

3. Material und Methoden

3.1 Patientenpopulationen

3.1.1 VLBW Frühgeborene

Bei der Untersuchungsgruppe handelt es sich um Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g (VLBW), die im Zeitraum von Januar 2000 bis Juli 2004 in der Charité, Campus Virchow Klinikum (CVK), sowie von Januar 2000 bis Mai 2002 in der Charité, Campus Mitte (CCM), geboren wurden. Dazu gehören auch VLBWs, die innerhalb der ersten 24 Stunden postnatal in eine der beiden Kliniken verlegt wurden. Das Patientenkollektiv besteht aus 522 VLBW Frühgeborenen: 402 Patienten aus dem CVK, 120 Patienten aus dem CCM.

Obwohl es sich beim Campus Virchow Klinikum und Campus Mitte um zwei voneinander unabhängige Kliniken handelt, wurden sie zur Datenanalyse mitunter als Gesamtpopulation zusammengefasst, da die gleichen Kriterien zur Definition einer Sepsis angewandt wurden (siehe 3.1.2.2).

Da die Ethnizität bei genetischen Untersuchungen von großer Bedeutung ist, wurden die Patienten des Virchow Klinikums nach deutscher und türkischer Herkunft getrennt betrachtet. Dabei waren Ethnizität und Nationalität der Mutter ausschlaggebend. Andere Ethnizitäten wurden aufgrund einer zu geringen Fallzahl außer Acht gelassen. Die Gesamtpopulation des Virchow Klinikums setzt sich zu 70,2% aus deutschen, zu 14,4% aus türkischen und zu 15,4% aus VLBW Frühgeborenen anderer Ethnizität zusammen.

Vom Patientenkollektiv der Charité, Campus Mitte, wurden keine Ethnizitäten dokumentiert. Der Ausländeranteil liegt nach Angabe ärztlicher Mitarbeiter bei > 20% (vorrangig Patienten asiatischer Ethnizität).

Das gesamte VLBW Frühgeborenenkollektiv setzte sich aus 254 (48,7%) weiblichen und 268 (51,3%) männlichen Kindern zusammen. Die Geschlechtsverteilung war im CVK und CCM prozentual ähnlich, in der türkischen Population des Virchow Klinikums lag sie mit 51,7% zugunsten des weiblichen Geschlechts (siehe Tab. 1). Die Unterschiede waren jeweils statistisch nicht signifikant.

Tabelle 1: Geschlecht

	CVK				CCM
	Deutsch	Türkisch	Andere	Insgesamt	Insgesamt
weiblich	138 (48,9%)	30 (51,7%)	28 (45,2%)	196 (48,8%)	58 (48,3%)
männlich	144 (51,1%)	28 (48,3%)	34 (54,8%)	206 (51,2%)	62 (51,7%)
Gesamt	282 (100%)	58 (100%)	62 (100%)	402 (100%)	120 (100%)

Im gesamten Patientenkollektiv gab es 364 (69,7%) Einlings-, 118 (22,6%) Zwillings-, 38 (7,3%) Drillings- und 2 (0,4%) Vierlingsgeburten. Zwischen dem Campus Virchow Klinikum und dem Campus Mitte waren die Unterschiede in der Verteilung statistisch nicht signifikant. Zwischen der deutschen und türkischen Population des CVK verhielt es sich anders. Die Anzahl der Drillings- und Vierlinge unterschied sich signifikant ($p=0,001$), siehe Tabelle 2.

Tabelle 2: Einlings-/ Mehrlingsgeburten

	CVK				CCM
	Deutsch	Türkisch	Andere	Insgesamt	Insgesamt
Einlinge	191 (67,7%)	42 (72,4%)	42 (67,7%)	275 (68,4%)	89 (74,2%)
Zwillinge	63 (22,4%)	14 (24,1%)	15 (24,2%)	92 (22,9%)	26 (21,6%)
Drillings	28 (9,9%)	0	5 (8,1%)	33 (8,2%)	5 (4,2%)
Vierlinge	0	2 (3,5%)	0	2 (0,5%)	0
Gesamt	282 (100%)	58 (100%)	62 (100%)	402 (100%)	120 (100%)

Das Gestationsalter entsprach im gesamten Patientenkollektiv sowie in den Subpopulationen einer Normalverteilung. In der Gesamtpopulation lag es zwischen 22,4 und 35,1 Schwangerschaftswochen: 25. Perzentile 26,4 SSW; Median 28,3 SSW; 75. Perzentile 30,2 SSW. In Abbildung 13 werden sowohl die beiden Kliniken CVK und CCM als auch die deutsche und türkische Population des CVK miteinander verglichen. Zwischen dem Campus Virchow Klinikum und Campus Mitte gab es signifikante Unterschiede ($p<0,0001$). Im CCM lag das Gestationsalter im Mittel 1,2 SSW über dem des CVK bei einem 95% Konfidenzintervall von 0,69 - 1,72. Zwischen deutschen und türkischen VLBWs fanden sich keine statistisch signifikanten Abweichungen.

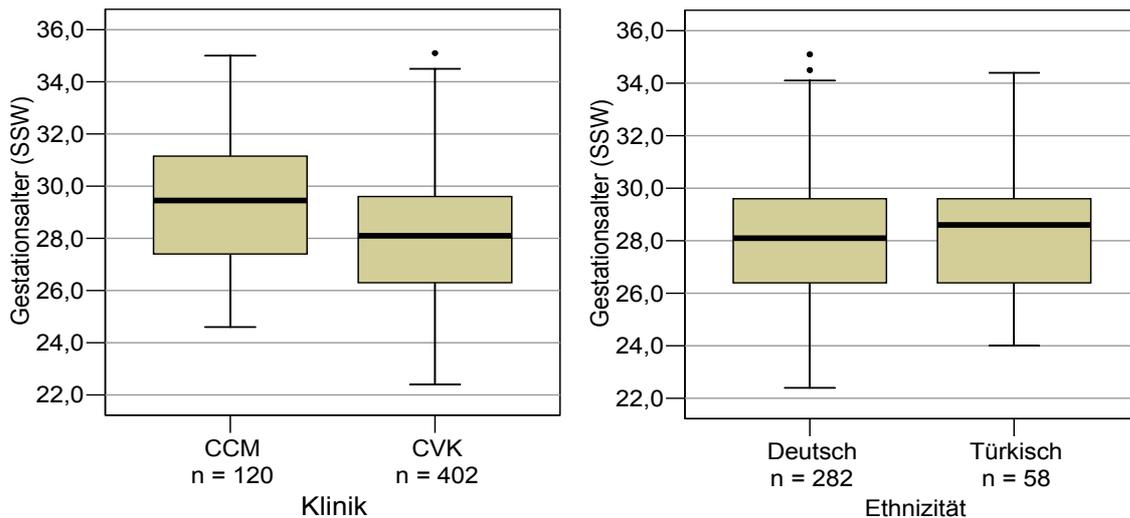


Abb.13: Gestationsalter der VLBW Frühgeborenen in SSW. Von unten nach oben: kleinster Datenwert, 25. Perzentile, Median, 75. Perzentile, größter erfasster Datenwert, Ausreißer (schwarze Punkte). Links: Vergleich Campus Mitte (Median 29,5 SSW) und Campus Virchow Klinikum (Median 28,1 SSW; 2 Ausreißer von 35,1 SSW). Rechts: Vergleich der deutschen (Median 28,1 SSW; 2 Ausreißer von 34,5 SSW; 2 Ausreißer von 35,1 SSW) und der türkischen (Median 28,6 SSW) Patientenpopulation des CVK

Auch das Geburtsgewicht entsprach einer Normalverteilung. Im gesamten Patientenkollektiv lag es zwischen 430 g und 1495 g: 25. Perzentile 835 g, Median 1075 g, 75. Perzentile 1286 g. Abbildung 14 vergleicht das Geburtsgewicht zwischen CVK und CCM sowie zwischen deutschen und türkischen VLBWs. Zwischen den beiden Kliniken gab es entsprechend dem Gestationsalter ebenfalls signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$). Das Geburtsgewicht war im CCM im Mittel um 96 g höher als im CVK (95% Konfidenzintervall 43 g – 149 g). Beim Vergleich deutscher und türkischer Kinder lag erwartungsgemäß keine Signifikanz vor.

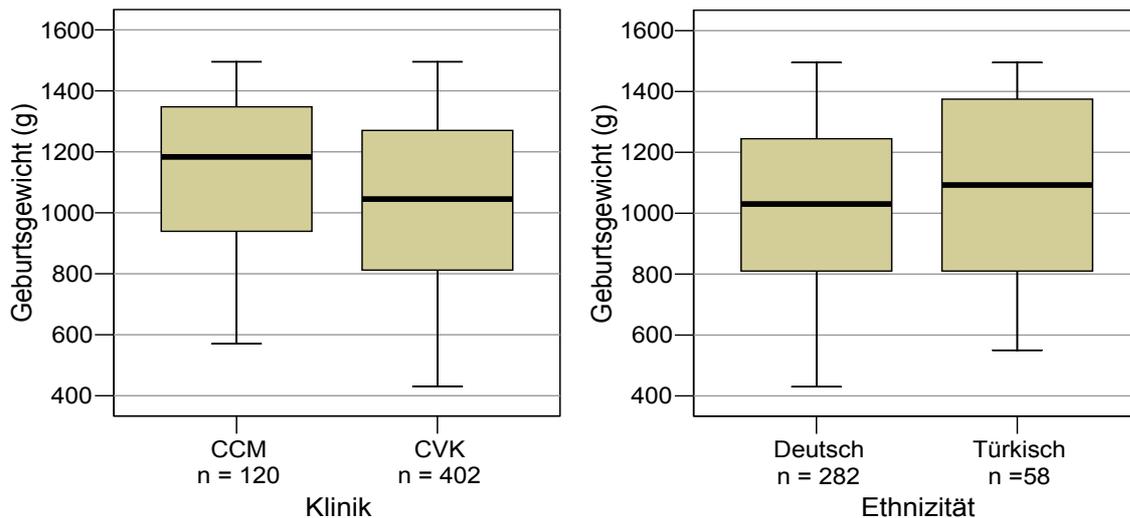


Abb.14: Geburtsgewicht der VLBW Frühgeborenen in Gramm. Von unten nach oben: kleinster Datenwert, 25. Perzentile, Median, 75. Perzentile, größter Datenwert. Links: Vergleich Campus Mitte (Median 1183g) und Campus Virchow Klinikum (Median 1045g). Rechts: Vergleich der deutschen (Median 1030g) und der türkischen (Median 1093g) Patientenpopulation des CVK

3.1.2 Datenanalyse

Die Daten dieser Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit dem Nationalen Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen (NRZ) mit Hilfe von NEO-KISS (Neonatales-Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System) ausgewertet. Bei NEO-KISS handelt es sich um ein Überwachungssystem im Rahmen des KISS-Projektes.

3.1.2.1 KISS

Das KISS-Projekt (Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System) beschäftigt sich mit der Sammlung von Daten über nosokomiale Infektionen in deutschen Krankenhäusern. Mit der Weiterentwicklung der modernen Medizin spielen nosokomiale Infektionen eine zunehmend große Rolle. Eine genaue Dokumentation und Auswertung von Daten solcher Infektionen kann zu einer relevanten Verringerung der Infektionen beitragen.^{42,87} Vor diesem Hintergrund hat das NRZ am Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Charité Berlin 1996 eine einheitliche Methode der Überwachung nosokomialer Infektionen entwickelt, das so genannte KISS-Projekt. Es dient der internen Qualitätssicherung und ermöglicht durch Bereitstellung von Referenzdaten einen Vergleich von Infektionshäufigkeiten verschiedener Krankenhäuser. KISS konzentriert sich auf spezielle Risikobereiche, um eine möglichst hohe Aussagekraft der Daten zu

erzielen. Neben NEO-KISS werden folgende Gruppen unterschieden: ITS-KISS (Patienten auf Intensivstationen), OP-KISS (operierte Patienten), ONKO-KISS (Patienten nach Knochenmarkstransplantation), AMBU-KISS (ambulant operierte Patienten), DEVICE-KISS (Patienten mit ZVK, Harnwegskathetern oder maschineller Beatmung), MRSA-KISS (Patienten mit Methicillin-resistentem *Staph. aureus*).⁸⁸

3.1.2.2 NEO-KISS

NEO-KISS hat spezifische Definitionen für Frühgeborene entworfen, die sich an den Definitionen des amerikanischen NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance) Systems der CDC (Center for Disease Control and Prevention) orientieren. Das NNIS System enthält spezielle Surveillance Komponenten für neonatologische Intensivstationen (NICUs). Da jedoch spezifische Definitionen für nosokomiale Infektionen bei Neonaten fehlen, wurden im NEO-KISS Protokoll eigene modifizierte Surveillance Methoden für Frühgeborene entwickelt. Damit sollen die besonderen physiologischen Umstände Neugeborener berücksichtigt werden.^{42,89}

Bei Frühgeborenen lässt sich eine besonders hohe Infektionsrate nachweisen. Sie steigt mit abnehmendem Gestationsalter und Geburtsgewicht. Am stärksten betroffen sind VLBW Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht < 1500 g. Daher beschränken sich die NEO-KISS Untersuchungen auf diese Patientengruppe. Die Surveillance der Patienten erfolgte bis zu einem Gewicht \geq 1800 g bzw. endete bei Verlegung, Entlassung oder Versterben des Kindes. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach Unterteilung in drei Gewichtsklassen (GG bis 499 g, GG 500 g - 999 g, GG 1000 g - 1499 g), da das Geburtsgewicht einen wesentlichen Faktor bei der Entwicklung nosokomialer Infektionen darstellt.⁴⁷

Es wurden Daten für Sepsis und Pneumonie dokumentiert, welche zu den häufigsten nosokomialen Infektionen zählen. Als dritte Gruppe wurde die NEC mit in das Surveillance Protokoll aufgenommen. Diese drei Krankheitsbilder wurden in der Auswertung betrachtet.

Die aufgestellten Kriterien zielen auf eine Objektivierung nosokomialer Infektionen. Die Differenzierung Device-assoziiertes Infektionen ist ebenfalls möglich. Der Schweregrad einer Infektion kann mit Hilfe von NEO-KISS nicht bestimmt werden.

Eine primäre Sepsis wird folgendermaßen unterteilt:

1. Klinische Sepsis (ohne Erregernachweis)
2. Sepsis mit Erregernachweis (außer KNS)
3. Sepsis durch KNS

Für die unterschiedlichen Formen der primären Sepsis gelten die folgenden, jeweils spezifischen Definitionen:⁴⁷

1) Klinische Sepsis (ohne Erregernachweis):

A) Alle <u>drei</u> Kriterien:	B) Und <u>zwei</u> der folgenden Kriterien:
1) antimikrobielle Therapie über mind. 5 Tage 2) kein Keimnachweis in der Blutkultur bzw. nicht getestet 3) keine offensichtliche Infektion an anderer Stelle	► Fieber (> 38 °C) oder instabile Temperatur (häufiges Nachstellen des Inkubators) oder Hypothermie (< 36,5 °C) ► Tachykardie (> 200/min) oder neu/vermehrte Bradykardie (< 80/min) ► Rekapillarierungszeit (RKZ) > 2 sec ► neu oder vermehrte Apnoe (> 20 sec) ► unerklärte metabolische Azidose (BE < -10 mval/l) ► neu aufgetretene Hyperglykämie (> 140 mg/dl) ► anderes Sepsiszeichen (Hautkolorit, wenn RKZ nicht verwendet), laborchemische Zeichen (CRP, Interleukin), erhöhter Sauerstoffbedarf (Intubation), instabiler AZ, Apathie

2) Sepsis mit Erregernachweis (außer KNS):

Gefordert wird der Erregernachweis aus Blut oder Liquor (nicht KNS), wobei der Erreger nicht mit einer Infektion an anderer Stelle verwandt sein darf. Zusätzlich kommen zwei Kriterien der klinischen Sepsis aus Spalte B hinzu.

3) Sepsis durch KNS:

Gefordert wird die Isolation von KNS aus Blut oder einem Gefäßkatheter und einer der folgenden Laborparameter:

- CRP > 2 mg/dl;
- I/T-Ratio > 0,2;
- Thrombozyten < 100/nl;
- Leukozyten < 5/nl

Zusätzlich werden zwei Kriterien der klinischen Sepsis aus Spalte B gefordert.

Die Diagnose einer Pneumonie erfordert folgende Befunde:⁴⁷

<u>Einer</u> der folgenden radiologischen Befunde:	Und <u>vier</u> der folgenden Kriterien:
<ul style="list-style-type: none"> ▶ neues oder progressives Infiltrat ▶ Verschattung ▶ Flüssigkeit im Lobär- oder Pleuraspalt 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ neu/vermehrte Tachykardie (> 200/min) oder Bradykardie (< 80/min) ▶ neu/vermehrte Tachypnoe (> 60/min) oder neu/vermehrte Apnoe (> 20 sec) ▶ eitriges Trachealsekret ▶ Keim aus Trachealsekret ▶ neu/vermehrte Dyspnoe (Einziehungen, Nasenflügeln, Stöhnen) ▶ Temperaturinstabilität/Fieber/Hypothermie ▶ vermehrte respiratorische Sekretion (vermehrtes Absaugen) ▶ CRP > 2,0 mg/dl ▶ I/T-Ratio > 0,2
Und: Verschlechterung des Gasaustausches, Sättigungsabfall	

Für die Diagnose einer NEC gilt folgendes:⁴⁷

<u>Eines</u> der folgenden radiologischen Zeichen:	Und <u>zwei</u> der folgenden Kriterien (ohne andere Ursache):
<ul style="list-style-type: none"> ▶ Pneumoperitoneum ▶ Pneumatosis intestinalis ▶ unverändert stehende Dünndarmschlingen 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Erbrechen ▶ Nahrungs- („Magen-„) Reste ▶ geblähter Bauch ▶ Flankenrötung ▶ wiederholt mikroskopisch (Haemocult) oder makroskopisch Blut im Stuhl
Oder: Diagnose durch histologische Untersuchung des OP-Präparates (allein ausreichend)	

Diese Definitionen sind ausschließlich für die Erfassung der oben beschriebenen Infektionen für das Surveillance Protokoll zu verwenden. Sie finden keine Anwendung zur Behandlung von Patienten in der Klinik. Demnach kann z.B. eine Infektion, die klinisch diagnostiziert und behandelt wird, nach den NEO-KISS Definitionen nicht in das Protokoll aufgenommen werden, wenn die Kriterien nur ungenügend erfüllt sind.⁴⁷

Bei allen Erkrankungen muss beachtet werden, dass Symptome frühestens 72 Stunden nach der Geburt bzw. nach Krankenhausaufnahme auftreten dürfen und dass für die Diagnose neuer Infektionen ein symptomfreies Intervall vorgelegen haben muss. Des Weiteren berechtigt ein Erregerwechsel allein nicht dazu, eine neue Infektion zu diagnostizieren.⁴⁷

Für jeden an der NEO-KISS Studie teilnehmenden Patienten werden Patientenverlaufsbögen, Patientenbögen zur Surveillance und Infektionserfassungsbögen erstellt (siehe Anhang 1-3).⁴⁷

Die Kriterien für die Definitionen des NEO-KISS Protokolls wurden in den Jahren 1994/95 in einer 10-monatigen Studie, die in der Abteilung für Neonatalogie im Virchow Klinikum der Charité durchgeführt wurde, angewendet. Anhand der Ergebnisse wurden die Definitionen modifiziert.^{42,89}

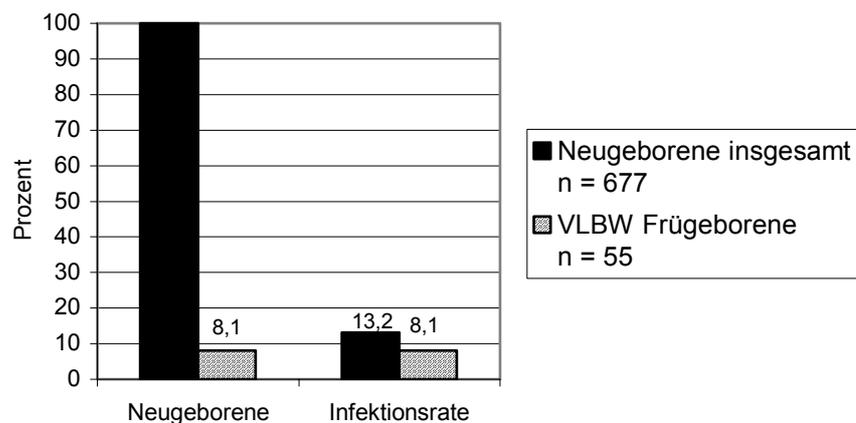


Abb. 15: Infektionsrate bei Neugeborenen, insbesondere bei VLBW Frühgeborenen^{42,89}

Seit dem Pilotprojekt 1994/95 hat sich das Surveillance System stetig weiterentwickelt und wurde deutschlandweit ausgedehnt. Erst im Verlauf der Surveillance wurde die Geburtsgewichtsklasse < 500 g eingeführt, da ein Anstieg der Anzahl der Patienten in dieser Gewichtsklasse zu verzeichnen war. Ein besonderer Schwerpunkt wurde auf Katheter-assoziierte Sepsitiden und Beatmungs-assoziierte Pneumonien gelegt. Patiententage, Antibiotikage und Devices-Tage eines jeden Patienten wurden dokumentiert und zur Berechnung von Infektionsraten herangezogen.⁴²

Ende 2002 nahmen bereits 33 Krankenhausabteilungen mit 66 NICUs am NEO-KISS Projekt teil.⁴² Seit dem Jahr 2006 sind alle Perinatalzentren Deutschlands gesetzlich zu einer Teilnahme verpflichtet. Momentan wird das Surveillance System schrittweise in den einzelnen Perinatalzentren eingeführt.

Die jetzige Studie wurde durch die Ethikkommission (Charité) begutachtet und bewilligt. Das schriftliche Einverständnis der Eltern liegt vor.

3.2 Materialien

3.2.1 Geräte

Wasserbad	GFL 1086, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge	Varifuge RF, Heraeus Sepatech, Hanau Centrifuge 5415D, Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	Eppendorf Multipipette plus, Eppendorf AG, Hamburg 3,5ml Transferpipette, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht Eppendorf Research Pipetten 0,5-10µl; 10-100µl; 100-1000µl, Eppendorf AG, Hamburg Multichannel Finnpipette 5-50µl, Thermo Labsystems, Egelsbach Finnpipette 40-200µl Thermo Labsystems, Egelsbach
PCR-Maschinen	Tpersonal, Biometra GmbH, Göttingen T3 Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen
Vortexer	Minishaker MS1, IKA-Works Inc., Wilmington, NC, U.S.A
LightCycler	LightCycler II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Kapillarzentrifuge	LC Carousel Centrifuge, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler Software	Version 3.5, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PC	Vectra, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn
Drucker	Deskjet 970CXI, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn
Bildschirm	P1110, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

DNA-Extraktionskit	QIAamp DNA Midi Kit, Qiagen GmbH, Hilden
Konische Polystyrolröhrchen	Falcon 15ml u. 50ml, Becton Dickinson Labware, Meylan Cedex, Frankreich
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Microcentrifuge Tubes 1,5ml, Eppendorf AG, Hamburg Qiagen Collection Tubes 15ml, Qiagen GmbH, Hilden Tubes 4ml 75x11,5mm, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen	Combitips plus 2,5ml u. 10ml, Eppendorf AG, Hamburg Eurotips in Racks 100µl u. 1000µl, Eppendorf AG, Hamburg 10µ, 100µl, 1000µl, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Mikrotiterplatten	96-well Format, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Handschuhe	SatinPlus Exam Gloves, Safeskin GmbH, Neufahrn Nitrile Exam Gloves, Safeskin GmbH, Neufahrn
PCR-Reaktionsgefäße	CR Tubes ultradünn 0,2ml Strips a 8 Tubes u. Caps, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf Multiply-Pro Cap 0,2ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Parafilm	American National Can, Menaska, WI, U.S.A

Mikrotiterplatte
LightCycler Kapillaren

Nunc, Roskilde, Dänemark
Capillaries, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

3.2.3 Reagenzien und Chemikalien

Ethanol, absolut (100%) Merck KgaA, Darmstadt
Steriles Wasser Aqua ad injectabile, Braun, Melsungen
PCR-Öl Bayol F, Serva, Heidelberg

3.2.4 Enzyme und Pufferlösungen

Taq-Polymerase 5U/μl, AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, Roche, Branchburg, New Jersey, U.S.A.
PCR-Puffer 10x PCR buffer (+15mM MgCl₂), Applied Biosystems, Roche, Branchburg, New Jersey, U.S.A.
dNTPs NTPs, je 2,5mM, Applied Biosystems, Roche, Branchburg, New Jersey, U.S.A.

3.2.5 Primer und Sonden

PCR-Primer 10μM, TIBMOLBIOL, Berlin
Sonden 5μM, TIBMOLBIOL, Berlin

3.3 Methoden

3.3.1 Gewinnung der DNA

Erstscreening Zweitscreening Kontrolle bei erhöhtem Wert

Einsender mit Telefonnummer:

Name d. Kindes: [redacted]

Vorname: [handwritten: st] männl. weibl.

Mehrling?

Nationalität, wenn nicht deutsch:

Geburtsdatum: Tag [redacted] Monat [redacted] Jahr [redacted] Uhrzeit [redacted] o.24

Gestationsalter: SSW

Ernährungsstörung?

Probennahme: Tag [16] Monat [05] Jahr [07] Uhrzeit [10:00] o.24

Adresse der Mutter mit Telefonnummer:

[redacted]

Virchow-Klinikum
Medizinische Fakultät der
Humboldt-Universität zu Berlin
Augustenburger Platz 1
13353 Berlin
Endokrinologisches Labor, Telefon 4 50-6 66 78
Screening Labor, Telefon 4 50-6 67 98

Durchfrähen Sie alle Kreise gleichmäßig und vollständig mit je einem Blutstropfen. Tropfen darf größer, nicht kleiner als Kreis sein, auch Rückseite muß ganz durchfräht sein.

Die DNA wurde aus getrockneten Blutproben von Guthrie-Kärtchen gewonnen, die einem Stoffwechsel-screening im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung U2 dienen (siehe Abb. 16).

Jedem Neugeborenen wird zu diesem Zweck zwischen dem 3. und 10. Lebenstag Blut abgenommen. Bei Frühgeborenen wird nach ungefähr vier Wochen ein zweites Screening durchgeführt. Kinder, die vor dem dritten Lebenstag verstorben sind, konnten nicht in die Analysen eingeschlossen werden, da in der Regel kein Stoffwechselscreening von ihnen vorgelegen hat.

Abb. 16: Guthrie-Kärtchen

Für die Gewinnung der DNA aus getrocknetem Vollblut wurden ein bis zwei Blutpunkte aus den Screening-Kärtchen herausgeschnitten, was einer Vollblutmenge von ungefähr 100 µl entspricht. Die Blutmenge der verwendeten Proben war in jedem Fall für die anschließende Weiterverarbeitung ausreichend. Um das getrocknete Blut zu lösen, wurden die Papierpunkte bei Raumtemperatur über 24 Stunden in einem Eppendorfgefäß mit jeweils 400 µl sterilem Aqua dest. eingeweicht.

3.3.2 DNA Extraktion

Zur Aufreinigung der DNA wurde der QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen verwendet. Nach dem Aufweichen des Vollblutes aus den Papierpunkten wurden die Proben mit 400 µl Lysis-Puffer und 40 µl QIAGEN Protease gründlich durchmischt. Je nach Lösungszustand der Proben wurden diese dann für 1 bis 2 Stunden in einem Wärmebad bei 60 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit 400 µl reinem Ethanol gemischt und kurz zentrifugiert, danach auf eine QIAamp-Säule überführt und für 1 Minute bei 5000 rpm zentrifugiert. Aufgrund der großen Lysat-Menge wurde der Vorgang wiederholt. Das Filtrat wurde jeweils verworfen, die Säule mit 500 µl Waschpuffer AW1 beladen und für 3 Minuten zentrifugiert. Es folgte ein zweiter Waschschrift mit 500 µl Waschpuffer AW2 und erneuter Zentrifugation über 3 Minuten. Das Filtrat wurde nach beiden Vorgängen verworfen. Anschließend folgte die Elution der DNA mittels 2 x 50 µl Elutionspuffer und einer Einwirkungszeit von je 10 Minuten. Um eine möglichst effektive Elution zu erreichen, wurden die 100 µl Eluat nach dem Zentrifugieren erneut auf die Säule aufgetragen und für eine weitere Minute inkubiert.

Die gewonnene Lösung enthielt DNA-Mengen von jeweils 8 - 30 ng/µl. Das entspricht einer Gesamtmenge von 0,8 - 3 µg genomischer DNA. Die extrahierte Lösung von ca. 100 µl wurde in Eppendorfgefäße überführt und kurzzeitig bei -4 °C und langfristig bei -20 °C gelagert.

3.3.3 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion stellt eine Technik zur Vervielfachung spezifischer DNA Abschnitte dar. Sie wird als Standardmethode zur Amplifizierung kleinster DNA Mengen verwendet.

Die PCR wurde mit Hilfe des Thermocyclers Tpersonal der Firma Biometra durchgeführt. Es wurden folgende Primer benutzt:

MBL2 F: 5'-CTCTgCCAgggCCAACgTAg-3'

MBL2 R: 5'-CTCCTCATATCCCCAggCAg-3'

Der Einmalansatz setzte sich wie folgt zusammen:

	Konzentration der Stocklösung	Volumen
H ₂ O	Aqua dest. 19,4 µl	19,4 µl
Puffer	10x-konzentriert	2,50 µl
MgCl ₂	15 mM	1,50 µl
dNTP	je 2,5 mM	1,00 µl
Primer-F <i>MBL2</i>	10 mM	0,25 µl
Primer-R <i>MBL2</i>	10 mM	0,25 µl
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	0,10 µl
DNA	2 µl luftgetrocknet	
Gesamtvolumen		25,0 µl

Die PCR wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt:

- Initiale Denaturierung bei 95 °C für 12 min.

Ein Zyklus bestand aus drei Schritten:

- Denaturierung bei 95 °C für 20 sec.
- Annealing bei 56 °C für 40 sec.
- Elongation bei 72 °C für 2 min.

Die Zyklenzahl betrug 50.

3.3.4 Schmelzkurvenanalyse (LightCycler-Technik)

Mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse kann man den Austausch von Einzelbasen feststellen und somit Polymorphismen in Genen nachweisen. Sie wird mit Hilfe eines LightCyclers durchgeführt.

Der LightCycler besteht aus zwei funktionellen Komponenten: der Thermocycler-Einheit und der Fluoreszenz-Messeinheit. Die Reaktion findet in 32 Glaskapillaren statt, die bis zu 20 µl Flüssigkeit fassen. In den Glaskapillaren wird mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Oligonukleotid-Proben die Fluoreszenz gemessen. Eine Hochleistungsleuchtdiode

(LED) emittiert blaues Licht, das nach Passage eines Filters und eines Kollimators die Proben mit einer Wellenlänge von 470 nm anregt. Drei unabhängige Photoelemente können Licht der Wellenlängen 530 nm, 640 nm und 710 nm gleichzeitig detektieren.

Um eine Punktmutation nachzuweisen, werden zwei Oligonukleotid-Sonden eingesetzt. Die erste Sonde dient als so genannter „Sensor“ und ist am 3' Ende mit Fluoreszin markiert. Die zweite Sonde, der „Anchor“, ist am 5' Ende entweder mit dem Farbstoff LightCyclerRed-640 oder LightCyclerRed-705 gekoppelt.

Binden die beiden Sonden an den Zielabschnitt der genomischen DNA, liegen die Farbstoffe in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander. Wird der „Sensor“-Farbstoff durch die Bestrahlung mit der Leuchtdiode angeregt, kann er die aufgenommene Energie an den „Anchor“-Farbstoff weitergeben, welcher dadurch selbst zur Emission von Licht einer anderen Wellenlänge angeregt wird. Diese Wellenlänge wird vom LightCycler detektiert. Der Vorgang der Energieübertragung wird auch Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) genannt und tritt nur auf, wenn beide Sonden an ihre Zielsequenz binden und die Farbstoffe Kopf-an-Kopf zu liegen kommen (Abb. 17).

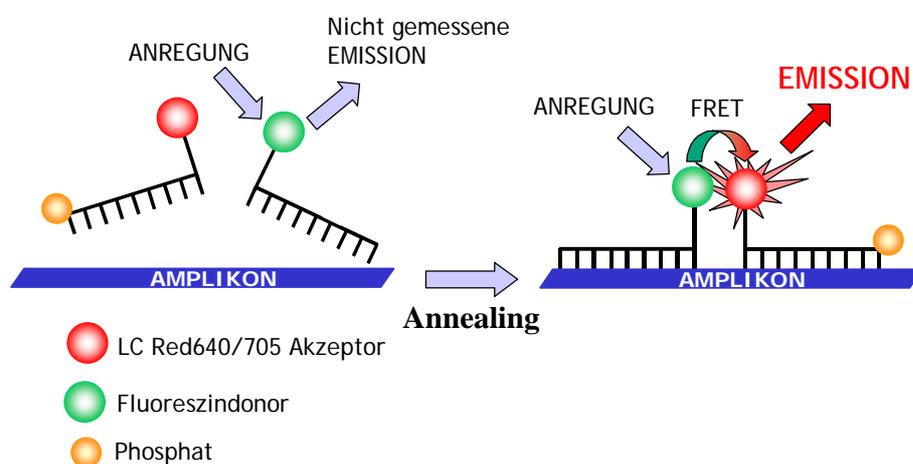


Abb. 17: Prinzip des FRET (nach LightCycler-Manual, Roche): Hybridisierung der Sonden mit der Zielsequenz und Anregung

Das Thermoelement des LightCyclers erhöht die Temperatur nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C und anschließender Abkühlung auf 45 °C schrittweise. Mit Hilfe der zeitgleich gemessenen Fluoreszenz wird eine Schmelzkurve

aufgezeichnet. Die Intensität der Fluoreszenz nimmt proportional zur Ablösung der Sonden von der zu untersuchenden DNA ab. Bereits eine einzige nicht komplementäre Base in der Zielsequenz, also eine Punktmutation, führt zu einer Destabilisierung der DNA-Sonden-Duplex und damit zu einer um einige Grad Celsius verschobene Schmelzkurve (Abb. 18).

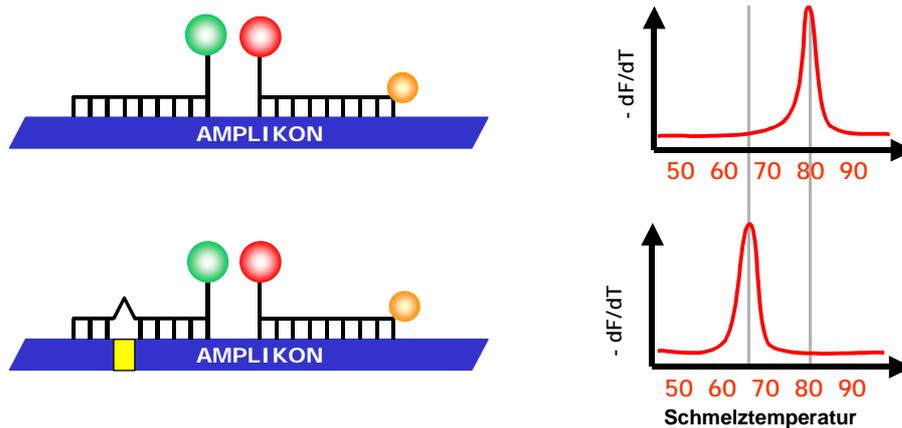


Abb. 18: Prinzip der Mutationsanalyse (nach LightCycler-Manual, Roche)

3.3.4.1 Schmelzkurvenanalyse für *MBL2*

Die Schmelzkurvenanalyse wurde mit Hilfe des LightCycler Systems von Roche Diagnostics (Mannheim) durchgeführt. Für die Analyse der SNPs im Exon 1 von *MBL2* wurden Mutations-spezifische Sonden verwendet. Dabei besteht eine hohe Stabilität zwischen Sonde und mutiertem Allel, was in einer hohen Schmelzkurve resultiert. Durch die „fehlerhafte“ Anlagerung einer Base an das Amplikon wird das DNA-Sonden-Hybrid instabiler. Seine Schmelztemperatur verringert sich dadurch um einige Grad.

Abbildung 19 zeigt eine solche Schmelzkurvenanalyse. Es war möglich, alle drei SNPs im *MBL2* Exon 1 in nur einem Assay auszuwerten. Für die Genotypisierung wurden folgende Oligonukleotid-Sonden eingesetzt:

G57E

Sensor: LC640-TCTTCCTTggTgCCATCACgCCCA-ph

ph = Phosphat

Anchor: 5'-CAgCCCAACACgTACCTggTTCCCCCT-FL

FL = 5,6-Carboxy-Fluoreszein

LightCycler Sondenansatz:

	Volumen
Aqua ad inj.	6,55 µl
Sensor FL	0,20 µl
Anchor LC	0,25 µl
Gesamtvolumen	7,00 µl

Zu je 5 µl des PCR-Produktes wurden 2 µl Sondenmix gegeben, in der Kapillare gemischt und für 30 Sekunden bei 3000 rpm abzentrifugiert.

Der „Sensor“ war komplementär zur Mutations-Sequence in Kodon 57 (G57E). Für die Polymorphismen im Kodon 52 und 54 sowie den *MBL2* Wildtyp ergaben sich dadurch tiefere, allelspezifische Schmelzkurven und -punkte.

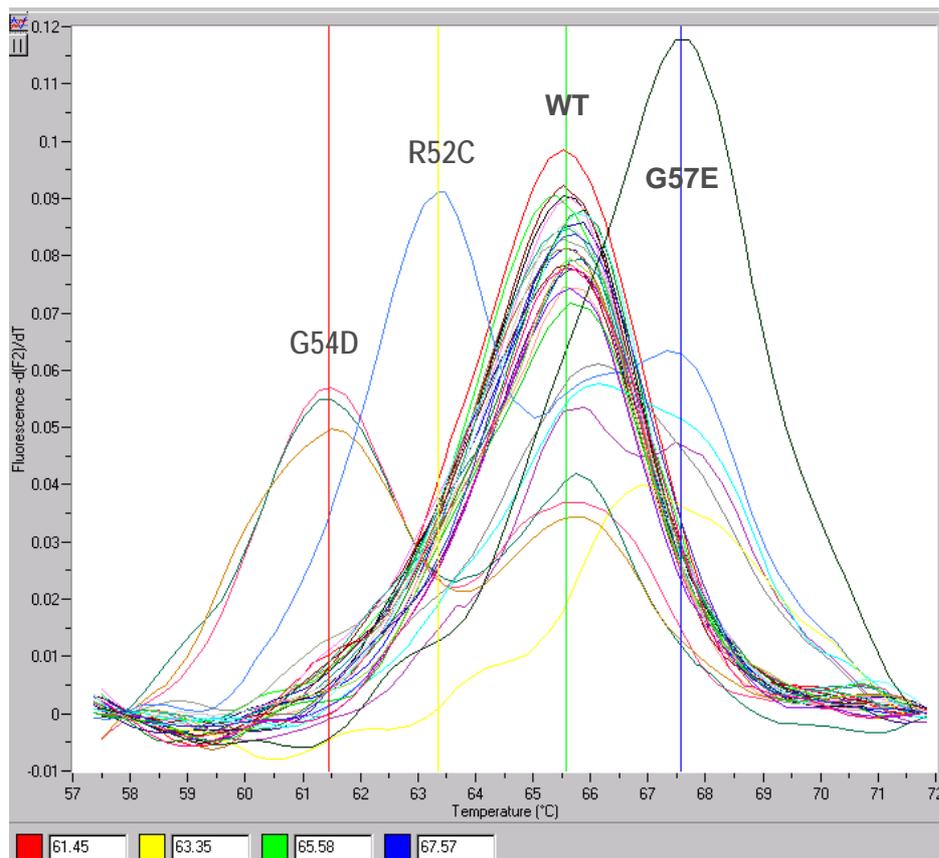


Abb. 19: Kurvenbeispiel einer Schmelzkurvenanalyse für die drei Varianten im Exon 1 des *MBL2* Gens: SNPs verändern die Hybridisierung mit der Sonde und führen zu verschobenen Schmelzkurven. Es gibt vier allelspezifische Temperaturpeaks, an denen sich die Sonde löst: 61,45 °C G54D, 63,35 °C R52C, 65,6 °C Wildtyp und 67,6 °C G57E. Heterozygote und compound heterozygote Varianten haben zwei Temperaturspitzen.

3.3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Office Excel, Epi Info (Version 3.3.2) und SPSS 12.0 für Windows. Bei Kindern, die an mehr als einer Sepsisepisode erkrankt waren, basieren die Angaben auf der ersten Sepsisepisode.

Häufigkeiten wurden mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson verglichen und bei Einzelvergleichen wurde $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Beim Vergleich von Häufigkeiten mehrerer Kategorien wurden diese zunächst mit dem Chi-Quadrat-Test verglichen. Bei Signifikanz wurde ein Vergleich der Häufigkeiten der einzelnen Kategorien durchgeführt. Aufgrund des multiplen Testens bei den Einzelvergleichen wurde das Signifikanzniveau nach Bonferroni korrigiert.

Zum Vergleich von metrischen Variablen in zwei unabhängigen Stichproben wurde der T-Test angewendet, da Normalverteilung vorlag. Das Konfidenzintervall wurde mit 95% festgesetzt. Signifikanz lag vor, wenn $p < 0,05$ war.