

MAGICS (Multicentre Asthma Genetics in Childhood Study)

Studienprotokoll

Stand 4.3.2003

Einleitung

Allergische Erkrankungen entstehen durch das Zusammentreffen von mehreren Komponenten und Auslösern. Es handelt sich um genetisch komplexe, multifaktorielle Erkrankungen, die sehr häufig in der Bevölkerung vorkommen. Von Asthma bronchiale alleine sind in Deutschland über 10% der Kinder betroffen.

Trotz dieses häufigen Auftretens der Erkrankung und trotz intensiver Forschungsbemühungen ist es noch nicht gelungen, die Ursachen von Asthma bronchiale zu identifizieren. Die Schwierigkeit besteht unter anderem darin, dass sowohl bestimmte Umweltfaktoren wie auch eine genetische Disposition eine wichtige Rolle für die Krankheitsentstehung zu spielen scheinen. Nach dem momentanen Stand des Wissens wird davon ausgegangen, dass eine Reihe von Genveränderungen in verschiedenen Genen des Immunsystems vorliegen muss, um eine Person für die Entstehung von allergischen Erkrankungen empfänglich zu machen. Sind Personen mit dieser genetischen Disposition in der Kindheit dann auch noch bestimmten Umweltfaktoren ausgesetzt, kann es zum Auftreten von allergischen Erkrankungen kommen.

Da die Entstehung von allergischen Erkrankungen und Asthma von mehreren Genen und einer Vielzahl von Umweltfaktoren beeinflusst wird, ist es wichtig, die Interaktion von genetischen Faktoren mit Umwelteinflüssen gemeinsam zu untersuchen. Dies ist nur in einem großen Kollektiv von Kindern mit Asthma möglich, um auch nach der Unterteilung in Untergruppen (z.B. nach verschiedenen Auslösern der Erkrankung oder nach bestimmten Genkonstellationen) noch aussagekräftige Ergebnisse liefern zu können. Aus diesem Grund wurde im Rahmen des vom BMBF geförderten deutschen Nationalen Genom Forschungs-Netzwerks (NGFN) diese bundesweite multizentrische Studie zum Thema „umweltbedingte genetische Erkrankungen“ initiiert. Die Untersuchungen zum Thema „kindliches Asthma“ werden in München koordiniert und in den Kinderkliniken von München, Wesel, Köln, Berlin, Bochum, Freiburg und Wien durchgeführt.

Das Ziel dieses Projekts ist die Identifizierung von genetischen Veränderungen in funktionell wichtigen Genen, die zur Entstehung von allergischen Erkrankungen und Asthma bronchiale im Kindesalter beitragen. Die gemeinsame Analyse von genetischen Veränderungen und Umwelteinflüssen soll zu einem umfassenden Verständnis der Rolle von Gen- Umweltinteraktionen bei der Entstehung von allergischen Erkrankungen führen. Dieser Wissenszuwachs soll zur Aufklärung der Pathomechanismen beitragen, die zur Entstehung von Asthma und Allergie führen. Langfristig kann dies der Verbesserung von Diagnose und Therapie allergischer Erkrankungen des Kindesalters dienen.

Studienpopulation und Studienorte

Das Studiendesign (Population based case-control) sieht vor, 1200 Kinder, die als ambulante Patienten in Allergie- und Asthma-Ambulanzen behandelt werden, in die Studie einzuschließen. Die beteiligten Kliniken sind:

1. Dr.v.Haunersche Kinderklinik in München
2. Marienhospital in Wesel
3. Universitäts-Kinderklinik in Köln
4. Kinderklinik der Charite in Berlin
5. Universitäts-Kinderklinik in Wien
6. Uni-Klinik Bochum
7. Asthmazentrum Freiburg

In allen beteiligten Zentren werden äquivalente Kontrollgruppen gebildet, die aus Patienten rekrutiert werden, die aus anderen Gründen die beteiligten Kinderkrankenhäuser aufsuchen und bei denen aus routinemedizinischen Gründen eine Blutabnahme durchgeführt werden muss.

Die angestrebte Mindestgröße der Studienpopulation liegt bei 2400 Teilnehmern. Dies ergibt eine Power von >85% mit einem $p < 0,05$, um in Subgruppenanalysen den kombinierten Effekt von 2 genetischen Haplotypen und 2 unabhängigen Umwelteffekten analysieren zu können, wenn dieser Effekt eine Prävalenzänderung von mehr als 7% bewirkt.

Einschlusskriterien für Fälle:

- Ambulanzpatienten der Asthma- und Allergieambulanz im Alter von 6-14 Jahren (Alter zum Zeitpunkt der Rekrutierung);
- In München und Umland zusätzlich Asthma-Patienten, die in Kinderarztpraxen niedergelassener Kollegen (mit Schwerpunkt Asthmatherapie) betreut werden
- Diagnose Asthma bronchiale von erfahrenem Ambulanzzarzt (in Pulmologie-/ Asthma-Ambulanz) gestellt;
- vorliegendes Einverständnis, an der Studie teilzunehmen;
- beide Eltern entweder deutscher, österreichischer oder türkischer Nationalität.

Einschlusskriterien für Kontrollen (frequency matched für Geschlecht):

- Klinikpatienten im Alter von 6-14 Jahren
- geplante routinemäßige Blutabnahme
- vorliegendes Einverständnis, an der Studie teilzunehmen
- beide Eltern entweder deutscher, österreichischer oder türkischer Nationalität

Ausschlusskriterien für Kontrollen:

- Diagnose Asthma bronchiale oder spastische, obstruktive oder asthmatische Bronchitis gestellt
- jemals Giemen
- Zustand nach stationär behandelter Bronchiolitis (RSV-Infektion)
- chronischer Husten
- Heuschnupfen, atopische Dermatitis
- positive Familienanamnese für Asthma bei Eltern oder Geschwistern

Studienablauf (München)

(Abweichungen im Ablauf der Rekrutierung und den Klinikbesuchen in den verschiedenen Studienorten sind möglich, s. geplanter Studienablauf Wesel, Wien, Köln, Berlin)

Kontaktaufnahme/Aufklärung

Die Kontaktaufnahme erfolgt durch das Studienteam im Rahmen eines Routine-Ambulanzbesuchs nach Rücksprache und Zustimmung der verantwortlichen Ambulanz- und Stationsärzte.

Alle Eltern der für die Studie in Frage kommenden Kinder (Fälle und Kontrollen) erhalten nach einem Aufklärungsgespräch eine schriftliche Information zur Studie mit Einverständniserklärung.

Für Rückfragen sollte im Informationsschreiben ein Ansprechpartner (mit Telefonnummer) angegeben werden.

Asthma-/Allergiepatienten

2-3 Wochen nach dem ersten Gespräch erfolgt eine telefonische Kontaktaufnahme mit den Eltern, um die Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie abzuklären und in der Zwischenzeit aufgetretene Fragen zu beantworten.

Für die Studienteilnehmer aus der Asthma- und Allergieambulanz wird ein Termin vereinbart (bzw. der Routine-Ambulanztermin bestätigt) an dem, schriftliches Einverständnis vorausgesetzt, eine Blutentnahme durchgeführt werden soll.

Ca eine Woche vor diesem vereinbarten Termin wird der Fragebogen und ein Einladungsschreiben an die Studienteilnehmer geschickt, mit der Bitte, den Fragebogen und die Einverständniserklärung(-en) ausgefüllt zum Termin mitzubringen.

Patienten der Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe besteht aus Patienten der Kliniken (ambulant und stationär), bei denen aus routinemedizinischen Gründen eine Blutabnahme vorgesehen ist.

Wenn sich die Eltern der in Frage kommenden Kinder zur Teilnahme an der Studie (Ausfüllen des Fragebogens und Erweiterung der Routine-Blutabnahme um 15 ml Blut beim Kind) bereit erklären, wird zuerst eine Einverständniserklärung für die erweiterte Blutentnahme und die allergologischen Blutuntersuchungen benötigt.

Das Einverständnis zur genetischen Untersuchung kann nachgereicht werden, da vom organisatorischen Ablauf her nicht immer ausreichend Bedenkzeit zwischen Information zur Studie mit Einverständnis und der geplanten Blutentnahme zur Verfügung stehen wird.

Die Eltern der Kinder aus der Kontrollgruppe werden gebeten, den Fragebogen baldmöglichst auszufüllen.

Bei stationär behandelten Kindern wird der Fragebogen vom Studienteam zum vereinbarten Zeitpunkt abgeholt und, falls nötig, mit den Eltern zusammen ergänzt.

Bei ambulant behandelten Kindern wird der ausgefüllte Fragebogen zusammen mit dem Einverständnis für den Genetik-Teil zurückgesandt (frankiertes Rückkuvert mitgeben!).

Die wichtigsten Daten des Patienten wie Geschlecht, Geburtsdatum, Grund des Klinikbesuchs (ambulant/stationär) werden auf einem mit ID-Nr. gekennzeichneten Dokumentationsbogen festgehalten (s. Doku-Bogen für Kontrollen).

Fragebogen

Der Fragebogen beinhaltet Fragen zur Gesundheit des Kindes bezüglich Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege und der Haut, sowie Fragen zur Erfassung allergischer Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen in der Familie. Weiter folgen Fragen zur Lebens- und Wohnsituation der Familien.

Es werden für alle Altersklassen die gleichen Fragebögen verwendet, da sich der Inhalt der Fragebögen durch das Alter der Kinder nicht verändert.

Blutentnahme (Kontrolle)

Bei den Kontrollkindern, die aus studienunabhängigen Gründen die beteiligten Kinderkrankenhäuser aufgesucht haben, und bei denen aus studienunabhängigen, routinemedizinischen Gründen eine Blutabnahme durchgeführt werden muss, wird bei dieser routinemedizinischen Blutentnahme das Blut (10ml EDTA-Blut und 5 ml Serum) für diese Studie mit abgenommen, sofern ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie schriftlich vorliegt. Es muss kein weiterer Termin für einen Klinikbesuch aus Studiengründen vereinbart werden.

Benötigtes Material: 2 EDTA-Blut Röhrchen: 1. à 1ml (für Diff.-Blutbild)
2. à 9ml oder 2x à 4,7ml (für Genetik)

1 Serum-Röhrchen à 5ml (für Allergiediagnostik)

(in München: 1 Li-Heparin-Röhrchen zur Bestimmung des Gesamt IgE)

Die Aufbereitung und Weiterverarbeitung des Blutes erfolgt wie in der Patientengruppe (s. Abschnitt Blutentnahme (Patienten der Asthma- und Allergieambulanz) f.) möglichst am Tag der Blutentnahme.

Es findet keine DNA-Extraktion vor Vorliegen der Einverständniserklärung für den Genetik-Teil statt!

Klinikbesuch (Patienten der Asthma- und Allergieambulanz)

Die wichtigsten Daten des Patienten wie Geschlecht, Geburtsdatum, Medikamenteneinnahme, bronchialer Hyperreaktivität werden auf einem mit ID-Nr. gekennzeichneten Dokumentationsbogen festgehalten (s. Doku-Bogen-Asthma).

Die **Angaben zur Medikamenteneinnahme** in den letzten 3 bzw. 12 Monaten sollen einerseits aus der Krankenakte dokumentiert werden und andererseits beim Klinikbesuch bei Eltern und Kind abgefragt werden, da die tatsächlich eingenommene Medikation in vielen Fällen von der verordneten abweicht. Es ist wichtig, die Tagesdosis bei der Dauermedikation und Änderungen in der Medikation unter Angabe von Monat/Jahr zu erfassen. Es sollte entweder Wirkstoff oder Handelsname im Bogen dokumentiert werden.

Bei Kindern mit **Neurodermitis/ atopischem Ekzem** soll eine Dokumentation anhand des SCORAD-Schemas erfolgen. (Anlage SCORAD-Dokumentation mit ID-Nr.)

Für die Studie wird keine Lungenfunktions-Untersuchung oder Provokationstestung durchgeführt, sondern es wird aus der Patienten-Akte dokumentiert, ob jemals eine **Testung der bronchialen Hyperreaktivität** durchgeführt wurde. Es wird die Methode des Belastungstests (siehe Anhang 2: Standard-Methoden zur Durchführung einer Testung der BHR der einzelnen Studienzentren) dokumentiert, ebenso ob eine negative oder eine positive Response vorlag. Bei positiver Response soll ebenfalls erfasst werden, ob der Patient in der Zeit vor dem Belastungstest unter Behandlung mit inhalativen Steroiden stand.

Blutentnahme

Bei den Patienten der Asthma- und Allergieambulanz wird, schriftliches Einverständnis vorausgesetzt, bei einer venösen Blutentnahme 5ml Serum-Blut (für Allergologie) und ca. 10ml EDTA-Blut (1ml für Blutbild und ca. 9ml für die DNA-Aufbereitung) abgenommen.

Benötigtes Material: 2 EDTA-Blutröhrchen: 1. à 1ml (für Diff.-Blutbild)
2. à 9ml oder 2x à 4,7ml (für Genetik)

1 Serum-Röhrchen à 5ml (für Allergiediagnostik)

(in München: 1 Li-Heparin-Röhrchen zur Bestimmung des Gesamt IgE)

Aus den entnommenen Blutproben werden in den einzelnen Kliniken (München, Wien) das Gesamt-IgE und das spezifische IgE gegen folgende Allergene bestimmt: Dermat.pter., Dermat.farinae, Katze, Gräser, Birke (und optional Milch und Ei).

(RAST-Analyse für Wesel wird in München durchgeführt)

Zusätzlich wird die Eosinophilenzahl im peripheren Blut gemessen, um einen Anhalt für das Ausmaß und die Aktivität der allergischen Entzündung zu erhalten.

Eine Rest-Serumprobe (ca. 1ml), die Plasmaprobe (1ml) und die zur DNA-Extraktion aufbereiteten Blutproben werden für spätere Analysen bei -20° C gelagert. (s. Abschnitt

Blutaufbereitung)

Die Befunde aus den Blutuntersuchungen (Diff.-BB, IgE und RAST) sollen mit Patienten-Name für die Patientenakte zur Verfügung gestellt werden. Für die Studien-Dokumentation und -Archivierung muss der Patientennamenname durch die entsprechende ID-Nr. ersetzt werden.

(→ München: Markierung des Laborzettels für **BB** und **IgE** (EDTA- + Li-Heparin-Blutprobe) mit Barcode-Etikett für MAGICS-Studie + Patientennamenname ins Zentrallabor;

RAST: 1ml Serum für CLA-Atopy-Panel ins Allergielabor Poliklinik, Absender MAGICS;

Kopie der Befunde in die Patienten-Akte; für Archivierung für die Studie Name durch ID-Nr. ersetzen!)

DNA-Gewinnung durch Wangenabstrich (siehe „Anleitung zu Entnahme eines Wangenabstrichs“)

Bei Patienten, die eine Studienteilnahme aus Gründen der Blutentnahme verweigern oder bei denen die Eltern keine Blutentnahme wünschen, kann als Alternative eine Abstrichentnahme aus der Wangenschleimhaut angeboten werden.

Aus der durch Abstrich gewonnenen Probe kann ebenfalls DNA für die weiteren Untersuchungen gewonnen werden.

Die Abstrichentnahme kann von den Eltern zuhause an 4 verschiedenen Tagen durchgeführt werden.

Für die Abstrichentnahme ist es wichtig, dass das Kind mindestens 30 min vor der Entnahme nichts gegessen oder getrunken hat.

Um die Probe zu entnehmen, wird mit einem sterilen Wattestäbchen 6-mal fest an beiden Wangeninnenseiten entlang gestrichen. Dies wird an 4 verschiedenen Tagen wiederholt.

Die Wattetupfer sollen anschließend ca. 2 Stunden an der Luft getrocknet werden. Danach werden sie in einem mit ID-Nummer gekennzeichneten Briefumschlag bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

Da ohne Blutabnahme keine weiteren Untersuchungen wie Blutbild und Allergietest durchgeführt werden können, muss in diesem Fall auf bereits in der Patientenakte vorliegende Befunde von routinemedizinisch durchgeführten Untersuchungen zurückgegriffen werden.


Die Befunde werden dann wie die für die Studie erhobenen Befunde anonymisiert (nur mit ID-Nr. versehen, ohne Namen) zur Dateneingabe weitergegeben.

Im Dokubogen muss dokumentiert werden, wenn ein Patient mit Abstrich ohne aktuelle Blutentnahme an der Studie teilnimmt. Auch die Art des bereits vorliegenden Allergietests muss im Doku-Bogen erfasst werden (RAST oder Haut-Pricktest.)


Die Wattetupfer in dem mit ID gekennzeichneten Umschlag werden im Labor noch jeweils einzeln mit zugehörigen ID-Nummern versehen.

Anleitung zur Entnahme eines Wangenabstriches






Inhalt des Testpaketes

	<p>4 sterile Wattestäbchen 1 Probetasche (Briefumschlag mit Proben-Nr.) 1 frankierter Rückumschlag (falls nötig)</p>
---	--

Wichtig

	<p>Ihr Kind sollte 30 Min. vor Entnahme weder gegessen noch getrunken haben!</p>
---	--

So entnehmen Sie den Wangenabstrich von Ihrem Kind

	<p>1. Entnehmen Sie ein Wattestäbchen. Den Wattebausch selbst bitte nicht berühren!</p>
	<p>2. Reiben Sie mit der wattierten Seite des Wattestäbchens 6× m starkem Druck über die Innenseite der linken Wange (3× rauf und 3× runter) und dann 6× über die Innenseite der rechten Wange (3× rauf und 3× runter).</p>
	<p>3. Legen Sie das Wattestäbchen in die mitgeschickte Probetasche. Verschließen Sie diese noch nicht!</p>
	<p>4. Wiederholen Sie diese Entnahme an den folgenden 3 Tagen mit je einem Wattestäbchen. Nach dem letzten Wangenabstrich b den Umschlag verschließen.</p>
	<p>5. Die Probetasche können Sie bei dem nächsten Ambulanz-Termin zusammen mit dem Fragebogen abgeben. Oder: Für den Probenversand per Post verwenden Sie bitte den beigegefügteten Rückumschlag. Er ist bereits adressiert und ausreichend frankiert.</p>

Blutaufbereitung in allen Zentren

Die Bestimmungen für die Allergologie (**Diff.-BB., Gesamt-IgE, spezifisches IgE***) erfolgt in den jeweiligen Kliniken, damit den Patienten und den behandelnden Ärzten die Ergebnisse unmittelbar zur Verfügung gestellt werden können.

Aus der **Serum-Blutprobe** wird eine Menge von mind. **1ml als Rest-Serum** bei -20°C eingefroren.

Aus der **EDTA-Blutprobe** (9ml für Genetik) wird **1ml Plasma** abzentrifugiert und ebenfalls bei -20°C eingefroren.

Der erste Abschnitt der Blutaufbereitung des EDTA-Blutes (Ery-Lyse) für die genetischen Untersuchungen wird in den beteiligten Kliniken durchgeführt. Die Proben werden bei -20°C gelagert.

Die weiteren Schritte der DNA-Extraktion und die genetischen Analysen werden in der Dr.v.Haunerschen Kinderklinik durchgeführt.

Die Blutaufbereitung für die DNA-Analyse soll am selben Tag wie die Blutentnahme erfolgen (spätestens im Lauf des folgenden Tages).

Alternativ: bei Personalmangel kann nach Rücksprache mit der Studienleitung und dem Allergogenetischen Labor in München auch auf eine Vorbehandlung der DNA verzichtet werden, und die EDTA-Blutprobe für die Genetik direkt eingefroren werden.

Blutbild, Gesamt-IgE und RAST

Das EDTA-Blut für **Blutbild** und **maschinelles Differentialblutbild** wird in den Labors der jeweiligen Kliniken analysiert.

Blut bald ins Labor bringen! (Zeit vom Zeitpunkt der Blutentnahme bis zur Diff.-Bestimmung max. 5 Stunden!)

Das **Gesamt-IgE** und das **spez.IgE*** (in München und Wien) werden ebenfalls in den Labors der einzelnen Kliniken bestimmt.

*Wesel: 1ml Serum für RAST wird bei -20°C eingefroren und zur Bestimmung auf Trockeneis nach München versandt. (mit **ID-Nr.** und **Farbcodierung orange**)

Serum-Zentrifugation (für RAST, IgE, Restserum)

Zentrifugation der Serumblutprobe nach WHO-Richtlinien:

- Zentrifugationsdauer von mindestens 10min
 - Geschwindigkeit mindestens 1500 rcf
- rcf = RZB = g (an der Zentrifuge einstellbar von rpm auf rcf oder RZB)

Das Restserum-Röhrchen (mind.1ml) mit der zugehörigen **ID-Nr.** und **Farbcodierung rot** markieren und in der Box für Restserum bei -20°C einfrieren und lagern. Von den Boxen wird ein Belegungsplan mit ID-Nr. der Microtubes erstellt.

EDTA-Blut für die genetischen Analysen: DNA-Präparation aus 9 ml EDTA-Vollblut

Procedere für 50ml Zentrifugen-Röhrchen:

1. **vor Ery-Lyse Plasma** abzentrifugieren:

EDTA Blut (mindest. 9ml) abzentrifugieren, mit 2000-3000 rcf (rcf = RZB = g) für mindestens 15 min nach WHO-Richtlinie (Temperatur 15 -24°C).

Dann 1ml Überstand = **Plasma** in 1,5ml Microtube pipettieren. **CAVE: Den Überstand nicht zu tief abpipettieren, sonst nimmt man Leukozytenschicht (=sehr dünne Schicht über den Erys) mit raus!!** Einfrieren bei -20°C (ID + Farbmarkierung grün + Eintrag im Boxen-Belegungsplan nicht vergessen!)

2. Restlichen Inhalt des Röhrchens (Erys+restl Plasma) resuspendieren und in sterile mit ID-Nr. beschriftete **50ml** Sarstedt-Zentrifugen-Röhrchen umfüllen (reinkippen).
3. Mit Ery-Lyse-Puffer auffüllen und schwenken. **CAVE:** Falls sich Gerinnsel im Röhrchen befinden, warten bis Gerinnsel am Röhrchenboden absinkt, dann Inhalt in ein neues Röhrchen kippen.
4. Warten, bis Lyse vollzogen ist (dauert mindest. 10min, lieber länger stehen lassen), gelegentlich schwenken. Ist Lyse vollzogen, wird die zuerst trübe Lösung klar/"lackfarben".
5. 10min lang zentrifugieren bei 400-500 rcf (rcf = RZB = g), mit leichter Bremse. Prüfen, ob **Leukozytenpellet** wirklich am Röhrchenboden sichtbar ist (wenn nein, lieber nochmals zentrifugieren!)
6. Überstand beherzt auf einmal abkippen, Leukozyten resuspendieren, indem Röhrchen z.B. an Metallständer geschrappt wird, nicht mit Pipette resuspendieren!!)
7. Nochmals mit Ery-Lyse-Puffer auffüllen, wieder mindest. 7 min stehen lassen
8. 10min lang zentrifugieren bei 400-500 rcf (rcf = RZB = g), mit leichter Bremse. Wieder auf Leukozytenpellet achten, siehe oben! (Punkt 5.)
9. Überstand beherzt auf einmal abkippen, Leukozyten resuspendieren, indem Röhrchen z.B. an Metallständer geschrappt wird, nicht mit Pipette resuspendieren!!)
10. Nochmals mit Ery-Lyse-Puffer auffüllen, wieder mindest. 7 min stehen lassen
11. 10min lang zentrifugieren bei 400-500 rcf (rcf = RZB = g), mit leichter Bremse. Wieder auf Leukozytenpellet achten, siehe oben! (Punkt 5.)
12. Überstand wieder beherzt abkippen, **restlichen Überstand abpipettieren**, gegebenenfalls nochmals zentrifugieren (400-500 rcf für 1-2min)
13. **2ml Proteinase K-Puffer** dazugeben, vermischen (mit Pipettenspitze oder schrappen) und Inhalt in 2ml-Microtube (Sarstedt) füllen.
14. Beschriften mit **ID-Nr.** + Farbmarkierung blau und Eintrag im Boxen-Belegungsplan nicht vergessen! Einfrieren bei -20°C.

DNA-Aufbereitung / nur in München :

(eingefrorene Proben erst auftauen vor der Verarbeitung)

1. Weiterverarbeitung von eingefrorenen Proben:

3ml Proteinase K-Puffer + 25µl Proteinase K(20mg/ml) + 250µl 20%SDS zugeben und über Nacht im Wasserbad bei 37°C (od. 2 Std. bei 65°C) inkubieren

Weiterverarbeitung der Proben direkt nach Erylyse, ohne Einfrieren/ Lagerung:

5ml Proteinase K-Puffer + 25µl Proteinase K(20mg/ml) + 250µl 20%SDS zugeben und über Nacht im Wasserbad bei 37°C (od. 2 Std. bei 65°C) inkubieren

2. 1500µl 5M NaCl zugeben und vortexen (max. 15sec.)
3. mindestens 30min zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit (ca.4000rpm oder 3200 rcf)
4. Überstand (= DNA-haltige Lsg.) in frische Röhrchen überführen
5. 20ml 100%Ethanol (unvergällt) zugießen, sofort schwenken, dabei fällt DNA aus
6. DNA-Knäuel mit Pipette rausfischen, in Schraubverschlußröhrchen überführen, in 70% Ethanol waschen und Ethanol möglichst vollständig absaugen – dabei DNA immer im Auge behalten. (falls mehrere kleine DNA-Fäden ausfallen, die schwer zu fischen sind, DNA 10min abzentrifugieren bei max. Geschwindigk., Überstand vorsichtig abkippen – möglichst unter Sichtkontrolle des Pellets und im letzten 1ml DNA wieder aufwirbeln, in Röhrchen wieder abzentrifugieren etc.)
7. Ev. Waschvorgang mit 70% Ethanol in frischem Röhrchen wiederholen
8. DNA trocknen lassen (je nachdem, wie gut das 70% Ethanol abgesaugt wurde)
9. DNA in etwa 150µl TE lösen (TE-Menge richtet sich nach der Menge der gefällten DNA) und bei +4Grad (nie einfrieren od. in Wasser lagern!) aufbewahren.

DNA-Isolierung eines Wangenabstrichs

Cell Lysis

1. 300 µl **Cell Lysis Solution** in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß pipettieren
2. Probenabstrich 10× in die Cell Lysis Solution tauchen
3. 1.5 µl **Proteinase K Solution** dazupipettieren → 25× schwenken
4. ► für 1h bei 55°C inkubieren

RNase Treatment

5. 1.5 µl **RNase Solution** zupipettieren
6. 25× schwenken
7. ► für 15 Min. bei 37°C inkubieren

Protein Precipitation

8. Probe auf RT bringen (kurz unter den Wasserstrahl halten)

9. 100 µl **Protein Precipitation Solution** in die Probe pipettieren
10. sofort 20 sek. Vortexen (max.)
11. Proben für 5 Min. in ein Eisbad stellen
12. 3 Min. bei 16000×g zentrifugieren

DNA Precipitation

13. 300 µl **Isopropanol (100%)** in ein sauberes 1.5 ml Reaktionsgefäß pipettieren
14. 0.5 µl **Glykogen Solution** zupipettieren
15. zentrifugierter Proben-Überstand vorsichtig abpipettieren (ohne das Pellet zu berühren) und in die vorbereitete Lösung überführen
16. 50× schwenken
17. ► für 5 Min. bei RT inkubieren
18. 5 Min. bei 16000×g zentrifugieren
19. Überstand vorsichtig abkippen (Vorsicht: Pellet!) und über Kopf auf ein sauberes Papier kurz stehen lassen
20. 300 µl **Ethanol (70%)** vorsichtig dazupipettieren
21. 1 Min. bei 16000×g zentrifugieren
22. Überstand vorsichtig abkippen (Vorsicht: Pellet!) und kurz über Kopf auf ein sauberes Stück Papier stellen
23. 10-15 Min. an der Luft trocknen

DNA Hydration

24. 20 µl **DNA Hydration Solution** zupipettieren
25. ► für 1h bei 65°C inkubieren
26. die Probe über Nacht bei RT stehen lassen
27. ► DNA bei 4°C lagern

Anhang 1 :

Material zur DNA-Isolierung aus EDTA-Blut

Herstellung der Pufferlösungen :

- Ery-Lyse- Puffer:**
- | | |
|---|----------------|
| - 155mM NH ₄ Cl(Ammoniumchlorid) | 41,45g |
| - 10mM KHCO ₃ (Kaliumhydrogencarbonat) | 5g |
| - 0,1mM EDTA(als Komplexbildner) | 1ml 0,5 M EDTA |
- ad 5000ml Aqua dest.
- mit pH-Meter auf pH 7,4 einstellen (mit HCL oder NaOH)

Procedere: 5l Becher auf Waage stellen und Waage auf 0 Stellen. NH₄Cl und KHCO₃ (mit Löffel) in den Becher abwiegen (eventuell in separaten Gefäßen abwiegen und dann in 5l Becher). EDTA in Becher pipettieren und mit Aqua bi-dest. Becherinhalt auf 5l auffüllen. Becher auf Magnetrührer stellen und mit Rührfisch den Inhalt mischen. Den pH des Puffers einstellen und **in 500ml Flaschen** abfüllen. Beschriften und **autoklavieren** bei etwa 121Grad, 20min (dabei den Deckel der Flaschen nicht ganz zudrehen!).

- Proteinase K- Puffer:**
- 5ml Tris/Cl 1M (pH 7,5)(= Puffer)
 - 2ml EDTA 0,5 M (pH 8,0) (=Komplexbildner)
 - 3ml NaCl 5 M
- ad 1000ml

Procedere: In 1l Becher Tris/Cl, EDTA und NaCl reinpipettieren. Mit Aqua be-dest auf 1l auffüllen und mit

Magnetrührer mischen. In 100ml Flaschen abfüllen. Beschriften und **autoklavieren** bei etwa 121Grad, 20min (dabei den Deckel der Flaschen nicht ganz zudrehen!).

-TE- Puffer: 10mM Tris 1,21g
 1mM EDTA 0,37g

Procedere: pH auf 8,0 einstellen mit HCl oder NaOH

Bestell-Liste:

Chemikalien zur Zubereitung der Pufferlösungen:

- NH₄ Cl	Ammoniumchlorid	A – 9434 (500g)	<u>Sigma</u>
- KHCO₃	Kaliumhydrogencarbonat	1.04854.0500 (500g)	<u>Merck</u>
- 0,5M EDTA (EDTA 0,5-molar)		E – 7889 (100ml)	<u>Sigma</u>
- 1M Tris pH 7,4 (Tris, 1-molar)		T – 2663 (1000ml)	<u>Sigma</u>
- 5M NaCl	Natriumchlorid, 5-molar	S –5150 (1000ml)	<u>Sigma</u>

Laborbedarf:

- 50ml Zentrifugen-Röhrchen	Nr. 62.547.004 PP	<u>Sarstedt</u>
------------------------------------	-------------------	-----------------

Material für DNA-Isolierung eines Wangenabstrichs

Lösungen die im Kit enthalten sind:

Lösungen bei RT lagern:

- Cell Lysis Solution
- Protein Precipitation Solution
- DNA Hydration Solution

Lösungen bei +4°C lagern:

- RNase Solution

Lösungen extra bestellen:

Lösungen bei -20°C lagern:

- Proteinase K Solution → nicht im Kit enthalten
- Glykogen Solution → nicht im Kit enthalten

Lösungen bei RT lagern:

- Isopropanol 100% → nicht im Kit enthalten
- Ethanol 70% → nicht im Kit enthalten

Bestell-Liste für Laborbedarf:

- Gentra Zell- und Gewebekit incl. RNase A (für 100 Proben): Biozym Bestellnr. 202005
- Glykogen Lösung (20mg/ml) 500µl: Biozym Bestellnr. 219505 (68€)
- Proteinase K (10mg): Sigma Bestellnr. P-2308
- 1.5 ml sterile Mikroröhrchen: Sarstedt Bestellnr. 72.692.005
- 10µl, 100µl, 1000µl Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere : Eppendorf

Material für Versandpaket:

- Versandtasche C4 sk o.Fenster
- Briefumschlag DIN lang ohne Fenster sk
- Versandtasche C5 o.F. nk
- Wattestäbchen klein steril
- Etiketten evtl. für das MAGIC-Logo

Anhang 2:

Standard-Methoden zur BHR-Testung**1. Provokation mit Hypertoner Kochsalzlösung****Voraussetzungen:**

- möglichst keine Medikamenten-Einnahme (vor allem keine Bronchodilatoren) am Morgen vor der geplanten Lungenfunktions-untersuchung;
- sollten doch Medikamente eingenommen oder inhaliert worden sein, Wirkstoff, genaue Dosis und Einnahmezeit dokumentieren.
- frei von akutem Infekt der unteren Atemwege

Vor Durchführung der Lungenfunktionsmessungen müssen zur Berechnung der Sollwerte aktuelle Größe und Gewicht des Kinds bestimmt werden (Standard-Sollwert nach Zapletal)

Die Lungenfunktionsgeräte müssen täglich auf Raumtemperatur, Luftdruck und relative Luftfeuchtigkeit geeicht werden.

Mit Hilfe eines Spirometers („Master Screen“/ „Master Scope“; Programm-Version 4.51, Fa. Jäger, Germany) wird die Fluss-Volumen-Kurve aufgezeichnet, aus welcher sich die FEV1 (Einsekundenkapazität) bestimmen lässt.

Es werden mindestens 2 und maximal 3 Lungenfunktionsmessungen durchgeführt.

Wenn die ersten zwei Messungen um mehr als 5% voneinander abweichen, wird eine dritte Messung durchgeführt. Von diesen 2 oder 3 Messungen wird der beste Wert als Ausgangswert festgelegt. (Von diesem Ausgangswert wird der FEV1-Abfall von 10% und 15% für den Provokationstest mit hypertoner Kochsalzlösung berechnet.)

Liegt der FEV1 unter 70% des Sollwerts, wird ein Bronchodilatator (Salbutamol, 2x2 Hub über Volumatic) verabreicht und nach 10 min eine erneute Lungenfunktionsmessung durchgeführt.

Liegt der FEV1 über 70% des Sollwerts, folgt eine Testung der bronchialen Hyperreaktivität mit hypertoner Kochsalzlösung.

Provokationstestung mit hypertoner Kochsalzlösung

Hier atmet das Kind zuerst 30 sec. lang ein 4,5%iges Kochsalzaerosol aus einem Ultraschallvernebler (DeVilbiss Ultra-Neb 2000, Germany) ein. Daraufhin wird die Messung der FEV1 wiederholt. Die bei Respondern erfolgende bronchiale Obstruktion wirkt sich in einem Abfall der FEV1 aus.

Erfolgt bei der ersten Messung noch kein Abfall der FEV1 um mehr als 15% des Initialwerts, so wird die Dauer der Inhalation schrittweise erhöht. Hierbei wird pro Einzelschritt die Inhalationsdauer verdoppelt, bis man maximal eine Gesamtdauer von 15,5 min erreicht hat (1/2min → 1min → 2min → 4min → 8 min). Eine Minute nach jeder Inhalation werden 2 Messungen des FEV1 durchgeführt, an die sich innerhalb von 3 Minuten die nächste Inhalationsperiode anschließt.

Der Provokationstest ist beendet, sobald die FEV1 um mehr als 15% gefallen ist, oder sofern keine Obstruktion erfolgt, sobald 15,5 min. Kochsalzlösung inhaliert wurden.

Liegt der FEV1-Abfall zwischen 10 und 15% des Initialwerts, wird die Dauer der folgenden Inhalationsphase nicht verdoppelt. Eine Inhalationsphase kann zweimal mit der gleichen Dauer durchgeführt werden, falls der FEV1-Abfall weiterhin zwischen 10 und 15% des Initialwertes liegt. Nach einer Wiederholung mit der gleichen Dauer wird die Dauer der nächsten Inhalationsphasen wieder verdoppelt, bis die maximale Gesamtdauer von 15,5 min erreicht wird (d.h. die Dauer der letzten Inhalationsperiode wird entsprechend verkürzt).

Nach der Maximaldauer von 15,5min wird die Inhalation in jedem Fall beendet.

Das Verhältnis von inhaliertem Aerosol zu FEV1-Abfall wird in einer Dosis-Wirkungskurve dokumentiert.

Die Kammer und der Schlauch (ohne Mundstück) werden vor der ersten Inhalationsphase und im Anschluss an die letzte Provokation gewogen, um die tatsächlich verbrauchte Menge des Kochsalzaerosols zu messen (Waage mit Messbereich bis ca. 1,5 oder 2kg; d=0,1g oder d=1g). Daraus wird die verdampfte Menge von Kochsalzaerosol pro Minute errechnet.

Ein FEV1-Abfall von >15% wird als positive Response gewertet.

Nach einer positiven BHR-Testung soll eine Broncholyse mit 2 x 2Hub Salbutamol über Inhalationshilfe (Volumatic oder Aerochamber) durchgeführt, und die Messwerte nach 10 min dokumentiert werden.

2. München: Kaltluft-Provokation

Provokationsgerät: RHES Version 2, Jaeger Toennies; Germany

1. Basis-Lungenfunktion mittels Bodyplethysmographie zur Bestimmung der Ausgangswerte

2. Es wird keine Provokation durchgeführt bei Patienten mit FEV1 < 80% des Sollwertes oder R tot > 1,5 oder MEF 25 < 60% des Sollwertes.
3. Berechnung der Voreinstellungen am RHES-Gerät aus FEV1 [l]:
 - Pressluftdruck des KLP-Geräts = FEV1 [l] x 22
 - CO2-Wert [l/min] = FEV1 [l] x 1,1
(max. Zugabe von CO2 darf 8 Vol.% nicht überschreiten!)
4. Sobald das RHES die eingestellte Provokations-Temperatur von -10°C erreicht hat und die Zeiteingabe von 4 min erfolgt ist, kann die Provokation gestartet werden. Die Kontrolle der Vitalparameter des Patienten erfolgt durch Pulsoxymetrie.
5. Der Patient soll tief und mit leicht erhöhter Atemfrequenz atmen. Der Atembeutel soll auf gleichem Füllstand gehalten werden, aber niemals prall gefüllt sein.
6. Sollte der Patient einen starken Hustenanfall bekommen, sich unwohl fühlen oder die O2-Sättigung unter 90% absinken, kann der Vorgang unterbrochen werden. Hierbei muss die Pausetaste am RHES gedrückt werden, damit die Provokationsdauer nicht verkürzt wird.
7. Nach 4 min Inhalation von Kaltluft ist die Provokation beendet. Es wird eine erneute Messung der Lungenfunktion mittels Bodyplethysmographie durchgeführt.
8. Ein **FEV1-Abfall von >10% zum Ausgangswert** wird als Positive Response gewertet.

3. Wesel: Metacholin-Provokation

(orientiert an den "Guidelines for Methacholine and Exercise Challenge Testing-1999" der American Thoracic Society)

Herstellung der Metacholinlösungen:

Metacholin: Acetyl-beta-methyl-choline-chlorid in Konzentrationen von: 0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 und 16 mg/ml.

Verdünnungslösung: sterile physiologische Kochsalzlösung.

Verdünnungsschema (ausgehend von 100 mg Metacholin):

100 mg Metacholin	+	6,25 ml NaCl	=	A: 16 mg/ml
3 ml der Lösung A	+	3 ml NaCl	=	B: 8 mg/ml
3 ml der Lösung B	+	3 ml NaCl	=	C: 4 mg/ml
3 ml der Lösung C	+	3 ml NaCl	=	D: 2 mg/ml
3 ml der Lösung D	+	3 ml NaCl	=	E: 1 mg/ml
3 ml der Lösung E	+	3 ml NaCl	=	F: 0,5 mg/ml
3 ml der Lösung F	+	3 ml NaCl	=	G: 0,25 mg/ml

3 ml der Lösung G	+	3 ml	NaCl	=	H: 0,125 mg/ml
3 ml der Lösung H	+	3 ml	NaCl	=	I: 0,0625 mg/ml
3 ml der Lösung I	+	3 ml	NaCl	=	J: 0,031 mg/ml

Die Haltbarkeit der Lösung wird unterschiedlich beurteilt. Wir empfehlen, die Verdünnungslösungen nicht länger als 24 Stunden zu verwenden. 30 Minuten vor Beginn, sollten die Lösungen aus dem Kühlschrank genommen werden.

Ablauf der Metacholinprovokation

Voraussetzung ist die Anwesenheit eines Arztes und das Vorhandensein von Notfallbesteck !

Es werden immer 3 ml des jeweiligen Lösungsmittels vernebelt.

1. Leerwertmessung: Bodyplethysmographische Bestimmung des sRAW 0,5 und der FEV₁.
2. Inhalation der Kochsalzlösung über den PARI-PROVOII (mit Nasenklemme). 30 sec nach der Inhalation Bestimmung des sRAW 0,5 und der FEV₁ (Basismessung)

Bestimmung der Sollwertgrenze für die positive Reaktion der Basiswerte:

- a. **Abfall der FEV₁ um 20%**
 - b. **100% Anstieg des sRAW 0,5**
3. Beginn der Inhalation mit Metacholinlösung : 1. Stufe 0,031 mg/ml.
 4. 30 sec. nach Inhalation Bestimmung des sRAW 0,5 und der FEV₁
 5. Inhalation der nächsten Konzentrationsstufe und wiederum Lungenfunktion
 6. Abbruch der Metacholinprovokation wenn der sRAW 0,5 sich vom Baseline wert um 100% erhöht hat oder die FEV₁ um 20% abgefallen ist, bzw. wenn die letzte Konzentrationstufe inhaliert wurde
 7. Bronchospasmyse mit Salbutamol; 10 Minuten später erneute Lungenfunktionen
 8. Die nach BSL gemessene FEV₁ sollte nicht mehr als 10% vom Baseline-Wert abweichen.

Zeitschema:

Vernebeln: 2 Minuten Dauer

Wartezeit: mind. 1 Minute nach dem Vernebeln warten, bevor der Beutel leergeatmet wird.

Inhalationsintervall: max 5min

Wenn die Ausgangs-FEV₁ < 70% des Sollwertes oder ein sRAW 0,5 von größer 1,0 vorliegt, kann keine Metacholinprovokation durchgeführt werden. Dann muß direkt eine Bronchospasmyse durchgeführt werden!

4. Wesel: Laufbelastung

Standardisierte Provokation mittels Laufbelastung auf dem Laufband:

1. Leerwertmessung (Bestimmung der Baseline): Bodyplethysmographische Bestimmung des sRAW 0.5 und der FEV₁.
2. Wenn eine FEV1 von >80%, ein sRAW kleiner 1,0 kPa x sec und ein SaO₂ von > 95% vorliegt, kann mit der Laufbelastung begonnen werden.
3. Beginn der Laufbelastung:
4. 6 minütiges freies Laufen auf einem Laufband der Firma Jäger mit einer festen Steigung von 6°. Die Patienten werden bei submaximaler Herzfrequenz ausbelastet (85-95% der maximalen Herzfrequenz {220-Lebensalter})
5. 30 sec nach der Laufbelastung erneute Bodyplethysmographische Bestimmung des sRAW 0,5 und der FEV₁.
6. Wenn ein Anstieg des sRAW 0,5 auf Werte von > 1,0 oder die FEV₁ < 80% liegt wird eine BSL durchgeführt.

Bewertung der positiven Hyperreagibilität:

**Anstieg des sRAW 0,5 auf > 100% vom Leerwert
Abfall der FEV1 um ≥ 15% vom Leerwert**

5. Köln: Laufbelastung

Standardisierte Provokation mittels Laufbelastung auf dem Laufband:

Voraussetzungen:

- Inhalation von Sympathomimetika bzw. Parasymptholytika liegt mindestens 8 Stunden zurück
- Keine Kontraindikation für körperliche Belastung

Praktische Durchführung:

1. Spirometrie und Bodyplethysmographie sowie Messung der Vitalparameter
2. Laufbandbelastung mit 5-9km/h und 10-15% Steigung;
Belastungsintervall ca.7-10min, je nach Belastbarkeit des Kindes
Standard: Belastung erfolgt, bis der Puls auf das Zweifache vom Basiswert bzw. auf 175 Schläge/min angestiegen ist.
Dabei erfolgt eine kontinuierliche Messung von Sättigung und Herzfrequenz.
3. Nach einer 5-minütigen Pause erneute Durchführung einer Spirometrie und Bodyplethysmographie
4. Danach erfolgt eine Bronchospasmolyse mittels Salbutamol (Dosieraerosol über Volumatic-Volumenkammer)

5. Wartezeit von 10min.

6. Erneut Spirometrie und Bodyplethysmographie

Bewertung als positive BHR: Abfall des FEV1 um >15%.