



Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), erstmalig von der amerikanischen Arbeitsgruppe Saiki et al. 1985 (1) beschrieben, ist eine Methode zur in vitro Vermehrung ("Amplifikation") definierter DNA- Stücke mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase. Sie erlaubt den schnellen, empfindlichen Direktnachweis kleinster Mengen von DNA oder RNA. Der Einsatz dieser Methode hat inzwischen fast alle Bereiche der Wissenschaft und Medizin, einschließlich die forensische Medizin, pränatale Diagnostik gebendiger Erkrankungen, Gewebetypisierung für Organtransplantation, Onkologie, Paläontologie und nicht zuletzt die mikrobiologische Diagnostik revolutioniert (2,3). 1993 wurde der Entdecker der PCR, Kary Mullis, mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

Methode

Die PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung von drei Schritten (Abb. 1):

Denaturierung der doppelsträngigen DNA in einzelstränge

Anlagerung (Annealing) von synthetischen Oligonukleotiden (Primern) an die flankierenden Enden des zu amplifizierenden Genbereiches

Polymerisierung (Neubildung) der doppelsträngigen DNA - ausgehend von den Primern - mit Hilfe des Enzyms DNA - Polymerase sowie der vier Desoxynukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).

Mit jedem Zyklus wird die DNA zwischen den beiden Primern verdoppelt. Dies führt zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA, so dass nach 20 Zyklen theoretisch 2^{20} oder eine Million DNA-Kopien erzeugt werden können. Dieser Vorgang dauert nur wenige Stunden.

Zum Nachweis der Amplifikations-Produkte wird in der Regel die DNA mit Ethidium-Bromid gefärbt, in Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht betrachtet. Eine sichtbare Bande der erwarteten Länge (nach Vergleich mit DNA-Längenstandards) wird als positiv bewertet (Abb. 2).

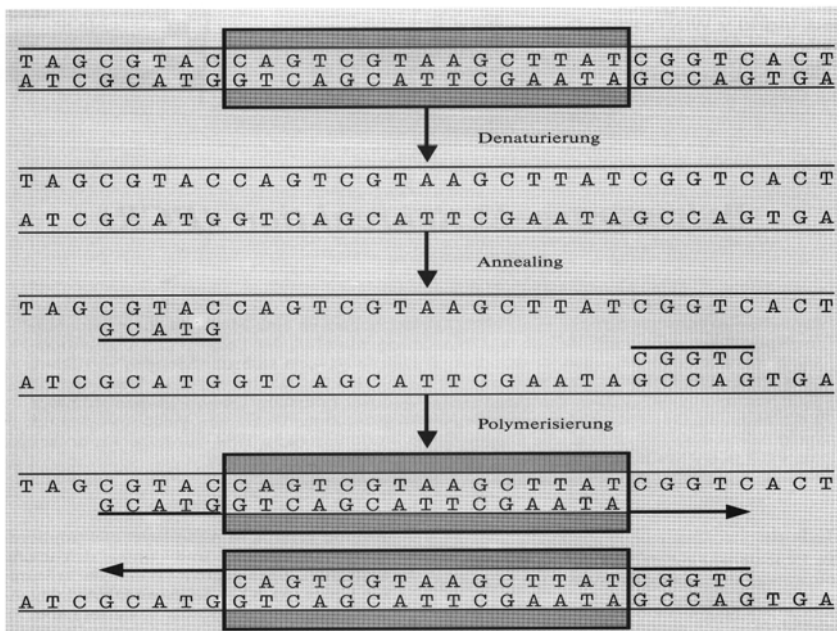
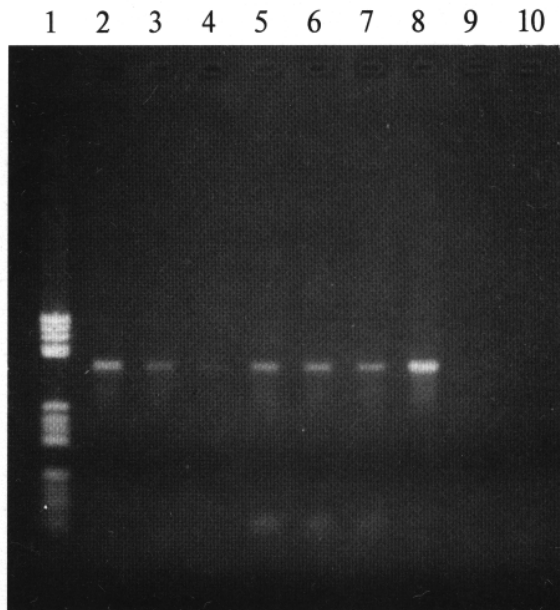


Abb. 1 Die Polymerase-Kettenreaktion: Denaturierung, Annealing, Polymerisierung

Abb. 2 Elektrophoretische Auftrennung von amplifizierten PCR-Produkten



Bahn 1: DNA-Marker (Längenstandards)
Bahnen 2-8: positive Proben
Bahnen 9,10: negative Kontrollen

Vorteile der PCR

Direkt

Der Krankheitserreger selbst wird nachgewiesen, nicht seine Produkte (Antigene, Toxine) oder Produkte der Immunantwort (Antikörper).

Schnell

Die PCR-Reaktion dauert nur 3-4 Stunden, die komplette Untersuchung 1-2 Tage.

Hochsensitiv

Theoretisch kann ein einziges DNA-Molekül (bzw. ein Krankheitserreger) nachgewiesen werden. Praktisch weist die PCR ca. 10-100 Krankheitserreger/ml nach.

Spezifisch

Eine hohe Spezifität wird durch die Nukleotidsequenz der ausgewählten Primer bedingt.

Nachteile der PCR

1) Falsch negative Ergebnisse können u.a. verursacht sein durch

- zu geringe Anzahl von Krankheitserregern in der Patientenprobe
- Inhibitoren der DNA-Polymerase in der Patientenprobe
- Erreger-Varianten, die aufgrund einer veränderten Nukleotidsequenz eine Amplifikation mit den verwendeten Primern nicht zulassen
- Verdauung der Erreger-Nukleinsäure durch eingeschleppte DNasen oder RNasen

Falsch negative Ergebnisse können vermieden oder reduziert werden durch Verarbeiten einer ausreichenden Menge Patientenmaterials, das Benutzen von Primern aus bekannt konstanten DNA-Bereichen und die Verwendung von sterilem (DNase- und RNase-freiem) Einmalmaterial bei der Gewinnung des Patientenmaterials sowie der Durchführung der PCR.

2) Falsch positive Ergebnisse können u.a. verursacht sein durch

- Kontamination bei der Gewinnung des Patientenmaterials
- Kontamination während der Durchführung der PCR, hauptsächlich durch bereits amplifizierte Produkte.

Falsch positive Ergebnisse können vermieden oder reduziert werden durch die Verwendung eines geschlossenen Systems (z.B. Monovetten) bei der Gewinnung des Patientenmaterials sowie das Einhalten aller bekannten Vorsichtsmaßnahmen bei der Durchführung der PCR (getrennte prä- und post-PCR-Räume, Benutzung wattegestopfter Pipettenspitzen und steriler Plastikwaren, häufiges Wechseln der Handschuhe, Mitführen von negativen Kontrollen für alle Schritte der PCR) (4).

Indikation für die medizinische Diagnostik

Die PCR-Methode ist insbesondere geeignet

- für den Nachweis von Krankheitserregern, die schwierig, langsam oder gar nicht zu kultivieren sind (z.B. Mycobacterium tuberculosis, Chlamydia trachomatis, Hepatitis C-Virus, Hepatitis B-Virus, HIV)
- in der akuten Phase der Erkrankung, noch bevor Antikörper nachgewiesen werden können (z. B. nach einer HCV- oder HIV-Infektion)
- bei immundefizienten Personen, die nur wenige oder keine spezifischen Antikörper produzieren können (z.B. HIV- Infektion, Z. n. Organtransplantation, Z. n. zytostatischer Therapie)
- als Direktmarker einer Virämie (z. B. bei einer HCV- Infektion)
- bei unklarer Serologie (z.B. isolierter HBc AK bei Hepatitis B)
- für die Kontrolle des Therapie- Erfolges (z.B. nach Interferon-Behandlung bei Hepatitis B)

Gegenwärtiger Stand der Anwendung in der mikrobiologischen Diagnostik

Die PCR bietet zweifellos eine schnelle, sensitive Methode zum Direktnachweis von Krankheitserregern bei entsprechender Indikation. Aufgrund ihres Aufwandes jedoch sowie der Schwierigkeit, in einigen Fällen das Ergebnis klinisch zu bewerten, soll sie zunächst nur dort eingesetzt werden, wo die klinische Relevanz eindeutig ist. In Tab. I werden diese Anwendungsbereiche zusammengefasst.

Unser Labor bietet zur Zeit die PCR für den Nachweis von HBV-DNA (siehe gesondertes Labor- INFO), HCV-RNA (siehe gesondertes Labor- INFO) sowie Mycobacterium tuberculosis.

Untersuchungsmaterial

Für HBV-DNA oder HCV-RNA:

2 ml EDTA- Blut, Nativblut (kein Heparin-Blut!), in einem geschlossenen System (z.B. Mono-
vetten) gewonnen

Für Mycobacterium tuberculosis:

5-10 ml Sputum, Bronchiallavage, Magensaft, Liquor

Literatur

1. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Ehrlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230:1350-1354
2. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.). PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego, 1990
3. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (Eds.). Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications. American Society for Microbiology, Washington, 1993
4. Kwok S. Procedures to minimize PCR-product carry-over. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, Eds., PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego, pp 142-145, 1990
5. Bitter-Suermann D. Der Stellenwert der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für die klinische Diagnostik von Infektionskrankheiten. Dt Ärztebl 1993; 90:53-56



Tab. 1 Beispiele der klinischen Anwendung der PCR in der medizinischen Diagnostik
(modifiziert nach Bitter-Suermann)(5)

Erreger	Indikation
Hepatitis B- Virus	Nachweis im Serum bzw. Biospat bei chronischer Hepatitis oder Leberzellkarzinom unklarer Ätiologie Abklärung bei isolierter HbcAK Therapiekontrolle bei chronischer Hepatitis
Hepatitis C- Virus	Überprüfung der Virämie bei HCV- AK positiven Personen Therapiekontrolle Bei HCV- AK negativer akuter oder chronischer Hepatitis sowie Leberzellkarzinom unklarer Ätiologie Abklärung des Infektionsstatus bei Kindern von HIV- infizierten Müttern
Herpes- Simplex- Virus	Liquordiagnostik bei V. a. Herpes- Simplex-Enzephalitis und bei Neugeborenen
Cytomegalievirus	Nachweis im peripheren Blut: Überwachung von Transplantierten und anderen Immunsupprimierten Nachweis in Liquor, Bronchiallavage, Biopsaten: bei V. a. entsprechende Organmanifestation
Epstein-Barr-Virus	Nachweis im Liquor bei V. a. EBV- assoz. Guillain-Barré-Syndrom Nachweis in Biopsaten u.a. bei V. a. EBV- assoz. Tumor/ Lymphoproliferation
HIV-1/2	Abklärung des Infektionsstatus bei Kindern infizierter Mütter Abklärung bei anti. HIV- negativen Personen mit dokumentierter Exposition
Parvovirus	Virusnachweis bei Patienten mit aplastischer Krise, bei Patientinnen mit unklarem Exanthem in der Schwangerschaft sowie im fetalen Material bei Hydrops fetalis
Rubellavirus	Virusnachweis bei V. a. pränatale Infektion
Variella- Zoster- Virus	Virusnachweis im Liquor bei neurologischen Komplikationen von Windpocken und Herpes zoster
Mykobakterien	Nachweis von <i>M. tuberculosis</i> aus Liquor, Biopsaten, Pleuraflüssigkeit bei entsprechender Organmanifestation Nachweis von <i>M. avium</i> im peripheren Blut bei V.a. disseminierte Infektion bei HIV- positiven Personen Identifizierung nicht- tuberkulöser Mykobakterien
Chlamydia trachomatis	Nachweis im Ersturin zur Abklärung unklarer Fertilitätsstörungen bzw. Salpingitiden bei der Frau
Chlamydia pneumoniae	Nachweis aus der bronchoalveolären Lavage bei V. a. Chlamydien-Pneumonie
Toxoplasma gondii	Nachweis im Liquor bzw. Fruchtwasser bei V.a. Neugeborenentoxoplasmose Nachweis im Liquor bzw. Hirnbiopsie bei V. a. akute Toxoplasma- Enzephalitis bei HIV- Patienten
Borellia burgdorferi	Nachweis im Liquor bei V.A Neuroborreliose Nachweis aus Gelenkpunktat bei V.A. Lyme-Arthritis bei Kindern