

Markus Faas
Dr. med. dent.

Geboren am 01.08.1968 in Pforzheim
Reifeprüfung am 03.05.1988 in Pforzheim
Studiengang der Fachrichtung Zahnmedizin vom SS 1989 bis SS 1995
Physikum am 05.10.1992 an der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Staatsexamen am 02.08.1995 an der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg

Hans-Peter Hornig
Dr. med. dent.

Geboren am 23.05.1967 in Heidelberg
Reifeprüfung am 03.05.1986 in Heidelberg
Studiengang der Fachrichtung Zahnmedizin vom WS 1989 bis SS 1995
Physikum am 02.10.1992 an der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Staatsexamen am 02.08.1995 an der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pathologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. K. Kayser

Vergleich zweier unterschiedlicher PCR-Protokolle zum direkten Nachweis von Mycobacterium tuberculosis im Sputum sowie zweier Farbstoffe zum DNA-Nachweis durch Gelelektrophorese

Es werden zwei unterschiedliche Protokolle für die Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von Mycobacterium tuberculosis evaluiert.

Die Sputumproben der 50 untersuchten Patienten wurden in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe umfaßte 20 Patienten mit gesicherter Tuberkulose. Die zweite Gruppe stellten 20 Patienten einer nicht tuberkulösen Bettenstation ohne Anhaltspunkte für Tuberkulose. Die dritte Patientengruppe umfaßte 10 Patienten, von welchen uns zum Zeitpunkt der Abgabe des Sputums weder Diagnose noch Kultur- oder histologischer Befund bekannt waren.

Folgende Ergebnisse wurden unter allen 50 untersuchten Patienten bei der Standard-PCR und bei der Nested-PCR erzielt: Sensitivität 92,9% (Standard) und 64,3% (Nested), Spezifität 80,5% (Standard) und 94,4% (Nested).

Beim Vergleich der zwei DNA-Fluoreszenzfarbstoffe Ethydiumbromid und Sybr®GreenI für die Gelelektrophorese verwendeten wir 2%ige Agarosegels. Beurteilt wurden die Farbstoffe in Bezug auf die Sensitivität, die Leuchtintensitätsabnahme unter UV-Einwirkung und die Hintergrundfluoreszenz.

Die Analyse der Resultate ergab eine 10,5 fach höhere Sensitivität von Sybr®GreenI, sowie eine 6 fach höhere Sensitivität bei Sybr®GreenI nach zehnminütiger UV-Licht Exposition gegenüber Ethydiumbromid. Die Auswertung der Hintergrundfluoreszenz ergab keinerlei Fluoreszenz in DNA-freien Gelabschnitten bei Sybr®GreenI, während Ethydiumbromid einen generellen Hintergrund aufwies.

Als Schlußfolgerung ergibt sich, daß die Polymerasekettenreaktion eine hohe Sensitivität und Spezifität im Bereich der frühen Diagnostik mykobakterieller Infektionen aufweist. Trotz der relativ hohen Zuverlässigkeit der PCR-Methoden sollte jedoch nicht auf die konventionellen Untersuchungsmethoden wie histologischer Nachweis und kulturelle Erregeranzucht verzichtet werden. Die Diagnose bei Patienten mit nicht eindeutigen Standard-PCR-Ergebnissen wird durch eine zusätzliche Untersuchung mit einer Nested-PCR erleichtert. Der Vergleich der beiden DNA-Farbstoffe Ethydiumbromid und Sybr®GreenI zeigt, daß die Verwendung von Sybr®GreenI für die praktische Anwendung in der Routineelektrophorese Vorteile verglichen mit dem gebräuchlichen DNA-Farbstoff Ethydiumbromid aufweist. Bis auf die höheren Kosten liegen diese in der höheren Lichtempfindlichkeit, dem geringen Fluoreszenzverlust (Fading) und der nahezu fehlenden Toxizität.