

Udo Kronberg  
Dr. med.

## **Entwicklung und Evaluation eines direkten Nachweisverfahrens für *Helicobacter pylori* aus Stuhlproben mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Geboren am 24.10.1970 in Stade  
Reifeprüfung am 09.05.1990 in Ettlingen  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991/92 bis zum SS 1998  
Physikum am 30.08.1993  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Schwetzingen  
Staatsexamen am 05.05.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Labormedizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Heinrich Schmidt-Gayk

Ziel der Arbeit war es, einen diagnostischen Test für *Helicobacter pylori* - ein Bakterium, welches für die Entstehung von Gastritiden, Ulcera und Magenneoplasien verantwortlich gemacht wird - zu entwickeln, der einerseits in der Lage ist, einen direkten Keimnachweis zu erbringen, und andererseits ohne die invasive Gastroskopie mit Biopsieentnahme auskommt. Dies sollte mit einer Polymerase-Kettenreaktion aus Stuhlproben von infizierten Patienten gelingen.

Nach der Auswahl entsprechend sensitiver Primerpaare (im endgültigen Protokoll werden Primer verwendet, die gegen das 16S-rRNA-Gen von *Helicobacter pylori* gerichtet sind) war die Schwierigkeit, ein geeignetes Verfahren zu finden, um die bakterielle DNA aus Stuhlsuspension so zu präparieren und zu reinigen, daß die in Stuhlsuspension reichlich vorhandenen Inhibitoren der PCR in ausreichendem Maße entfernt wurden. Mit den zunächst getesteten Methoden, die in der Literatur beschrieben waren, war es nicht möglich, zuverlässig zufriedenstellende Ergebnisse zu erhalten. Einzig erfolgversprechend waren die High-Speed/Low-Speed-Zentrifugation nach Brian et al. (1992) und eine selbstentwickelte Zweiphasenzentrifugation, die auf einer Methode von Iralu et al. (1993) basiert. Mit deren Hilfe allein können jedoch nur  $10^5$  Bakterien in 250 mg Stuhl nachgewiesen werden, was für einen diagnostischen Test nicht ausreicht.

Nach zahlreichen Versuchen zur Modifizierung der Methode mit verschiedenen anderen Reinigungsverfahren stellte sich das endgültige Protokoll heraus. Dieses umfaßt eine Vorreinigung der Stuhlsuspension mit einer Low-Speed-Zentrifugation zur Entfernung der Schwebstoffe, die anschließende Anreicherung der Bakterien in der Interphase der Zweiphasenzentrifugation, wodurch die Keime sich vom Rest der Stuhlsuspension gut trennen lassen, sowie die DNA-Präparation mit einem kommerziellen Spin-Column-Set (QIAamp "Blood Kit", Fa. QIAGEN, Hilden) mit anschließender Reinigung der DNA mit CTAB. Mit dieser Methode lassen sich im günstigsten Falle 10 Bakterien in 100 mg Stuhl nachweisen, was als zufriedenstellend angesehen wird.

Im weiteren Verlauf wurde die neue Methode im Vergleich zu anderen Diagnostikverfahren wie der Untersuchung von Magenbiopsien mit Kultur und PCR sowie der serologischen Untersuchung des Patienten auf Antikörper gegen *Helicobacter pylori* evaluiert. Es wurden insgesamt Proben von 41 Patienten untersucht, von denen 17 *Helicobacter pylori*-positiv

waren. Die Stuhl-PCR erreichte eine Sensitivität von 64,7 % bei einer Spezifität von 100 %, einem positiven Voraussagewert von 100% und einem negativen Voraussagewert von 80%, woraus sich eine Voraussagegenauigkeit von 85,4% ergibt. Dies kann sicherlich als für einen diagnostischen Test ausreichend bezeichnet werden. Der Stellenwert der neuen Methode als fragliche Alternative zur Biopsieentnahme oder zur Verlaufskontrolle nach Eradizierungstherapie muß in der Zukunft in Studien mit größeren Fallzahlen überprüft werden.