



Dr. Judith Rohde
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel. +49 511 856-7353
Fax +49 511 856-7697
e-mail:judith.rohde@tiho-hannover.de

Nachweis bakterieller Infektionserreger:

Kultur oder PCR?

Immer öfter erreichen uns Anfragen zur Vergleichbarkeit des Nachweis bakterieller Infektionserreger mittels Kultur oder mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Die Antwort darauf ähnelt dem Versuch Äpfel mit Birnen zu vergleichen, da beide Verfahren ihre Vor- und Nachteile haben.

Der wesentliche Vorteil der Kultur bestehen darin, dass im positiven Fall als Ergebnis ein Isolat vorliegt, das für die Resistenzprüfung und ggf. für die Herstellung von stallspezifischen Vakzinen bzw. Autovakzinen zur Verfügung steht. Ihre Grenzen erreicht die Kultur bei Erregern, die nicht (z.B. Chlamydien) oder nur sehr langsam (z.B. Mykobakterien) auf künstlichen Medien wachsen oder die sehr empfindlich gegen das Überwuchern mit Begleitkeimen sind und für die keine geeigneten Selektivmedien verwendet werden können (z.B. *Mycoplasma hyopneumoniae*). Ob allgemein der Nachweis von „toter“ DNA (im Gegensatz zur Lebensfähigkeit der Bakterien als Voraussetzung für die Kultur) ein Vorteil der PCR ist, darf bezweifelt werden, denn die Anwesenheit eines Krankheitserregers (besser: seiner DNA) ist i.d.R. ein notwendiger aber kein hinreichender Grund für eine Erkrankung. Im übrigen wird auch DNA im Untersuchungsmaterial mit der Zeit degradiert, so dass auch für die PCR frische Proben Voraussetzung sind. Im Gegensatz zur PCR, die nur die Erreger nachweist, nach denen im Ansatz gezielt gesucht wird (festgelegt durch die eingesetzten „primer“ Paare), eröffnet die Kultur, wenn sie breit genug angelegt ist und Ergebnis offen ausgewertet wird, die Möglichkeit primär nicht bedachte Keimgruppen bzw. einen Wandel im Erregerspektrum festzustellen. Dies ist insbesondere bei polyfaktoriellen Erkrankungen bzw. Mischinfektionen von Vorteil. Z.T. wird versucht diesen Nachteil der PCR durch die Anwendung sogenannter multiplex-Verfahren zu kompensieren, bei denen in einem Ansatz nach mehreren Erregern gleichzeitig gesucht wird. Dabei muss generell ein deutlicher Verlust an Sensitivität in Kauf genommen werden, der für die einzelnen Komponenten der multiplex-PCR je nach Größe des PCR-Produkts unterschiedlich stark ausfallen kann. Auch die Spezifität kann unter einem solchen Ansatz leiden, wenn die Reaktionstemperaturen nicht für alle Komponenten gleich stringent sind, so dass es sowohl zu falsch negativen als auch zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann.

Seiten insgesamt
1 / 2

Gerade eine höhere Sensitivität und Spezifität werden generell als Eigenschaften der PCR angesehen. Diese Pauschalisierung ist unzutreffend. Soll Probenmaterial direkt mittels PCR untersucht werden, so muss zuvor die DNA aus der Probe aufgereinigt werden. Das gilt insbesondere für Kotproben, in geringerem Maß auch für Gewebe und Körperflüssigkeiten. Dabei treten unterschiedlich starke Verluste an Ziel-DNA auf. Beispielsweise kann der Nachweis von *Brachyspira hyodysenteriae* mittels Kultur etwa 1000 mal empfindlicher sein als der Nachweis mittels *tlyA*-Gen-PCR (Råsbäck et. al., 2006). Außerdem bergen diese Aufreinigungsverfahren das Risiko der Kreuzkontamination zwischen gleichzeitig bearbeiteten Proben, das auch durch mitgeführte Kontrollen nicht gänzlich beherrschbar ist. Nach der Aufreinigung können nach wie vor Inhibitoren der PCR in der Probe sein, die die PCR unterdrücken oder die Empfindlichkeit senken. Auch diese Effekte müssen durch geeignete Kontrollen überprüft werden.

So wie die Empfindlichkeit der Kultur von den verwendeten Nährmedien abhängt, so haben auch bei der PCR die Auswahl der sogenannten „primer“, die die vervielfältigte Ziel-DNA definieren, und der anderen Reaktionsparameter und Reaktionsbedingungen einen großen Einfluss auf Sensitivität und Spezifität. Beispielsweise können unterschiedliche „primer“-Paare beim Nachweis desselben Untersuchungsziels einen 1000fachen Unterschied in der Empfindlichkeit für diesen Nachweis haben (He et al., 1994). Eine zu niedrige Reaktionstemperatur bei der „primer“-Anlagerung an die Ziel-DNA führt im Beispiel des Nachweises von Chlamydien im Kot von Hühnern bei unkritischer Auswertung zu falsch positiven Ergebnissen (Sachse, 2003). Darüber hinaus gibt es verschiedene Modifikationen der herkömmlichen PCR, die Einfluss auf die Nachweisgrenze haben. Die wichtigste ist die sogenannte Nested-PCR, die aber auch besonders empfindlich gegenüber (Kreuz-) Kontaminationen ist.

Zur Auswahl der „primer“ und zur Durchführung der PCR gibt es genauso wenig wie bei der Kultur z.B. zur Auswahl der Nährmedien verbindlichen Vorgaben oder Standards, so daß die zur Erreichung eines bestimmten Untersuchungsziels verwendeten Verfahren sowohl für den kulturellen Nachweis als auch für den molekularbiologischen von Labor zu Labor durchaus variieren können.

Ein Ausgangspunkt für den Einzug der PCR in die diagnostischen Labors war der zeitliche Vorteil beim Nachweis langsam wachsender Bakterien (s.o.). Dieser Vorteil wird auf den Einsatz bei anderen Bakteriengruppen übertragen. Nach wie vor ist jedoch der Aufwand für die Aufreinigung der Proben und Durchführung der PCR so hoch, daß manche Labors die Proben für eine spezielle PCR über mehrere Tage sammeln, um die Laborabläufe effizienter zu halten. Dadurch nivelliert sich natürlich der Zeitvorteil bei in der Kultur schnell wachsenden Bakterien. Umgekehrt kann die Identifizierung vieler angezüchteter Bakterienarten sowie zusätzlich der Nachweis potentieller Virulenzfaktoren mittels von der Kultur ausgehender PCR rascher und zuverlässiger erfolgen als mit konventionellen Methoden. Spätestens an diesem Punkt heißt es also mit diagnostischem Gewinn „culture meets PCR“.