

Molekulare Methoden

Die Verfahren beruhen darauf, dass bei den Erregern bestimmte Sequenzen ihrer Nukleotide speziesspezifisch vorkommen.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Prinzip

Die PCR geht von DNA aus, deren Doppelstränge zunächst durch Erwärmen getrennt werden. Dann werden synthetische Oligonukleotide (Primer) hinzugefügt, die komplementär zu den Enden des gesuchten Genomabschnitts sind und sich an diese Enden anlagern (hybridisieren). Sie definieren so den Anfang bzw. das Ende des zu kopierenden DNA-Abschnitts. Die anschließend zugegebene DNA-Polymerase kopiert nun den gesuchten Genomabschnitt. Dieser Zyklus (Erwärmen, Oligonukleotide, Polymerase) wird mehrfach wiederholt, sodass schließlich sehr viele neu synthetisierte DNA-Stränge definierter Länge vorliegen. Diese gleich langen DNA-Stränge können mit einer Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Kopieren und
Vervielfältigen
von Genom-
abschnitten



Die PCR ist eine In-vitro-Amplifikation, also sozusagen eine künstliche Vermehrung eines Gens im Reagenzglas.

Real-Time-PCR

Es ist auch möglich, am Ende eines jeden PCR-Zyklus zu prüfen, wie viele neu synthetisierte Stränge vorliegen, indem diese Stränge durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert werden (Quantifizierung durch Fluoreszenzmessung). Dieses Verfahren wird als Real-Time-quantitative PCR bezeichnet (RTQ-PCR).

Beurteilung

Hohe Sensi-
tivität

Das Verfahren bietet eine hohe Sensitivität und kann selbst geringste Bakterienmengen sowohl qualitativ als auch quantitativ nachweisen.

Gegenüber den anderen erwähnten Methoden ist dies die Stärke des Verfahrens.

Allerdings sind die Ergebnisse dieser Untersuchungsmethode mit Vorsicht zu interpretieren:

Interpretation
der Ergebnisse

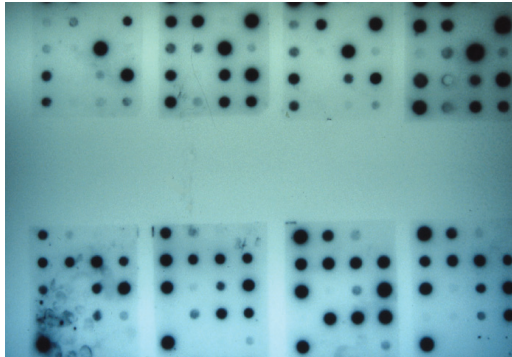
- Auch 10 oder 100 PORPHYROMONAS-ZELLEN werden durch die PCR nachgewiesen, sind aber sicher nicht praxisrelevant.
- Durch die nicht linear verlaufende In-vitro-Vermehrung bei der PCR kann die Relation der Bakterien zueinander verschoben werden. Es ist für die Behandlung aber enorm wichtig zu wissen, in welchem Verhältnis z.B. AGGREGATIBACTER (ACTINOBACILLUS) ACTINOMYCETEMCOMITANS zu Anaerobiern steht.

DNA-Sonden-Hybridisierung

Prinzip

DNA-Sonden sind entweder radioaktiv oder z.B. mit Fluoreszenzfarbstoff markierte DNA-Einzelstränge, die sich an komplementäre Einzelstränge der zu untersuchenden DNA anlagern (hybridisieren, das heißt die beiden Nukleinsäuren-Einzelstränge bilden eine Doppelstrang-Nukleinsäure). Das untersuchte Material ist also positiv, wenn eine Hybridisierung möglich ist, wenn also die Basenreihenfolge der DNA-Sonde (Sequenz) 100%ig komplementär zu den Sequenzen der Bakterien im Material ist. Im Falle einer Fluoreszenzmarkierung der Einzelstränge können die Bakterien dann mithilfe von Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzlicht, das z.B. einen Röntgenfilm schwärzt (Abb. 2.1), oder über Spezialkameras ausgelesen werden. Die Proben werden bezüglich ihrer Intensität mit Referenzen abgeglichen. So können die Art (Qualität) und die ungefähre Zellzahl (Quantität) der Bakterien in der Probe bestimmt werden.

Bestimmung
von Art und
Anzahl der
Bakterien

**Abb. 2.1**

Beispiel für das sichtbar gemachte Ergebnis einer DNA-Sonden-Hybridisierung. Mithilfe von Fluoreszenzmarkierung sind die Bakterien sichtbar gemacht, eine stärkere Schwärzung bedeutet eine höhere Keimanzahl.

Präziser und
verlässlicher
Nachweis

Anwendung bei
Parodontitis
und Peri-
implantitis

Beurteilung

Die DNA-Sonden-Hybridisierung (ggf. mit vorgeschalteter PCR in der Variante der Genchip-Hybridisierung) ist derzeit das einzige Verfahren, das die Forderungen nach einem präzisen und verlässlichen Nachweis pathogener Keime qualitativ und quantitativ erfüllt.

Die Sensitivität dieser Methode wird heute mit 10^3 Zellen pro Untersuchungsmaterial angegeben. Damit wird ihre Aussagekraft für die klinische Diagnostik der Parodontitis als ausreichend angesehen. Eine weitere mögliche Anwendung ist die Diagnostik der Erreger einer Periimplantitis, die ja durch das gleiche Keimspektrum verursacht und unterhalten wird.

Gen-Chips

Prinzip

Nachweis von
Art und Menge
der Eiweiße im
Untersuchungs-
material

Ein Gen-Chip (Microarray) ist ein Untersuchungsmedium in Form eines Glasplättchens mit den Ausmaßen nur weniger Quadratzentimeter. Seine Oberfläche enthält in einem Raster angeordnete winzige, mitunter bis zu 400.000 kleine Kammern. In jeder dieser Kammern befindet sich das Bruchstück eines DNA-Moleküls. Enthält das Untersuchungsmaterial dazu passende mRNA, verbinden sich DNA-Moleküle und mRNA miteinander. Durch eine Farbstoffmarkierung kann aus dem Muster der unter einem Laser aufleuchtenden Lichtsignale auf die

Art und Menge der Eiweiße geschlossen werden, die im Untersuchungsmaterial vorzufinden sind.

Beurteilung

Gen-Chips stellen eine der derzeit wohl am weitesten fortgeschrittenen Untersuchungsmethoden dar. In der Zukunft werden sie noch weitaus mehr Raum in der Diagnostik einnehmen als bisher. Wir werden Ihnen im Rahmen der PA-Diagnostik ein solches Testverfahren vorstellen.

Fortgeschrittene Untersuchungsmethode