

Entwicklung eines sensitiven PCR-verfahrens zur Detektion von *Helicobacter pylori*-DNA aus Archivmaterial

Shirin Bakhtiarvand, BMA 23-26

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Inselgruppe AG, Clinical Genomics Lab (CGL), Molekularpathologie

1. Zusammenfassung

Helicobacter pylori ist ein weltweit verbreitetes bakterielles Pathogen und mit verschiedenen Magenerkrankungen assoziiert. Der Nachweis aus formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe (FFPE) ist aufgrund der häufig fragmentierten DNA diagnostisch anspruchsvoll. Ziel dieser Diplomarbeit war die Entwicklung und Optimierung einer Nested-PCR zum sensitiven Nachweis von *H. pylori*-DNA aus FFPE-Magengewebe. Die optimierte semi-nested-PCR mit der Primerkombination Heli 1+4 zeigte die beste Spezifität. Bei der Untersuchung von 34 FFPE-Patientenproben wurden im Vergleich zur Immunhistochemie (IHC) eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 90% erreicht. Die Ergebnisse zeigen, dass die optimierte semi-nested-PCR eine sensitive und spezifische Ergänzung zur bestehenden histologischen und immunhistochemischen Diagnostik darstellt.

2. Einleitung

Helicobacter pylori besiedelt die Magenschleimhaut und gehört zu den häufigsten bakteriellen Infektionserregern des Menschen. Eine Infektion kann unter anderem chronische Gastritis, peptische Ulzera und Magenkarzinome verursachen [1]. Für eine zuverlässige Diagnostik ist daher ein sensibler und spezifischer Erregernachweis entscheidend. Bei der Untersuchung von FFPE-Gewebe stellt die durch Formalin verursachte Fragmentierung der DNA eine besondere Herausforderung dar. Zudem können andere *Helicobacter*-Spezies, wie *H. heilmannii*, die eindeutige molekulare Identifikation erschweren [2]. Daher sind kurze Zielsequenzen und Hochspezifische Primer für den PCR-basierten Nachweis aus FFPE-Material von besonderer Bedeutung. Abbildung 1 zeigt mikroskopische Darstellung von *Helicobacter pylori* mit IHC-Färbung.

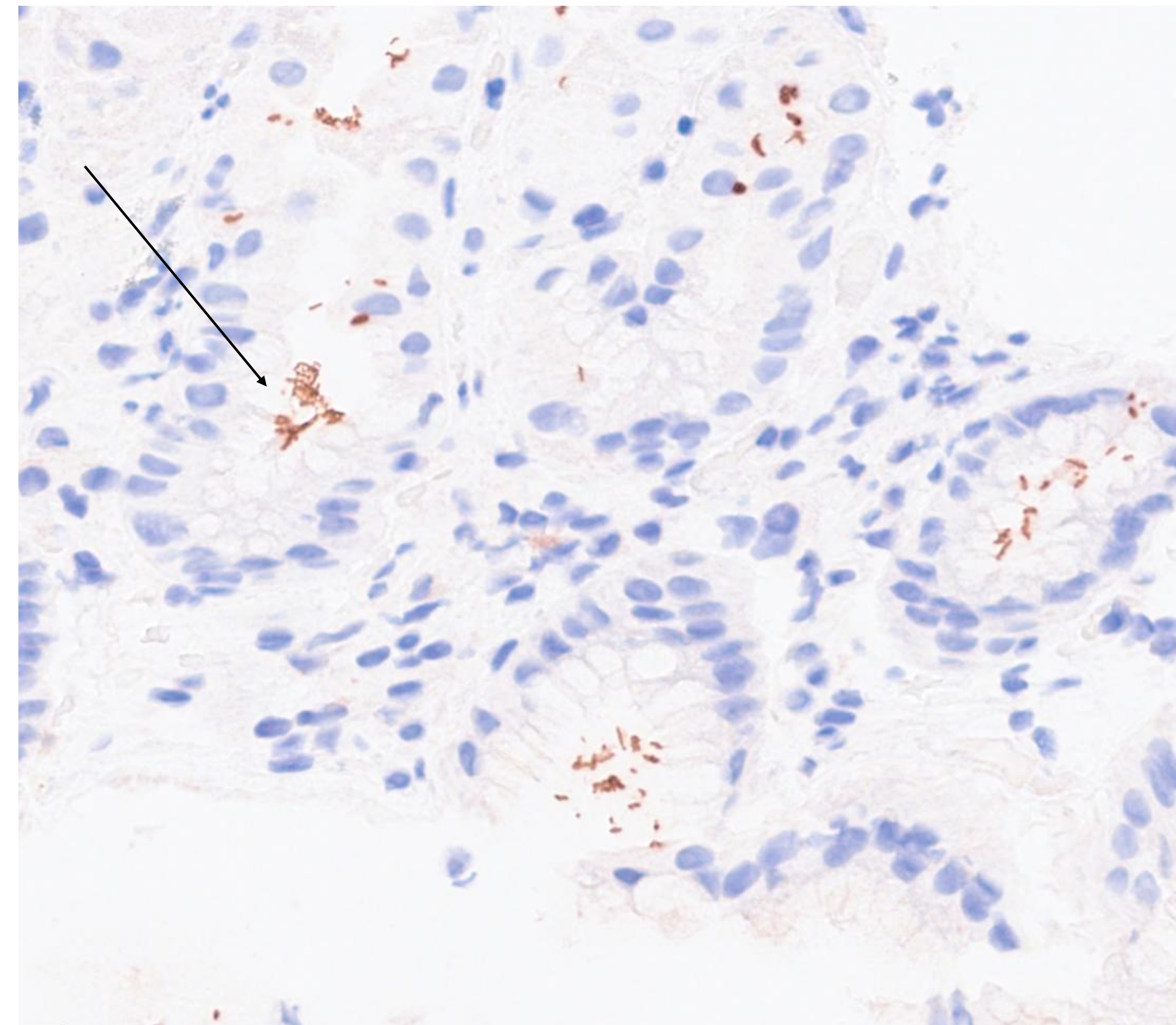


Abb. 1: Immunhistochemischer Nachweis von *Helicobacter pylori* aus FFPE-Material. Die braunen Signale markieren die Bakterien, (IGMP-adaptiert, 2026)

3. Ziele und Fragestellungen

Ziel 2- Evaluation am Patientenmaterial

Evaluation der in Ziel 1 optimierten Nested-PCR zum Nachweis von *Helicobacter pylori*-DNA aus FFPE-Magengewebe im Vergleich zu IHC und bestehenden PCR-Verfahren. Untersucht werden die Nachweisleistung bei geringer bakterieller Belastung und mögliche Kreuzreaktionen mit *H. heilmannii* [3].

Fragestellung:

Welche Sensitivität und Spezifität erreicht die Methode?
Ist sie sensibler als IHC und bisherige PCR-Verfahren?
Können Kreuzreaktionen mit *H. heilmannii* ausgeschlossen werden?

Abbildungen

Abb. 1 IGMP (2026), Immunhistochemische Abbildung
Abb. 2 Claud (KI-Foto), nested-PCR-Methode

4. Material, Methodik, Vorgehen

Untersucht wurden 34 anonymisierte FFPE-DNA-Proben. Davon stammen 25 Proben aus Magengewebe mit bereits vorliegenden CGL-PCR-Befunden, fünf Proben aus Nicht-Magengewebe und vier Proben mit nachgewiesenem *H. heilmannii*. Die Proben wurden mit zwei zweistufigen PCR-Formaten untersucht:

- Nested-PCR: in der Zweiten PCR-Runde werden zwei neue innere Primer verwendet.
- Semi-Nested PCR: Ein Primer aus der ersten Runde wird beibehalten und nur einer ausgetauscht.

Beide Verfahren zielen auf eine Erhöhung der Sensitivität und Spezifität ab und eignen sich insbesondere für die Analyse fragmentierter DNA. Abbildung 2 zeigt das Prinzip der Nested-PCR.

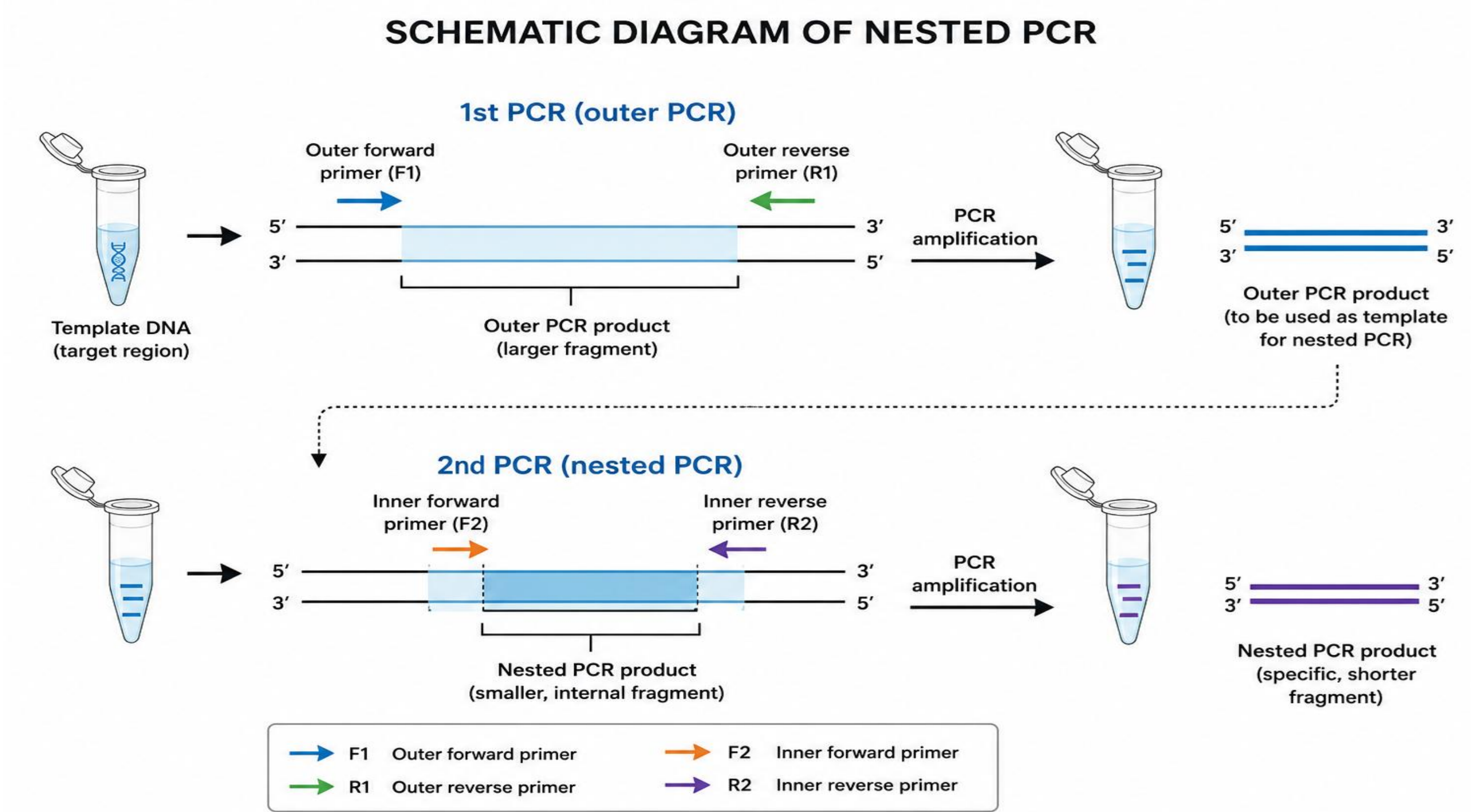


Abb. 2: Nested PCR Methode, (Claud, 2026)

5. Ergebnisse/ Resultate

Die optimierte semi-nested PCR (Heli 1+4) und die Nested-PCR (Heli 1+2) zeigten bei allen 34 untersuchten Proben eine 100%ige Konkordanz. Von den 20 IHC-positiven Proben konnte *H. pylori* in 18 Fällen (90 %) mittels PCR nachgewiesen werden. Die IHC-negativen Proben waren bei beiden PCR-Verfahren durchgehend negativ. Auch die vier *H. heilmannii*-positiven Proben zeigten keinen PCR-Nachweis von *H. pylori*. Im Vergleich zur bestehenden CGL-PCR unterschieden sich die Ergebnisse lediglich in zwei Fällen. Die auffälligen Fälle sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Vergleich der wichtige PCR-Ergebnisse –eigene Darstellung (Bakhtiarvand, 2026)

Fall	IHC	Resistenz-PCR	Semi-nested	Nested-PCR
1	Negativ	Positiv	Negativ	Negativ
11	Positiv	Negativ	Positiv	Positiv
25	Positiv	Negativ	Negativ	Negativ

6. Diskussion

Die semi-nested-PCR zeigte im Vergleich zur IHC eine Sensitivität von 18/20. zwei abweichende Fälle waren potenziell *H. heilmannii*-positiv. Die Konkordanz mit der Nested-PCR betrug 100 % wobei die Semi-nested-PCR stärkere und spezifischere Banden zeigte und besonders bei fragmentierter DNA aus FFPE-Material als robust erwies. Vorteile waren zudem das einfachere Protokoll mit nur drei Primern sowie die hohe Spezifität ohne Kreuzreaktion mit *H. heilmannii*. Im Vergleich zur Resistenz-PCR bleibt die Sensitivität und Spezifität unklar, Fall 11 war dort negativ, jedoch in beiden Nested-PCR Varianten positiv, was auf eine potenziell höhere analytische Sensitivität hinweist, und weitere Validierung bedarf.

Referenzen

- [1] Suerbaum, S. (2016).
- [2] Trebesius et al., 2001
- [3] Zsikla, et al (2006)

Tabelle

Tabelle 1 Bakhtiarvand, S., (2026). Vergleich der wichtige PCR-Ergebnisse