

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Techniken</b>	<b>15</b>
2.1.	Nukleinsäure-Isolierung	15
2.2.	Nukleinsäure-Direktnachweis	19
2.2.1.	Nukleinsäure-Hybridisierung zum Direktnachweis von Erregern im Untersuchungsmaterial	19
2.3.	Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT)	22
2.3.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
2.3.2.	Nested PCR	24
2.3.3.	Reverse Transkriptase (RT)-PCR	25
2.3.4.	Ligase-Kettenreaktion (LCR)	25
2.3.5.	NASBA, 3SR, TMA und TAS	25
2.3.6.	Strand Displacement Amplification (SDA)	27
2.3.7.	Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)	28
2.4.	Nachweis von spezifischen Amplifikationsprodukten	28
2.4.1.	Qualitative oder quantitative Detektion?	29
2.5.	Real-time-PCR-Verfahren	34
2.5.1.	Detektionsverfahren mit Doppelstrang-spezifischen Farbstoffen (ohne Sonden)	36
2.5.2.	Sondenbasierte Verfahren	37
2.5.3.	Hydrolyse (TaqMan)-Sonden und Molecular Beacons	37
2.5.4.	Fluoreszenzmarkierte Primer	38
2.5.5.	FRET-Hybridisierungssonden	39
2.5.6.	Thermocycler für die real-time-PCR	42
2.5.7.	Diagnostische Fragestellungen	46
2.6.	DNA-Sequenzierung	47
2.7.	Next-Generation-Sequenzierung in der medizinischen Forschung	48
<b>3</b>	<b>Reaktionsparameter und diagnostischer Workflow</b>	<b>52</b>
3.1.	Analytische Sensitivität von NAT-Nachweisverfahren	52
3.2.	Analytische Spezifität von NAT-Nachweisverfahren	55
3.3.	Diagnostische Sensitivität und Diagnostische Spezifität	57
3.4.	Positiver und Negativer Prädiktionswert	57
3.5.	Kriterien zur Evaluierung von eigenentwickelten NAT-Testsystemen	57
3.6.	Präanalytik	70
3.7.	Kontaminationsproblematik und Raumkonzept	71
3.8.	Qualitätsmanagement und externe Qualitätskontrolle	74
<b>4</b>	<b>Beispiele aus der mikrobiologischen Praxis für PCR-gestützte Nachweisverfahren – bakterielle Nachweise</b>	<b>77</b>
4.1.	PCR-Verfahren zum Direktnachweis von Methicillin-resistenten <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	77
4.2.	Pathogene <i>Escherichia coli</i> (EHEC, EPEC u.a.)	85
4.2.1.	EHEC	86
4.2.2.	EPEC	88
4.3.	<i>Borrelia burgdorferi</i>	88

4.4.	<i>Tropheryma whippiei</i> .....	90
4.5.	Bakterielle Erreger bei "atypischen" Pneumonien .....	92
4.6.	<i>Chlamydia trachomatis</i> .....	93
4.7.	Mykobakterien .....	95
4.7.1.	Erreger und klinische Manifestation .....	95
4.7.2.	Mikrobiologische Diagnostik .....	96
4.7.3.	Mykobakterien-Nachweis mittels NAT in klinischen Proben .....	97
4.7.4.	Molekularbiologische Methoden der Speziesidentifizierung .....	98
4.7.5.	NAT-basierte Resistenztestung von <i>M. tuberculosis</i> -Komplex .....	99
4.8.	<i>Toxoplasma gondii</i> .....	100
4.9.	Leishmanien .....	102

<b>5.</b>	<b>Beispiele aus der mikrobiologischen Praxis für PCR-gestützte Nachweisverfahren – virale Nachweise</b>	<b>106</b>
5.1.	Molekulare Resistenztestung .....	106
5.2.	Clarithromycin-Resistenz bei <i>Helicobacter pylori</i> .....	106

<b>6.</b>	<b>Speziesübergreifende Nachweisverfahren – die Königsdisziplin?</b>	<b>110</b>
6.1.	Kontaminationsproblematik .....	112
6.2.	Microarrays zur Analyse von Mischpopulationen .....	113

<b>7.</b>	<b>NAT in der Virusdiagnostik – Anwendungsbereich und geeignetes Untersuchungsmaterial</b>	<b>115</b>
7.1.	Adenoviren .....	115
7.2.	Bocavirus (BoV) .....	116
7.3.	Coronaviren .....	116
7.4.	Dengueviren .....	116
7.5.	Enteroviren (Polio, Coxsackie, ECHO) .....	117
7.6.	Epstein-Barr-Virus (EBV) .....	117
7.7.	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSMEV) .....	118
7.8.	Hantaviren .....	118
7.9.	Hepatitis-A-Virus (HAV) .....	118
7.10.	Hepatitis-B-Virus (HBV) .....	119
7.11.	Hepatitis-C-Virus (HCV) .....	119
7.12.	Hepatitis-D-Virus (HDV, Delta-Agens) .....	119
7.13.	Hepatitis-E-Virus (HEV) .....	120
7.14.	Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2 (HSV-1, HSV-2) .....	120
7.15.	Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6) .....	121
7.16.	Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8) – Kaposi-Sarkom-assoziertes-Herpesvirus (KSHV) .....	121
7.17.	Humanes Immundefizienzvirus, Typ 1 und 2 (HIV-1, HIV-2) .....	122
7.18.	Humanes Metapneumovirus (hMPV) .....	122
7.19.	Influenzaviren .....	122
7.20.	Masernvirus .....	123
7.21.	Molluscum-contagiosum-Virus .....	123
7.22.	Mumpsvirus .....	123
7.23.	Norovirus .....	123

7.24.	Papillomaviren (HPV) .....	124
7.25.	Parainfluenzavirus Typen 1-4 .....	124
7.26.	Parvovirus B19 .....	124
7.27.	Polyomaviren (JC- und BK-Virus [JCV, BKV]) .....	125
7.28.	Respiratory-Syncytial-Virus (RSV) .....	125
7.29.	Rötelnvirus (Rubella) .....	126
7.30.	Rotaviren .....	126
7.31.	Varizella-Zoster-Virus (VZV) .....	126
7.32.	West-Nil-Virus (WNV) .....	127
7.33.	Zytomegalievirus (CMV) .....	127

	<b>Literatur</b>	<b>128</b>
--	------------------	------------

	<b>Index</b>	<b>135</b>
--	--------------	------------