

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	13
2. Techniken	15
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. <i>Nested</i> 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. <i>Real-time</i> -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 <i>real-time</i> -PCR	42
2.5.7. Diagnostische Fragestellungen	46
2.6. DNA-Sequenzierung	47
2.7. Next-Generation-Sequenzierung in der medizinischen Forschung	48
3. Reaktionsparameter und diagnostischer Workflow	52
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
4. Beispiele aus der mikrobiologischen Praxis für PCR-gestützte Nachweisverfahren – bakterielle Nachweise	77
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 whipplei</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

Beispiele aus der mikrobiologischen Praxis für PCR-gestützte

Nachweisverfahren – virale Nachweise 106

5.1.	Molekulare Resistenztestung	106
5.2.	Clarithromycin-Resistenz bei <i>Helicobacter pylori</i>	106

Speziesübergreifende Nachweisverfahren – die Königsdiziplin?

110

6.1.	Kontaminationsproblematik	112
6.2.	Microarrays zur Analyse von Mischpopulationen	113

NAT in der Virusdiagnostik – Anwendungsbereich und geeignetes

Untersuchungsmaterial 115

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
 3.	Literatur	128
 ■	Index	135