

Der Direkte Darmprotozoennachweis mittels multipler Amplifikation, Multiplex-PCR und Chip-Detektion.

Andreas Hassl, Wolfgang Tuma

Klinisches Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, Medizinische Universität Wien, Ö.
Fachhochschule Gelsenkirchen, Recklinghausen, D.

Die Diagnostik von Darmprotozoen im menschlichen Stuhl beruht heute meist immer noch auf einem direkten mikroskopischen Nachweis von Zysten, Oozysten, Sporen oder anderer Stadien von parasitären Einzellern nativ oder mittels unspezifischer Färbungen. Dieser Nachweis ist arbeitsintensiv, daher teuer, schlecht standardisierbar, und erfordert wegen des Formenreichtums hohe diagnostische Kompetenz.

Einer opportunen Automatisierung der parasitologischen Stuhldiagnostik stehen hauptsächlich die Formenvielfalt der Erreger und die Materialbeschaffenheit entgegen. Polymerasekettenreaktionen (PCR) in Mehrfachansätzen mit gleichem Protokoll und Multiplex-PCR-Verfahren ermöglichen es aber, mehrere Erreger in einem automatisierbaren Arbeitsgang gleichzeitig zu erfassen. Der Aufbau solcher PCR-Systeme ist weit fortgeschritten und bereits in der Erprobungsphase. Gemessen an der Mikroskopie als Standardverfahren erweisen sich PCR-Verfahren wie erwartet als sensitiv, aber wenig spezifisch, alles in allem aber als vielversprechend. Die Entwicklung eines Microarrays zur spezifischen Detektion der Amplifikate aus einer Multiplex-PCR ermöglicht einen einfachen und Bearbeiter unabhängigen Nachweis von Darmprotozoen. An der Entwicklung eines solchen Microarrays – der im Gegensatz zur herkömmlichen Biochip-Technologie relativ wenige Fragestellungen mit einem relativ hohen Probenaufkommen verbinden können muss – wird gearbeitet.

Als derzeit schwierigstes Problem im Rahmen des Aufbaus einer verlässlichen Darmprotozoen-Amplifikationstechnik erweist sich die Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials. Ca. 10% der Stuhlproben enthalten unbekannte Amplifikationshemmer in unterschiedlicher Konzentration. Ein Schwerpunkt der gegenwärtigen Entwicklungsarbeit ist also die gestalterisch vergleichsweise wenig anspruchsvolle Entdeckung und Eliminierung solcher Hemmsubstanzen. Das Ziel einer Ausschaltung von Hemmstoffen könnte auch durch eine veränderte DNS-Isolierungsprozedur erreicht werden.

Nach einer erfolgreichen Lösung dieser Einzelprobleme scheint aus heutiger Sicht der Entwicklung bis zur Marktreife einer Multiplex-PCR mit einer Detektion des Amplifikats durch einen Microarray zum Nachweis von beim Menschen parasitierenden Darmprotozoen innerhalb weniger Jahre kein Hindernis mehr entgegen zu stehen.