

Oliver Wankmüller
Dr. med.

Entwicklung einer „real-time PCR“-Methode zur Detektion und Differenzierung von *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* und *Entamoeba moshkovskii*

Geboren am 09.02.1968 in Pforzheim
Staatsexamen am 22.05.1996 an der Humboldt-Universität zu Berlin

Promotionsfach: Hygiene
Doktorvater: Prof. Dr. Michael Lanzer

Die Amöbiasis zählt mit jährlich 500 Millionen Erkrankten, 50 Millionen invasiven Erkrankungen und circa 100000 tödlich verlaufenden Komplikationen zu den weltweit häufigsten Parasitosen. *Entamoeba histolytica*, als Erreger der Amöbiasis, führt nach einer variablen Phase der asymptomatischen Besiedlung zu einer akuten Rektokolitis. Gefährlichste Komplikationen der Amöbenruhr stellen die Perforation mit Peritonitis, die akute nekrotisierende Kolitis und das toxische Megakolon dar. Der Amöbenleberabszeß ist die häufigste Manifestation der extraintestinalen Amöbiasis. Jede Infektion mit *Entamoeba histolytica* ist behandlungsbedürftig. Die mittlere Halbwertszeit der Ausscheidung von *Entamoeba histolytica* beträgt bei unbehandelten Personen circa 13 Monate, in Einzelfällen mehrere Jahre. Zur antiparasitären Therapie der akuten Amöbiasis stehen Nitroimidazole wie Metronidazol und Tinidazol zur Verfügung. Zur Eliminierung der im Darmlumen auch nach Nitroimidazol-Therapie verbleibenden Amöbenzysten oder zur Sanierung einer Besiedlung durch *Entamoeba histolytica* kommt Paramomycin mit einer dem Diloxanid-furoat überlegenen Wirksamkeit zur Anwendung. Als diagnostische Methoden der intestinalen Amöbiasis haben sich der mikroskopische Nachweis von Zysten oder Trophozoiten im Stuhl, verschiedene Antigen-ELISA und molekularbiologische Nachweismethoden etabliert. Serologie und bildgebende Verfahren haben in der Diagnostik der extraintestinalen Manifestationen der Amöbiasis ihren Stellenwert.

Morphologisch unterscheiden sich die ebenfalls den menschlichen Darm besiedelnde apathogene *Entamoeba dispar* und die überwiegend als apathogen eingeschätzte *Entamoeba moshkovskii* von *Entamoeba histolytica* nicht. Die Mikroskopie ist daher zur spezifischen Diagnostik der Amöbiasis ungeeignet.

Die Sensitivität und Spezifität der unterschiedlichen Antigen-ELISA zur Detektion von *Entamoeba histolytica* sind unsicher, der Stellenwert der Antigen-ELISA in der Diagnostik der Besiedlung oder Infektion mit *Entamoeba histolytica* ist umstritten.

Eine deutliche Verbesserung der Diagnostik stellen Testmethoden auf der Grundlage molekularbiologischer Verfahren dar. Moderne Amplifikationstechniken bedienen sich der real-time PCR Methode im geschlossenen Reaktionsgefäß. Wird eine Standardkurve mitgeführt, ist die Bestimmung der Parasitendichte möglich. Nukleinsäureamplifizierende Methoden besitzen eine 1.000- bis 10.000-fach höhere Sensitivität als Antigen-ELISA. Hoch konservierte Gensequenzen finden sich in der SSU rDNS, die ribosomale RNS kodieren und ermöglichen eine hohe Spezifität der Bestimmung und Differenzierung der einzelnen Amöbenspezies. Die hohe Sensitivität nukleinsäureamplifizierender Methoden kann durch die Auswahl von Genabschnitten unterstützt werden, die als Multikopiengen vorliegen. Die von uns entwickelte real-time PCR-Methode nutzt einen hoch konservierten Genabschnitt der SSU rDNS, der als Multikopiengen vorliegt. Ein Basenaustausch in der amplifizierten Gensequenz bei *Entamoeba dispar* und *Entamoeba moshkovskii* ermöglicht über die Erniedrigung des Schmelzpunktes bei *Entamoeba dispar* und *Entamoeba moshkovskii* in einer

der Amplifikation angeschlossenen Schmelzkurvenanalyse die Differenzierung der verschiedenen Amöbenspezies *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* und *Entamoeba moshkovskii* im geschlossenen Reaktionsgefäß. Die hohe Sensitivität und Spezifität der Methode konnte in einer Validation und dem Vergleich der Ergebnisse mit Daten aus der Literatur belegt werden. Die Diagnostik von *Entamoeba histolytica* stützt sich auch heute noch, in weiten Teilen der Welt, auf den mikroskopischen Nachweis von Zysten im Stuhl. Bei jährlich 500 Millionen Erkrankten rückt der Aspekt der Wirtschaftlichkeit diagnostischer Methoden immer mehr in den Fokus der Forschung. Durch die zwar kostengünstige aber unspezifische mikroskopische Diagnostik werden hohe Raten an überdiagnostizierter Amöbiasis generiert, die eine vermeidbare antiparasitäre Therapie nach sich zieht. Der Einsatz spezifischer Nachweisverfahren, von der WHO schon seit 1997 gefordert, würde eine Übertherapie vermeiden und deutlich überhöhte epidemiologische Daten korrigieren. Der von uns entwickelte Nukleinsäurenachweis birgt ein hohes Potential der Kosteneffizienz und einen hohen epidemiologischen Nutzen in sich.