



**Teil B: Der schnelle Weg zur  
richtigen Diagnose und Therapie –  
Vorteile der PCR Diagnostik im  
ambulanten Praxisalltag**

# Abteilung Molekularbiologie

Molekularbiologischer Nachweis mittels real-time-PCR



Abb. 1: LightCycler® 480 Instrument (Roche LifeScience)

# Was genau heißt PCR?

- Polymerase-Kettenreaktion, engl. Polymerase Chain Reaction
- Direkter Nachweis von DNA (bzw. RNA) eines Krankheitserregers in wenigen Stunden
- Amplifikation eines gesuchten DNA-Fragment durch eine spezielle Enzymreaktion
- Fluoreszenz-markierte Sonden können die DNAs von Krankheitserregern „sichtbar“ machen

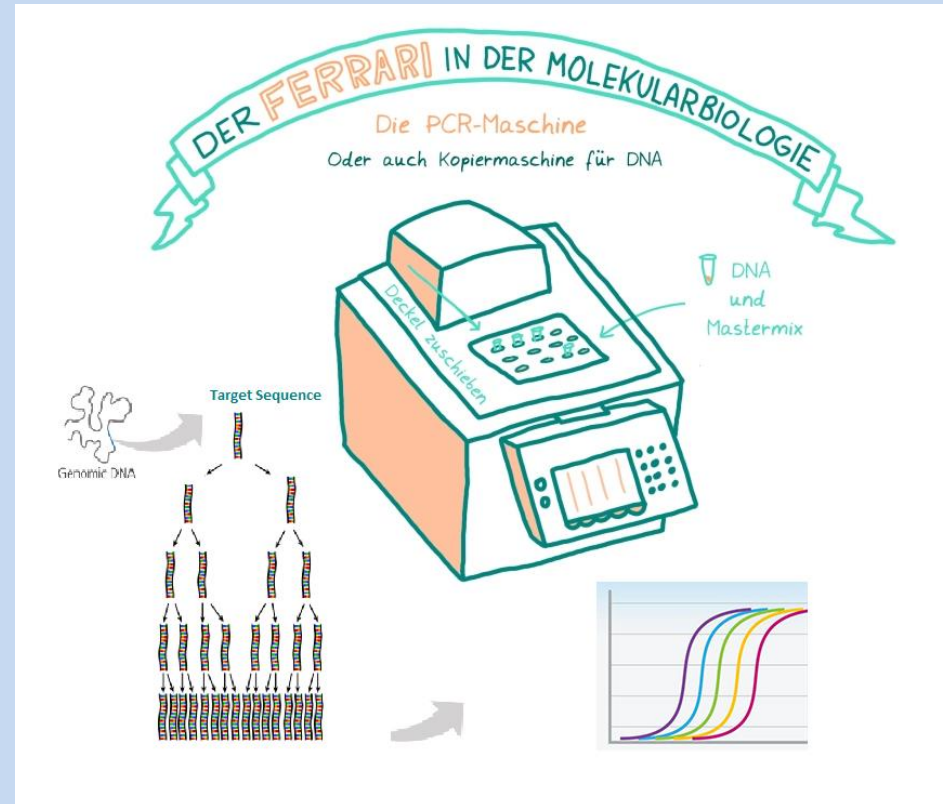


Abb. 2: PCR Workflow (CRISPER Whisper)

# Vorteile der PCR

- Die PCR ist eine sehr sensitive und spezifische Methode zum Direktnachweis von Erreger-DNA
- Sehr schnelle Diagnostik (qPCR , real-time-PCR)
- Nachweis bereits kleinster Mengen an Erreger-DNA/RNA

## Wichtig zu wissen:

Ein **negatives PCR Ergebnis** schließt eine Infektion mit hoher Wahrscheinlichkeit aus. Ein **positives Ergebnis** beweist nicht das Vorliegen einer aktiven Infektion, da mit PCR-Verfahren auch DNAs von nicht mehr vermehrungsfähigen Erregern erfasst werden.

# Vorteile der PCR gegenüber Serologie und Mikrobiologie

- Unabhängig von der Immunantwort (Impfung, Kreuzreaktivität)
- Schneller als die mikrobiologische Kultur
- Nachweis von unkultivierbaren oder anspruchsvollen Bakterien
- Zeitlich flexiblerer Proben transport und -lagerung
- Gleichzeitiger Nachweis von mehreren Krankheitserregern ist möglich (Multiplex-PCR)
- Geeignet als Therapieerfolgskontrolle

# Grenzen der PCR

- Nachweis toter Erreger-DNA / kleinster Erregermengen
- Bedeutung von Ergebnissen ohne „therapeutischen Impact“
- Kein Antibiogramm
- Ungeeignetes Probenmaterial

# PCR Grenzen – Ungeeignetes Probenmaterial

## Nukleinsäure-Extraktion:

- Quantität und Qualität der Nukleinsäure-Extraktion ist essentiell wichtig für ein aussagekräftiges PCR-Ergebnis

### ❖ Abhängig vom Probenmaterial

Abb. 3: **eSwab**-Abstrich  
mit Transportmedium  
(für Bakterienkultur und  
PCR-Verfahren geeignet)  
(Copan/Interpath)



Abb.4: trockener Abstrich  
**OHNE GEL** (Sarstedt)

# PCR Grenzen – Ungeeignetes Probenmaterial

## Nukleinsäure-Extraktion:

- ❖ PCR-Inhibitoren müssen entfernt werden

(Salze, organische Chemikalien, Ethanol, Polysaccharide, Phenole, Proteine, ...)

- ❖ DNA Extrakte können degradieren

(DNAsen, Temperaturschwankungen)

- ❖ DNA verschiedener Organismen kann unterschiedlich schwer oder leicht isoliert werden

(Fremd-DNA, Kontaminationen)



# Molekularbiologische Untersuchungen

## *Chlamydia trachomatis*

Target: kryptische CT-Plasmid und ompA-Gen

- *C. trachomatis*-Untersuchung (symptomatisch, Vorsorge-Screening unter 25 Jahren oder Mutterschaftsvorsorge)

Untersuchungsmaterialien für die *Chlamydien*-PCR:

- Erststrahlurin
- Urogenitalabstriche (Zervix, Vaginal, Urethra)

# Molekularbiologische Untersuchungen

## *Neisseria gonorrhoeae*

- PCR bevorzugte Nachweismethode, da unabhängig von Vitalität der temperatursensiblen Gonokokken
- Nachteil der PCR: bisher keine Resistenztestung möglich

Untersuchungsmaterial für die *Neisseria gonorrhoeae*-PCR:

- Erststrahlurin
- Urogenitalabstrich (Zervix, Vagina, Urethra)

# Molekularbiologische Untersuchungen

## Sexuell übertragbare Infektionen (STI)

STI Panel  
für **Frauen**

(IGEL  
Leistung)

- *Chlamydia trachomatis*
- *Neisseria gonorrhoeae* (Tripper)
- *Mycoplasma genitalium*
- *Trichomonas vaginalis*
- *Mycoplasma hominis*
- *Ureaplasma urealyticum/parvum*
- Herpes simplex Virus 1/2
- *Treponema pallidum* (Syphilis)

STI Panel  
für  
**Männer**

### Untersuchungsmaterial für die STI-PCR:

- ❖ Erststrahlurin
- ❖ Urogenitalabstrich (Zervix, Vagina, Urethra)

# Molekularbiologische Untersuchungen

## Urogenitale Mykoplasmen

- *Mycoplasma genitalium*
- *Mycoplasma hominis*
- *Ureaplasma urealyticum/parvum*
  - ❖ Zellwandlose Saprophyten
  - ❖ Sehr umweltlabil (Lagerungs- und Transportzeit)
  - ❖ Lange Generationszeit und langsam wachsend

# Molekularbiologische Untersuchungen

## *Mycoplasma genitalium*

- STI-Erreger für nichtgonorrhöische-Urethritis, Zervizitis und Schwangerschaftskomplikationen
- Pathogenetisch ähnlich wie *C. trachomatis*
- Oft asymptomatisches Auftreten
- Häufige als Koinfektion mit anderen STIs (*C. trachomatis* u./o. *N. gonorrhoeae*)
- Kulturelle Anzucht im Routinelabor nicht möglich
- Aufgrund der Ähnlichkeit zu *M. pneumoniae* sind Kreuzreaktionen bei serologischen Nachweisen möglich

# Molekularbiologische Untersuchungen

## *Mycoplasma hominis & Ureaplasma urealyticum/parvum*

➤ *neue Leitlinie*

➤ *Normalflora ?*

Leitlinien-Detailansicht

Angemeldetes Leitlinienvorhaben

Registernummer 059 - 007 Klassifikation **S2k**

---

Mykoplasmen, Ureaplasmen

---

<b>Anmeldedatum:</b>	09.07.2018
<b>Geplante Fertigstellung:</b>	31.12.2019
<b>Gründe für die Themenwahl:</b>	Epidemiologie, Resistenzsituation, neue diagnostische Verfahren
<b>Zielorientierung der Leitlinie:</b>	1. Verbesserung der Diagnostik von Mykoplasmen, Ureaplasmen, 2. Vermittlung der Wertigkeit von positiven Testbefunden, 3. Einordnung zu Therapieindikationen, 4. Verbesserung der Therapie 5. Verminderung von Resistenzen

Abb. 5: Neuanmeldung einer Leitlinie für Mykoplasmen und Ureaplasmen durch die Deutsche STI-Gesellschaft e. V. (DSTIG) - Gesellschaft zur Förderung der Sexuellen Gesundheit

# Molekularbiologische Untersuchungen

## *Trichomonas vaginalis*

- In den USA häufigster nicht-viraler STI
- Etwa 14% der afroamerikanischen Frauen betroffen
- Ca. 2% der non-Hispanic weißen Frauen
- *In Europa Nachweisraten < 1% (auch in eigenen Untersuchungen)*

## Trichomoniasis - Vergleich Labormethoden:

- Mikroskopie: bis 61% (**Reduktion um 20% je Stunde**)
- Kultur: in Studien bis 70%
- **PCR: > 95%**

# Molekularbiologische Untersuchungen

## Untersuchungsmaterial für *Trichomonas vaginalis* - PCR:

- Vaginal-/Zervixabstrich, Erststrahlurin, Ejakulat

## Cave: Untersuchungsmaterialien: Rachen- und perianale/rektale Abstriche

- Bei **positiver PCR**: mögliche Kreuzamplifikationen mit apathogenen Kommensalen,  
wie im Rachenraum: *Trichomonas tenax* oder  
im Darm: *Pentatrichomonas hominis* beachten!



# Molekularbiologische Untersuchungen

## Respiratorische Erkrankung

- *Bordetella pertussis / parapertussis*
- *Influenza A / B Virus*
- *Respiratorischer Synzytialvirus (RSV)*

# Molekularbiologische Untersuchungen

## Keuchhusten (Pertussis, 100-Tage-Husten, Stickhusten)

### ➤ *Bordetella pertussis*

❖ Target: IS481

### ➤ *Bordetella parapertussis*

❖ Target: IS1001

### ➤ *Bordetella holmesii*

❖ Target: IS1001-like und IS481

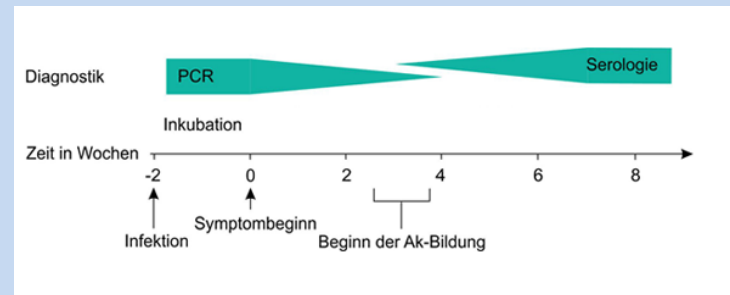


Abb. 6: Zeitlicher Verlauf für die Diagnostik von *B. pertussis* (LADR)

## Labordiagnostik mittels PCR:

➤ bis zu 3-4 Wochen nach Hustenbeginn

➤ nach 4 Wochen rasche Abnahme der Pertussis-DNA Menge

# Molekularbiologische Untersuchungen

## Untersuchungsmaterial für die PCR:

- Tiefer Nasopharyngeal-Abstrich
- Sputum oder Trachealsekret
- **Nasen- und Rachenabstriche** sind nicht oder nur eingeschränkt **geeignet**, da sich *B. pertussis* vorrangig auf dem Flimmerepithel des hinteren Nasopharynx ansiedelt

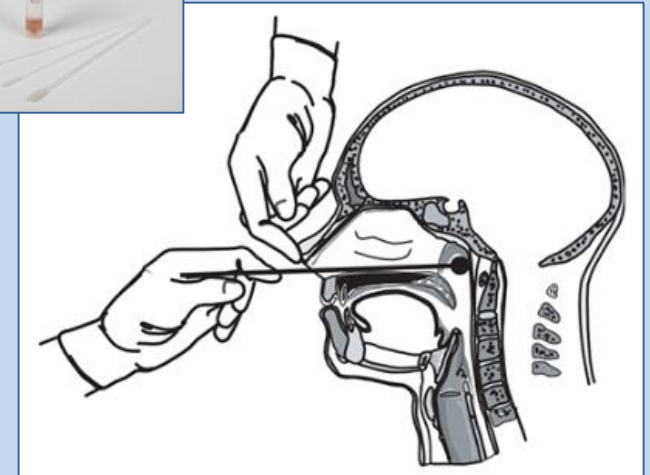


Abb. 7: Entnahme eines Nasopharyngealabstrichs zum Nachweis von *B. pertussis* (RKI)

# Molekularbiologische Untersuchungen

## Influenza - Saisonale Influenza

### ➤ *Influenza A-Virus*

- ❖ Subtypen durch Antigen-Drift:
  - ❖ H1N1 (Spanische Grippe / Schweinegrippe)
  - ❖ H2N2 (Asiatische Grippe)
  - ❖ H3N2 (Hongkong- Grippe)

### ➤ *Influenza B-Virus*

- ❖ keine Subtypen

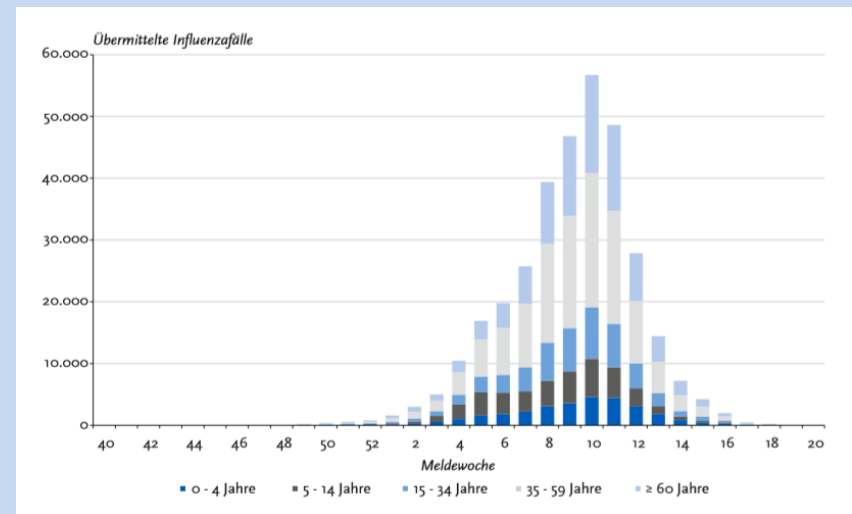


Abb. 8: Anzahl an diagnostisch bestätigten Influenza A/B-Fällen nach Altersgruppen (40. MW 2017 bis 20. MW 2018) (RKI)

# Molekularbiologische Untersuchungen

## Influenza - Diagnostik

- **Direkter RNA-Erregernachweis** mittels Multiplex-PCR  
(Goldstandard)
  - ❖ Sensitivität und Spezifität = **100%**
- höchste Virusausscheidung in den ersten 4 Krankheitstagen
- Antigennachweis, auch im Schnelltest nur mäßig sensitiv
  - ❖ Sensitivität < 73%
  - ❖ negativer Test schließt Influenza nicht aus
- Virusanzucht ist zu zeitaufwendig

# Molekularbiologische Untersuchungen

## Untersuchungsmaterial für die Influenza-PCR

- tiefer Nasenabstrich
- Rachenabstrich
- Sputum
- Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BAL)

## Transportmedium verwenden:

- Abstrich mit **UTM**-Medium  
(für PCR-Diagnostik von Viren und Bakterien)
- **NICHT** für bakterielle Kultur geeignet!
- Längere Transport- und Lagerungszeit möglich



Abb. 9: Abstrich mit  
**Universal Transport Medium**  
(Hain Lifescience)

# Molekularbiologische Untersuchungen

## *Respiratorischer Synzytialvirus (RSV)*

- Subgruppe A und B
- bedeutender Erreger von Atemwegsinfektionen bei Säuglingen, insbesondere Frühgeborenen und Kleinkindern < 5 Jahren
  - ❖ RSV Infektion innerhalb des 1. Lebensjahres bei 50–70%
  - ❖ Bis zum 3. Lebensjahr bei nahezu allen Kindern mindestens eine RSV-Infektion
- Keine Immunität und Reinfektion möglich
- RSV-Infektionen betreffen alle Altersgruppen
- Saisonalität und Symptomatik ähneln die einer Influenza-Infektion

# Molekularbiologische Untersuchungen

## RSV - Diagnostik

- Direkter Erregernachweis mittel PCR
  - ❖ Multiplex-PCR für Influnza A/B und RSV

### Untersuchungsmaterial für die RSV-PCR:

- tiefer Nasenabstrich
- Rachenabstrich
- Nasen- oder Rachensekrete
- Nasopharyngealabstrich
- Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BAL)





**Vielen Dank für Ihre  
Aufmerksamkeit**