

Multiplex-PCR für den Nachweis von Infektionen des Genitaltraktes

Als Erreger von Infektionen des Genitaltraktes kommt eine Vielzahl verschiedener Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren) in Betracht. Allein aufgrund der klinischen Präsentation lässt sich in der Regel nicht auf einen spezifischen Erreger schliessen. Der mikrobiologischen Diagnostik kommt deshalb eine grosse Bedeutung zu. Sie ist aber – wenn das ganze Erregerspektrum abgedeckt werden soll – aufwendig und teuer, nicht zuletzt auch deshalb, weil einige Erreger nur mittels molekularbiologischer Methoden detektiert werden können. Neue Perspektiven bieten Multiplex-PCR-Assays, mit welchen in einem Test gleichzeitig mehrere Organismen nachweisbar sind. Sie können die weiterhin unumgängliche Kultur ideal ergänzen.

Martin Altwegg, Livia Berlinger

Infektionen des Genitaltraktes, speziell die sexuell übertragbaren Infektionen (englisch: sexually transmitted infections, STI) im engeren Sinn, haben in den letzten Jahren auch in der Schweiz zahlenmässig deutlich zugenommen (1). So hat sich die Zahl der Meldungen von Infektionen mit Chlamydia trachomatis zwischen 1999 und 2010 mehr als verdreifacht, während Infektionen mit Neisseria gonorrhoeae im Jahr 2010 etwa 5-mal häufiger waren als noch 1996. Auch für den Lueserreger Treponema pallidum stiegen die Meldezahlen seit Wiedereinführung der Meldepflicht kontinuierlich an, von 580 für das Jahr 2007 auf 1053 für 2012. Im Vergleich mit andern europäischen Ländern weist die Schweiz eine sehr hohe Inzidenz auf. Die Ursachen dafür sind allerdings unklar (1). Die hohe Zahl gemeldeter Fälle deutet aber nicht zuletzt auf eine verlässliche Diagnosestellung durch die behandelnden Ärzte hin, inklusive der entsprechenden spezifischen Labordiagnostik. Zahlen zu Infektionen mit Trichomonas vaginalis fehlen für die Schweiz vollständig, da keine Meldepflicht besteht und diese Parasiten oft gar nicht gesucht werden. Die Erkennung und Kontrolle von STI und anderen Erregern von Infektionen des Genitaltraktes ist nicht zuletzt deshalb schwierig, weil eine asymptomatische Infektion/Kolonisation eher die Re-

gel als die Ausnahme darstellt. So zeigen 50 bis 70 Prozent der Frauen mit einem positiven Chlamydiennachweis keine Symptome, und sowohl Mycoplasma hominis wie auch Ureaplasmen sind häufig im Genitaltrakt von gesunden Personen zu finden. Komplikationen wie Sterilität infolge von Tubenverschluss treten allerdings auch ohne vorangegangene manifeste Chlamydieninfektion auf. In verschiedenen Ländern wurden deshalb spezifische Screeningprogramme – zum Beispiel die regelmässige Untersuchung von jungen, sexuell aktiven Personen auf C. trachomatis – etabliert. Deren Kosteneffizienz ist allerdings umstritten, weil diese stark von der lokal sehr unterschiedlichen Prävalenz der Erreger abhängig ist.

Mikrobiologische Diagnostik

Die Grenzen zwischen STI im engeren Sinn und anderen, nicht vorwiegend sexuell übertragenen Infektionen des Genitaltraktes sind meist unklar, weil die klinischen Symptome unspezifisch sind und häufig mehrere potenzielle Erreger nachgewiesen werden können. Der mikrobiologischen Diagnostik kommt deshalb eine grosse Bedeutung zu. Neben den «konventionellen» Methoden (Methylenblau-/Gramfärbung, Kultur) sind molekularbiologische Nachweise mittlerweile unverzichtbar und für Chlamydien, Gonokokken und Mycoplasma genitalium bestens etabliert. Sie werden aber auch immer häufiger für den Nachweis von Trichomonas vaginalis, Mycoplasma hominis und Ureaplasma urealyticum/parvum eingesetzt. Dieser Prozess wird sich mit dem Einsatz von Multiplex-Assays deutlich beschleunigen, da diese bei tieferen Kosten zusätzliche Erreger erfassen und die Resultate rascher verfügbar sind.

Bakterielle Vaginose

Mikroskopie und Kultur sind für eine verlässliche Diagnostik unabdingbar, je nach Situation ergänzt durch molekularbiologische Untersuchungen. Eine Empfindlichkeitsprüfung der beteiligten Erreger ist nur im Anschluss an einen kulturellen Nachweis möglich.

Chlamydia trachomatis

Nur der molekularbiologische Nachweis ist routinetauglich und verlässlich. Gelegentlich angebotene Schnelltests für die Praxis sind zu wenig sensitiv und sollten deshalb nicht verwendet werden. Jeder Nachweis ist als signifikant einzustufen.

Neisseria gonorrhoeae

Der Nachweis von intrazellulären Diplokokken im Direktpräparat (Methylenblau- oder Gramfärbung) erlaubt eine schnelle Bestätigung einer Gonorrhö. Die Sensitivität der Mikroskopie ist allerdings limitiert, und damit ist ein negatives Resultat nicht aussagekräftig. Der Direktnachweis mittels molekularbiologischer Methoden (heute oft Kombitest für Chlamydien und Gonokokken) ist auch der Kultur bezüglich Sensitivität überlegen. Dies ist nicht zuletzt darauf zurückzuführen, dass Gonokokken während des

Transports ins Labor absterben können. Infolge der schnell wachsenden Resistenzproblematik und im Hinblick auf eine gezielte Antibiotikatherapie sollte in jedem Fall ein kultureller Nachweis als Grundlage für eine Empfindlichkeitsprüfung angestrebt werden. Eine «allgemeine bakteriologische Untersuchung» für Proben aus dem Genitaltrakt umfasst immer auch die kulturelle Suche nach Go-

kokken, bei andern Materialien (z.B. Rachen- oder Perianalabstrich) muss diese speziell angefordert werden.

Trichomonas vaginalis

Auch für die Trichomonaden gilt, dass ein signifikanter Teil der Infizierten keine Symptome zeigt. Weniger bekannt ist die Tatsache, dass sie auch bei Männern bis zu 20 Prozent der Non-Gonokokken-Ure-

Tabelle 1:

Häufige Erreger von Infektionen des Genitaltraktes; modifiziert nach (2)

Bakterien	
Bakterielle Vaginose	Gardnerella vaginalis, Mycoplasma hominis, Mobiluncus spp. (in Kooperation mit anderen Bakterien)
Gonorrhö	Neisseria gonorrhoeae
Lymphogranuloma venereum	Chlamydia trachomatis Serotypen L1–L3
Non-Gonokokken-Urethritis	Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis (fraglich)
Syphilis	Treponema pallidum
Viren	
Herpes genitalis	Herpes simplex Virus Typ 1 und 2
Pilze	
Vulvovaginitis, Balanitis, Non-Gonokokken-Urethritis	Candida spp.
Protozoen	
Trichomoniasis	Trichomonas vaginalis

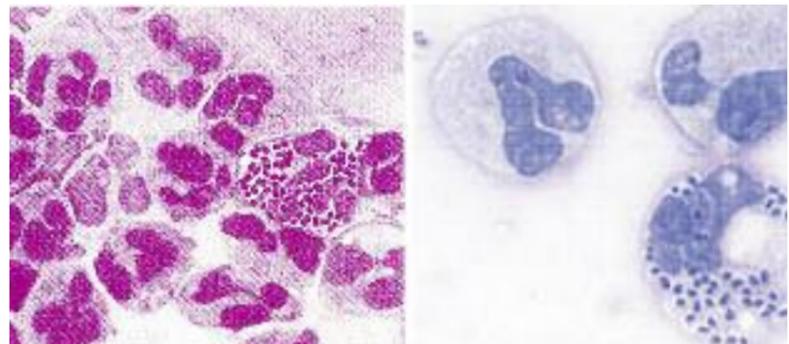


Abbildung 1: Gram- (links) und Methylenblaufärbung (rechts) von Gonokokken im Direktpräparat. Gut zu sehen ist die intrazelluläre Lokalisation der gramnegativen Diplokokken.

Resistenzproblematik bei Gonokokken

Penicillin- und Chinolonresistenz sind bei den Gonokokken schon länger bekannt. Mittlerweile ist nur noch eine Minderheit der Stämme empfindlich (4). Als aktuelle Therapie der Wahl gilt deshalb Ceftriaxon (250–500 mg i.m.) plus Azithromycin (1 g p.o.) jeweils als Einmaldosis (5). Ist eine i.m.-Verabreichung kontraindiziert, kann Cefixim (400 mg p.o.) statt Ceftriaxon verwendet werden. Anlass zur Sorge bereitet allerdings die Tatsache, dass auch zunehmend Resistenzen gegenüber 3.-Generations-Cephalosporinen (Ceftriaxon, Cefixim) beobachtet werden (4, 6). Es wird deshalb empfohlen, bei einer Gonorrhö immer einen kulturellen Nachweis inklusive Empfindlichkeitsprüfung anzustreben.

Tabelle 2:

Kosten für eine umfassende Diagnostik bei Infektionen des Genitaltraktes (zusätzlich zur normalen kulturellen Untersuchung)

Untersuchung	gemäss Analysenliste (in Fr.)	Multiplex-PCR
Chlamydia trachomatis, PCR	95	Pauschalpreis
Neisseria gonorrhoeae, PCR	95	
Mykoplasmen und Ureaplasmen, Kultur	42	
Mykoplasmen und Ureaplasma, PCR	230	
Trichomonas vaginalis, PCR	180 ¹	
Mycoplasma genitalium, PCR	180 ¹	
Total	592 ²	325
	780 ³	

¹keine Pflichtleistung gemäss Analysenliste

²Mykoplasmen/Ureaplasmen mittels Kultur

³Mykoplasmen/Ureaplasmen mittels PCR

Multiplex-PCR für den Nachweis von Infektionen des Genitaltraktes

thritus verursachen können (3). Diagnostisch gilt die mikroskopische Untersuchung (Nativpräparat mit 0,9% NaCl aus Zervix- oder Urethralesekret, wenn möglich im Dunkelfeld) als adäquat, obwohl nur mit einer Sensitivität von etwa 50 Prozent gerechnet werden kann. Wie häufig diese Methodik angewendet wird, ist ebenso wenig bekannt wie die Häufigkeit des Trichomonasnachweises in zytologischen Präparaten. Eine kulturelle Untersuchung ist zwar im Prinzip möglich (Sensitivität ca. 75%) (7) aber kaum routinetauglich, und die PCR ist bis heute wenig verbreitet.

Mycoplasma hominis und Ureaplasma urealyticum/parvum

Mykoplasmen und Ureaplasmen gehören zu den kleinsten frei lebenden Organismen und besitzen ein ausgesprochen kleines Genom. Die fehlende Zellwand bewirkt, dass diese Organismen in der Gramfärbung nicht dargestellt werden können und zudem resistent sind gegenüber allen Betalaktam-Antibiotika. Ihre Bedeutung für die Entstehung von Infektionen des Genitaltraktes ist im Einzelfall schwierig zu beurteilen. Meistens wird deshalb die Menge als diagnostisches Hilfsmittel beigezogen. Die gut etablierte Kultur erlaubt nicht nur einen semiquantitativen Nachweis, sondern auch die Unterscheidung von *M. hominis* und (Harnstoff spaltenden) Ureaplasmen, aber keine Differenzierung zwischen *U. urealyticum* und *U. parvum*. Unglücklicherweise wird von den meisten Laboratorien in den mikrobiologischen Befunden die Speziesbezeichnung «Ureaplasma urealyticum» in dem Sinn verwendet, dass damit eigentlich beide Spezies gemeint sind. Eine Unterscheidung (mittels Multiplex-PCR nun möglich, siehe unten) wäre jedoch sehr hilfreich, da *U. urealyticum* wohl eine Rolle bei der Non-Gonokokken-Urethritis spielt, die häufigeren *U. parvum* es aber vermutlich nicht tun (8).

Mycoplasma genitalium

Gilt als etablierter Verursacher sowohl der Non-Gonokokken-Urethritis (NGU) wie auch der Zervizitis, der akuten Endometritis und möglicherweise auch von anderen Infektionen des oberen Genitaltraktes. Jeder Nachweis sollte deshalb bei Vorliegen entsprechender Symptome als signifikant betrachtet werden. Die prinzipiell mögliche Kultur dauert mehrere Wochen und ist deshalb für die Routinediagnostik nicht geeignet. Etabliert, aber nicht in allen Laboratorien verfügbar, ist der molekularbiologische Nachweis. Wegen des ungenügenden Ansprechens auf Doxycyclin wird derzeit eine Therapie mit Azithromycin empfohlen (5).

Vom Einzelnachweis zur Multiplex-PCR

Sollen alle diese Erreger von Infektionen des Genitaltraktes diagnostisch adäquat abgedeckt werden, dann ist das aufwendig und entsprechend teuer. Gemäss eidgenössischer Analysenliste könnten dafür zusätzlich zu den Kosten für eine normale Kultur (Fr. 63.– wenn negativ, Fr. 70.– wenn positiv) Fr. 592.– bis 780.– anfallen (Tabelle 2). Neue molekularbiologische Technologien ermöglichen nun aber deutlich einfachere, zum Teil we-

sentlich schnellere und zudem günstigere Vorgehensweisen (9).

So erlaubt die Kombination eines ungewöhnlichen Primerdesigns (Dual-priming Oligos/DPO) (10) mit völlig neu konzipierten Sonden (Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension/TOCE) (11) nicht nur den Nachweis von bis zu 15 verschiedenen Zielsequenzen in einer Amplifikationsreaktion, sondern ermöglicht gleichzeitig eine Semiquantifizierung mittels wiederholter Schmelzkurvenanalyse (Abbildung 2). Damit ist die Grundlage geschaffen, für *Mycoplasma*

Tabelle 3:

Vergleich der semiquantitativen Resultate zwischen Kultur und PCR für Mykoplasmen und Ureaplasmen

	Multiplex-PCR								
	Mycoplasma hominis				Ureaplasma urealyticum/parvum				
	neg	+	++	+++	neg	+	++	+++	
Kultur	neg	104	2	2	0	38	0	12	5
	+	0	0	1	0	0	0	22	17
	++	0	0	3	1	1	0	3	10
	+++	0	0	2	4	0	0	1	8

Von den 78 in der Ureaplasma-PCR positiven Proben enthielten 63 (81%) *U. parvum*, 12 (15%) *U. urealyticum* und 3 (4%) beide Spezies.

