MT im Dialog

Die Fachzeitschrift der Medizinischen Technologinnen und Technologen

www.mtdialog.de | www.dvta.de

DVTA

Dachverband für Technologen/-innen und Analytiker/-innen in der Medizin Deutschland e.V.

September 2026 | 27. Jahrgang | 9

Radiologische Diagnostik

Tracheale Veränderungen

Podcast – Stimmen aus der Praxis
www.mtdialog.de/podcasts



Ausbildung
Berufliche Identität und interdisziplinäre Zusammenarbeit

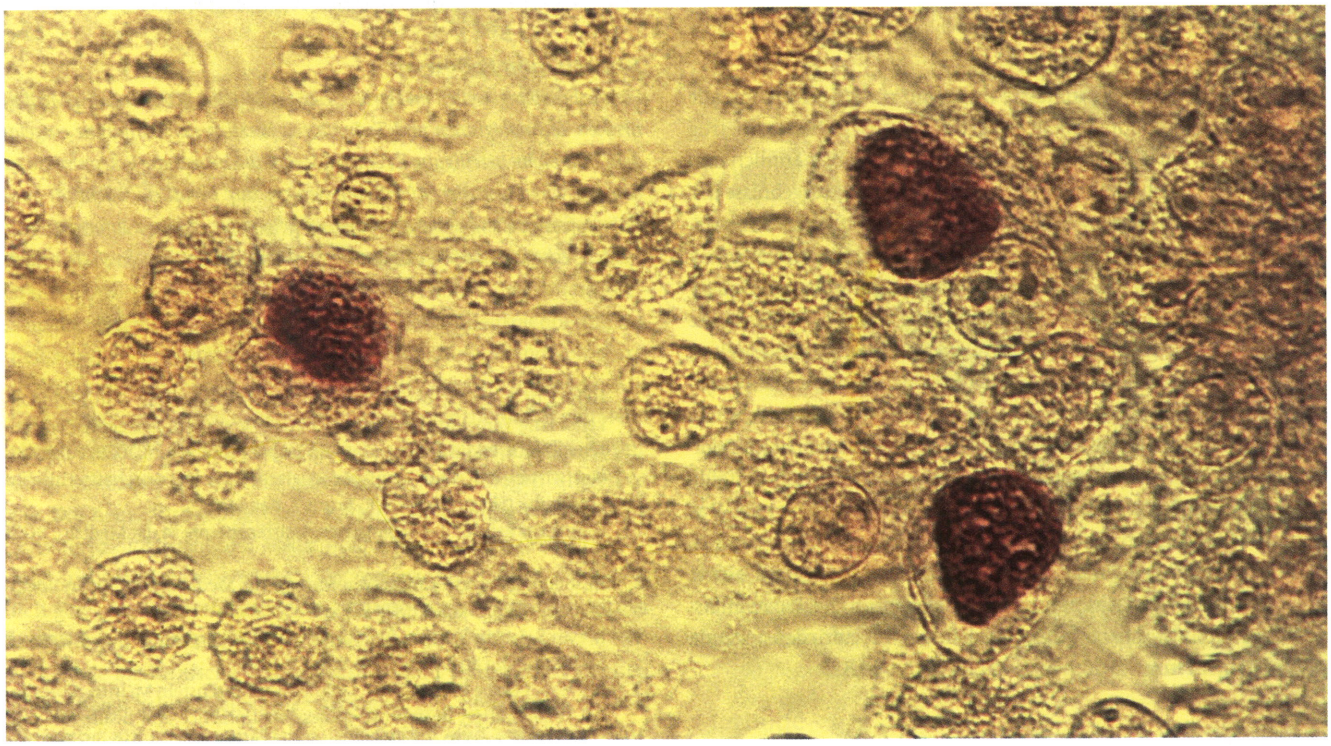
Mikrobiologie
Lactobacillus iners

Hämostaseologie
Thrombasthenie Glanzmann

Diese Zeitschrift ist gelistet bei EBSCOhost

Etablierung einer molekularbiologischen Methode zum Nachweis von *Chlamydia trachomatis* L1–L3 im Rahmen einer schulischen abschließenden Arbeit (ABA)

Yannick Epp, Feldkirch (AT)



Einschlusskörperchen von *C. trachomatis*

© CDC/Dr. E. Arum; Dr. N. Jacobs/public domain

Zusammenfassung

Im Rahmen einer schulischen abschließenden Arbeit (ABA) wurde ein Real-Time-PCR-basiertes Nachweisverfahren zur Detektion von *Chlamydia trachomatis* (CT) Serovare L1–L3 etabliert. Diese Arbeit befasst sich neben der Funktionsweise des Tests und dem direkten Vergleich mit der routinemäßig eingesetzten Methode auch mit möglichen Störfaktoren. Das verwendete Probenkollektiv wurde mit einer Real-Time-PCR-basierten Screening-Methode analysiert, die alle CT Serovare erfasst. Zur Überprüfung der Nachweisgrenze wurde eine kommerzielle Kontrolle mit bekannter Pathogenkonzentration verwendet. Des Weiteren wurde im Rahmen des Troubleshootings auf mögliche Fehlerquellen hingewiesen und abschließend ein Fazit gezogen.

Schlüsselwörter: Nachweisverfahren, Real-Time-PCR, Nachweisgrenze, Troubleshooting

Abstract

As part of a school thesis (ABA), a real-time PCR-based detection method for *Chlamydia trachomatis* (CT) serovars L1–L3 was developed. This thesis addresses not only the functionality of the test and a direct comparison with the routinely used method, but also potential sources of interference. The sample group was analyzed using a real-time PCR-based screening method that detects all CT serovars. A commercial control with a known pathogen concentration was used to verify the detection limit. Furthermore, potential sources of error were identified through troubleshooting, and a conclusion was drawn.

Keywords: detection method, real-time-PCR, detection limit, troubleshooting

VORWORT DIR. MAG. CHRISTOPH PRUGGER

Die abschließende Arbeit an AHS in Österreich
Die abschließende Arbeit (ABA) ist ein Format an AHS in Österreich, das im Rahmen der Matura eine der möglichen Säulen der Reifeprüfung ist. Sie ist bis einschließlich 2028/29 freiwillig, denn Schüler/-innen können alternativ dazu eine zusätzliche schriftliche oder mündliche Prüfung wählen.
Die ABA soll die Fähigkeit fördern, selbstständig, strukturiert und methodisch an einer Fragestellung oder einem Projekt zu arbeiten und das Ergebnis vor einer Kommission zu präsentieren.
Die ABA kann in 3 Grundformen verfasst werden:
- Forschender Zugang: Hier steht eine wissenschaftliche Fragestellung im Mittelpunkt, die mit geeigneten Methoden untersucht wird. Diese Form der ABA, die Yannick Epp gewählt hat, muss einen empirischen Teil mit Datenerhebung und methodischer Reflexion umfassen.
- Gestalterischer Zugang
- Künstlerischer Zugang

Die ABA soll Schüler/-innen ein grundlegendes Verständnis wissenschaftlichen Arbeitens vermitteln. Dazu gehören zum Beispiel das Formulieren einer klaren Fragestellung, das Recherchieren und Auswerten fachlicher Quellen, methodisches Vorgehen sowie ein strukturierter Schreib- oder Dokumentationsprozess. Dabei verlangt eine ABA ein hohes Maß an Selbstorganisation. Betreut wird der Arbeitsprozess von einer sachkundigen Lehrperson.
Am Ende des Arbeitsprozesses muss jede ABA präsentiert und diskutiert werden. Die Präsentation dauert bis zu 20 Minuten und umfasst eine Zusammenfassung der Arbeit sowie das Beantworten von Fragen der Prüfungskommission.

Einleitung

Chlamydia trachomatis

Chlamydia trachomatis (CT) ist ein gramnegatives, obligat intrazelluläres Bakterium der Gattung Chlamydia aus der Familie Chlamydiaceae. Der kugelförmige Erreger gehört zu den bedeutendsten humanpathogenen Bakterien und ist besonders bekannt für seinen komplexen Reproduktionszyklus. Eine Infektion mit *Chlamydia trachomatis* erfolgt in der Regel über ungeschützten Geschlechtsverkehr; daher zählt man es zu den STIs (sexually transmitted infection). Der Erreger kann in 3 Serovare subtypisiert werden: Serovare A–C, D–K und L1–L3. Endemisch kommen Infektionen mit *Chlamydia trachomatis* nahezu überall auf der Welt vor, wobei es bevorzugte Gebiete für jedes Serovar gibt. Die Serovare A–C weisen ein charakteristisches Vorkommen in den Tropen und in Gebieten mit schlechten hygienischen Bedingungen, wie Afrika oder Teilen Asiens, auf. Die Serovare D–K beschränken sich auf kein bestimmtes Gebiet und kommen auf der ganzen Welt vor. Typischerweise treten Infektionen mit den Serovaren L1–L3 in den Tropen auf, wobei diese Serotypen in Europa und Nordamerika an Bedeutung gewinnen, vor allem bei Männern, die Sex mit Männern (MSM) haben, sowie als Co-Infektion bei HIV-positiven Patienten.

Übertragungswege

Eine Infizierung mit CT erfolgt primär durch direkten Schleimhautkontakt, da der Erreger nur in lebenden Epithelzellen überleben kann, welche zum Beispiel in den Schleimhäuten des Urogenitaltraktes und des Rektums vorkommen. Grund dafür ist seine obligat intrazelluläre Lebensweise, welche ihm ein Überleben außerhalb einer Wirtszelle nicht ermöglicht. Als Hauptübertragungsweg gilt ungeschützter Geschlechtsverkehr, wobei auch eine Übertragung durch infizierte Körperflüssigkeiten in Form von Vaginal- und Oralverkehr oder gemeinsamer Nutzung eines Sexspielzeuges ohne gründliche Reinigung möglich ist. Eine Übertragung auf ein Neugeborenes ist während der Passage des Geburtskanals, bei der es mit den Schleimhäuten der infizierten Mutter in Kontakt kommt, ebenfalls möglich. Vor allem bei den Serotypen A–C kann es sich auch um eine Schmierinfektion handeln.

Krankheitsbild

Der klinische Nachweis von CT ist von elementarer Bedeutung, da die Mehrheit der Erkrankungen symptomlos verläuft, was die Übertragung begünstigt. Des Weiteren können Infektionen mit CT ernsthafte gesundheitliche Folgen haben.

Die Serovare A–C sind die häufigste infektiöse Ursache für Blindheit, das sogenannte Trachom. Symptome dafür sind ein Fremdkörpergefühl im Auge, Schwellung der Lider und ein eitriger Ausfluss aus dem Auge.

Eine urogenitale Infektion von CT ist meist auf die Serovare D–K zurückzuführen. Die Symptome unterscheiden sich nach biologischem Geschlecht. Typische Krankheitsbilder bei Männern sind Urethritis, Prostatitis, Epididymitis oder Proktitis. Die Symptomatik umfasst Brennen beim Wasserlassen, eitrigen oder schleimigen Ausfluss, Schmerzen im Unterbauch und in den Hoden sowie Juckreiz. Das klinische Bild bei einer Infektion einer Frau ist gekennzeichnet durch Urethritis, Proktitis und Pelvic Inflammatory Disease (PID), was unbehandelt das Risiko einer ektopen Schwangerschaft erhöht.

Geschlecht	**Anzahl**
Männlich	95/107 (88,8 %)
Weiblich	12/107 (11,2 %)
Lokalisierung	**Anzahl**
Rektalabstrich	95/107 (88,8 %)
Urethralabstrich	1/107 (0,9 %)
Zervixabstrich	3/107 (2,8 %)
Nativharnprobe	3/107 (2,8 %)
Vaginalabstrich	1/107 (0,9 %)
Oralabstrich	1/107 (0,9 %)
LBC (Liquid-Based Cytology)	2/107 (1,9 %)
Unbekannt	1/107 (0,9 %)
Diagnose	**Anzahl**
Chlamydien	18/107 (16,8 %)
Neisseria gonorrhoeae	11/107 (10,3 %)
Mycoplasma genitalium	11/107 (10,3 %)
Ureaplasma urealyticum	1/107 (0,9 %)
Negativ	67/107 (62,6 %)

Tab. 1: Patientenkollektiv

Konzentration	Triplikate			Durchschnittlicher Ct-Wert	Finale Konzentration
5.000 co/mL	32,15	32,94	33,71	32,94	25 co/mL
2.500 co/mL	34,55	34,70	33,19	34,15	12,5 co/mL
1.250 co/mL	37,19	34,75	N/A	35,97	6,25 co/mL
625 co/mL	36,38	39,01	37,77	37,72	3,125 co/mL
312 co/mL	36,25	N/A	34,13	35,19	1,56 co/mL

Tab. 2: Ergebnisse der Verdünnungsreihe

Infertilität kann bei beiden Geschlechtern eine Spätfolge sein, beim Mann infolge Verklebung des Samenleiters und bei der Frau infolge Verklebung der Eileiter.

Die Serovare L1–L3 verursachen das Lymphogranuloma venerum (LGV), eine sexuelle Krankheit mit schweren Symptomen. Diese Krankheit betrifft überwiegend men who have sex with men (MSM), kann aber auch bei Frauen und heterosexuellen Männern auftreten.

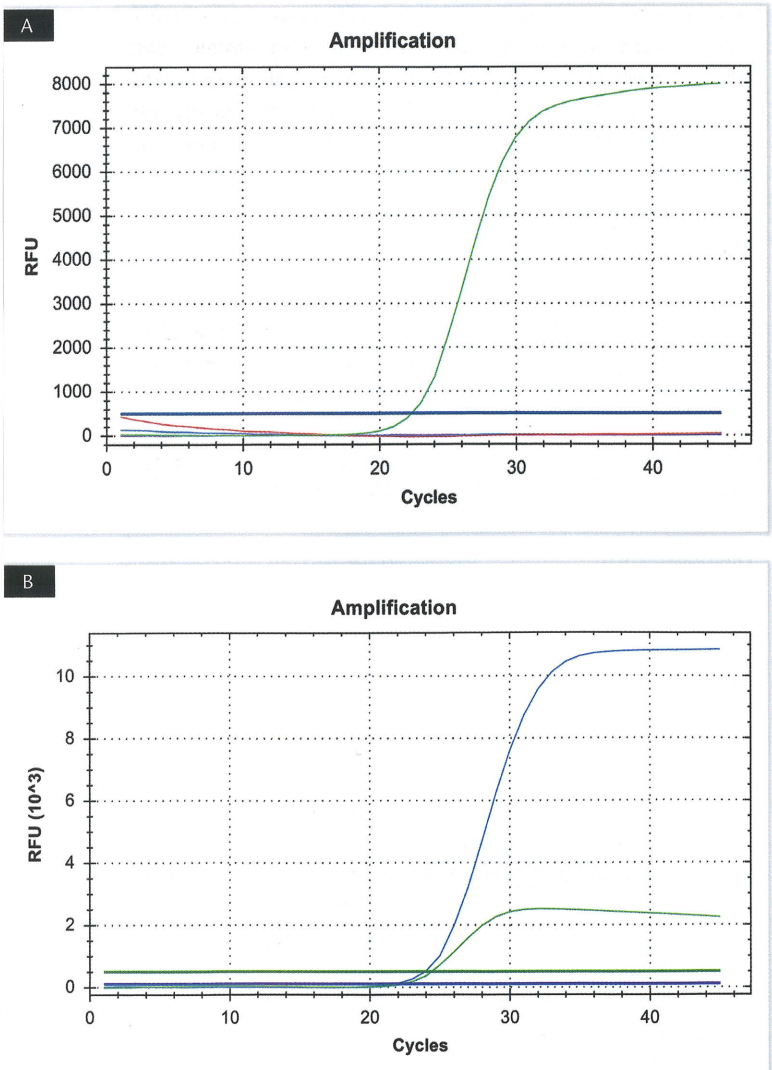


Abb. 1: Exemplarische Amplifikationskurven einer negativen (A) und positiven (B) Probe mit der IC (blau) und dem Target (grün), *eigene Darstellung*

Klinisch zeigt sich die Krankheit durch mit Flüssigkeit gefüllte Bläschen an Penis oder Vagina, geschwollene Lymphknoten in Leisten- und Bauchregion und anale Schmerzen. Bleibt LGV unbehandelt, kann es zu Analfisteln und schmerzenden Geschlechtsorganen kommen. Es konnte eine überproportionale Zahl an LGV-Infektionen bei HIV-Patienten nachgewiesen werden, da sie durch mehrere Faktoren begünstigt werden. Einerseits haben beide Erreger den gleichen Übertragungsweg, und die veränderte Immunlage bei HIV-Patienten begünstigt eine Infektion mit *Chlamydia trachomatis* L1–L3. Andererseits begünstigen die durch LGV entstandenen Wunden das Eindringen von HI-Viren. Zusätzlich bewirkt eine gleichzeitige HIV-Infektion einen schwereren LGV-Verlauf. So entsteht zwischen HIV und LGV eine gefährliche Wechselwirkung.

Molekularbiologische Diagnostik

Um CT molekularbiologisch zu diagnostizieren, werden beim Screening einer Frau Urinproben, Zervixabstriche sowie Vaginal- und Rektalabstriche verwendet. Bei Männern werden in der Regel Urinproben oder Urethral- und Rektalabstriche verwendet. Die Extraktion der bakteriellen Erbsubstanz und der anschließende Nachweis durch molekularbiologische Testmethoden liefern ein zuverlässiges und zeitnahes Ergebnis.

Behandlung

Die Behandlung von CT basiert auf einer einwöchigen Therapie mit Antibiotika. Möglich sind Behandlungen mit Doxycyclin, Azithromycin und Levofloxacin. Bei einer Infektion mit den Serovaren L1–L3, speziell bei LGV, wird die Behandlungsdauer auf 3 Wochen erhöht.

Material und Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein molekularbiologisches Verfahren zur spezifischen Testung der Serovare L1–L3 von CT etabliert und evaluiert. Dazu wurden klinische Proben mittels des Kits VIASURE CT (LGV) Real Time Detection Kit getestet und mit einem in der Routine etablierten Verfahren verglichen. Um die Nachweisgrenze zu überprüfen, wurde eine Verdünnungsreihe mit einer kommerziellen Methode der Firma ZeptroMetrix durchgeführt.

Untersuchungsmaterial

Im Rahmen der Etablierung eines molekularbiologischen Nachweises wurden am Institut für Pathologie des Landeskrankenhauses Feldkirch in der Abteilung der Molekularpathologie ein vorher ausgewähltes Patientenkollektiv spezifisch mittels des Kits auf die Serovare

L1–L3 getestet. In Summe waren es 107 Proben, davon 88,8 % (95/107) Männer und 11,2 % (12/107) Frauen. Das Durchschnittsalter entsprach 37,9 Jahren, während die Spannweite 24–80 Jahre betrug. Die Abnahmelokalisationen verteilten sich auf Rektalabstrich 88,8 % (95/107), Urethralabstrich 0,9 % (1/107), Zervixabstrich 2,8 % (3/107), Nativharnprobe 2,8 % (3/107), Vaginalabstrich 0,9 % (1/107), Oralabstrich 0,9 % (1/107) und Liquid-Based Cytology (LBC) 1,9 % (2/107) (siehe Tabelle 1).

Untersuchungsmethode

Derzeit wird im Landeskrankenhaus Feldkirch der Nachweis von CT unter anderem unter Verwendung des Alinity m (Abbott Molecular, USA) durchgeführt, der nicht zwischen den Serovaren differenziert. Da diese Differenzierung therapeutische Relevanz besitzt, ist es wichtig, diese spezifisch im Labor nachweisen zu können. Um diesem Problem entgegenzuwirken, hat VIASURE eine kommerziell verfügbare Real-Time-PCR entwickelt, die spezifisch die Serovare L1–L3 nachweist. Das Kit wird mit den entsprechenden Komponenten geliefert, die den größten Teil der benötigten Materialien abdecken. Zusätzlich zu der apparativen Ausrüstung (Real-Time-PCR Thermocycler, Zentrifuge und Vortexer) werden passende Kunststoffverbrauchsmaterialien (zum Beispiel Röhrchen, 8er-Well-Streifen et cetera), Micropipetten (0,5–10 µL, 10–20 µL, 20–200 µL), Filterspitzen, puderfreie Einweghandschuhe und Extraktionskits benötigt.

Die Nukleinsäure-Extraktion wurde vollautomatisiert mit dem QIAsymphony SP (Qiagen GmbH, Deutschland) durch die Mitarbeiter der oben genannten Abteilung der Molekularpathologie durchgeführt. Das Gerät extrahiert die Nukleinsäure unter Verwendung magnetischer Partikelaufreinigung [2].

Um den Erreger nachzuweisen, kam das VIASURE CT (LGV) Real-Time-PCR Detection Kit (CerTest, Spanien) zum Einsatz. Die Bestandteile des Mastermixes liegen lyophilisiert in jedem Well vor. Daher beginnt man mit der Zugabe von 15 µL Rehydrationspuffer in jedes Well, da der Mastermix durch Zugabe des Rehydrationspuffers gelöst wird. Danach muss man, insofern es noch nicht im Zuge der Extraktion getan wurde, 1 µL IC hinzupipettieren. Anschließend werden von jeder Probe jeweils 5 µL hinzugefügt, wobei bei jedem Lauf eine Positiv- (PC) und eine Negativkontrolle (NTC) mitgeführt werden muss. Um die Real-Time-PCR starten zu können, muss man zuerst das spezifische PCR-Profil für dieses Kit einstellen. Dieses umfasst eine 2-minütige initiale Denaturierung bei 95 °C. Danach wiederholt man 45-mal die Schritte: 10 Sek. Denaturierung bei 95 °C, 10 Sek. Annealing und 50 Sek. Elongation bei 60 °C. Während jedes Zyklus erfolgt eine Fluoreszenzmessung, um die, sofern vorhanden, amplifizierte Zielsequenz in Echtzeit anzugeben.

Verdünnungsreihe zur Überprüfung der analytischen Sensitivität

Um die analytische Sensitivität nachzuweisen, wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 angefertigt. Dafür wurde eine kommerzielle PC mit der Konzentration 5,00+03 co/mL (copies per milliliter) mit dem Namen NATtrol™ *Chlamydia trachomatis* External Run Control Low (ZeptoMetrix, USA) verwendet. Sie wurde mittels Dreifachbestimmung in der RT-PCR angesetzt. In das erste Well wurden 20 µL der unverdünnten PC pipettiert. Um die erste Verdünnung durchzuführen, werden in die nächsten 3 Wells 20 µL PCR-grade Wasser pipettiert. Anschließend pipettiert man 20 µL der unverdünnten PC in die

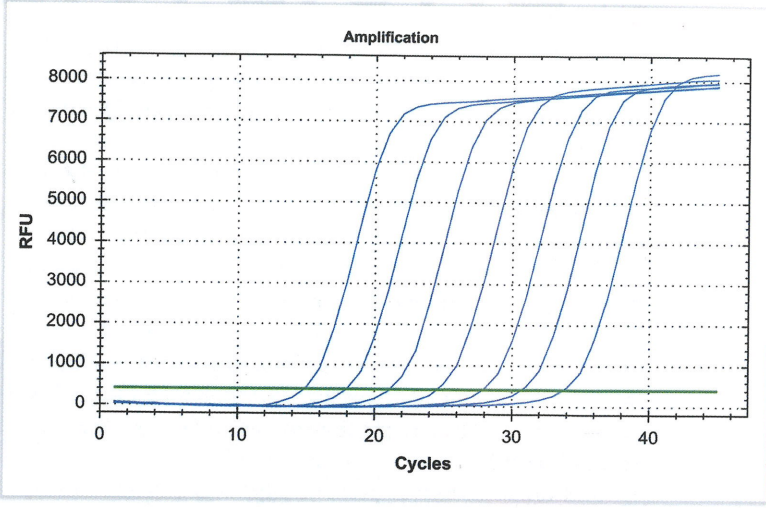


Abb. 2: Exemplarische Amplifikationskurven einer Verdünnungsreihe,
eigene Darstellung

3 Wells, wodurch eine theoretische Verteilung von 1:2 (circa 2.500 co/mL) entsteht. Um die nächste Verdünnungsstufe zu erhalten, werden diese Schritte wiederholt, nur mit dem Unterschied, dass man anstatt der PC aus der zuvor angesetzten verdünnten Lösung pipettiert, wodurch man eine 1:4-Verteilung mit theoretisch 1.250 co/mL erhält. Das wird wiederholt bis zu einer Verdünnung von 1:16 mit einer Konzentration von 312 co/mL.

Ergebnisse

Um die Ergebnisse des neuen Kits überprüfen zu können, wurden die Proben zuerst mittels des schon in der Routine etablierten Analysesystems Alinity m (Abbott Molecular, USA) getestet. Unter Verwendung des STI-Kits werden die Pathogene *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma genitalium* und *Trichomonas vaginalis* nachgewiesen. Im Rahmen dieser initialen Untersuchung im Rahmen der patientenorientierten Basisdiagnostik zeigten sich folgende Ergebnisse: 16,8 % (18/107) der Proben wurden positiv auf CT getestet, 9,3 % (10/107) positiv auf *Neisseria gonorrhoeae,* 10,3 % (11/107) auf *Mycoplasma genitalium* und 0,9 % (1/107) *Trichomonas vaginalis*. 62,6 % (67/107) der Proben wurden negativ gewertet.

1,87 % (2/107) der Patientenproben wurden positiv auf Chlamydien der Serovare L1–L3 mittels VIASURE Real-Time-PCR Detection Kit getestet. 2,8 % (3/107) der Tests zeigten ein ungültiges Ergebnis aufgrund einer Inhibition, während eine Probe wegen einer invaliden Extraktion nicht getestet wurde. 94,4 % der Proben (101/107) wurden als negativ für CT Serovare L1–L3 getestet.

Der Test konnte CT bis 625 co/mL verlässlich nachweisen, während bei 312 co/mL Ergebnisse ausfielen und es einen großen Unterschied des Ct-Werts der 3 Ergebnisse gab. Die Sensitivität des Tests konnte durch eine Verdünnungsreihe bestätigt werden. Die ausgegebene analytische Sensitivität von ≥ 10 DNA-Kopien pro Reaktion, das sind 10 Kopien auf 20 µL, konnten näherungsweise erreicht werden. Die angesetzte Verdünnungsreihe konnte verlässlich 12,5 Kopien auf 20 µL nachweisen. Die genauen Ergebnisse mit Ct-Werten sind in Tabelle 2 illustriert und die Amplifikationskurven von der Verdünnungsreihe sind in Abbildung 2 dargestellt.

Diskussion

Es zeigte sich, dass die in der Routine als negativ gewerteten Proben mittels Alinity m auch mittels VIASURE korrekt negativ getestet wurden, was somit falsch positive Ergebnisse in diesem Kollektiv ausschließt. Des Weiteren gab es keine Kreuzreaktivität, das heißt, dass der Test für andere Erreger wie *Neisseria gonorrhoeae* oder Mycoplasmen/Ureaplasmen negativ ausfiel und kein falsch positives Ergebnis zeigte. Der Alinity m diagnostizierte zwar mehr positive Proben für CT, aber das ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass die routinemäßige Methode alle Serovare von A–L3 nachweist, während der VIASURE *Chlamydia trachomatis* (LGV) nur die Serovare L1–L3 testet. Der Alinity m gab 16,8 % (18/107) der Proben als positiv an. In 11,1 % (2/18) der Proben, die einen positiven Nachweis für CT zeigten, wurden die Serovare L1–L3 nachgewiesen, was in dem zu erwartenden Anteil dieser Serovare der Chlamydien-Infektionen liegt. Der Anteil des Serovars L1–L3 der CT-positiven Infektionen betrug laut einer österreichischen Studie je nach untersuchter Gruppe circa 10–23 % [1]. Im Detail kann man diese Zahlen aber nicht vergleichen, da das Patientenkollektiv gezielt aus echten Proben ausgewählt und somit beeinflusst wurde. 3 Proben können nicht für die Auswertung herangezogen werden, da bei ihnen aufgrund von Inhibitionen die IC negativ ausfiel. Normalerweise müsste man die Extraktion dieser Proben wiederholen und erneut testen, um Prozessierungsfehler auszuschließen, was aber im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr möglich war. Mögliche Gründe dafür gibt es viele. Zum Beispiel kann es sein, dass bei der Extraktion vergessen wurde, die IC hinzuzufügen oder dass inhibierende Stoffe in der Probe enthalten waren. Genau das führt zu einem schwachen Signal der IC oder gar zu einem vollständigen Ausfall. Der einzige Fall, in dem der Ausfall der IC toleriert wird, ist bei Vorliegen einer hohen Konzentration von CT L1–L3 in der Probe, da es sich um eine kompetitive RT-PCR handelt. Die analytische Sensitivität des Tests konnte durch eine Verdünnungsreihe bestätigt werden. Die ausgegebene analytische Sensitivität von ≥ 10 DNA-Kopien pro Reaktion konnte mit verlässlichen Ergebnissen bestätigt werden. Der Test konnte 6,25 Kopien in einer Reaktion verlässlich positiv nachweisen. Somit konnten die ausgewiesene Nachweisgrenze des Tests und die Funktionsfähigkeit nachgewiesen werden.

Resümierend kann man sagen, dass der Test sehr einfach in der Handhabung ist und gleichzeitig sehr gute und verlässliche Ergebnisse ohne Kreuzreaktionen liefert. Daher ist er sehr gut für die patientenorientierte Basisdiagnostik geeignet. «

Literatur

1. Chromy D, Sadoghi B, Gasslitter I, et al.: Asymptomatic lymphogranuloma venereum is commonly found among men who have sex with men in Austria. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 2024; 22: 389–97, DOI: https://doi.org/10.1111/ddg.15329.
2. Kruhøffer M, Voss T, Beller K, et al.: Evaluation of the QIAsymphony SP Workstation for Magnetic Particle-Based Nucleic Acid Purification from Different Sample Types for Demanding Downstream Applications. SLAS Technology 2010; 15 (1): 41–51, DOI: https://doi.org/10.1016/j.jala.2009.07.006.



YANNICK EPP

Kontakt: yannick.epp@gmx.at

© privat