

Validierung einer kombinierten PCR-Platte unter Verwendung von Roche TIB Molbiol LightMix® Kits für seltene Infektionserreger

Janina Joan, Beutler, BMA 23-26

Biomedizinische Analytik HF

Institut für Infektionskrankheiten, Molekulare Analytik

1. Zusammenfassung

Die Roche TIB Molbiol Kits lieferten für fünf der ursprünglich sieben vorgesehenen Erreger zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse. *Haemophilus ducreyi* wurde aufgrund fehlenden Probenmaterials aus der Evaluation ausgeschlossen. Die Ergebnisse meiner Diplomarbeit bilden eine Grundlage für die zukünftige Implementierung dieser Analysen am Institut für Infektionskrankheiten (IFIK). Durch die Internalisierung können externe Probenversände reduziert, Kosten eingespart und den Patientinnen und Patienten die Resultate schneller zur Verfügung gestellt werden.

2. Einleitung

Im IFIK wurden bis anhin Erreger von selten durchgeführten Analysen an externe Laboratorien versandt, wodurch längere Analysezeiten und zusätzliche Versandkosten entstehen. Für sieben dieser Erreger sind Roche TIB Molbiol LightMix® Kits verfügbar, die aufgrund desselben PCR-Zyklusprofils auf einer gemeinsamen PCR-Platte kombiniert und direkt am IFIK analysiert werden können. [1]

Bislang war noch nicht untersucht worden, ob eine solche kombinierte interne Durchführung am IFIK mit den Ergebnissen der externen Laboratorien vergleichbar ist. Ziel der Diplomarbeit war es daher, die ausgewählten Erreger zu analysieren und die Ergebnisse mit den externen Laboratorien zu vergleichen. Eine Internalisierung könnte Analysezeiten und Versandkosten reduzieren sowie den ökologischen Fussabdruck minimieren. Meine Motivation lag vor allem darin, an der Evaluation einer Methode mitzuwirken, die zukünftig in die Routinediagnostik am IFIK integriert werden könnte.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden sieben seltene Infektionserreger für die geplante Evaluation ausgewählt. Untersucht wurden 41 Proben von *Borrelia spezie*, den Verursachern der Lyme-Borreliose, 41 Proben von *Coxiella burnetii*, dem Verursacher des Q-Fiebers, 39 Proben des Hepatitis-E-Virus, dem Verursacher von Hepatitis E, 40 Proben des Humanen Herpesvirus 6, dem Verursacher des Dreitagefiebers, 35 Proben von *Treponema pallidum*, dem Verursacher der Syphilis, sowie 44 Proben von *Tropheryma whipplei*, dem Verursacher des Morbus Whipple. Für *Haemophilus ducreyi*, den Verursacher von Ulcus molle, stand kein Probenmaterial zur Verfügung. [2], [3], [4], [5], [6], [7], [8]

3. Ziele und Fragestellungen

Ziel der Diplomarbeit war es, mindestens fünf ausgewählte, bisher extern analysierte Erreger auf einer LightMix®-Platte zu kombinieren und deren Eignung für die Routinediagnostik am IFIK zu evaluieren. Daraus ergaben sich folgende drei Fragestellungen:

Fragestellung 1: Inwieweit korrelieren die Ergebnisse der kombinierten PCR-Analysen auf der LightMix®-Platte mit den Resultaten der externen Referenzlabore unter Berücksichtigung von Sensitivität und Spezifität, Präzision und Linearität?

Fragestellung 2: Ist bei der Anwendung der Roche TIB Molbiol Kits für alle untersuchten Erreger unter Routinebedingungen eine reproduzierbare Ergebnisqualität gewährleistet?

Fragestellung 3: Kann die bisher verwendete PurelC auch für die LightMix®-Platte eingesetzt werden?

Der Schwerpunkt liegt auf den Fragestellungen 1 und 2. Fragestellung 3 wird nicht näher behandelt, konnte jedoch hinsichtlich der Verwendung der bestehenden Kontrolle durchwegs mit Ja beantwortet werden.

4. Material, Methodik, Vorgehen

Für die Beantwortung der Fragestellungen wurden 240 Proben aus dem IFIK und externen Laboratorien analysiert. Da für *Haemophilus ducreyi* kein Probenmaterial zur Verfügung stand, wurde dieser Erreger von der Evaluation ausgeschlossen. Die Proben der übrigen sechs Erreger wurden aufbereitet und die Nukleinsäuren anschliessend extrahiert. Der PCR-Ansatz erfolgte mit den Roche TIB Molbiol Kits auf der LightMix®-Platte. Der spezifische Nachweis erfolgte mit TaqMan-Sonden mittels Real-Time-PCR.

5. Ergebnisse/ Resultate

Für die Auswertung wurden Proben mit Cycle threshold (Ct)-Werten unter 28 als positiv, zwischen 32–35 als schwach positiv und ab 40 als negativ eingestuft.

Die Sensitivitäten lagen zwischen 55–100 %, die Spezifitäten zwischen 85–100 % und die Cohen's-Kappa-Werte zwischen 0,57–1,00. Die Standardabweichungen der Intra- und Inter-Assay-Präzision lagen überwiegend unter 1. Die höchste Standardabweichung von 1,21 wurde bei der schwach positiven *Borrelia spezie*-Probe im Inter-Assay gemessen. Alle untersuchten negativen Proben blieben negativ.

Die R²-Werte lagen zwischen 0,968–0,999, die PCR-Effizienzen zwischen 91,23–109,79 % und die Slope-Werte zwischen –3,55 und –3,10.

Erreger	Sensitivität	Spezifität	Cohen's Kappa	Intra positiv	Intra schwach pos.	Inter positiv	Inter schwach pos.	R ²	Effizienz	Slope
<i>Borrelia spp.</i>	100,00%	90,00%	0,90	0,06	0,52	0,49	1,21	0,9976	91,23%	-3,5517
<i>C. burnetii</i>	95,00%	100,00%	0,94	0,29	0,09	0,08	0,07	0,9965	106,60%	-3,1733
HEV	55,56%	100,00%	0,57	0,07	-	0,39	-	0,9685	95,23%	-3,4417
HHV-6	80,00%	85,00%	0,64	0,03	0,11	0,29	0,24	0,9996	95,42%	-3,4367
<i>T. pallidum</i>	100,00%	100,00%	1,00	0,04	0,07	0,12	0,25	0,9824	108,11%	-3,1417
<i>T. whipplei</i>	79,17%	100,00%	0,76	0,02	0,11	0,32	0,59	0,9907	109,79%	-3,1077

Abb. 1 Übersicht der Ergebnisse (Beutler, 2026)

6. Diskussion

Für die Mehrheit der untersuchten Erreger zeigte sich eine gute bis sehr gute Übereinstimmung mit den externen Laboratorien sowie eine gute Reproduzierbarkeit und Linearität. Einschränkungen zeigten sich insbesondere bei schwach positiven Proben. Beim Hepatitis-E-Virus konnten schwach positive Proben mit geringer Zielkonzentration trotz guter Linearität nicht zuverlässig detektiert werden. Bei *Tropheryma whipplei* traten ebenfalls diskrepante Resultate auf. Neben der Zielkonzentration könnten auch das Probenmaterial und präanalytische Faktoren einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit gehabt haben. Das Ziel, mindestens fünf PCR-Analysen auf der LightMix®-Platte zu evaluieren, wurde erreicht. Eine zukünftige Implementierung ist für *Borrelia spezie*., *Coxiella burnetii*, *Treponema pallidum*, Humanem Herpesvirus 6 sowie *Tropheryma whipplei* mit Ausnahme von Stuhlproben vorgesehen. Für Hepatitis-E-Virus und Stuhlproben von *Tropheryma whipplei* sind weitere Untersuchungen erforderlich. Für *Haemophilus ducreyi* sind zukünftig Untersuchungen notwendig.

Referenzen

- [1] TIB Molbiol Portfolio | roche.de. (o. J.-a). Abgerufen 15. Mai 2026, von <https://www.roche.de/diagnostik/produkte-loesungen/tests-parameter/tibmolbiol-portfolio>
- [2] Borreliose / Lyme-Krankheit. (o. J.). Abgerufen 9. März 2026, von <https://www.bag.admin.ch/de/borreliose-lyme-krankheit>
- [3] DocCheck, M. bei. (o. J.-a). *Coxiella burnetii*. DocCheck Flexikon. Abgerufen 18. März 2026, von https://flexikon.doccheck.com/de/Coxiella_burnetii
- [4] DocCheck, M. bei. (o. J.-c). *Tropheryma whipplei*. DocCheck Flexikon. Abgerufen 18. März 2026, von https://flexikon.doccheck.com/de/Tropheryma_whipplei
- [5] DocCheck, M. bei. (o. J.-d). *Ulcus molle*. DocCheck Flexikon. Abgerufen 18. März 2026, von https://flexikon.doccheck.com/de/Ulcus_molle
- [6] DocCheck, M. bei. (2021b, März 19). *Humanes Herpesvirus 6*. DocCheck Flexikon. https://flexikon.doccheck.com/de/Humanes_Herpesvirus_6
- [7] Hepatitis-E. (o. J.). Abgerufen 18. März 2026, von <https://www.bag.admin.ch/de/hepatitis-e-de>
- [8] Sheldon R. Morris. (2025). *Syphilis—Infektionskrankheiten*. MSD Manual Profi-Ausgabe.

Abbildungen

Abb. 1 Beutler, J. (2026). Übersicht der Ergebnisse. medi