

cobas 4800 von Roche Diagnostics

Warum Automatisierung in der PCR-Diagnostik

Mit dem cobas 4800 System bietet Roche erstmalig eine Gerätekombination zur automatisierten Probenaufbereitung und Real-Time-PCR für die Infektionsparameter Chlamydien, Gonokokken und Humane Papillomaviren an. Wozu das gut ist?



Dr. Armin Pahl im Expertengespräch über die Automatisierung in der PCR-Diagnostik und zum cobas 4800 System bei der MEDICA 2009.

„Wir können direkt aus dem Primärgefäß arbeiten, unseren eigenen Barcode aufkleben und das Ergebnis gekoppelt an diesen Barcode in unser Informationssystem übertragen“, so Dr. Armin Pahl, Leiter der

molekulardiagnostischen Abteilung des Labors Dr. Kramer und Kollegen in Geesthacht. In seiner Praxis sei das ein wichtiger Aspekt, um Verwechslungen auszuschließen und beispielsweise der Nachfrage nach Chlamydientests besser Herr zu werden, die seit Einführung des Screenings gestiegen ist.

Da z. B. Urinalysen nur abgerechnet werden können, wenn sie DNA-basiert sind, ist ein System wie cobas 4800, das Nukleinsäuren schnell aus unterschiedlichen Probenmaterialien isolieren und in Real-Time-PCR bestimmen kann,

mit bis zu 376 Chlamydienergebnissen pro Tag dafür gut geeignet. Ohne zusätzlichen Aufwand kann aus einer Probe parallel eine Neisserien-Bestimmung erfolgen, aber der größte Vorteil der neuen Testreagenzien sei, so Pahl, dass positive Ergebnisse nicht mehr extra bestätigt werden müssten.

Automatisierte Abarbeitung

cobas 4800 besteht aus einer Gerätekombination für die automatisierte Probenaufbereitung und Real-Time-PCR. Die erste Komponente, cobas x 480 Instrument, isoliert Nukleinsäuren aus verschiedenen Probenmaterialien in Primärrohrchen und pipettiert anschließend vollautomatisch den PCR-Ansatz in eine barcodierte Multiwellplatte.

Der Barcode enthält alle Informationen, um die PCR in der zweiten Systemkomponente cobas z 480 ohne weiteren Eingriff in die Software sofort zu starten. Das System kann außerdem an das Labor-Informationssystem angeschlossen werden. Aktuell stehen zwei Testkits zur Verfügung: cobas 4800 CT/NG und HPV.

Testprinzip

Der cobas 4800 CT/NG-Test detektiert Chlamydia trachomatis nach dem Dual Target Prinzip und bietet mehr Sicherheit bei der Erfassung genetischer Varianten. Neben den Serovaren A-K und LV 1-3 werden beispielsweise plasmidfreie Chlamydien und die so genannte Schwedische Variante erkannt.

Unfruchtbarkeit durch bakterielle Infektionen

Eine verschleppte Genital-Infektion mit Chlamydia trachomatis (CT) ist die häufigste Ursache erworbener Unfruchtbarkeit in den westlichen Industrieländern. Eine der Ursachen liegt im meist asymptomatischen Verlauf. Als Koinfektion mit Chlamydien treten bei Frauen sehr häufig Infektionen mit Neisseria gonorrhoeae (NG) auf. Die Bakterien verursachen Entzündungen verschiedener Organe und können unbehandelt zu Unfruchtbarkeit bzw. während der Schwangerschaft zu Fruchtschädigungen und Fehlgeburten führen oder beim Neugeborenen Bindehautentzündung bis zur Erblindung verursachen.

Das Humane Papillomavirus (HPV) als Auslöser des Gebärmutterhalskrebses

In den 80er Jahren gelang es dem Virologen und Nobelpreisträger Harald zur Hausen erstmals, den Zusammenhang zwischen einer HPV-Infektion und dem Gebärmutterhalskrebs (Zervixkarzinom) nachzuweisen. In Deutschland gehen Experten von rund 12-14 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen aus; 1.566 Frauen starben im Jahr 2007 an Gebärmutterhalskrebs (Quelle: RKI, EpidBull 32/2009). Da die Latenzzeit in der Regel 15-25 Jahre beträgt, bieten Vorsorgeuntersuchungen wie der zytologische PAP-Test und der Nachweis der so genannten high risk HPV-Typen gute Chancen zur Prävention des Zervixkarzioms.

Für die Bestimmung der *Neisseria gonorrhoeae* wurden zwei neue Primer- und Sondensets entwickelt, die in der hochkonservierten Repeat Region DR-9 sehr spezifisch amplifizieren und detektieren. Aufgrund der Multiplex-PCR ist die gleichzeitige Doppelbestimmung von Chlamydien und Neisserien aus einer Probe möglich. Außerdem müssen Urinproben nicht mehr abzentrifugiert werden, sondern können zusammen mit Abstrichproben als Primärrohre direkt in den Automaten gestellt werden.

Der cobas 4800 HPV-Test weist die Gruppe der 14 high risk Genotypen qualitativ nach und genotypisiert die im Zervixkarzinom am häufigsten auftretenden Genotypen HPV 16 und HPV 18. Die Spezifität des HPV-Testes korreliert mit



Das cobas 4800 System mit zwei Gerätekomponenten.

dem klinischen Neoplasie-Status CIN2 und schließt die Interferenz mit low risk HPV-Genotypen sowie anderen Mikroorganismen aus.

Im Lauf dieses Jahres wird das Portfolio durch einen weiteren Parameter der Mikrobiologie erweitert: mit dem cobas 4800 MRSA Advanced Test kann der

Methicillin-resistente *staphylococcus aureus* schnell, spezifisch und mit hoher Sensitivität detektiert werden. 

Dr. Monika Mölders

Roche Diagnostics GmbH

Tel. 0621/759-4746

monika.moelders@roche.com

Diagnostik der Lyme-Borreliose



Die Lyme-Borreliose ist eine bakterielle Infektionskrankheit, die vorwiegend durch Schildzecken auf den Menschen übertragen werden kann. Die Tiere leben im Unterholz und Gras auf einer

maximalen Höhe von eineinhalb Metern. Nicht nur Waldgebiete sind ihr Jagdrevier. Auch in städtischen und dörflichen Fluss- oder Grünanlagen, in heimischen Gärten und vereinzelt sogar in der Wohnung (von Haustieren eingeschleppt) ist der Mensch vor Zeckenstichen nicht gefeit.

Stadien und Symptome

Eine Borrelioseinfektion verläuft in drei Stadien mit fließenden Übergängen: Die lokalisierte oder frühe hämatogene Streuung führt nach Tagen bis Wochen zur charakteristischen Wanderröte, die aber auch fehlen kann, sowie evtl. zum Borrelien-Lymphozytom oder zu einer „Sommergrippe“.

Die akute Organmanifestation kann nach Wochen bis Monaten zu einer Neuroborreliose mit Lähmungen von Gesichts- und Augenmotorik, starken Rumpf- oder Extremitätenschmerzen sowie Sensibilitätsstörungen führen. Chronische Gelenkbeschwerden, neurologische Veränderungen und Hautveränderungen (*Acrodermatitis chronica atrophicans*) kennzeichnen schließlich nach Monaten bis Jahren die chronische Organmanifestation. Möglich sind auch psychische Erkrankungen, zum Beispiel Depressionen.

Diagnostik

Die Diagnosestellung einer Borrelioseinfektion erfolgt grundsätzlich primär klinisch. Entsprechend den neueren diagnostischen Empfehlungen der Deutschen Borreliose-Gesellschaft e.V. sowie der International Lyme and Associated Diseases Society (ILADS/USA) wird ferner eine umfassende Labordiagnostik auf humoraler und zellulärer Ebene empfohlen.

Borrelien-Antikörper-Untersuchungen mittels EIA besitzen eine geringe Sensitivität und werden deshalb durch Borrelien IgM- und IgG-Immuno-

blot abgesichert. Da auch hier „seronegative“ Infektionen nicht auszuschließen sind, kann der extrem empfindliche VisE-Test (*Variable major protein-like sequence Expressed*) in EIA und Immunoblot mitgetestet werden. Ein einmaliger positiver Borrelien-Antikörper-Nachweis besagt nur, dass in der Vergangenheit ein Zeckenstich vorgelegen haben muss, bei dem Borrelien übertragen wurden.

Der Borrelien-Lymphozyten-Transformations-Test (LLT) gibt Auskunft über die aktuelle Aktivität und ist 20- bis 200-fach empfindlicher als ein EIA-Antikörper-Test. Die CD3-/CD57+ Zellen dokumentieren das Ausmaß der chronischen Immunsuppression bei chronischer Borreliose und sind prognostischer Faktor während und nach einer Antibiose. Therapieüberwachung und Staging auf zellulärer Ebene erfolgen vor, während und nach einer antibiotischen Therapie unter exakter Dokumentation der klinischen Symptome wie z.B. Gelenkbeschwerden.

Dr. Armin Schwarzbach

B-C-A Borreliose Centrum Augsburg