

Multiplex-PCR zum Virusnachweis

Multiplex-PCR ermöglicht den Nukleinsäure-Nachweis von Herpesviren, Adeno- und Enteroviren. Bei Einsatz der Multiplex-PCR kann der Nachweis verschiedener Virus-DNA/RNA oft in einem oder wenigen Ansätzen zusammengefasst werden.



Dr. Thomas Juretzek und Priv.-Doz. Dr. Heidrun Peltroche, Zentrum für Laboratoriumsmedizin, Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Carl-Thiem-Klinikum, Cottbus

Humane Herpesviren infizieren schon frühzeitig die menschliche Population und erreichen schließlich hohe Prävalenzen in der alternden Bevölkerung. Dabei verbleiben diese Viren nach der Primärinfektion latent in verschiedenen Körperzellen und werden durch das intakte Immunsystem kontrolliert. Während einer Immunsuppression können sie teilweise wieder reaktivieren und zu schweren Komplikationen im Rahmen von immunkompromittierenden Grunderkrankungen führen. Für die Therapie der Wahl von Herpes-simplex-Viren und Varizella-Zoster-Viren steht der antivirale Wirkstoff Aciclovir und für Cytomegalieviren und das Humane Herpes-Virus 6 der Wirkstoff Ganciclovir zur Verfügung. Die Reservemittel verursachen starke Nebenwirkungen, was ihren Einsatz erst beim Auftreten von Resistenzen oder Unverträglichkeiten vorsieht. Die Adenoviren, die ebenfalls schwere Erkrankung



© domaskina - stock.adobe.com

Methoden der Wahl. Die Verfügbarkeit von PCR-Ergebnissen 8h/7d (wünschenswert 24h/7d) ist eine weitere dringende Notwendigkeit für die zielgerichtete Therapie.

Multiplex-PCR ermöglichen effizientere Diagnostik

Da die Häufigkeit der Erregernachweise bei den unterschiedlichen Krankheitsbildern variiert, wird aus Kostengründen, Verfügbarkeit von Tests auf einer PCR-Plattform und der Materialmengen-Verfügbarkeit oft nur der Nachweis der wahrscheinlichsten Erreger zur Diagnostik angefordert. Diese Nachweise erfolgen meistens im Singleplex-Format (ein Erreger, eine PCR) und ohne Automatisierung auch nur werktags durch hoch spezialisierte Mitarbeiter.

Durch den Einsatz von Multiplex-PCR kann der Nachweis verschiedener Virus-DNA oft in einem oder wenigen Ansätzen zusammengefasst werden. Die Komplexität der PCRs ist dabei nicht unbegrenzt, kann aber die Anzahl des Erreger-Nachweises erhöhen. Nebenbei sollten die Kosten reduziert werden können und die Effizienz des Personal- und Geräte-Einsatzes gesteigert werden. Vor allem bei Proben von Kindern kann möglicherweise die heute oft unzureichende Probenmenge ausreichend sein bzw. effektiver eingesetzt werden.

Seltene therapierelevante Erreger sicher erfassen

Ein Fall aus unserer Klinik soll die Notwendigkeit der umfangreichen Erregersuche verdeutlichen. Bei einem heterolog stammzelltransplantierten Patienten sollte ein EDTA-Plasma auf das Vorhandensein von CMV- und HSV-DNA im Blut untersucht werden. Da Cytomegalieviren bei Stammzelltransplantierten häufig im Blut auftreten können, überraschte der Nachweis von CMV-Genomen nicht. Mit einer Viruslast von 150 Genomen/ml Blut lag die Viruslast eher an der unteren Nachweishgrenze.

Durch den Einsatz von zwei Multiplex-PCRs (1. HSV, VZV, ADV und 2. CMV, EBV, HHV6) wurden zusätzlich 300 Genome EBV und 65.000.000 Adenoviren-Genome/ml Blut nachgewiesen. Durch die Cidofovir-Therapie konnte die Adenoviren-Infektion gestoppt werden. Die CMV- und EBV-Nachweise oszillierten noch Tage im folgenden Monitoring um die untere Nachweishgrenze und dürften keine infektiologische Bedeutung gehabt haben. Das Ergebnis zeigt, dass seltene therapierelevante Erreger sicher erfasst werden konnten und dass durch den Multiplex-PCR-Einsatz eine Mischinfektion nachgewiesen wurde, was beim alleinigen Nachweis von CMV und HSV zu einer möglichen Fehlinterpretation und -therapie geführt hätte.

PCR-Diagnostik in enger Abstimmung mit Klinikern

In den meisten Krankenhäusern ist die PCR, wenn überhaupt, nur an Werktagen verfügbar. Mit der Etablierung von PCR-Vollautomaten sollte diese Lücke endlich geschlossen werden und die PCRs (ob singleplex oder multiplex) wenigstens einmal am Tag durchgeführt werden. Dabei ist der Einsatz nur unter Aufsicht von fach- und sachkundigem Personal durchzuführen, um die Notwendigkeit, Sinnhaftigkeit, Häufigkeit und Richtigkeit der Untersuchungen aus geeignetem Material zu gewährleisten. So ist z.B. Plasma dem Serum für die PCRs aufgrund der höheren Sensitivität vorzuziehen, oder viele CMV-seropositive, gesunde Menschen scheiden z.B. CMV im Urin aus, und somit ist der CMV-Nachweis aus Urin nur bei Neugeborenen bei Verdacht einer konatalen CMV-Infektion in den ersten 72 h sinnvoll. Steht zu wenig Material für mehrere Untersuchungen zur Verfügung, sollte die Analyse ausgesetzt werden und mit dem Kliniker die Reihenfolge der Untersuchung festgelegt werden. Positive PCR-Ergebnisse sollten immer mit dem Kliniker besprochen werden, um eine Therapie, Monitoring und Hygienemaßnahmen zu besprechen, aber auch um Laborkontaminationen rechtzeitig zu erkennen.

| www.ctk.de |

hervorrufen können, umfassen derzeit 53 bekannte Genogruppen, die in sechs Serogruppen zusammengefasst werden und den Menschen wiederholt infizieren können. Auch hier können während des Krankheitsverlaufes leichte bzw. schwere Komplikationen auftreten. Zur möglichen Therapie steht der Wirkstoff Cidofovir zur Verfügung.

Die Enteroviren stellen mit Abstand die heterogenste Gruppe mit über 100 verschiedenen Virusarten dar. Infektionen durch Enteroviren treten vorrangig in der Freiluftbadesaison in Mitteleuropa auf und sind die häufigsten Erreger der viralen Enzephalitis/Meningitis. Die Antikörper gegen Enteroviren sind kreuzreaktiv, aber nicht immer neutralisierend zu anderen Enteroviren, somit sind wiederholt Infektionen durch Enteroviren möglich. Die Therapie erfolgt vorrangig symptomatisch. Die Tab. 1 vermittelt einen kurzen Überblick über die zuvor beschriebenen Viren.

Schnelle, sichere Virus-Identifikation

Die sichere und schnelle Identifizierung der Viren ist die Grundlage für eine erfolgreiche antivirale bzw. symptomatische Therapie. Aufgrund der hohen Antikörperprävalenz und des Auftretens von kreuzreaktiv reagierenden Antikörpern gegen nahverwandte Arten sollte eigentlich die Antikörperdiagnostik

für die Akutdiagnostik nicht mehr zur Anwendung kommen. Aber für die epidemiologische Erfassung der Prävalenz der Bevölkerung und zur Ermittlung des Immunstatus bei Patienten ist die Bestimmung des spezifischen Immunglobulin G sinnvoll. Jedoch können Patienten mit einer schweren Immunsuppression nicht mehr mit einer adäquaten Antikörperproduktion antworten, was überhaupt die Interpretation von serologischen Befunden erschwert. Für die Akutdiagnostik bei Verdacht einer viralen Infektion bei stationären Patienten sind die PCRs die

Tab. 1: Übersicht von bedeutenden therapierbaren Viren (modifiziert und erweitert nach <https://msdmnls.co/2tH7sZF>)

Erreger	Erkrankungsbild	Prävalenz	Therapieoption Mittel der 1. Wahl	Therapie bei Resistenz-Entwicklung und Unverträglichkeit
HSV1	Gingivostomatitis, Keratokonjunktivitis, kutaner Herpes, Herpes genitalis, Herpes labialis, virale Meningitis/Enzephalitis, Ösophagitis, Pneumonie, disseminierte Infektion, Hepatitis	65–90 % Primärinfektion oft in der Kindheit	Aciclovir bzw. Valaciclovir	Foscarnet bzw. Famciclovir
HSV2	Herpes genitalis, kutaner Herpes, Gingivostomatitis, Neugeborenenherpes, virale Meningitis, disseminierte Infektion, Hepatitis	14–16,7 %	Aciclovir bzw. Valaciclovir	Foscarnet bzw. Famciclovir
VZV	Varizellen, Otitis media, Pneumonie, disseminierter VZV-Infektion virale Meningoenzephalitis	> 90 %	Aciclovir bzw. Valaciclovir	Foscarnet bzw. Famciclovir
EBV	Infektiöse Mononukleose, Hepatitis, Enzephalitis, Nasen-Rachen-Karzinom, Hodgkin-Lymphom, Burkitt-Lymphom, lymphoproliferative Syndrome*, orale Haarleukoplakie*	Im hohen Alter 80–90 %	Keine Therapie. Gelegentlich Ganciclovir-Einsatz beschrieben	
CMV	CMV-Mononukleose, Hepatitis, angeborene Zytomegalie, Retinitis, Pneumonie, Enzephalitis, Knochenmarksdepression, Colitis	40 % Europa, bis 100 % Dritte Welt	Ganciclovir und Valganciclovir	Foscarnet bzw Cidofovir