

Molekulare Detektion sexuell übertragbarer Erreger mittels
multiplex real-time Polymerase-Kettenreaktion

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität

von Nicole Wendt
geboren am 28.12.1993 in Jena

Gutachter

1. Frau Prof. Dr. med. Bettina Löffler

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Jena

2. Frau PD Dr. rer. nat et med. habil. Uta-Christina Hipler

Klinik für Hautkrankheiten, Universitätsklinikum Jena

3. Herr Prof. Dr. med Uwe Wollina

Klinik für Dermatologie und Allergologie, Städtisches Krankenhaus Dresden

Friedrichstadt

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.08.2020

Tag des Studienabschlusses: 09.11.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	3
2.1 Sexuell übertragbare Infektionen	3
2.2 Relevante Erreger, Diagnostik und Therapie	10
2.3 Methodik der multiplex real-time PCR und des Anyplex II STI-7 Panels	22
3 Fragestellung	35
4 Methodik.....	37
4.1 Patientenauswahl.....	37
4.2 Untersuchungsmaterialien	37
4.3 Testung auf einfache Infektionen mittels Standardtests	38
4.3.1 Detektion von <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	39
4.3.2 Detektion von <i>Chlamydia trachomatis</i>	40
4.3.3 Detektion von <i>Trichomonas vaginalis</i>	41
4.3.4 Detektion von <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>Ureaplasma urealyticum/Ureaplasma parvum</i>	41
4.4 Multiplex rt PCR für die Detektion von NG, CT, TV, MH, MG, UU und UP.....	43
4.5 Datenverarbeitung	44
5 Ergebnisse	46
5.1 Detektion mittels der Standardtests auf einfache Infektionen	46
5.2 Detektion mittels der multiplex rt PCR	47
5.3 Detektionsraten der Standardtests und der multiplex rt PCR im Vergleich	48
5.4 Ergebnisübereinstimmungen der Standardtests mit der multiplex rt PCR.....	51
5.5 Probenauswertung und Häufigkeiten der Erreger.....	54
5.6 STI-Infektionen der Patienten	56
5.7 Durchführung der Testmethoden im Vergleich	59
6 Diskussion	65
6.1 Vergleich der Detektionsraten und Auswirkungen auf die Therapie	65
6.2 Vor- und Nachteile der Standardtests und der multiplex real-time PCR.....	68
6.3 Die multiplex Testung für die Detektion von STI.....	70

6.4 STI-Pathogene für das Detektionspanel	72
6.5 Bedeutung der semiquantitativen Analyse der multiplex real-time PCR.....	73
7 Schlussfolgerung	75
8 Literatur- und Quellenverzeichnis	77
9 Anhang	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	VIII
Publikation	IX
Ehrenwörtliche Erklärung.....	XVII
Danksagung.....	XVIII

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
d	Tag
g	Gramm
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
n	Anzahl
nm	Nanometer
s	Sekunde
CI	Konfidenzintervall
CMTA	Catcher Melting Temperature Analysis
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DPO	Dual Priming Oligonucleotide-Technologie
dATP	Desoxyadenosin -5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DGI	disseminierte Gonokokken-Infektion
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-5'-Triphosphat
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, engl. enzyme-linked immunosorbent assay
FSU	Friedrich-Schiller-Universität
HBV	Hepatitis-B-Virus
HPV	Humane Papillom-Viren
HSV	Herpes-simplex-Viren
HWI	Harnwegsinfektion

IC	interne Kontrolle, engl. internal control
i. m.	intramuskulär
i. v.	intravenös
KGI	komplizierte Gonokokken-Infektion
LGV	Lymphogranuloma venereum
MG	<i>Mycoplasma genitalium</i>
MH	<i>Mycoplasma hominis</i>
MM	Mastermix
MSM	Männer mit sexuellem Kontakt zu Männern
NAAT	Nukleinsäure-Amplifikationstest, engl. nucleic acid amplification test
NC	Negativkontrolle, engl. negative control
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NGU	Nicht-Gonokokken-Urethritis
PC	Positivkontrolle, engl. positive control
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. polymerase chain reaction
PID	Unterleibsentzündung, engl. pelvic inflammatory disease
p. o.	peroral
PPLO	pleuropneumonia-like microorganisms
Q	Quencher
R	Reporter
RNase	Ribonuklease
rt	real-time
STD	sexuell übertragbare Erkrankung, engl. sexually transmitted disease
STI	sexuell übertragbare Infektion, engl. sexually transmitted infection
T_m	mittlere Schmelztemperatur
TOCE	Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension-Technologie
TV	<i>Trichomonas vaginalis</i>
U	Ureaplasmen
UDG	Uracil-DNA-Glycosylase
UGI	unkomplizierte Gonokokken-Infektion
UKJ	Universitätsklinikum Jena
UP	<i>Ureaplasma parvum</i>
UU	<i>Ureaplasma urealyticum</i>

1 Zusammenfassung

Sexuell übertragbare Infektionen (STI) sind aktuell ein weltweit wachsendes gesellschaftliches Problem, das die Gesundheitssysteme vor organisatorische und kostenintensive Herausforderungen stellt. Eine schnelle und spezifische Detektion von STI kann das Auftreten von Infektionsübertragung und schwerwiegenden Komplikationen verringern, da die umfangreiche Diagnostik eine erregeradaptierte antibiotische Behandlung ermöglicht. Die herkömmlichen diagnostischen Testverfahren sind in der Detektion mehrerer Pathogene in unterschiedlichen Probenarten limitiert und weisen Defizite in der Quantifizierung dieser Ergebnisse auf. Eine große Bedeutung könnte daher zukünftig der multiplex real-time (rt) PCR zuteil werden. Unsere Untersuchung analysierte die Nutzbarkeit dieses Verfahrens für eine mögliche Integration in den Laboralltag. Gegenstand der Analysen war der Vergleich der multiplex rt PCR mit den in der Routine-Diagnostik verwendeten Standardtests auf einfache Infektionen bezüglich des Arbeitsaufwands, der Durchführung und der Detektionsrate. Die Effektivität der Diagnostikoptionen wurde durch eine grobe Gegenüberstellung der Kosten beurteilt. Das Probenmaterial der symptomatischen Männer und Frauen wurde hinsichtlich der Infektionshäufigkeit analysiert und Urethralabstriche mit zugehörigen Urinproben verglichen. Die von der multiplex rt PCR ausgegebenen semiquantitativen Ergebnisse sollten dabei bezüglich einer möglichen Korrelation mit der Infektionsschwere vermessen werden. In Zusammenarbeit mit der Klinik für Hautkrankheiten, der Klinik für Urologie und der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Jena (UKJ) wurden 100 Proben von 82 symptomatischen Patienten untersucht. Die Proben wurden je nach Anamnese und klinischer Symptomatik an verschiedenen Entnahmestellen gewonnen. So konnten Urethral-, Vaginal-/Zervikal-, Anal-/Rektal- und Oralabstriche, sowie Urinproben und intraoperativ entnommene Aszitespunktate untersucht werden. Die multiplex rt PCR mit dem Anyplex II STI-7 Reaktionskit (Seegene Inc., Seoul, Südkorea) kann simultan auf *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Mycoplasma hominis* (MH), *Ureaplasma parvum* (UP), *Ureaplasma urealyticum* (UU) und *Trichomonas vaginalis* (TV) testen. In der Routine-Diagnostik wurden die Proben mit verschiedenen Testverfahren (singleplex PCR, Mikroskopie, bakterielle Kulturen) auf einzelne Erregerspezies untersucht. Die

konkreten Tests wurden von den behandelnden Ärzten angefordert. Die Testergebnisse der multiplex rt PCR wurden mit den Testergebnissen der Routine-Diagnostik verglichen und den Klinikern für eine adaptierte Antibiotikabehandlung mitgeteilt. Die beobachteten Übereinstimmungen der einzelnen Testverfahren lagen zwischen 92,9% und 100%, die Kappa-Koeffizienten zwischen 0,627 und 1,000. Über die Routine-Diagnostik angeforderte Tests ermittelten 28 Erregerinfektionen. Die multiplex rt PCR detektierte 40 weitere Erreger, die von den Klinikern aufgrund der Testvorauswahl nicht berücksichtigt wurden. Die häufigsten Erreger waren UP mit 16, CT mit 15 und NG mit 13 positiven Proben. Am häufigsten an Mehrfachinfektionen beteiligt waren UP, CT und UU. Von 82 Patienten wurden 27 auf einen Erreger und 14 auf multiple Erreger positiv getestet. Für die semiquantitativen Ergebnisse wurde keine Korrelation mit der Infektionsschwere erkannt. Insgesamt zeigte die multiplex rt PCR eine sehr hohe Übereinstimmung (99,5%) mit den Ergebnissen der durchgeführten Standardtests. Auffällig ist der hohe Anteil an Erregerinfektionen, der allein durch die Verwendung der multiplex rt PCR detektiert wurde. Demnach wurden diese Infektionen von den Klinikern in der Routine ungenügend diagnostiziert und therapiert. Weitere Vorteile im Vergleich mit den Standardtests sind die hohe Sensitivität, ein geringer Arbeits-, Kosten- und Zeitaufwand, niedrige Störanfälligkeit bei der Probengewinnung und -verwertung, sowie ein großes Analysespektrum pro Probe und Durchlauf. Für die Abklärung eines klinischen Infektionsbildes, für dessen Ursache ein weites Spektrum an Erregern in Frage kommen kann, ist die Zusammenstellung eines multiplex Detektionspanel sinnvoll. Dieses Panel sollte neben diagnostischen und therapeutischen, auch epidemiologische Aspekte berücksichtigen. Nachteilig kann die fehlende Möglichkeit einer Resistogramm-Erstellung sein. Zur Untersuchung eines möglichen Auftretens von Überdiagnose und Übertherapie sind weitere Studien notwendig. Die multiplex rt PCR mit dem Anyplex II STI-7 Detektionspanel kann aufgrund des geringen arbeitstechnischen Aufwands leicht in den mikrobiologischen Laboralltag integriert werden. Die schnelle, einfache und kosteneffektive Probenanalyse ohne Testvorauswahl liefert einen deutlichen diagnostischen Mehrwert durch die Erstellung eines umfangreichen Infektionsprofils. Der Patient vermag von der zügigen erregeradaptierten Behandlung profitieren, die vergleichsweise komplikations- und nebenwirkungsärmer sein kann. In diesem Zuge könnten die Behandlungskosten bei steigender Patientenzufriedenheit sinken.

2 Einleitung

2.1 Sexuell übertragbare Infektionen

Sexuell übertragbare Infektionen (STI) und Erkrankungen (STD) sind weltweit und aktuell wieder ein stetig wachsendes Gesundheitsproblem (World Health Organization 2017). Infolge der steigenden Infektionsinzidenzen und sich entwickelnden Antibiotikaresistenzen der STI-Pathogene, werden die Gesundheitssysteme mit Langzeitkomplikationen und immensen Kosten konfrontiert (Centers for Disease Control and Prevention 2013). WHO-Daten zufolge gibt es weltweit über 1 Mio. Neuinfektionen täglich (World Health Organization 2017). Jedes Jahr sollen 500 Mio. Neuinfektionen von behandelbaren STI erworben werden, wie Gonorrhoe, Chlamydiose, Syphilis und Trichomoniasis. Trotz der Möglichkeit der adäquaten Therapie dieser STI, bleiben sie ein gesellschaftliches Gesundheitsproblem, sowohl in Entwicklungs- als auch in Industrieländern. Daneben werden jährlich Millionen virale STI erworben, wie HIV, HSV, HPV und HBV, welche nicht durch derzeit existierende Medikamente eliminiert werden können.

Über die unmittelbaren Auswirkungen der Infektion hinaus, können STI ernstzunehmende Konsequenzen haben. So kann eine bestehende Infektion die Wahrscheinlichkeit der Übertragung weiterer STI-Erreger, z. B. infolge von Milieubeeinträchtigung und unerkannten Infektionsreservoirs, erhöhen (Kissinger und Adamski 2013, Freeman et al. 2006, Eron et al. 1996). Spezifische Auswirkungen können diese Infektionen im Rahmen einer Schwangerschaft haben. Eine bestehende Infektion der Mutter kann durch Übertragung schwerwiegende Folgen für das Kind haben, darunter ein verringertes Geburtsgewicht, neonatale Konjunktivitis, Sepsis, Pneumonie, kongenitale Deformitäten oder die Gefahr einer Totgeburt (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2016, Cox et al. 2016). Langzeitbesiedelungen und chronische Infektionen, z. B. mit HPV, HBV, HCV oder HIV, begünstigen die Entstehung maligner Erkrankungen (Nogueira Dias Genta et al. 2017, Hu et al. 2019, Alfano et al. 2013, Quatan et al. 2005) und beeinflussen den Therapieerfolg dieser signifikant

(Munagala et al. 2009, Bachtiry et al. 2002). Ebenso können die chronischen Entzündungen im Rahmen der pelvic inflammatory disease (PID) zu Infertilität führen (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2013, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2015, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2016). Die Behandlung dieser Folgekomplikationen finden sich zu einem Großteil in den Kosten der Gesundheitssysteme wieder. Screeningverfahren und Ursachensuche bei Infertilität, die Therapie von Zervixkarzinomen, Lebererkrankungen, perinataler Morbidität, Erblindung und Lungenerkrankungen im Kindesalter, sowie PID lassen die Ausgaben weiter ansteigen (WHO Press 2007). Eine zusätzliche und enorme Kostensteigerung resultiert, sobald der Aspekt der erhöhten HIV-Transmission und ihre Folgen mit einbezogen werden (WHO Press 2007, World Health Organization - Department of HIV/AIDS 2001).

Die Epidemiologie geht nicht nur den Krankheitshäufigkeiten in bestimmten Populationen nach, sondern auch den Ursprüngen und - im Falle der Infektionskrankheiten - den Gründen für ihre Verbreitung. Es existieren einige Risikofaktoren, welche bestimmte Populationen für das gehäufte Auftreten von STI prädestinieren. Diese Risikofaktoren unterscheiden sich teilweise infektionsspezifisch, einige gelten generell. Junges Alter ist als Risikofaktor vielen STI gemein. Jugendliche und junge Erwachsene (15-24 Jahre) stellen 25% der sexuell aktiven Bevölkerung und repräsentieren 50% der neu aufgetretenen STIs (Da Ros und Schmitt Cda 2008). Ebenso zeigt diese Altersgruppe vermehrtes *high-risk* Sexualverhalten (weiterer Risikofaktor) im Vergleich zur älteren Bevölkerung. Hierunter zählt beispielsweise Geschlechtsverkehr mit multiplen Partnern und ungeschützter Geschlechtsverkehr. Andere Gruppen, die gehäuft *high-risk* Sexualverhalten leben, sind Prostituierte, intravenös Drogenkonsumierende, Männer mit sexuellen Kontakten zu Männern (MSM) und Gefängnisinsassen, sodass in diesen Populationen ebenfalls vermehrt STI auftreten (Johnston und Mabey 2008, Centers for Disease Control and Prevention 2014). Weitere Risikofaktoren für einige STI sind mangelnde Hygiene, ein niedriger sozioökonomischer Status und die unbeschnittene Vorhaut beim Mann (O'Farrell 1993, Steen 2001, Weiss et al. 2006). Zur globalen Verbreitung von STI und resistenten Stämmen tragen auch international

Reisende bei. Hochrisikogruppen sind Trucker, Seemänner, Sex-Touristen und Langzeit-Besucher. Das Gefühl sexueller Freiheit, das Fehlen sozialer Befangenheit, Alkohol- und Drogenkonsum führen zu vermehrt zwanglosen sexuellen Zusammentreffen und reduzierter Kondomnutzung (Ward und Plourde 2006). Bei der epidemiologischen Betrachtung müssen die Begriffe Inzidenz und Prävalenz unterschieden werden. Die Inzidenz bezieht sich auf die Neuinfektionen innerhalb eines bestimmten Zeitraums (meist ein Jahr) und die Prävalenz bestimmt die Gesamtanzahl der Krankheitsfälle an einem bestimmten Zeitpunkt. Akute Erkrankungen oder solche mit hoher Mortalitätsrate zeichnen sich häufiger durch eine hohe Inzidenz und eine niedrige Prävalenz aus. Die Neuinfektionen innerhalb einer Zeitspanne sind erhöht, jedoch werden die Erkrankten schneller gesund oder versterben. In die Prävalenz zu einem bestimmten Zeitpunkt werden sie nicht einberechnet. Chronische Erkrankungen hingegen können hohe Prävalenzen haben, obwohl ihre Inzidenz gering ist. Die Erkrankten werden bei jeder Prävalenzbestimmung an verschiedenen Zeitpunkten miteinberechnet, zu den Neuinfektionen innerhalb eines Zeitraums zählen sie dann aber nicht mehr. Bezogen auf die folgenden epidemiologischen Betrachtungen der STI sollte dies bewusst gemacht werden.

Neben HPV-, HSV 2-, HIV- und HBV-Infektion, gehören Chlamydiose (CT), Gonorrhoe (NG), Syphilis (*Treponema pallidum*) und Trichomoniasis (TV) zu den häufigsten Neuinfektionen pro Jahr (World Health Organization 2017). Die verursachenden Erreger dieser letzten vier Infektionen können durch ein geeignetes Antibiotika-Regime behandelt werden - vorausgesetzt sie werden rechtzeitig und eindeutig identifiziert. Die Mehrzahl der STI-Pathogene zeigen ein ähnliches klinisches Krankheitsbild oder unspezifische Symptome (Tabelle 1), wie Dysurie, urethraler und vaginaler Ausfluss, Unterbauchschmerzen, azyklische Blutungen, Ausschläge, Lymphknotenschwellungen/Hautveränderungen im Leistenbereich, anogenitale Ulzera oder das anorektale Syndrom (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2015). Da diese Symptome durch verschiedene STI-Pathogene hervorgerufen werden können, stellt die klinische Erregerdiagnose den behandelnden Arzt vor eine Herausforderung. Die Wahrscheinlichkeit, mit der bestimmte Erreger in Betracht kommen und damit der Umfang der Labordiagnostik im Einzelfall, sind in hohem Maße abhängig von

klinischem Befund, Alter, Geschlecht und Sexualanamnese. Die herkömmliche Diagnostik detektiert dabei nur die für den einzelnen Test spezifischen Erreger, berücksichtigt aber nicht das in Frage kommende gesamte Erregerspektrum. Die zeitgerechte und umfassende Erkennung der Erreger hat aber eine relevante Bedeutung für das Therapieregime und damit den Krankheitsverlauf und die Komplikationsrate.

Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt die hohe Anzahl an Infektionen dar, die symptomlos verlaufen (Robert-Koch-Institut 2010a, Robert-Koch-Institut 2013). Dementsprechend gibt es neben der Ursachenbestimmung von Infektionszeichen zusätzliche Indikationen für die Durchführung von Erregertests (siehe 3.2). Voraussetzung einer solchen Erregerdiagnostik sollte stets eine vertrauensvolle Arzt-Patienten-Beziehung sein, die mittels Beratungsgespräch, ausführlicher Anamneseerhebung und angepasster klinischer Untersuchung, die Notwendigkeit weiterer labordiagnostischer Maßnahmen detektiert (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2015). Der Schweregrad einer Infektion sowie die Auswirkungen einer Infektion mit fakultativ pathogenen Keimen werden dabei von Immunstatus, Alter, Infektionsdauer, Co-Infektionen und Co-Morbidität beeinflusst.

Von Bedeutung wird bei den Betrachtungen die in jüngerer Vergangenheit gemachte Unterscheidung der Begrifflichkeiten *sexually transmitted infection* (STI) und *sexually transmitted disease* (STD). Da längst nicht alle Infektionen auch zu einer Erkrankung führen, findet diese Differenzierung immer mehr Gebrauch (Handsfield und Rietmeijer 2017). Eine Infektion mit sexuell übertragbaren Erregern (STI) schließt demnach - im Gegensatz zu dem Begriff STD - den symptomlosen Befall ein. Übertragung und Ansteckung sind in beiden Fällen möglich. Da es in der Diagnostik und für die Bekämpfung von STD und STI von Relevanz ist, möglichst viele Infektionen im frühen Stadium zu detektieren, wird sich folgend auf den Begriff STI konzentriert.

In Deutschland gibt es keine länderübergreifende STI-Surveillance und da einige STI mit einem hohen Anteil an asymptomatischen Infektionen vorkommen, ist eine Untererfassung der Infektionen sehr wahrscheinlich. Die genaue Anzahl von STI

sowie die Häufigkeiten von Komplikationen können daher nur grob geschätzt werden (Deutsche STI-Gesellschaft 2014). Die deutsche STI-Gesellschaft und die deutsche dermatologische Gesellschaft gehen derzeit von steigenden Inzidenzen bei den STI mit und den STI ohne Meldepflicht aus und verzeichnet ein schlechtes Abschneiden im internationalen Vergleich bezüglich der Teilnehmerrate am jährlichen STI-Check (Deutsche STI-Gesellschaft 2014, Buder et al. 2019).

Tabelle 1 Symptome, mögliche STI-Erreger und Differentialdiagnosen. In der Tabelle werden die wichtigsten Leitsymptome von STI mit den möglichen verursachenden Erregern, sowie die häufigsten Differentialdiagnosen veranschaulicht (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2015).

Symptome	Mögliche STI-Erreger	Differentialdiagnosen
Dysurie mit/ohne urethralem Fluor	CT Serovar D-K, NG, TV, Mykoplasmen, Ureaplasmen, HSV, <i>Candida spp.</i>	HWI mit anderen Erregern (Streptokokken), EBV, Adenoviren, externe Dysurie bei Hautläsion oder mechanische Reizung, Harnwegskonkremente
vaginaler Fluor	CT Serovar D-K, NG, TV, MH <i>Candida spp.</i> ,	bakterielle Vaginose, hormonell bedingter vermehrter Fluor, Kolpitis/Zervizitis durch andere Erreger (Streptokokken), vaginale Fremdkörper, genitale Malignome
anogenitales Ulcus	<i>Treponema pallidum</i> , HSV 1 + 2, <i>Haemophilus ducreyi</i> , CT Serovar L1-3	Verletzungen, Kratzartefakte, Mykosen, chronische Analfissur, ulzerierende Dermatosen
Hautveränderungen in der Anogenitalregion	Papeln: HPV, <i>Treponema pallidum</i> , Krätzmilben, Molluscum-Virus Bläschen: HSV 1 + 2, <i>Treponema pallidum</i>	chronische Ekzeme, Mykosen, Lichen ruber, Psoriasis, Impetigo contagiosa, atopische Dermatitis, Lichen sclerosus, Marisken, Arzneimittellexantheme, Präkanzerosen, Tumore

Tabelle 1 Symptome, mögliche STI-Erreger und Differentialdiagnosen (Fortsetzung).

Hautausschlag	<i>Treponema pallidum</i> , HIV, Krätze/ Milben	Virusinfektion, Arzneimittellexanthem, sonstige Dermatosen
Lymphknotenschwellung im Leistenbereich	<i>Treponema pallidum</i> , HSV 1 + 2, <i>Haemophilus ducreyi</i> , CT Serovar L1-3, NG	Lymphome, andere Malignome, Infektionen und Tumore der unteren Extremität, EBV
azyklische vaginale Blutung/Kontaktblutung	CT Serovar D-K, NG, TV, vaginale Candida-Infektion	hormonell bedingte dysfunktionale Blutungen, bakterielle Vaginose durch andere Erreger, Kolpitis/Zervizitis durch andere Erreger (Streptokokken), vaginale Fremdkörper, genitale Malignome insbesondere Zervixkarzinome
Unterbauchschmerzen (pelvic pain) bei Frauen, mit/ohne Dyspareunie	CT Serovar D-K, NG, MH, MG, Ureaplasmen	Adhäsionen, benigne Neubildungen, genitale Malignome, extragenitale Erkrankungen, psychosomatische Erkrankung
anorektales Syndrom (rektale Blutung, Defäkationsschmerz, Sekretion)	<i>Treponema pallidum</i> , CT Serovar D-K und L1-L3, NG, HPV	Analfissur, anale Verletzung, Hämorrhoidalleiden, M. Crohn, Colitis ulcerosa, Malignom

2.2 Relevante Erreger, Diagnostik und Therapie

Bestimmten Erregern kommt eine besondere Bedeutung in der Diagnostik von STI zu. Die Relevanz eines Erregers wird dabei von der Prävalenz, dem klinischen Erscheinungsbild, dem Prozentanteil asymptomatisch verlaufender Infektionen, den Langzeitkomplikationen und den vorhandenen Therapieoptionen bestimmt. So sind die bakteriellen Infektionen mit *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* und *Ureaplasma urealyticum*, sowie die parasitäre Infektion mit *Trichomonas vaginalis* besonders bedeutsam.

Chlamydia trachomatis (CT) ist die häufigste bakterielle Ursache für STI. Weltweite Prävalenzraten schwanken zwischen 5-15% (Imai et al. 2004, Ngandjio et al. 2003, Kucinskiene et al. 2006). Eine Infektion mit CT Serovar D-K wird bei ungefähr 70% der infizierten Männer symptomatisch, wohingegen sie bei etwa 70% der infizierten Frauen asymptomatisch verläuft (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2016). Bei Männern stellt die CT-Infektion die häufigste Ursache der Nicht-Gonokokken-Urethritis (NGU) dar. Das Hauptsymptom einer lokalen Infektion ist eine Dysurie. Der Urethralfluor ist dünnflüssig, glasig bis trüb und oft eitrig. Eine makroskopische Beurteilung des Sekrets ermöglicht keine klare Zuordnung, da ein ähnliches Bild bei einer Infektion mit NG oder TV besteht. Bei Männern breitet sich eine lokale Infektion weniger häufig in eine aufsteigende Infektion bis hin zu Prostatitis, Vesikulitis und Epididymitis aus (Robert-Koch-Institut 2010a). Unter Frauen findet sich die CT-Infektion beachtlich häufig in der Hochrisikogruppe der 15- bis 25-Jährigen (Wilson et al. 2002). Das könnte anatomische Ursachen haben, da die jugendliche Zervix nicht abschließend entwickelt und besonders anfällig für STIs ist (Sedlecki et al. 2001). Hier finden sich unterschiedliche Verläufe nach zervikaler Infektion abhängig von genetischen Faktoren, individuellen Immunreaktionen, Alter und Zahl der Reinfektionen. Initial ist die Infektion entweder asymptomatisch oder ein selbstlimitiertes, akut inflammatorisches Geschehen (Gross und Tyring 2011). Die SpekulumEinstellung einer Zervizitis zeigt Abbildung 1.



Abb. 1 Zervizitis. Die Abbildung zeigt die infizierte Portio bei SpekulumEinstellung (Gross und Tyring 2011). Erkennbar ist eine deutliche Rötung und Gefäßzeichnung, sowie vermehrter weißer, zähflüssiger Ausfluss, welcher die äußere Zervikalöffnung bedeckt. Konsistenz, Menge und Farbe können nach verursachendem Erreger variieren. Eine Erregerbestimmung allein über die Klinik ist insbesondere bei Mehrfachinfektion in den wenigsten Fällen eindeutig möglich. STI-Erreger der Zervizitis sind CT, NG, TV, MG, MH, Ureaplasmen, HSV und *Candida spp* (siehe Tabelle 1).

Unbehandelt kann es zur Keimaszension und zum Übergang von akuter in chronische Entzündung der inneren Genitale im Sinne einer PID kommen (Schuchardt und Rupp 2016). In Abhängigkeit der Ausprägung resultieren gravierende Spätfolgen wie tubare Sterilität, chronische Unterbauchschmerzen oder extrauterine Schwangerschaften (Shafer et al. 1999). Eine Übertragung auf das Neugeborene einer infizierten Mutter während der Passage des Geburtskanals kann zu einer Augeninfektion oder Pneumonie führen. Weltweit ist die häufigste Erkrankung, die durch eine CT-Infektion ausgelöst wird, das Trachom. Es wird hervorgerufen durch die Serovare A-C. Insbesondere in ländlichen und weniger entwickelten Gebieten sind seine Auswirkungen auf das innere Oberlid und die Hornhaut ein Hauptgrund für Erblindung. Eine weitere Erkrankung, welche durch CT ausgelöst wird, ist das Lymphogranuloma venereum (LGV). Die schmerzhafteste Lymphadenopathie wird durch die Serovare L1-3 verursacht und in drei Stadien unterteilt (Neves und Lupi 1997). Die primäre Läsion präsentiert sich durch Bläschen, kleine Erosionen und ulzeröse Areale für zwei bis drei Tage. Diese findet sich häufig genital, aber auch anal, rektal und oral. Sekundär folgt die schmerzhafteste Entzündung

und Schwellung der inguinalen und femoralen Lymphknoten mit ödematöser Hautverfärbung. Das tertiäre Stadium oder genito-anorektale Syndrom folgt nicht immer der sekundären Lymphadenitis. Unbehandelt kann es, infolge der Infektionsausbreitung und Lymphknotenrupturen, zu Gewebeuntergang, akuter Proktokolitis, genitalen Ödemen, Fibrose und chronisch granulomatöser Elephantiasis der Genitalien kommen. Proktitiden äußern sich häufig mit Schmerz, Blut- und Sekretbeimengungen im Stuhl, Tenesmen und Obstipation. Als Komplikationen sind Abszedierung, Fistelbildung und Ulzerationen zu nennen (Buder et al. 2019). Derzeit verzeichnen die LGV-Infektionen in Form der LGV-Proktitis (Abb. 2) insbesondere bei MSM einen Anstieg (Bremer et al. 2006, Dougan et al. 2007). Ein Großteil dieser Patienten ist HIV-co-infiziert.

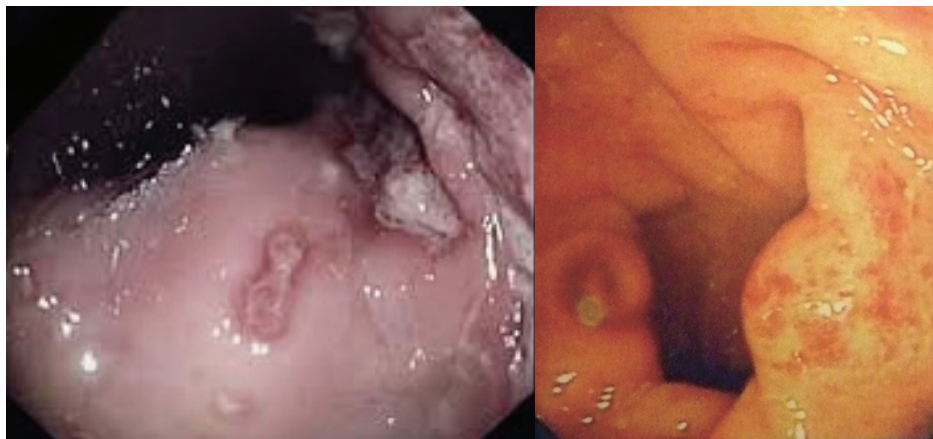


Abb. 2 Endoskopisches Bild einer rektalen LGV-Infektion (Mistrangelo et al. 2012). Die LGV-Proktitis zeigt sich vermehrt in der Gruppe der MSM. In der Endoskopie sichtbare Komplikationen können Abszedierung, Fistelbildung und Ulzerationen sein.

Die Gonorrhoe ist die zweithäufigste bakterielle STI und wird durch *Neisseria gonorrhoeae* (NG) hervorgerufen. Bei einer Infektion mit NG steht die Schleimhautinfektion an der Eintrittspforte im Vordergrund (Robert-Koch-Institut 2013). Es wird in eine unkomplizierte (UGI), komplizierte (KGI) und disseminierte Gonokokken-Infektion (DGI) unterschieden (Ison und Martin 2003). Die Keimaszension und Ausbreitung in den sonst sterilen oberen Genitaltrakt führt zu einer KGI, die Invasion ins Blut mit systemischen Komplikationen zu einer DGI. Lokal kommt es bei Männern zu Dysurie und eitrig gelb-grünem urethralen Ausfluss (Abb.

3). Die KGI schließt Prostatitis, Vesikulitis, Funikulitis und Epididymitis ein. Bei MSM findet sich häufig rektal der primäre Infektionsort mit analem Pruritus bis klassischer Proktitis.



Abb. 3 Gonorrhoe mit urethralem Ausfluss (Ison und Martin 2003). Die Gonokokken-Infektion wird bei Männern häufiger symptomatisch als bei Frauen. Lokale Symptome sind vermehrter eitrig gelb-grünlicher Ausfluss, Rötung und eine Dysurie.

Die UGI bei Frauen zeigt vermehrten, gelblichen Fluor und eine Begleiturethritis mit Dysurie. Etwa die Hälfte der infizierten Frauen hat keine subjektiven Beschwerden. Bei rund 50% findet sich eine symptomlose rektale sekundäre Kontamination. Ein Aufsteigen der Infektion wird durch Menstruation, Entbindung und Fehlgeburt begünstigt (KGI). Ist das Endometrium mitbeteiligt, können Menorrhagie und Zwischenblutungen auftreten. So können eine gonorrhoeische Salpingitis und PID mit langfristigen Folgen wie chronisch schmerzhaften Adhäsionen, Infertilität oder Extrauterin gravidität entstehen. Komplikationen stellen Ovarialabszesse, Peritonitis und Perihepatitis (Fitz-Hugh-Curtis-Syndrom) dar. Die DGI äußert sich über Knie- und Sprunggelenksarthritis und ist sehr selten geworden. Eine Infektion in der Schwangerschaft birgt Gefahren wie Frühgeburtlichkeit, niedriges Geburtsgewicht (Donders et al. 1993) und Mutter-zu-Kind-Übertragung unter der Geburt mit folgender Augeninfektion (Ophthalmia neonatorum). Pharyngeal verläuft die NG-Infektion oft asymptomatisch, da die Schleimhaut hier widerstandsfähiger gegenüber STI ist und der Speichel Erreger abspült und verdünnt (Robert-Koch-Institut 2013). Daher stellen

die oralen Infektionen ein großes Infektionsreservoir dar. Symptome bei oralem Befall können schmerzhaftige Schleimhautläsionen, Auflagerungen und Schwellung der Tonsillen sein (Abb. 4). Frauen und MSM zeigen häufig einen asymptomatischen und multilokulären Befall mit NG, was insbesondere bei der Diagnostik und der Untersuchung von Risikogruppen zu bedenken ist (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2013, Patton et al. 2014).



Abb. 4 Orale STI (STD Testing Near Me). Orale und pharyngeale STI bilden häufig ein asymptomatisches Infektionsreservoir z. B. für CT und NG. Symptomatisch können sie sich durch Schleimhautläsionen des harten und weichen Gaumens, der Lippen und des Zahnfleischs sowie Auflagerungen auf Zunge und Tonsillen präsentieren.

Mykoplasmen (MH, MG) und Ureaplasmen (UU, UP) lassen sich häufig im Urogenitaltrakt nachweisen (Leli et al. 2018, Zeng et al. 2016, Wang et al. 2016). Durch die besondere Bauweise der Zellmembran und ihrer Bestandteile, sowie das Fehlen der Zellwand können sie intrazellulär und gewebespezifisch verweilen und sich vermehren (Jensen 2004). Zu ihren Virulenzfaktoren gehören die Bildung leicht toxischer Stoffwechselprodukte und die Adhäsion an und das Eindringen in Wirtszellen (Burgos et al. 2006, Burgos et al. 2007). Die meisten klinischen Manifestationen sollen eine Folge der Entzündungsreaktion und weniger der direkten toxischen Effekte der Mykoplasmen-Zellkomponenten sein (Uuskula und Kohl 2002). Genitale Mykoplasmen finden sich vermehrt bei sexuell aktiven Jugendlichen und Erwachsenen, Männern wie Frauen. Die Prävalenz in den Populationen korreliert mit der Frequenz der sexuellen Beziehungen und der Anzahl an Sexualpartnern. MH und UU sind zwei der am häufigsten isolierten Mikroorganismen des Urogenitaltrakts.

Die Prävalenzen schwanken in Abhängigkeit der betrachteten Population. Dabei sind UP und MH die häufigsten Vertreter unter den genitalen Mykoplasmen und Ureaplasmen (Patel und Nyirjesy 2010). Die Prävalenz für UU scheint in Abhängigkeit der untersuchten Population bis zu 75% bei Frauen und 45% bei Männern zu betragen, wobei die verwendeten Testverfahren nicht konsequent zwischen UU und UP unterscheiden (Zeng et al. 2016, Lee et al. 2016, Ikonomidis et al. 2016). Nachweisraten von MH über verschiedene Populationen gemittelt, halten sich im einstelligen bis kleinen zweistelligen Prozentbereich. Die Prävalenzen für MG liegen eher im einstelligen Prozentbereich (Leli et al. 2018). Mykoplasmen und Ureaplasmen werden häufig zusammen mit CT und NG übertragen. In vielen epidemiologischen Betrachtungen werden sie zwar als STI geführt, wegen der teilweise hohen Prävalenzen und niedriger Virulenz dennoch in der Bedeutung als bakterielle STI hinter den CT- und NG-Infektionen erfasst.

Eine Infektion mit *Mycoplasma genitalium* (MG) verläuft bei bis zu 70% der Männer symptomatisch und dagegen bei bis zu 75% der Frauen asymptomatisch (Jensen et al. 2016). Die NGU ist die häufigste STD bei Männern. Bei einem Großteil der NGU spielt MG unabhängig von CT eine ätiologische Rolle (Bjornelius et al. 2000). Infizierte Männer berichten von Ausfluss und Dysurie. MG scheint insbesondere bei CT-negativer NGU und der *high-grade* Urethritis mit hohem Entzündungsgrad eine Rolle zu spielen (Totten et al. 2001). Eine MG-Infektion ist mit chronischen und rezidivierenden Urethritiden assoziiert und kann rektal zu einer Proktitis führen. Bei Frauen finden sich die Symptome Dysurie, Urethritis und Zervizitis mit vermehrtem Ausfluss (Manhart et al. 2003, Pepin et al. 2005, Gaydos et al. 2009). Es können Zwischen- oder postkoitale Blutungen auftreten, sowie bei chronischen Infektionen das klinische Vollbild einer PID (Abb. 5) entstehen (Haggerty 2008).

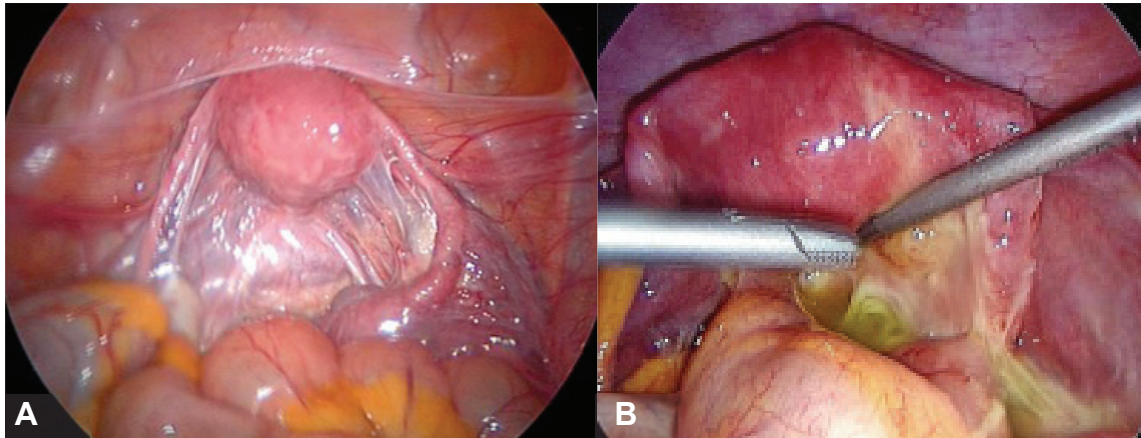


Abb. 5 Laparoskopisches Bild der PID (Mylonas 2016). **A** Deutlich zu erkennen sind links die Verklebungen zwischen Uterus, Tuben, Ovarien und parietalem Peritoneum. **B** Intraoperativ zeigen sich neben den Adhäsionen, purulente Flüssigkeitsansammlungen, vermehrte Gefäßzeichnung und vernarbtes Gewebe. Mögliche STI-Erreger einer PID durch Keimaszension sind CT, NG, MG und selten TV (siehe Tabelle 1).

Die infektiologischen Konsequenzen einer Besiedlung mit *Mycoplasma hominis* (MH) scheinen sich bei Frauen auf die Assoziation zu bzw. Aufrechterhaltung der bakteriellen Vaginose zu konzentrieren (Keane et al. 2000, Taylor-Robinson und Rosenstein 2001). Darüber hinaus kann MH im Sinne einer symbiotischen Beziehung in TV-Protozoen leben und sich vermehren. Die Beschreibung dieser ersten symbiotischen Verbindung zweier obligat *human* pathogener Keime, setzt erneut die Bedeutung und Untersuchung von Co-Infektionen und ihren Ausprägungen in den Vordergrund. Interessant sind diese Betrachtungen hinsichtlich der Virulenz und Therapieresistenz (Dessi et al. 2005), sowie dem insgesamt gesteigerten Aufkommen von Infektionen mit multiplen Erregern bei STDs allgemein.

Die Einführung von NAATs erlaubte eine Unterscheidung der Spezies *Ureaplasma urealyticum* in *Ureaplasma parvum* (zuvor UU Biovar 1) und *Ureaplasma urealyticum* (zuvor UU Biovar 2). Es gibt noch keine eindeutigen Beweise, ob die Mikroorganismen als Pathogene oder lediglich als Co-Faktoren in Assoziation mit genitalen Infektionen angesehen werden müssen (Patel und Nyirjesy 2010). Einige Autoren beschrieben sie als gewöhnliche Kommensalen (Guyen et al. 2007, Marovt et al. 2015), andere brachten sie in Zusammenhang mit pathologischen Zuständen (Vouga et al. 2014, Gupta et al. 2009). In diesen Fällen wurden sie mit Zervizitis und Urethritis assoziiert. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch Faktoren,

wie Studiendesign, Studienpopulation, bewertete Auswirkung, Entnahmeort der Proben und verwendete Detektionsmethode, wie Serologie, bakterielle Kultur und PCR, beeinflusst und erklärt werden. Ebenso lässt sich die vorhandene Literatur vor dem Hintergrund der nachträglichen Unterscheidung in zwei Arten nur schwer hinsichtlich Virulenz und Infektionsauswirkungen bewerten. Durch die Nutzung neuer PCR-Methoden für die Detektion der Ureaplasmen, kann die Epidemiologie dieser Mikroorganismen im Genitaltrakt möglicherweise besser definiert werden (McIver et al. 2009).

Trichomonas vaginalis (TV) ist ein flagelliertes Protozoon und weltweit die häufigste nicht-virale Ursache von STI (Van Der Pol et al. 2005). In Deutschland wird die Prävalenz allerdings geringer als die von CT und NG beobachtet (Robert-Koch-Institut 2010b). Bei Männern findet sich häufiger ein asymptomatischer Verlauf als bei Frauen. Die klinischen Manifestationen werden sehr heterogen dokumentiert. Bei Männern können sich TV-Infektionen mit Dysurie und Ausfluss präsentieren. Zu den Auswirkungen bei Frauen zählen juckende Vaginitis mit schaumig-übelriechendem Ausfluss, Dysurie und Dyspareunie (Sherrard et al. 2014). Selten kommt es zu einer atypischen PID. Bedeutsam ist die nachweislich erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine Ansteckung mit weiteren STI, insbesondere mit HIV, sowie die erhöhte Transmission von HIV (Kissinger et al. 2009). Das könnte mit der lokalen Entzündungsreaktion auf die Parasiten und der gestörten mukosalen Barriere erklärt werden. Die Ansammlung von Immunzellen und die pro-inflammatorischen Zytokine spielen dabei eine erhebliche Rolle (Guenther et al. 2005, McClelland et al. 2007). Ein weiterer Aspekt, der die Bedeutung von sexuell übertragbaren Co-Infektionen unterstreicht, ist die symbiotische Beziehung von TV und MH mit gesteigerter Pathogenität (Dessi et al. 2005).

Dementsprechend werden das Interesse an und die Diagnostik von Co-Infektionen und Mehrfachinfektionen immer bedeutsamer. Bisherige Untersuchungen zeigen die anfänglich beschriebenen Häufungen gewisser Erreger und die sich überlappenden Risikofaktoren in bestimmten Populationen. Die sich gegenseitig beeinflussenden Erreger und teilweise eingegangenen Symbiosen (siehe TV und MH), machen eine umfängliche Erregerkenntnis relevant für den Therapieerfolg und etwaige Verhaltens- und Behandlungsoptionen. Die Prävalenzen der Co-Infektion z.B. von UU und MH

präsentierten sich bis zu 18% (Zeng et al. 2016). Die Pathogenität bei Kombination der Erreger scheint erhöht (Kwak et al. 2014). Weitere häufig detektierte Co-Infektionen sind CT und NG. So waren 15% der CT-infizierten männlichen Patienten der Sentinel Surveillance auch NG-positiv (Robert-Koch-Institut 2010b). Bei 10-30% der NG-infizierten Patienten liegt zusätzlich eine CT-Infektion vor. Bei Frauen wurden gleichermaßen Co-Infektionen von NG und TV beobachtet.

Neben der Symptomabklärung gibt es anamnestische Indikationen zur Testung auf STI (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2015). Generell sollte urethraler oder vaginaler Ausfluss bei unter 30-jährigen Patienten mit neuem Partner, mukopurulente Zervizitis, akute PID oder Epididymo-Orchitis bei unter 40-jährigen Patienten hinsichtlich sexuell übertragbarer Erreger untersucht werden. Bei Anamneseangaben des Patienten wie das Vorhandensein von anderen STI, Sexualpartner mit bekannten STI, häufig wechselnde/neue Sexualpartner mit erhöhtem Risiko für STI, ein Risiko aus epidemiologischer Sicht, injizierender oder intranasaler Drogenkonsum oder Vergewaltigung/sexueller Missbrauch sollten ebenfalls labordiagnostische Untersuchungen folgen (Robert-Koch-Institut 2013, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2015).

Bei der Betrachtung der häufigen Symptome und des klinischen Bildes, welche jeweils von den sieben Erregern verursacht werden, wird eine hohe Überschneidung und demnach schwere klinische Differenzierung deutlich. Ebenso finden sich viele Parallelen hinsichtlich der Indikationen zur Testung auf STI. Eine simultane Erregertestung bei vorliegender Symptomatik oder zur situativen und risikobedingten Abklärung scheint sinnvoll (Bercot et al. 2015, Schmitt et al. 2014). Die Tabelle 2 veranschaulicht die derzeitig verbreiteten diagnostischen Verfahren und die leitliniengerechte Therapie dieser sieben Erreger (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2015, Jensen et al. 2016). Auffällig sind die unterschiedlichen Detektionsverfahren der Routine-Diagnostik wie Kultur, Mikroskopie und NAAT, häufig in Form einer singleplex rt PCR. Es müssen zum Teil unterschiedliche Probenotypen mit konkret einzuhaltenden Bedingungen für die erfolgreiche Durchführung der verschiedenen Tests entnommen werden (Gross und Tying 2011). Das gilt z. B. für die umgehend anzulegende bakterielle Kultur für

den Trichomonaden-Nachweis oder die strenge Unterscheidung trockener Abstriche ohne Transportmedium und Abstriche, die zwingend in einem Transportmedium zu transferieren sind. Durch die ausgesprochen hohe Sensitivität und Spezifität der NAAT haben sie in der STI-Diagnostik zunehmend an Bedeutung gewonnen (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2015, Skulska et al. 2015, Mlynarczyk-Bonikowska et al. 2015). Eine Vereinfachung der Probengewinnung und -verarbeitung würde eine erhebliche Erleichterung für Patienten, Kliniker und Labor bedeuten. Der präzisen STI-Diagnose kann eine spezifisch auf den Erreger angepasste Therapie folgen (Wagenlehner et al. 2016, Gaydos 2017). Die Erregerinfektionen werden auch bei asymptomatischem Verlauf behandelt, die UP-Besiedlung häufig nur bei immunsupprimierten Patienten, Schwangeren, Kinderwunsch-Patienten oder Mehrfachinfektion von STI. Sinnvoll ist überwiegend die Mitbehandlung des Partners (Wagenlehner et al. 2016).

Tabelle 2 Übersicht der Erregerdiagnostik und -therapie. Es werden die diagnostischen Verfahren und Therapieschemata für die jeweiligen Erregerinfektionen dargestellt (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2015, Jensen et al. 2016). Als Untersuchungsmaterialien dienen bei Verdacht auf STI und lokalen Infektionszeichen urethrale, zervikale, vulvovaginale, anale, pharyngeale oder konjunktivale Abstriche und Urinproben, z. B. Erststrahlurin, Morgenurin, Urinsediment. Für die Untersuchung von pharyngealem und analem Abstrichmaterial mit kommerziellen NAAT gibt es derzeit noch keine Zulassung, sodass das analysierende Labor zuvor eine entsprechende Validierung gemäß den Qualitätssicherheitsstandards vorgenommen haben muss. Die Erregerinfektionen werden auch bei asymptomatischem Verlauf behandelt, die UP-Besiedlung häufig nur bei immunsupprimierten Patienten, Schwangeren, Kinderwunsch-Patienten oder Mehrfachinfektion von STI.

Erreger	Diagnostisches Verfahren	Therapie
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1. NAAT	2× Doxycyclin 100 mg p. o. für 7 d <i>Schwangerschaft:</i> 1× Azithromycin 1,5 g p. o., bei Co-Infektion mit NG 1× Azithromycin 500 mg p. o. für 1 d + nachfolgend 250 mg p. o. für 4 d <i>LGV/hämorrhagische Proktokolitis:</i> 2× Doxycyclin 100 mg p. o. für > 21 d
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1. Mikroskopie 2. Kultur (Selektivmedien, 5-10% CO ₂ , 35-37 °C, 70-80% relative Luftfeuchtigkeit) 3. NAAT	<i>Urethra, Zervix, Rektum:</i> 1× Ceftriaxon 1 g i. m./i. v. + Azithromycin 1,5 g p. o. <i>Pharynx:</i> siehe oben + Resistenztestung! <i>Epididymo-Orchitis:</i> siehe oben + nachfolgend 2× Doxycyclin 100 mg für 10-14 d <i>PID:</i> siehe oben + nachfolgend 2× Levofloxacin 500 mg p.o. für 10-14 d + 3× Metronidazol 400 g p. o. für 10-14 d) <i>Schwangerschaft/Stillzeit:</i> 1× Ceftriaxon 1 g i. v. (Therapiekontrolle NAAT/Kultur 2 Wochen nach Therapieende)

Tabelle 2 Übersicht der Erregerdiagnostik und -therapie (Fortsetzung).

<i>Trichomonas vaginalis</i>	1. Mikroskopie (Nativpräparat, Dunkelfeld oder Phasenkontrast) 2. Kultur (umgehend) 3. NAAT	1× Metronidazol 2 g p. o.
<i>Mycoplasma hominis</i>	1. Kultur (spezielle Kulturmedien z. B. PPLO- Nährlösung, Mykoplasmen- Agar, 37 °C) 2. NAAT	2× Doxycyclin 100 mg p. o. für 7 d
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2. NAAT	2× Doxycyclin 100 mg p. o. für 7 d
<i>Ureaplasma parvum</i>	1. NAAT	2× Doxycyclin 100 mg p. o. für 7 d
<i>Mycoplasma genitalium</i>		<i>unkompliziert, Schwangerschaft:</i> 1× Azithromycin 500 mg p. o. für 1 d + nachfolgend 250 mg p. o. für 4 d (Therapiekontrolle 4-6 Wochen nach Therapiebeginn, cave: Makrolid-Resistenz, dann Moxifloxacin 400 mg p. o. für 7-10 d) <i>PID, Epididymitis:</i> Moxifloxacin 400 mg p.o. für 14 d

2.3 Methodik der multiplex real-time PCR und des Anyplex II STI-7 Panels

Die PCR als künstliches Verfahren zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA ermöglicht die Amplifikation sehr geringer Nukleinsäuremengen aus den unterschiedlichsten Ausgangsmaterialien (Müller und Prange 2016). Sie stellt seit ihrer Erfindung 1983 von Kary Mullis eine molekularbiologische Technik mit sehr großer Bedeutung in der Forschung sowie der Diagnostik dar. Das Prinzip einer PCR ist in Abbildung 2 veranschaulicht. Die Arbeitsschritte lassen sich wie folgt beschreiben (Gassen et al. 1994): eine doppelsträngige DNA (dsDNA) wird denaturiert, an der sich am 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereichs komplementäre Oligonukleotide (Primer) anlagern (Annealing oder Primerhybridisierung). Für das Gelingen der PCR ist eine vollständige Denaturierung sehr wichtig, da bei inkompletter Auftrennung die Annealing-Effizienz herabgesetzt wird. Zu Beginn sollte ein ausreichend langer Denaturierungsschritt erfolgen. Eine hitzestabile DNA-Polymerase (Saiki et al. 1988) verlängert (elongiert) die Oligonukleotide in Anwesenheit freier Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs). Die Elongation erfolgt bei dem Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerase. Die Elongationszeit wird von der Prozessivität der Polymerase und von der Länge der zu amplifizierenden DNA-Matrize bestimmt. Enzyme mit *proofreading*-Aktivität arbeiten etwas langsamer als Enzyme ohne diese Eigenschaft. Der entstehende DNA-Doppelstrang wird solange von der DNA-Polymerase elongiert, bis diese von der DNA abfällt oder sie unterbrochen wird. Solch ein Abbruch kann z. B. durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 95 °C verbunden mit einer wiederholten Denaturierung der dsDNA erfolgen. Während der Zyklen ist eine Denaturierung von einigen Sekunden ausreichend. Bei Abkühlung des Ansatzes auf 60-40 °C herunter, binden sich die freien Primer in Abhängigkeit ihrer mittleren Schmelztemperatur (T_m) an die komplementären Sequenzen der DNA-Matrize. Dann kann die Synthese eines weiteren Doppelstranges wiederholt werden. Die optimale Annealing-Temperatur muss für jedes Primer-Paar bestimmt werden. Wird die Temperatur zu hoch gewählt, findet keine Primerhybridisierung statt und somit entsteht auch kein PCR-Produkt. Ist die Temperatur zu niedrig gewählt, kommt es zu Fehlpaarungen und unspezifischen PCR-Produkten. Nach dem letzten Zyklus wird ein finaler Elongationsschritt angehängt, um partiell verlängerte Produkte zu vervollständigen, da die DNA-Polymerasen mit steigender Zykluszahl langsamer werden. Anschließend können

DNA-Produkte mit verschiedenen Verfahren detektiert werden. Diese Analyse geschieht dann als Endpunktbestimmung des DNA-Produktes.

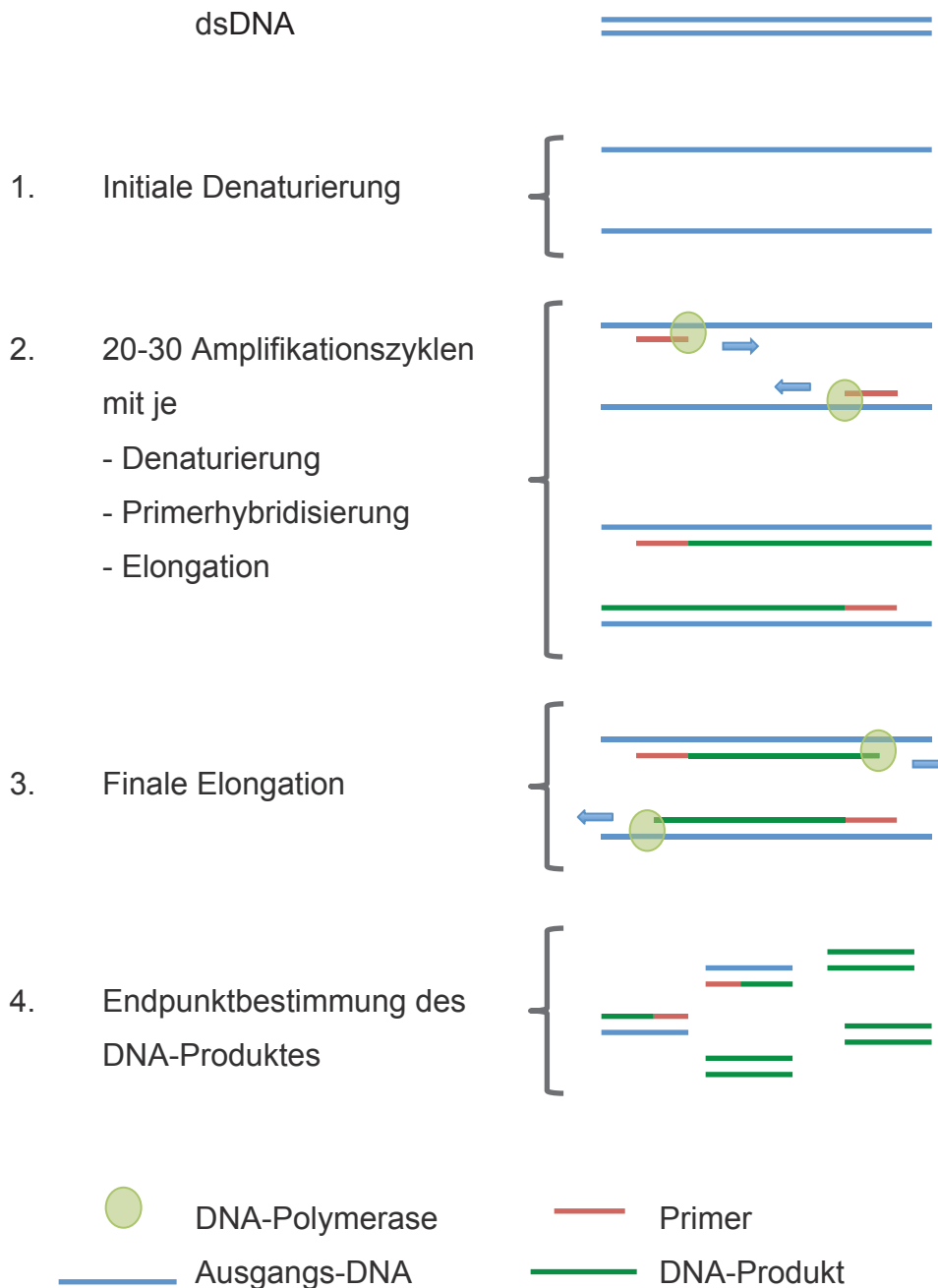


Abb. 6 Arbeitsschritte einer PCR. Die Abbildung zeigt die Arbeitsschritte einer einfachen diagnostischen PCR (eigene Darstellung). Die doppelsträngige Ausgangs-DNA wird durch einen initialen Denaturierungsschritt aufgetrennt. Anschließend folgen die Amplifikationszyklen mit einer kurzen Denaturierung, Primerhybridisierung an die DNA-Matrize und Elongation durch die DNA-Polymerase. An die 20-30 Amplifikationszyklen schließt sich ein finaler Elongationsschritt an. Die entstandenen DNA-Produkte können analysiert werden. Je nach Untersuchungsanforderung sind die Arbeitsschritte abgeändert und bezüglich Temperatur, Dauer und Wiederholungen optimiert sowie weitere Schritte vor oder nachgeschaltet.

Durch die Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase können alle Komponenten (Enzym, Matrize, Primer, dNTPs, Cl^- Ionen, Mg^{2+} Ionen, etc.) in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt und die DNA vollautomatisch in einem Thermocycler amplifiziert werden. Wegen der exponentiellen Vervielfältigung zeigt sich die Effizienz einer PCR bereits bei der Durchführung weniger Zyklen. In der Regel reicht eine Zyklusanzahl von 25-30. Eine Erhöhung der Zykluszahl steigert das Risiko, dass fehlerhafte Nukleotide eingebaut oder unspezifische DNA-Fragmente amplifiziert werden. Nach 30 Zyklen können 10^9 Kopien erhalten werden (Müller und Prange 2016).

In der Routine-Diagnostik von Infektionskrankheiten ist die vollautomatische Detektions-PCR mit der Verwendung eines Thermocyclers weit verbreitet. Bekannte spezifische DNA-Fragmente der gesuchten Infektionserreger im Probenmaterial werden so vervielfältigt und detektierbar. Für die Detektions-PCR müssen geeignete DNA-Polymerasen folgende Kriterien aufweisen: Toleranz gegenüber Puffer- und Konzentrationsschwankungen, hohe Aktivität bei optimaler Elongationstemperatur, niedrige Aktivität bei Raumtemperatur und ein günstiger Preis (Müller und Prange 2016).

Je nach Anforderung der Untersuchung stehen verschiedene Varianten der PCR mit unterschiedlichen Messverfahren und Prinzipien zur Verfügung. Bei der Variante der *real-time* (rt) PCR wird die DNA-Detektion über die Bestimmung der Fluoreszenz ermöglicht. Diese kann im Reaktionsgefäß und somit zu beliebigen Zeitpunkten während der PCR gemessen werden. Durch eine kontinuierliche Messung der Fluoreszenz kann die Zunahme des DNA-Produktes während der exponentiellen Phase in Echtzeit verfolgt werden (Kubista et al. 2006). Das ist ein großer Unterschied zur Endpunktbestimmung des DNA-Produktes bei einem PCR-Ansatz ohne Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen. Empfohlen wird bei der rt PCR die Durchführung von bis zu 50 Amplifikationszyklen, da die erforderliche Sensitivität teilweise nur durch diese große Anzahl an PCR-Zyklen erreicht werden kann (Müller und Prange 2016). Die rt PCR-Geräte sind sogenannte LightCycler. Es lässt sich das PCR-Temperaturprofil einprogrammieren und der Reaktionsverlauf kann in Echtzeit über eine Lichtemission von Fluoreszenzsonden verfolgt werden. Hierzu ist neben den beiden üblichen PCR-Primern eine Hybridisierungsprobe notwendig, welche sequenzspezifisch an die Target-DNA bindet. Diese Sonde ist mit zwei

verschiedenen Fluorochromen markiert (Woo et al. 1998) – ein Reporter-Farbstoff und ein Quencher-Farbstoff (Abb. 7). Solange diese Fluorochrome in räumlicher Nähe zueinander sind, z. B. am Anfang der PCR, gibt es kein Lichtsignal (Kreuzer et al. 2001). Die Hybridisierungssonde bindet sequenzspezifisch an die Target-DNA nachdem diese im Amplifikationszyklus denaturiert. Im Schritt der Elongation ersetzt die DNA-Polymerase mittels der 5'-3'-Exonukleaseaktivität die zuvor gebundene Hybridisierungssonde Nukleotid für Nukleotid und Reporter und Quencher werden getrennt (Holland et al. 1991). Daraufhin emittiert der Reporter Licht einer bestimmten Wellenlänge. Die Lichtemission kann während der gesamten PCR-Reaktion von den optischen Detektoren gemessen werden. Bei Mitführen einer Amplifikationskontrolle und Vergleich des Schwellenwerts des Fluoreszenzsignals können Rückschlüsse auf die Anfangskonzentration gezogen werden.

Ein Vorteil der rt PCR liegt darin, dass mit dem zeitgleichen Verfolgen der Produktakkumulation eine Aussage getroffen werden kann, ob die PCR-Reaktion erfolgreich war oder nicht. Von Vorteil ist, dass aufgrund der Messmethode das Reaktionsgefäß nicht geöffnet werden muss, sodass die Gefahr der Kontamination am Arbeitsplatz und der Arbeitsaufwand gering gehalten werden. Der größte Vorteil der rt PCR ist der Rückschluss auf die Anfangskonzentration des DNA-Templates. Das erklärt sich durch die Korrelation der Menge an Produkt mit der Menge an zuvor eingesetzter DNA (Müller und Prange 2016).

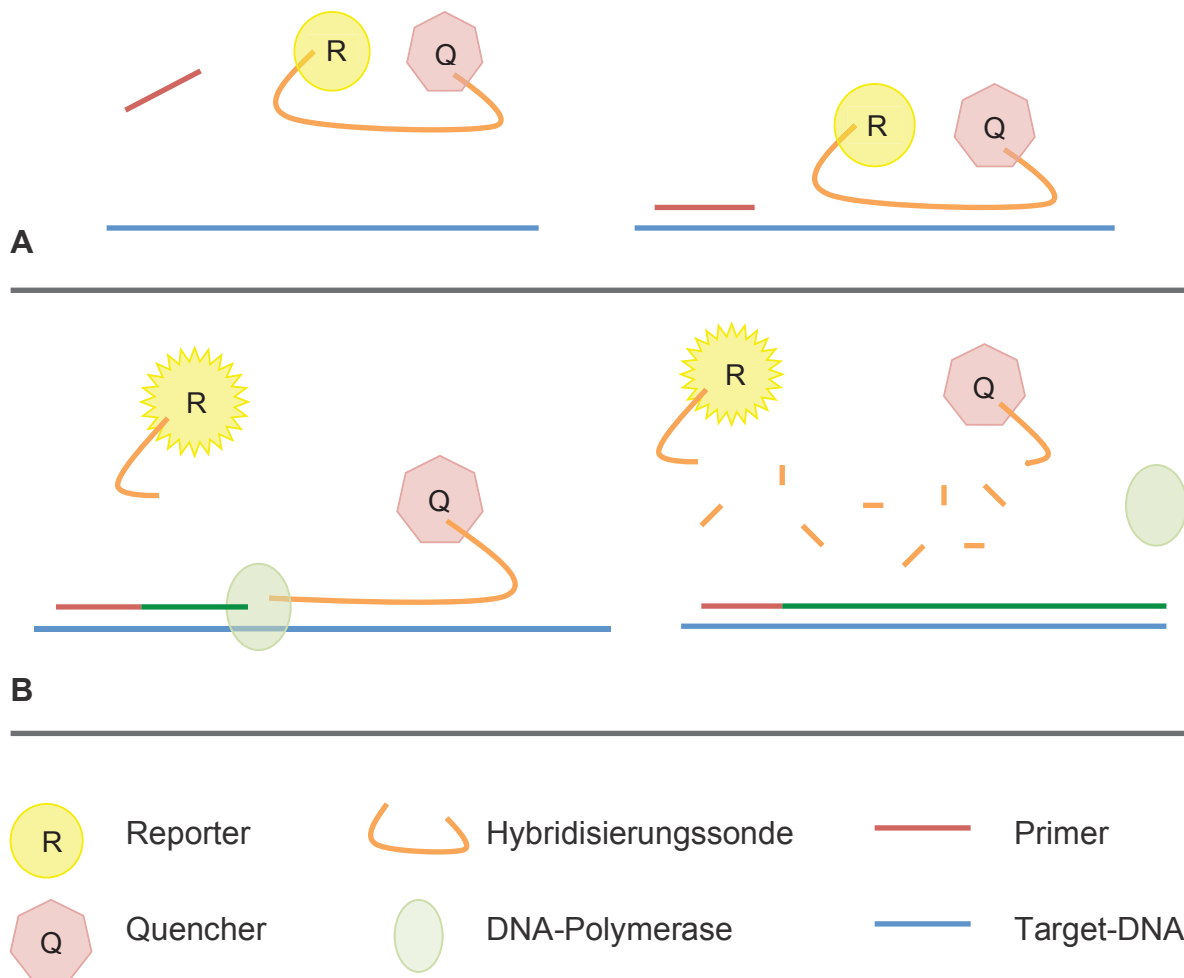


Abb. 7 Hybridisierungssonde mit Reporter-Farbstoff (R) und Quencher-Farbstoff (Q). A Solange die Hybridisierungssonde als Sequenz besteht, befinden sich R und Q in räumlicher Nähe zueinander, sodass der Quencher das Lichtsignal des Reporters unterdrückt. Im Schritt der Primerhybridisierung bindet die Hybridisierungssonde an die Target-DNA. B Die DNA-Polymerase ersetzt im Schritt der Elongation die zuvor gebundene Hybridisierungssonde, sodass Reporter und Quencher getrennt werden und die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs als Lichtemission messbar wird (eigene Darstellung).

Die multiplex rt PCR erlaubt die Amplifizierung und den Nachweis von mehr als einer Template-DNA in einem Reaktionsgefäß. Häufig wird der Nachweis der Sequenzen mit einer internen Amplifikationskontrolle (sog. Standard) kombiniert, um die Abwesenheit von Inhibitoren zu detektieren und falsch-negative Ergebnisse auszuschließen. Diese interne Kontrolle wird dem Reaktionsansatz beigefügt, um den erfolgreichen Ablauf der PCR nachzuvollziehen. Das Verfahren setzt allerdings voraus, dass die verschiedenen sequenzspezifischen Hybridisierungs sonden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen und zugehörigem Quencher markiert sind. Die Emissionsspektren der verschiedenen Reporter-Farbstoffe müssen sich deutlich

unterscheiden und dürfen sich nicht überlappen. So kann jedes detektierte Fluoreszenzsignal der Amplifizierung und dem Nachweis einer speziellen Template-DNA zugeordnet werden (Abb. 8).

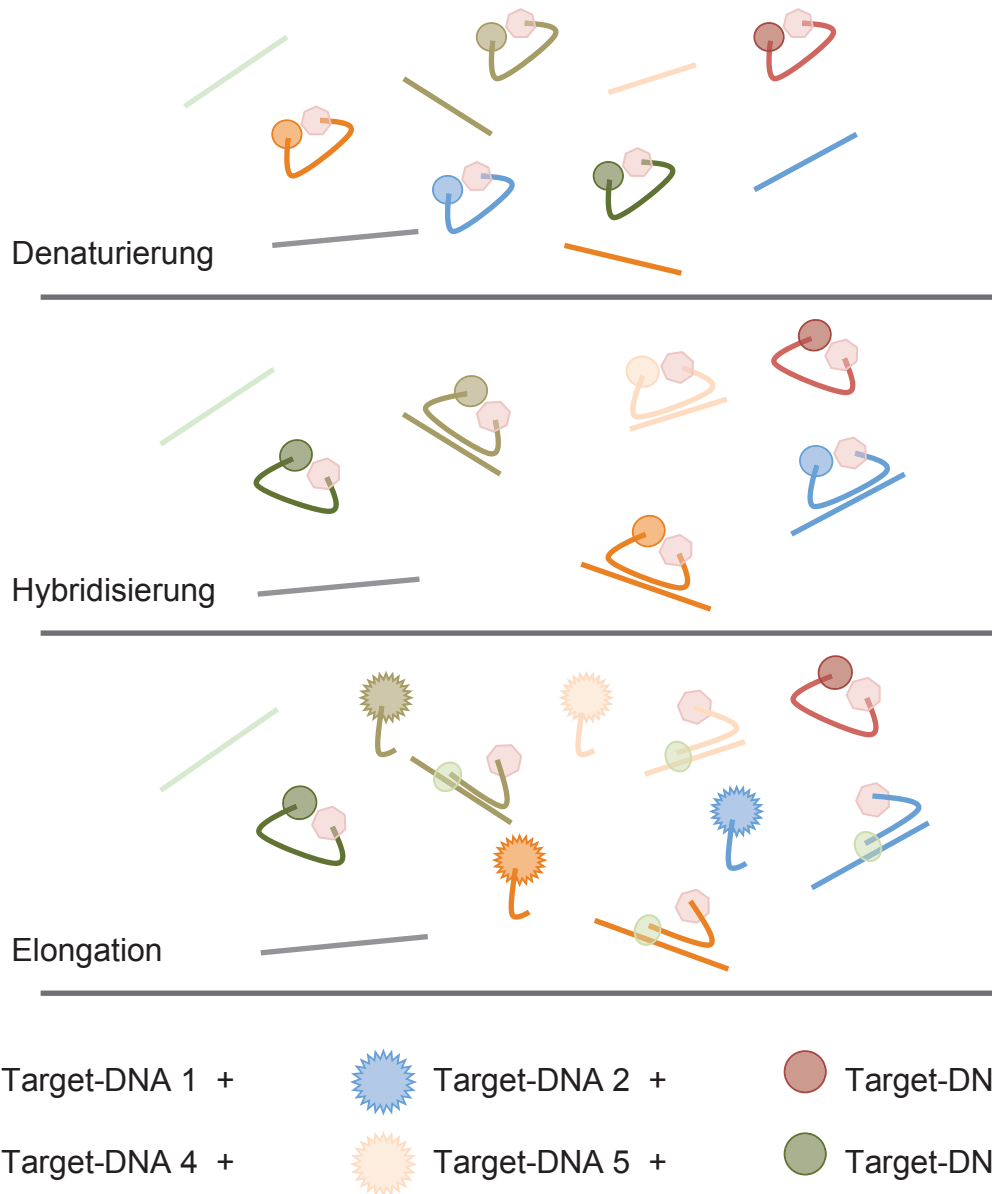


Abb. 8 Prinzip der multiplex rt PCR. Durch die Verwendung von unterschiedlichen Hybridisierungssonden, welche an verschiedene DNA-Sequenzen passen, können die DNA-Produkte unabhängig voneinander nachgewiesen werden. Die Hybridisierungssonden müssen mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert sein, damit sich ihre Fluoreszenzsignale nicht überlappen und sich eindeutig dem jeweiligen DNA-Produkt zuordnen lassen (eigene Darstellung).

Die multiplex rt PCR wird optimiert durch die Verwendung von Desoxyuridin-5'-Triphosphat (dUTP) und der Uracil-DNA-Glycosylase (UDG). Das für die Elongation

benötigte Nukleotid Desoxythymidin-5'-Triphosphat (dTTP) wird dabei teilweise durch dUTP ersetzt, welches ebenfalls von der DNA-Polymerase in das DNA-Produkt eingebaut wird, allerdings mit einer geringeren Effizienz (Edwards et al. 2004). Für den Erfolg der PCR ist daher das Mischungsverhältnis von dTTP und dUTP entscheidend und meist von den Firmen nicht angegeben. Die dUTP-Konzentration ist dabei etwa dreifach höher als die Konzentrationen der anderen Nukleotide Desoxyadenosin-5'-Triphosphat (dATP), Desoxyguanosin-5'-Triphosphat (dGTP) und Desoxycytidin-5'-Triphosphat (dCTG) (Pierce und Wangh 2004). Das Enzym UDG ist ein Reparaturenzym, welches Uracil-Reste aus der DNA entfernt (Longo et al. 1990). Anschließend ist bei höherer Temperatur eine DNA mit fehlenden Basen nicht mehr stabil und zerfällt. Vor PCR-Beginn wird der PCR-Ansatz für 2 min erwärmt und die UDG entfernt dabei alle Uracil-Reste aus den DNA-Molekülen, welche als Kontamination aus vorheriger PCR-Synthese in den Reaktionsansatz gelangten. Im darauffolgenden Erhitzungsschritt der sog. *hot start* PCR auf 95 °C für mehrere Minuten wird die UDG inaktiviert, sodass die im Anschluss neu synthetisierten DNA-Produkte nicht abgebaut werden. In diesem Schritt zerfällt ebenfalls das Phosphat-Rückgrat der von Uracil-Resten befreiten, kontaminierenden DNA-Moleküle. So werden *carry-over*-Kontaminationen und die Verunreinigung des PCR-Ansatzes durch zuvor im gleichen Gerät und mit gleichen Reagenzien amplifizierte Proben verhindert. Das Verfahren der UDG-Dekontamination in der *hot start* PCR kann nur mit DNA-Polymerasen durchgeführt werden, die keine *proofreading*-Aktivität aufweisen. Diese Korrekturfunktion würde dUTP als falsche Base erkennen und sie während der Synthese der DNA-Produkte wieder ausschneiden. Die Effizienz dieser Dekontamination ist stark abhängig von der verwendeten UDG, sowie den Reaktions- und Inaktivierungsbedingungen (Qiagen 2004). Die Reaktionstemperatur muss an die spezifische UDG angepasst sein. Die UDG erkennt nur DNA-Sequenzen mit dUTP als Substrat. Bei *rt* PCR-Verfahren sind die PCR-Produkte meist sehr kurz und enthalten möglicherweise wenig dUTP. Dieser Fakt verstärkt sich besonders bei PCR-Produkten mit Guanin-Cytosin-reichen DNA-Sequenzen (Pierce und Wangh 2004). In diesem Fall ist die Effizienz der UDG-Dekontamination herabgesetzt. Die anschließende Inaktivierung der UDG muss häufig für mehrere Minuten bei hoher Temperatur durchgeführt werden. Das könnte sich nachteilig auf die Reagenzien der folgenden PCR auswirken (Thornton et al. 1992). In diesem Fall wären Sensitivität und Spezifität der PCR gemindert.

Die Durchführung einer multiplex rt PCR für den Nachweis von verschiedenen Infektionskrankheiten in einer Probe kann mit kommerziellen Reaktionskits realisiert werden (Kim et al. 2015, Choe et al. 2013). So enthält das *Anyplex II STI-7* Detektionspanel alle Reagenzien für die Durchführung der multiplex rt PCR mit der Testung auf NG, CT, TV, MH, MG, UU und UP, sowie eine interne (IC) und eine Positivkontrolle (PC). Die Primer des Anyplex II STI-7 Reaktionskits sind nach der konzerneigenen *Dual Priming Oligonucleotide*-Technologie (DPO) konzipiert (Tang und Stratton 2012). Sie bestehen aus einem stabilisierenden 5'-Ende und einem determinierenden 3'-Ende. Verbunden sind diese über einen Poly-Desoxyinosin-Linker, welcher selbst nicht an der Bindung zum DNA-Template beteiligt ist, dem Primer jedoch eine bestimmte Form verleiht (Abb. 9). Die beiden Primerregionen sind unterschiedlich lang und binden unabhängig voneinander und nacheinander an die Target-DNA. Das etwa doppelt so lange 5'-Ende bindet zuerst an die Target-DNA. Bei höheren Temperaturen wölbt sich der Poly-Desoxyinosin-Linker blasenartig. Das 3'-Ende bindet daraufhin nur bei genauer Basen-Komplementarität an die Target-DNA. Vorteile dieser Technologie ergeben sich aus dem relativ großen Toleranzbereich der Anlagerungstemperatur und der hohen Primerbindungsspezifität infolge der zweifachen Prüfung der Passgenauigkeit von Primer und Target-DNA zuerst am 5'- und anschließend am 3'-Ende. Die Primer können demnach flexibel bezüglich der Anlagerungstemperatur-bestimmenden Faktoren wie Länge und Guanin-Cytosin-Gehalt designt werden. Die blasenartige Wölbung des Primers verhindert zudem Primer-Dimerisierung und die Ausbildung von Sekundärstrukturen wie Haarnadelschleifen. So wird die Bildung von unspezifischen DNA-Produkten und das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen minimiert und die Amplifizierung effizienter.

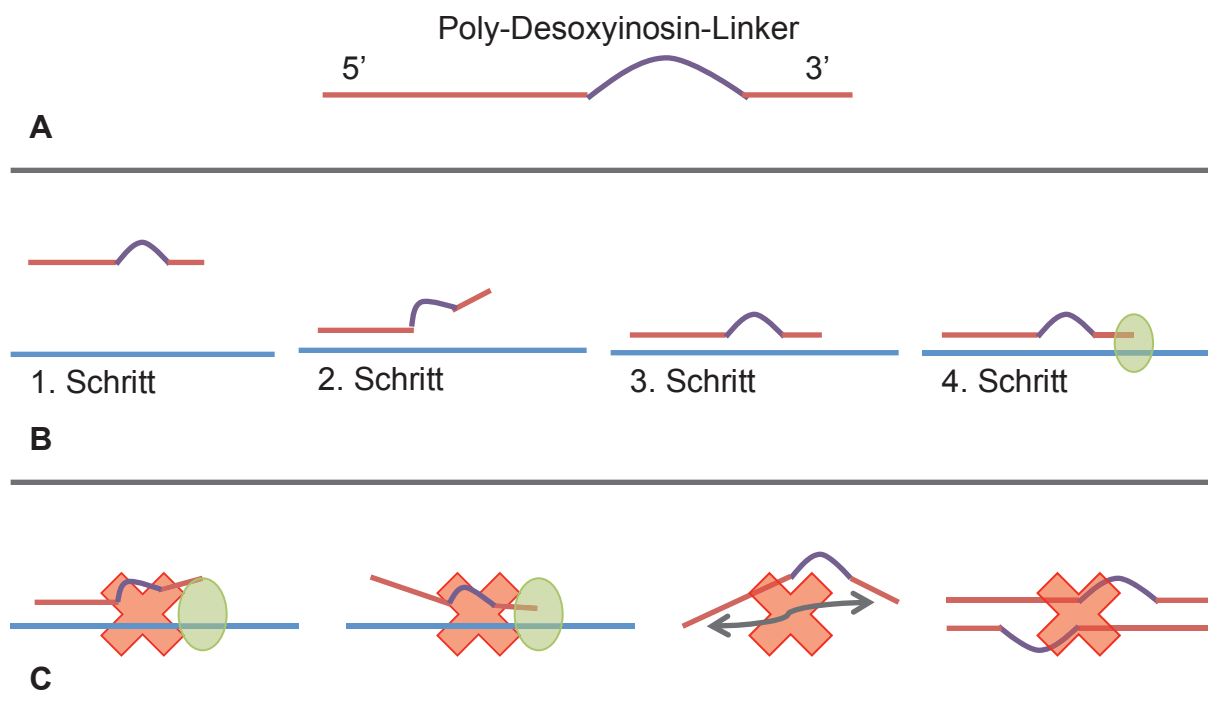


Abb. 9 Dual Priming Oligonucleotide-Technologie. **A** Die Primer bestehen aus einem stabilisierenden 5'-Ende und einem determinierenden 3'-Ende. Verbunden sind die beiden Primerregionen über einen Poly-Desoxyinosin-Linker. Dieser ist nicht an der Bindung zur Target-DNA beteiligt, aber sorgt durch seine Formgebung für eine zweifach geprüfte Primerbindungsspezifität. **B** Bei höherer Anlagerungstemperatur bindet zuerst die als Stabilisator wirkende 5'-Primerregion. Anschließend bindet die als Determinierer wirkende 3'-Primerregion. **C** Passt eine der Primerregionen nicht an das DNA-Template, wird die Bindung wegen des Poly-Desoxyinosin-Linkers nicht effizient aufrecht erhalten. Die DNA-Polymerase kann keine Elongation durchführen. Der Poly-Desoxyinosin-Linker verhindert die Ausbildung von Sekundärstrukturen wie Haarnadelschleifen und Primer-Dimerisierung (eigene Darstellung).

Mit dem Anyplex II STI-7 Detektionspanel wird ein weiteres, von Seegene entwickeltes Prinzip für die multiplex rt PCR umgesetzt. Die *Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension*-Technologie (TOCE) stützt sich auf die Verwendung von DPO-Primern, Pitchern und Catchern (Huggett und O'Grady 2014). Der Pitcher ist ein Oligonukleotid mit einem Tagging-Anteil und einem Targeting-Anteil. Er ist eine besondere Art einer Hybridisierungssonde, da nur ein Teil an die Target-DNA bindet und er nicht mit Fluorochromen markiert ist. Der Catcher ist ein künstliches Template-Oligonukleotid bestehend aus einem Capturing-Anteil und einem Templating-Anteil mit Reporter und Quencher (Abb. 10). Im Schritt der Primerhybridisierung bindet der Targeting-Anteil des Pitchers an die Target-DNA, der Tagging-Anteil bindet nicht. Während der Extension der Primer schneidet die DNA-

Polymerase den Tagging-Anteil des Pitchers ab und setzt diesen frei. Dieser freigesetzte Tagging-Anteil kann nun an den passenden Capturing-Anteil des Catchers binden. Der Catcher bindet nicht an die Target-DNA, sondern sorgt als zusätzlicher Zwischenschritt für einen spezifischeren Nachweis der Target-DNA. Denn nur wenn der Tagging-Anteil sauber abgeschnitten wurde und an den Capturing-Anteil gebunden hat, extendiert die DNA-Polymerase entlang des Templating-Anteils des Catchers. So werden Reporter und Quencher separiert und ein Fluoreszenzsignal generiert.

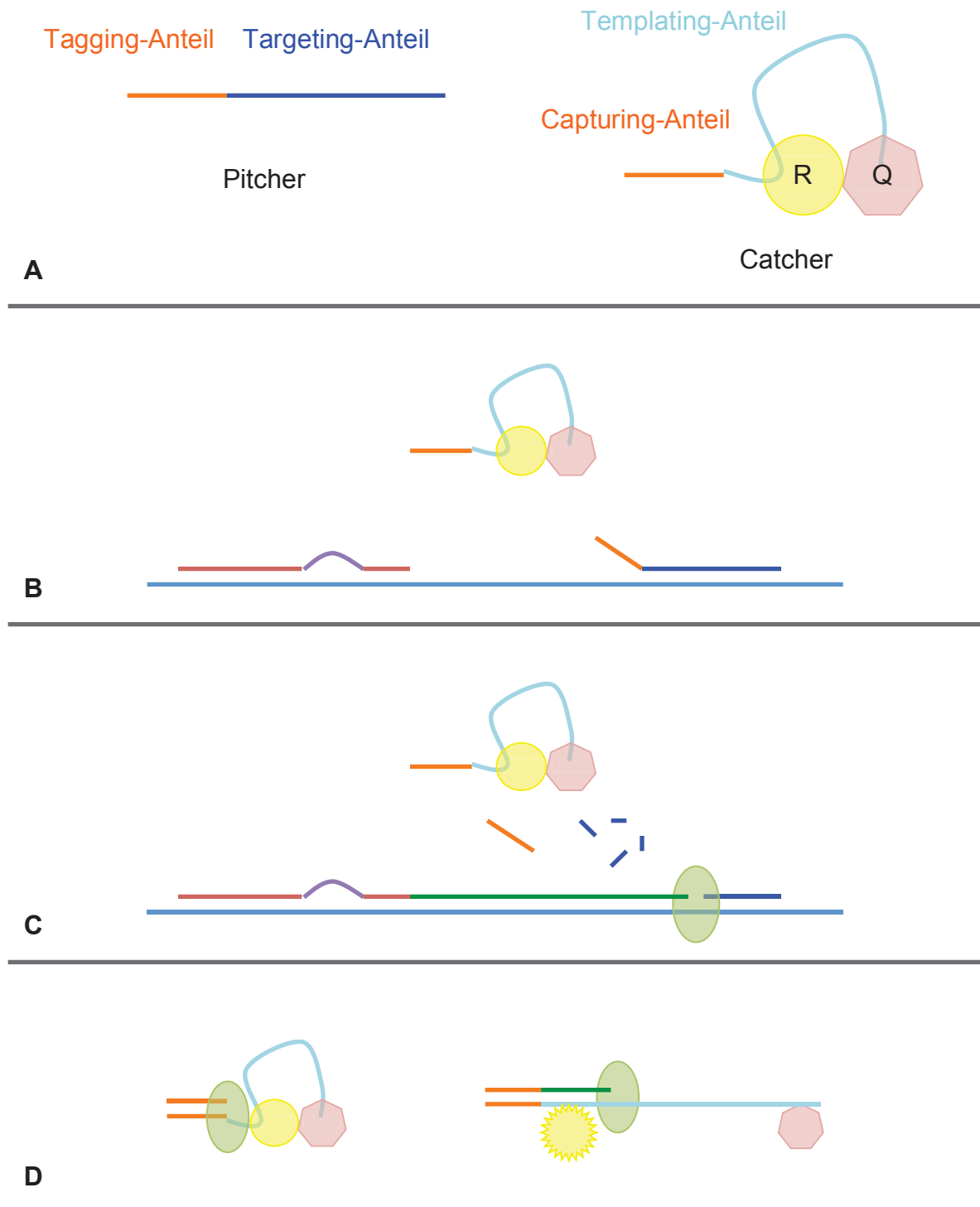
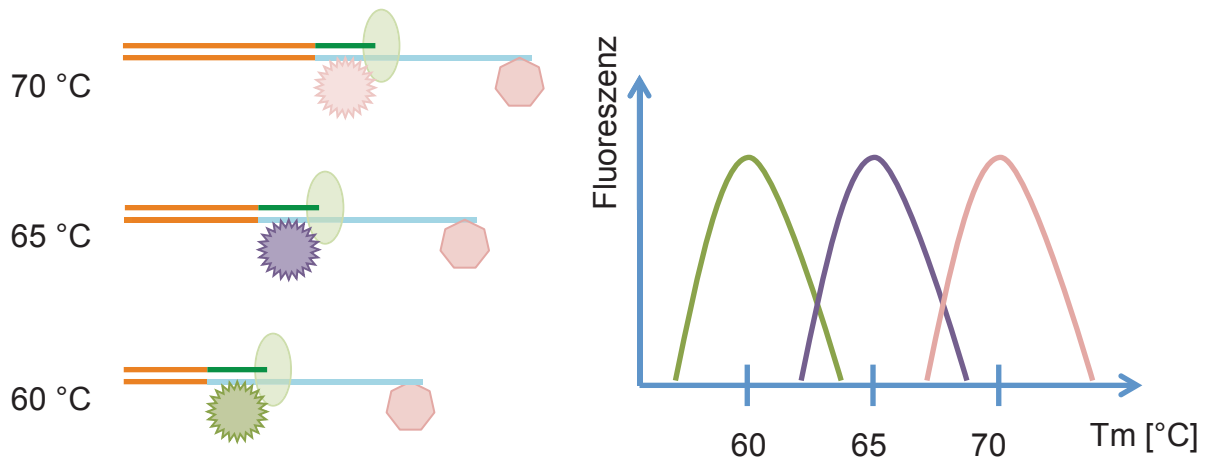


Abb. 10 Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension-Technologie. **A** Für die Analyse der Target-DNA über ein Fluoreszenzsignal kommen Pitcher und Catcher zum Einsatz. **B** Der sequenzspezifische Pitcher bindet im Schritt der Primerhybridisierung an die passende Target-DNA. **C** Während der Elongation durch die DNA-Polymerase wird der Tagging-Anteil des Pitchers abgeschnitten und freigesetzt. **D** Ist die Catcher-T_m erreicht, kann der Tagging-Anteil an den passenden Capturing-Anteil binden. Sobald die DNA-Polymerase entlang des Templating-Anteils des Catchers elongiert, wird der Reporter (R) vom Quencher (Q) getrennt und ein Lichtsignal emittiert (eigene Darstellung).

Mithilfe der Catcher-Funktionsweise der TOCE-Technologie und der Verwendung verschiedener Catcher können multiple Target-DNA-Sequenzen in einem Kanal nachgewiesen werden. Über die Catcher-Sequenz und -Länge kann die Catcher-Schmelztemperatur (Catcher-T_m) kontrolliert und eingestellt werden. So kann eine konstante Hybridisierungs- und Messtemperatur für jeden Catcher gewährleistet und eine Überlappung zwischen den Catcher-T_m minimiert werden. Dabei ist sie unabhängig von der Schmelztemperatur der Target-DNA-Sequenz sowie deren Schwankungen. Das Fluoreszenzsignal jedes Target-spezifischen Catchers wird bei der dazugehörigen T_m gemessen. Die Schmelztemperaturanalyse (Catcher Melting Temperature Analysis - CMTA) kann zyklisch im Verlauf der rt PCR durchgeführt werden. So kann auf das Vorhandensein der Pathogene getestet und gleichzeitig eine quantitative Erfassung vorgenommen werden. Nach Zyklus 30, 40 und 50 wird eine CMTA durchgeführt (Seegene Inc. 2015). Je eher ein Fluoreszenzsignal an der jeweiligen T_m nachgewiesen werden kann, desto höher war die Ausgangskonzentration der Target-DNA in der Probe (Abb. 11).



A

Target-DNA-Konzentration	1. CMTA (30 Zyklen)	2. CMTA (40 Zyklen)	3. CMTA (50 Zyklen)	Ergebnis
hoch				+++
mittel				++
gering				+
keine				-

B

Abb. 11 Schmelztemperaturanalyse. **A** Eine konstante Schmelztemperatur (Catcher-T_m) wird über Catcher-Länge und -Sequenz eingestellt und gewährleistet. Das Fluoreszenzsignal jedes Target-spezifischen Catchers wird bei der dazugehörigen T_m gemessen. So wird auf das Vorhandensein multipler Pathogene getestet. **B** Die Schmelztemperaturanalyse wird zyklisch durchgeführt. So kann zusätzlich eine quantitative Erfassung vorgenommen werden. Je eher ein Fluoreszenzsignal messbar wird, desto höher war die Ausgangskonzentration dieser Target-DNA (eigene Darstellung).

3 Fragestellung

Im Vordergrund der Betrachtungen stand die Nutzbarkeit der multiplex rt PCR für die STI-Diagnostik im medizinisch-mikrobiologischen Laboralltag. Zu diesem Zweck sollten herkömmliche Erregerdetektionsmethoden durch Standardtests auf einfache Infektionen mit der multiplex rt PCR bezüglich des Arbeitsaufwands, der Durchführung, sowie der Detektionsraten, ihrer Übereinstimmung und auf diagnostischen Zugewinn verglichen werden. In der Routine-Diagnostik werden die Proben mit bestimmten Standardtests analysiert, die von den Klinikern bei Probeneinsendung angefordert werden.

- Die Detektionsrate der alltäglichen Kliniks- und Laborarbeit sollte mit der Detektionsrate der multiplex rt PCR verglichen werden, welche ohne Vorauswahl in allen Proben auf die sieben Erreger getestet. Hierbei sollten die Übereinstimmungen der Methoden mit der multiplex rt PCR und der diagnostische Mehrwert der umfassenden STI-Detektion dargestellt werden.
- Für die Beurteilung der Alltagstauglichkeit der multiplex rt PCR sollten der zeitliche und arbeitstechnische Aufwand im Vergleich zu den herkömmlichen Methoden analysiert werden.
- Eine vergleichende Darstellung der Kostenbereiche der zum einen in der Routine-Diagnostik und zum anderen für die multiplex rt PCR genutzten Geräte, Materialien und Reaktionskits soll Aufschluss auf mögliche finanzielle Einsparungen im Laboralltag geben.

Die klinischen Fragestellungen dieser Methodenuntersuchung sollten mögliche Unterschiede der Infektionshäufigkeiten in den Proben der symptomatischen Patienten und die Verteilung dieser auf männliche und weibliche Patienten detektieren. Die Ergebnisse der multiplex rt PCR sollten aufzeigen, welche Erreger häufig an Mehrfachinfektionen beteiligt sind und ob so Auswirkungen auf die Therapiemaßnahmen diskutiert werden müssen.

Weiterhin sollten die Ergebnisse aus Urethralabstrichen und den dazugehörigen Urinproben gegenübergestellt werden. Eine große Bedeutung hat dieser Vergleich hinsichtlich der Tatsache, dass die Art der Probengewinnung für die Patienten sehr relevant ist und bei Äquivalenz in der einfacheren und weniger schmerzhaften Probenentnahme des Urins im Vergleich zum Urethralabstrich resultieren könnte.

Durch das Analyseverfahren der multiplex rt PCR können semiquantitative Ergebnisse bezüglich der detektierten DNA-Last ermittelt werden. Es sollte diskutiert werden, in wieweit diese mit dem Infektionsausmaß korrelieren und demnach zum Therapiemonitoring geeignet sind.

4 Methodik

4.1 Patientenauswahl

In diese Untersuchung wurden symptomatische Patientinnen und Patienten eingeschlossen, die sich im Zeitraum von Januar bis Dezember 2016 zur Diagnostik und Therapie von STI in der Klinik für Urologie, der Klinik für Hautkrankheiten und der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des UKJ vorstellten. Ebenso wurden Patientinnen und Patienten mit Verdacht auf STI aus der HIV-Ambulanz des UKJ und der Klinik für Innere Medizin untersucht. Über diesen Zeitraum wurden 82 Patientinnen und Patienten eingeschlossen, davon 27 weibliche und 55 männliche. Der Altersdurchschnitt der Frauen lag bei 30,5 Jahren, der Altersdurchschnitt der Männer bei 35,1 Jahren. Etwa ein Drittel der Patientinnen und Patienten (n = 26, 32%) befand sich in der Klinik für Urologie in Behandlung. Über die Klinik für Hautkrankheiten und über die Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe wurden 21 (26%) bzw. 19 (23%) Patientinnen und Patienten in die Untersuchung eingeschlossen. In der HIV-Ambulanz und über die Klinik für Innere Medizin wurden 16 Patientinnen und Patienten (19%) mit Verdacht auf STI untersucht.

Die Studiendurchführung wurde am 08.05.2015 von der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität mit der Bearbeitungsnummer 4399-04/15 genehmigt.

4.2 Untersuchungsmaterialien

Je nach Anamnese und klinischer Untersuchung wurden den Patienten Urethral-, Zervikal-/Vaginal-, Rektal- und Oralabstriche, sowie Urinproben zur Diagnostik entnommen. In zwei Fällen wurde Aszitespunktat während einer Unterleibsoperation in der Gynäkologie mit Verdacht auf PID entnommen und zur Untersuchung eingesandt. Bei 13 Patienten wurden, durch die Symptomatik begründet, Proben an unterschiedlichen Entnahmeorten gewonnen. Insgesamt wurden 100 Proben von 82

symptomatischen Patientinnen und Patienten in die Studie eingeschlossen. Es wurden 48 Urethral-, 23 Zervikal-/Vaginal-, 6 Rektal- und 4 Oralabstriche, sowie 17 Urinproben und 2 Aszitespunktate untersucht. Bei acht Patienten konnte die Urinprobe parallel zu dem vorhandenen Urethralabstrich getestet werden.

Die Abstriche wurden in *Remel M4RT® Transport Medium* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) oder in *eSwab Liquid Amies Collection and Transport System* (Copan Diagnostics, Murrieta, USA) platziert und zum Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des UKJ transportiert. Urinproben wurden in sterile Polypropylen-Probenbecher ohne Konservierungsmittel gegeben und transferiert. Alle Proben wurden am Tag der Einsendung mit den jeweilig angeforderten Standardtests auf einfache Infektionen untersucht bzw. im Falle externer Untersuchungsdurchführung an das entsprechende Labor geschickt. Ebenso wurde von allen Proben mittels DNA-Extraktion ein Eluat hergestellt und für die am UKJ wöchentlich durchgeführte *multiplex real-time* PCR bei -80 °C eingefroren und gelagert.

4.3 Testung auf einfache Infektionen mittels Standardtests

Die Proben wurden über das Laboranforderungssystem *Lauris* (Roche, Basel, Schweiz) eingesandt und routinemäßig von den Klinikern mit der Forderung auf gezielte Erregertestungen versehen. Diese gezielten Anforderungen richteten sich nach dem jeweiligen Krankheitsbild, den Symptomen sowie den Erfahrungen der behandelnden Kliniker. Diese Standardtests wurden größtenteils im Institut für Medizinische Mikrobiologie des UKJ durchgeführt, aber auch teilweise im Universitätsklinikum Dresden. Dafür wurden die Proben mit Testanforderungen auf MH und UU zur Untersuchung mittels bakterieller Kultur ins Institut für Medizinische Mikrobiologie der TU Dresden geschickt, da diese das Referenzlabor für Mykoplasmen und Ureaplasmen stellen. Auf CT und NG wurde jeweils mittels *singleplex real-time* PCR und auf TV mittels Giemsa-Färbung und Mikroskopie in der Medizinischen Mikrobiologie des UKJ getestet. Diese Standardtests können lediglich über das Vorhandensein eines bestimmten Erregertyps Aufschluss geben. Weitere Pathogene, die an einer Infektion mit multiplen Erregern (Mehrfachinfektion) beteiligt

sein können, bleiben unentdeckt. Aufgrund der Kosten, die Versand und eine externe Untersuchung verursachen, wurden die Proben hauptsächlich nach Wiedervorstellung bei fehlender Besserung nach antibiotischer Therapie zur Testung auf MH und UU an die TU Dresden geschickt (n = 28).

Um einen Vergleichstest für MG zu erhalten und um die Probenzahl mit Vergleichswerten bezüglich der Mykoplasmen und Ureaplasmen zu erhöhen, wurde ein weiterer Standardtest durchgeführt. Mittels DNA-Extraktion, PCR und ELISA reverser Hybridisierung wurden 81 der 100 Proben zusätzlich auf MH, MG und UU/UP getestet.

Die DNA-Extraktion aus dem Probenmaterial steht allen in dieser Untersuchung durchgeführten NAAT voran. Sie wurde einmalig für die Standardtests auf NG, den zusätzlich durchgeführten Standardtest für Mykoplasmen und Ureaplasmen und für die multiplex rt PCR realisiert. Die hergestellten DNA-Eluate wurden hierfür anschließend bei -80 °C in Aliquots eingefroren und gelagert. Das Vorgehen der DNA-Extraktion für diese drei Testverfahren wird im Abschnitt 5.3.1 erklärt. Für den Standardtest auf CT wurde die DNA-Extraktion aus den Proben mit einem anderen Protokoll und unter Verwendung eines anderen Gerätes vorgenommen, weil DNA-Extraktion und anschließende DNA-Amplifizierung mit Geräten einer Firma hintereinandergeschaltet waren (siehe 5.3.2).

4.3.1 Detektion von *Neisseria gonorrhoeae*

Der Standardtest auf NG beinhaltete die DNA-Extraktion mittels *EZ1 Advanced XL* und *EZ1 Virus Mini Kit v2.0* (Qiagen, Hilden, Deutschland) gefolgt von der singleplex rt PCR mittels *LightCycler® 2.0 System* (Roche) und dem *GeneProof Neisseria gonorrhoeae PCR Kit* (GeneProof a.s., Vídenská, Tschechische Republik). Zur Extraktion der bakteriellen DNA wurde das flüssige Transportmedium der Abstrichröhrchen genutzt. Urin wurde vorbehandelt, indem 10 ml bei $18000 \times g$ für 15 min zentrifugiert und der Überstand bis auf 300 μl verworfen wurde. Das Pellet wurde im Rückstand resuspendiert und damit die Probe konzentriert. Für die DNA-Extraktion wurden 50 μl des Gewebelysepuffers (ATL) zu 150 μl des konzentrierten

Urins bzw. des flüssigen Transportmediums hinzugegeben. Die Extraktion erfolgte mit dem EZ1 Virus Mini Kit v2.0 nach Protokoll des Herstellers. Die vorhergehende Zugabe von 1 µl IC zu jeder Probe diente der Qualitätssicherung. Die bakterielle DNA wurde in einem Schritt mittels der automatischen EZ1 Virus Prozedur zu einem Eluat von 60 µl purifiziert. Folgend wurden 15 µl eines gebrauchsfertigen Mastermixes (MM) des GeneProof *Neisseria gonorrhoeae* PCR Kits mit 5 µl des DNA-Eluats gemischt und für die anschließende singleplex rt PCR nach folgendem Protokoll im LightCycler® 2.0 System platziert.

Zyklus	Temperatur [°C]	Zeit	Reaktion
1×	37	2 min	UDG-Dekontamination
1×	95	10 min	UDG-Inaktivierung und Anfangsdenaturierung der DNA
45×	95	5 s	DNA-Denaturierung
	60*	40 s	Primer-Bindung
	72	20 s	Elongation
1×	40	40 s	Cooling
1×	10	∞	-

*Bei diesem Schritt wird in jedem Amplifikationszyklus die Fluoreszenz gemessen.

Von den eingesandten Proben wurden 75 mit der Anforderung der Kliniker auf NG-Testung untersucht.

4.3.2 Detektion von *Chlamydia trachomatis*

Der Standardtest auf CT beinhaltet die DNA-Extraktion mittels *Cobas AmpliPrep Instrument* mit *Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit* (Roche) gefolgt von der singleplex rt PCR mittels *Cobas TaqMan Thermocycler* und dem *TaqMan CT Test v2.0 Kit* (Roche). Urin und Aszites wurde vorbehandelt, indem 10 ml bei 18000 × g für 15 min zentrifugiert und der Überstand bis auf 300 µl verworfen wurde. Das Pellet wurde im Rückstand resuspendiert und damit die Probe konzentriert. Für die DNA-Extraktion wurde das Cobas AmpliPrep Instrument nach Protokoll des Herstellers mit den TNAI Reagent Racks beladen. Diese wurden mit den benötigten Mengen der

Reagenzien TNAI CS1 (magnetische Glaspartikel), TNAI CS2 (Lysereagenz), TNAI CS3 (Multireagenzkassette), TNAI CS4 (Probenverdünner), IC und 1 ml der Probenflüssigkeit (Transportmedium Abstrichröhrchen, konzentrierter Urin und Aszites) in den jeweiligen Rackreihen befüllt. Dann folgte die DNA-Extraktion nach Protokoll der automatisierten Software. Die anschließende DNA-Amplifizierung und die Analyse wurden im Cobas TaqMan Thermocycler mit 50 µl des Cobas TaqMan CT Test v2.0 MM und 50 µl des DNA-Eluats bzw. der PC und Negativkontrolle (NC; RNase-freies H₂O) nach einem fest voreingestelltem PCR-Protokoll durchgeführt, welches in der geräteeigenen Software installiert und nicht einsehbar ist. Von den eingesandten Proben wurden 84 mit der Anforderung der Kliniker auf CT-Testung untersucht.

4.3.3 Detektion von *Trichomonas vaginalis*

Der Standardtest auf TV wurde mit Giemsa-Färbung (Giemsa's Solution, Merck, Darmstadt, Deutschland) und Mikroskopie durchgeführt. Hierzu wurden die Abstriche auf einem Objektträger ausgestrichen, dieser luftgetrocknet und anschließend 3-5 min in Methanol fixiert. Danach wurde der Objektträger mit der zugehörigen Pufferlösung gespült, für 30 min mit Giemsa's Solution nach Giemsa gefärbt, wieder mit Pufferlösung gespült und folglich luftgetrocknet. Wurde in der anschließenden Mikroskopie ein TV Protozoon gefunden, wurde der Abstrich als positiv gewertet. Von den eingesandten Proben wurden 28 mit der Anforderung der Kliniker auf TV-Testung untersucht.

4.3.4 Detektion von *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*/*Ureaplasma parvum*

Die zusätzliche Untersuchung auf MH, MG und UU/UP erfolgte zur Steigerung der Vergleichswerte und wurde nicht von den Klinikern angefordert. Dieser Test beinhaltete DNA-Extraktion, PCR und anschließende ELISA reverse Hybridisierung. Die DNA-Extraktion wurde mit dem EZ1 Advanced XL und dem EZ1 Virus Mini Kit

v2.0 (siehe 5.3.1.) durchgeführt. Die folgende Amplifizierung wurde mittels *eppendorf Mastercycler personal* (eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und dem *hyplex® STD Mycoplasma Kit* (amplex Biosystems, Gießen, Deutschland) nach folgendem PCR-Protokoll realisiert.

Zyklus	Temperatur [°C]	Zeit	Reaktion
1×	94	5 min	Anfangsdenaturierung der DNA
35×	94	25 s	DNA-Denaturierung
	52	25 s	Primer-Bindung
	72	45 s	Elongation
1×	72	3 min	finale Elongation
1×	10	∞	-

Die amplifizierten Eluate wurden durch ELISA reverse Hybridisierung mittels *hyplex® STD ID Panel* (amplex Biosystems 2013) nach folgendem Protokoll prozessiert und der Farbumschlag von farblos auf gelb analysiert.

Verdünnungen		
♦Waschpufferverdünnung	1:19 mit H ₂ O deionisiert	0,05 ml + 0,95 ml pro Kavität
♦Konjugatverdünnung	1:100 mit verdünntem Waschpuffer	1 µl + 100 µl pro Kavität
Testschritte		
♦Denaturierung	PCR-Reaktionsansatz	>2 min bei 95 °C
♦Probenverdünnung	5 µl PCR-Reaktionsansatz zu 50 µl Hybridisierungslösung	
♦Hybridisierung	50 µl pro Kavität	30 min bei 50 °C
♦Stringentes Waschen	200 µl pro Kavität	3× kurz
♦Waschschritt	200 µl pro Kavität	1× kurz
♦Konjugatinkubation	100 µl pro Kavität	30 min bei Raumtemperatur
♦Waschschritt	200 µl pro Kavität	3× kurz
♦Substratinkubation	100 µl pro Kavität	15 min bei Raumtemperatur

◆Abstoppen	100 µl Stopplösung pro Kavität	
◆Photometrieren	450 nm und 620 nm Referenz	

Es wurden 81 der 100 Proben zusätzlich auf MH, MG und UU/UP getestet.

4.4 Multiplex rt PCR für die Detektion von NG, CT, TV, MH, MG, UU und UP

Die multiplex rt PCR Testung beinhaltet die DNA-Extraktion mittels dem EZ1 Advanced XL und dem EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (siehe 5.3.1), gefolgt von der multiplex rt PCR im *CFX96 Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) mit dem *Anplex II STI-7* Detektionspanel. Die DNA-Extraktion der Proben erfolgte am Tag der Probeneinsendung. Anschließend wurden die Eluate für die wöchentliche multiplex rt PCR Messung bei -80 °C gelagert. Für die Messung wurden die Proben aufgetaut und 5 µl des Eluats mit 15 µl des angefertigten MM und 1 µl der IC gemischt. Ebenso wurden die Kit-inkludierte PC und eine NC (RNase-freies H_2O) vorbereitet. Die Reaktionsgemische wurden bei $13000 \times g$ für 3 min zentrifugiert und anschließend im *CFX96 Thermal Cycler* platziert. Die multiplex rt PCR und die Fluoreszenzanalyse wurden nach folgendem Protokoll des *Anplex II STI-7* Herstellers (Seegene Inc. 2015) durchgeführt.

Zyklus	Temperatur [°C]	Zeit	Reaktion
1×	50	5 min	UDG-Dekontamination
1×	95	15 min	UDG-Inaktivierung und Anfangsdenaturierung der DNA
30×	95	30 s	DNA-Denaturierung
	60	1 min	Primer-Bindung
	72	30 s	Elongation
1×	55	30 s	Schmelztemperaturanalyse
1×	55 ~ 85	5 s/0,5 °C	Schmelztemperaturanalyse
10×	95	30 s	DNA-Denaturierung

	60	1 min	Primer-Bindung
	72	30 s	Elongation
1×	55	30 s	Schmelztemperaturanalyse
1×	55 ~ 85	5 s/0,5 °C	Schmelztemperaturanalyse
10×	95	30 s	DNA-Denaturierung
	60	1 min	Primer-Bindung
	72	30 s	Elongation
1×	55	30 s	Schmelztemperaturanalyse
1×	55 ~ 85	5 s/0,5 °C	Schmelztemperaturanalyse
1×	4	∞	-

Die CMTA mit Fluoreszenzmessung erfolgte bei aufsteigender Reaktionstemperatur von 55 °C bis 85 °C (0,5 °C/5 s) nach dem 30., 40. und 50. Zyklus der alternierenden Inkubationen. Nach der Fluoreszenzanalyse präsentiere die Bio-Rad Software semiquantitative Ergebnisse. Positive Proben wurden nach ihrer DNA-Last in drei aufsteigende Stufen sortiert. Diese Einstufung erfolgte je nach zyklischer CMTA, in der bereits die Erreger-DNA nachgewiesen werden konnte. Erreger wurden in den Proben mit „+++“ gekennzeichnet, wenn sich nach der ersten zyklischen CMTA die jeweilige bakterielle DNA nachweisen ließ. Bei Nachweis der bakteriellen DNA nach der zweiten CMTA, wurden die Erreger in den Proben mit „++“ gekennzeichnet. Mit „+“ wurden Erreger in den Proben bei Detektion der bakteriellen DNA nach der dritten CMTA gekennzeichnet.

4.5 Datenverarbeitung

Die Proben wurden für den einsendenden Kliniker mit den angeforderten Standardtests untersucht. Zusätzlich wurde ein Großteil der Proben mit einem erweiterndem zusätzlichem Standardtest für Mykoplasmen (MH und MG) und Ureaplasmen (U) analysiert. Alle Proben wurden anschließend mit der multiplex rt PCR auf alle sieben Erreger des Anyplex II STI-7 Detektionspanels getestet. Die Ergebnisse der Standardtests und die Ergebnisse der multiplex rt PCR wurden anschließend verglichen. So wurde die Übereinstimmung zwischen den Erregertests

und der multiplex rt PCR über die Ermittlung der jeweiligen Kappa-Koeffizienten und dem 95%-Konfidenzintervall (95% CI) bewertet (Kwiecien et al. 2011).

Für die Übereinstimmung der Ureaplasmen-Infektionen wurde die Detektion beider Arten teilweise zusammengenommen analysiert. Es standen zwei Standardtests zur Verfügung, welche auf Ureaplasmen testeten, jedoch eine Differenzierung zwischen den Ureaplasmen-Arten (UU und UP) nur bedingt vornahmen.

Eine in der multiplex rt PCR detektierte Erregerart, für die keine Testanforderung mit dem Standardtest bestand und demnach kein Ergebnis mittels dieses Tests vorlag, wurde als in der Routine-Diagnostik unentdeckte Infektion angesehen.

Für die Berechnung der statistischen Parameter wurde das Programm SPSS Statistics (IBM Corporation, Armonk, USA) Version 24.0 genutzt.

5 Ergebnisse

5.1 Detektion mittels der Standardtests auf einfache Infektionen

Über die Standardtests wurden 243 Ergebnisse von den Klinikern angefordert. Die Ergebnisse wurden durch singleplex rt PCR (84 × CT, 75 × NG), Giemsa-Färbung und anschließende Mikroskopie (28 × TV), sowie durch bakterielle Kultur im Institut für Medizinische Mikrobiologie der TU Dresden (28 × MH und 28 × UU) erhoben. Mittels der angeforderten Standardtests wurden 28 individuell gezählte Erregerinfektionen detektiert: 11 NG-Infektionen, 14 CT-Infektionen und 3 UU-Infektionen. Durch die Zusammensetzung der Einzelergebnisse dieser angeforderten Standardtests wurden 26 Einfachinfektionen und 1 Mehrfachinfektion erkannt.

Mit dem zusätzlich durchgeführten Standardtest für Mykoplasmen und Ureaplasmen (MH, MG und U durch PCR und ELISA reverse Hybridisierung) wurden 81 Proben getestet. Eine Überlappung der Ergebnisse von 24 Proben kam durch die UU-Testung mittels bakterieller Kultur und die Ureaplasmen-Testung (UU/UP) mittels des zusätzlich durchgeführten Standardtests, welcher keine Differenzierung zwischen den Ureaplasmen-Arten ermöglichte, zustande. Alle in der Kultur U-positiv getesteten Proben, wurden auch mit der amplex PCR + ELISA reversen Hybridisierung U-positiv getestet. Inwieweit die Kultur spezifisch für UU ist, zeigt der spätere Vergleich mit den Ergebnissen der multiplex rt PCR. Insgesamt wurden durch das zusätzliche Standardtestverfahren 15 weitere Erregerinfektionen diagnostiziert (2 × MG, 3 × MH, 10 × U).

Mit allen Standardtests wurden zusammengenommen 438 Ergebnisse ermittelt (243 + 243 – 2 × 24). Dabei konnten 43 spezifische Erregerinfektionen detektiert werden. Durch die Zusammenführung der Ergebnisse aller Standardtests wurden 35 Einfachinfektionen und 4 Mehrfachinfektionen ermittelt. Der Probenanalyseplan der Standardtests und ihre Ergebnisse sind in Abb. 12 veranschaulicht.

100 Proben

Standardtests für einfache Infektionen (von Klinikern angefordert)										Standardtest für Mykoplasmen und Ureaplasmen					
CT		NG		TV		UU		MH		U	MG		MH		
rt PCR		rt PCR		Giemsa		Kultur		Kultur		PCR + ELISA reverse Hybridisierung					
84		75		28		28		28		81		81		81	
+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
14	70	11	64	0	28	3	25	0	28	12	69	2	79	3	78
243										243					
+										+		-			
28										17		226			
438															
+										-					
43										395					

Abb. 12 Probenanalyseplan der Standardtests. Es wird veranschaulicht, wie viele der 100 eingesandten Proben jeweils mit den Standardtests für einfache Infektionen (CT, NG, TV, UU, MH) und dem zusätzlich durchgeführten Standardtest für Mykoplasmen (MG und MH) und Ureaplasmen (U) untersucht wurden. Es wurden 24 Proben mittels Kultur und mittels PCR + ELISA reverser Hybridisierung auf UU/U und MH getestet, sodass sich diese Ergebnisse teilweise überschneiden. Mit den Standardtests wurden 438 Ergebnisse erhoben. Die detektierten Erregerinfektionen innerhalb der getesteten Stichprobengröße sind grau hinterlegt.

5.2 Detektion mittels der multiplex rt PCR

In der multiplex rt PCR mittels Anyplex II STI-7 Detektionspanel wurden 700 Ergebnisse ermittelt (100 Proben × 7 Erreger). Es wurden 65 individuell gezählte, spezifische Erregerinfektionen innerhalb der 100 Proben diagnostiziert. Detektiert wurden CT in 14, NG in 12, UP in 16, MG in 3, MH in 8, UU in 11 und TV in 1 Probe.

Die Detektion von 65 Erregerinfektionen in insgesamt 42 positiven Proben wurde mit drei aufsteigenden Stufen der DNA-Last über semiquantitative Ergebnisse erreicht (Tabelle 3). So wurden 17 Erregerinfektionen in der ersten zyklischen CMTA, 41 Erregerinfektionen in der zweiten zyklischen CMTA und 7 Erregerinfektionen in der dritten zyklischen CMTA detektiert. Es ließen sich alle drei DNA-Last-Stufen sowohl in Einfach- als auch in Mehrfachinfektionen finden. Ebenso ergaben sich Mehrfachinfektionen aus Erregern mit unterschiedlich starkem DNA-Last-Nachweis. Mit 7 der 17 Erregerdetektionen der höchsten DNA-Last-Stufe, machte NG den größten Anteil dieser Infektionen aus. Beide Ureaplasmen-Arten und CT wurden hauptsächlich in der mittleren Stufe der DNA-Last gemessen. So wurden 12 UP-, 9 CT- und 8 UU-Infektionen unter den 41 Infektionen mit mittlerer DNA-Last ermittelt.

Tabelle 3 Semiquantitative Ergebnisse der multiplex rt PCR. Es werden die Häufigkeiten der Erregerdetektionen pro zyklische CMTA dargestellt. Der Nachweiszeitpunkt gibt Aufschluss über die Ausgangsmenge der DNA der gesuchten Pathogene. Dabei gilt: je früher DNA detektiert wird, desto größer war die Ausgangsmenge im Probenmaterial.

Erreger	+++	++	+	Total
	1. CMTA	2. CMTA	3. CMTA	
CT	4	9	1	14
NG	7	5	0	12
MG	0	3	0	3
MH	1	4	3	8
UP	3	12	1	16
UU	2	8	1	11
TV	0	0	1	1
	17	41	7	65

5.3 Detektionsraten der Standardtests und der multiplex rt PCR im Vergleich

Mit den über die Routine-Diagnostik angeforderten Standardtests wurden die insgesamt 28 Erregernachweise mit CT, NG und UU in den Proben detektiert (Tabelle 4). Durchgeführt wurden den Anforderungen nach insgesamt 243 Tests, sodass 215 der angeforderten Testergebnisse negativ waren. Die bakterielle Kultur

für den extern durchgeführten UU-Nachweis im Labor der Medizinischen Mikrobiologie der TU Dresden wies 3 UU-Infektionen nach. Dieser Nachweis ist allerdings recht unspezifisch für UU, da teilweise auch UP in der Kultur wächst. Der zusätzlich durchgeführte Standardtest für Mykoplasmen und Ureaplasmen lies keine Unterscheidung zwischen den beiden Arten UU und UP zu, sodass der Nachweis für die Ureaplasmen bei Vorhandensein einer dieser Arten oder beider als positiv gewertet wurde. Demnach werden die Ergebnisse der bakteriellen Kultur und des zusätzlichen Standardtests für Mykoplasmen und Ureaplasmen gesondert mit den Ergebnissen der multiplex rt PCR, welche eine Unterscheidung von UU und UP vornimmt, verglichen.

Die Gesamtheit aller in den Testmethoden positiv ermittelten Erregernachweise wird in Tabelle 4 veranschaulicht. Für die letztendliche Betrachtung der Gesamterregernachweise (total) wurden alle Erregernachweise gezählt, die in mindestens einer der Testmethoden als positiv analysiert wurden. Infolge der wenigen nicht übereinstimmenden Ergebnisse der Testmethoden, ergänzen sich die Erregerdetektionen von CT und NG auf höhere Werte (total) als mit der multiplex rt PCR ermittelt.

Tabelle 4 Erregerdetektion über die Testmethoden. Veranschaulicht werden die Häufigkeiten der detektierten Erreger, welche durch die Standardtests und den zusätzlich durchgeführten Mykoplasmen-Test, sowie dem gegenüberstehend durch die multiplex rt PCR ermittelt wurden. Die Gesamt-Erregerinfektionen (Total) setzen sich aus den Erregerinfektionen zusammen, die in einer der Testmethoden als positiv bestimmt wurden.

Erreger	angeforderte Standardtests	zusätzlicher Standardtest	Multiplex rt PCR	Total
CT	14	-	14	15
NG	11	-	12	13
MG	-	2	3	3
MH	0	3	8	8
UP	-	*12	16	16
UU	3		11	11
TV	0	-	1	1
	28	17	65	67

*Detektion beider Ureaplasmen-Arten zusammen (UP + UU)

Tabelle 5 Detektion der Einfach- und Mehrfachinfektionen über die Testmethoden. Es werden die Häufigkeiten der positiven Proben und der positiven Erregernachweise veranschaulicht, welche durch alle Standardtests und durch die Verwendung der multiplex rt PCR detektiert wurden. Dargestellt ist die Verteilung der Erregernachweise auf die positiven Proben im Sinne der Einfach- und Mehrfachinfektion. Die Gesamtheit der durch die Testverfahren detektierten positiven Proben und positiven Erregernachweise sind in der letzten Spalte (total) dargestellt.

	angeforderte Standardtests	Gesamtheit der Standardtests	multiplex rt PCR	Total
Positive Proben	27	39	41	42
♦ Erregernachweise	28	43	65	67
Einfachinfektion	26	35	26	27
Mehrfachinfektion	1	4	15	15
♦ Erregernachweise	2	8	39	40

Vergleicht man die positiven Ergebnisse der multiplex rt PCR mit den positiven Ergebnissen der Standardtests, welche von den Klinikern angefordert wurden, so wären 40 Erregerinfektionen infolge der fehlenden Testanforderungen unentdeckt geblieben. Über die multiplex rt PCR konnten weitere 11 Einfachinfektionen und 15 Mehrfachinfektionen diagnostiziert werden. Diese direkten Vergleichswerte weichen leicht von den dargestellten Tabellenwerten ab, da zum einen zwei Erregernachweise in beiden Testverfahren nicht übereinstimmten und zum anderen zusätzliche Erregernachweise in der multiplex rt PCR zu weiteren Einfachinfektionen oder Mehrfachinfektionen führen können. Da aus Einfachinfektionen der Standardtests durch zusätzliche Erregerdetektion Mehrfachinfektionen werden, scheint die Darstellung der Infektionen in der Tabelle verzerrt. Bei reiner Betrachtung der positiven Proben und positiven Erregernachweise konnten über die Nutzung der multiplex rt PCR im Vergleich zu den angeforderten Standardtests 14 weitere positive Proben und 37 weitere Erregernachweise detektiert werden.

Im Vergleich mit allen durchgeführten Standardtests, inklusive dem zusätzlich durchgeführten Standardtest für Mykoplasmen und Ureaplasmen, ist die Anzahl der positiven Proben nahezu gleich (vgl. 39 und 41), die Anzahl der detektierten Erreger innerhalb dieser Proben über die Nutzung der multiplex rt PCR allerdings deutlich höher (vgl. 43 und 65).

5.4 Ergebnisübereinstimmungen der Standardtests mit der multiplex rt PCR

Von den 700 Ergebnissen der multiplex rt PCR konnten über die durchgeführten Standardtests inklusive des zusätzlich durchgeführten Standardtests für Mykoplasmen und Ureaplasmen 438 Ergebnisse (84 × CT, 75 × NG, 28 × TV, 85 × MH, 81 × MG, 85 × UU/UP) verglichen werden. Innerhalb dieser Ergebnisse stimmten 436 (401/401 negativ, 35/37 positiv) verglichene Werte überein, sodass eine beobachtete Übereinstimmung von 99,5% erzielt wurde. Tabelle 6 zeigt die Konkordanz, die zufallskorrigierte Übereinstimmung, zwischen der multiplex rt PCR und den Standardtests als Kappa-Koeffizient. Die Kappa-Koeffizienten der NAATs liegen zwischen 0,945 und 1,000 und werden demnach als (fast) vollständig übereinstimmend eingestuft (Kwiecien et al. 2011). Die bakterielle Kultur ist mit der multiplex rt PCR bezüglich UU mit einem Kappa-Koeffizienten von 0,627 stark übereinstimmend, jedoch deutlich unter den Werten der anderen Standardtests. Der zu schmale Bereich des 95% CI, welcher aus der Berechnung mit einem Kappa-Koeffizienten um 1 resultiert, kann als Limitation der Formel angesehen werden.

Durch Addition der positiven Ergebnisse aller Tests, ergeben sich 67 spezifische Erregerinfektionen. Über die Standardtests wurden ein Urin NG-positiv und ein Vaginalabstrich CT-positiv getestet, welche mit der multiplex rt PCR negativ für diese Erreger getestet wurden. Der Urethralabstrich zum NG-positiven Urin wurde zudem mit beiden Testverfahren negativ auf NG getestet.

Tabelle 6 Konkordanzanalyse. Es werden die beobachteten Übereinstimmungen und die Kappa-Koeffizienten als zufallskorrigierte Übereinstimmungen der Standardtests auf einfache Infektionen und der multiplex rt PCR sowie des zusätzlich durchgeführten Standardtests für Mykoplasmen und Ureaplasmen (folgende Seite) mit dem 95% CI veranschaulicht. Für die Erregertests, mit denen keine positiven Proben detektiert wurden, besteht eine vollständige Übereinstimmung beider Verfahren, sodass ein Kappa-Koeffizient nicht ermittelt werden kann. Zu beachten ist, dass bei Kappa-Koeffizienten nahe 1 das errechnete Konfidenzintervall zu schmal ausfällt.

		UU		MH		NG		CT		TV	
		Kultur		Kultur		rt PCR		rt PCR		Giemsa	
		n = 28		n = 28		n = 75		n = 84		n = 28	
		positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Anyplex II STI-7	positiv	2	1	0	0	10	0	13	0	0	0
	negativ	1	24	0	28	1	64	1	70	0	28
Beobachtete Übereinstimmung [%]		92,9		100		98,7		98,8		100	
Kappa-Koeffizient [95% CI]		0,627 [0,128;1,000]		-		0,945 [0,837;1,000]		0,956 [0,870;1,000]		-	

Tabelle 6 Konkordanzanalyse (Fortsetzung).

		U		MG		MH	
		amplex PCR		amplex PCR		amplex PCR	
		n = 81		n = 81		n = 81	
		positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Anyplex II STI-7	positiv	12	0	2	0	3	0
	negativ	0	69	0	79	0	78
Beobachtete		100		100		100	
Übereinstimmung [%]							
Kappa-Koeffizient		1,000		1,000		1,000	
[95% CI]		[1,000;1,000]		[1,000;1,000]		[1,000;1,000]	

5.5 Probenauswertung und Häufigkeiten der Erreger

Die Häufigkeiten der Infektionen und die Verteilung der Erreger in einfache und Mehrfachinfektionen zeigt Tabelle 7. Unter den 100 eingeschlossenen Proben wurden 42 positiv auf mindestens einen Erreger getestet. In diesen positiven Proben wurden 27 Einfachinfektionen und 15 (36%) Mehrfachinfektionen mit multiplen Pathogenen diagnostiziert. Eine Mehrfachinfektion mit 2 Erregern fand sich in 8 Proben, eine Mehrfachinfektion mit 3 Erregern in 4 Proben und eine Mehrfachinfektion mit 4 Erregern in 3 Proben. Die Erregerkonstellationen der STI-Einfach- und Mehrfachinfektionen sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Erreger, die am häufigsten in Mehrfachinfektionen gefunden wurden, waren UP (67%), CT (60%) und UU (53%).

Tabelle 7 Probenauswertung. Es wird die Verteilung der positiven und negativen Proben, sowie der Einfach- und Mehrfachinfektionen von 100 analysierten Proben dargestellt. Es stammten 33 Proben von weiblichen und 67 Proben von männlichen Patienten. Ebenso sind die Verteilungen der Erregerdetektionen auf Proben weiblicher und männlicher Patienten veranschaulicht.

	Probenanzahl		
	Weiblich	Männlich	Gesamt
negativ	17	41	58
positiv	16	26	42
	33	67	100
Einfachinfektion	5	22	27
Mehrfachinfektion	11	4	15
CT	7	8	15
NG	3	10	13
MG	1	2	3
MH	6	2	8
UP	13	3	16
UU	4	7	11
TV	0	1	1
	34	33	67

Tabelle 8 Erregerhäufigkeiten in Einfach- und Mehrfachinfektionen. Es werden die Häufigkeiten der Einfach- und Mehrfachinfektionen sowie die Erreger-Konstellationen bei Mehrfachinfektion dargestellt.

Infektion	Probenanzahl	Erreger
einfach	27	8 × NG 6 × UP 6 × CT 3 × UU 2 × MG 2 × MH
zweifach	8	2 × UU + CT 2 × UP + CT 1 × UU + UP 1 × UP + NG 1 × UU + NG 1 × UP + MH
dreifach	4	2 × UP + MH + CT 1 × UU + NG + CT 1 × UU + UP + MH
vierfach	3	1 × UP + MG + MH + CT 1 × UU + UP + NG + CT 1 × UU + MH + NG + TV

Die Einfachinfektionen wurden hauptsächlich in Urethralabstrichen detektiert, die Mehrfachinfektionen fanden sich überwiegend in Vaginal-/Zervikalabstrichen, aber auch in Urinproben, Anal-/Rektal- und Oralabstrichen (Tabelle 9). In den Aszitespunktaten, welche intraoperativ entnommen wurden, wurde keiner der sieben Erreger nachgewiesen. Die Erregernachweise in den Oral- und Analabstrichen, sowie die Mehrfachinfektionen sollen genauer betrachtet werden: In dem einfach-positiven Oralabstrich eines männlichen Patienten (18 Jahre) wurde MH nachgewiesen. Die weiteren zwei positiven Oralabstriche fanden sich bei einem Mann (18 Jahre), vorerst vierfach positiv (UU + MH + NG + TV) und im Verlauf nach begonnener antibiotischer Therapie noch zweifach positiv (UU + NG). Der dreifach

positive Anal-/Rektalabstrich wurde ebenfalls von einem Mann (55 Jahre) gewonnen und positiv auf UU, NG und CT gemessen. Von den einfach positiven Anal-/Rektalabstrichen waren zwei der drei Abstriche von männlichen Patienten mit UU (49 Jahre) bzw. NG (18 Jahre) und einer von einer weiblichen Patientin mit UP (25 Jahre). Die vierfach positiven Vaginal-/Zervikalabstriche wiesen folgende Erregerkonstellationen auf: UP + MG + MH + CT (26 Jahre), sowie UU + UP + NG + CT (31 Jahre). In den dreifach positiven Vaginal-/Zervikalabstrichen wurden folgende Erregerkonstellationen nachgewiesen: UP + MH + CT (28 Jahre), UP + MH + CT (16 Jahre) und UU + UP + MH (20 Jahre). Auffällig ist hier die stetige Co-Infektion von UP + MH.

Tabelle 9 Infektionsdetektion in den untersuchten Probenmaterialien. Es werden die Probenmaterialien und die in ihnen nachgewiesenen Einfach- und Mehrfachinfektionen veranschaulicht.

Material	negativ	einfach positiv	zweifach positiv	dreifach positiv	vierfach positiv
Urethralabstrich	33	15	0	0	0
Vaginal-/Zervikalabstrich	10	3	5	3	2
Urin	10	5	2	0	0
Anal-/Rektalabstrich	2	3	0	1	0
Oralabstrich	1	1	1	0	1
Aszites	2	0	0	0	0

5.6 STI-Infektionen der Patienten

Von 82 symptomatischen Patienten der Studie, hatten 43 für alle sieben Erreger negative Testergebnisse, 25 wurden auf einen der sieben Erreger positiv getestet und 14 wurden auf multiple Erreger (2-4 Pathogene) positiv getestet und somit eine Mehrfachinfektion diagnostiziert (Tabelle 10). Dabei galt die Detektion multipler Erreger innerhalb eines Probenmaterials sowie die Detektion verschiedener Erreger in der Gesamtheit der vom Patienten entnommenen Probenarten als Mehrfachinfektion. Unter den Patienten, die für alle Erreger negativ getestet wurden,

befanden sich 31 Männer und 12 Frauen. Insgesamt wurden 15 Frauen und 24 Männer positiv auf mindestens einen Erreger getestet. Eine einfache Infektion ergab sich für 4 weibliche und 21 männliche Patienten. Von den Mehrfachinfektionen wurden 11 bei weiblichen Patienten und 3 bei männlichen Patienten ermittelt. Von den getesteten Frauen wurden 56% auf mindestens einen Erreger positiv getestet, bei den Männern wurden 42% positiv auf mindestens einen Erreger getestet. Der Altersdurchschnitt der positiv getesteten Frauen lag bei 26,3 Jahren und der positiv getesteten Männer bei 31,1 Jahren. Der am häufigsten detektierte Erreger unter den Frauen war UP (n = 13), während es NG unter den Männern war (n = 10).

Tabelle 10 Infektionen der Patienten. Es wird die Verteilung von Einfach- und Mehrfachinfektionen auf die getesteten, symptomatischen Frauen und Männer dargestellt. Zudem werden die Häufigkeiten der Erregerinfektionen der Frauen und Männer aufgezeigt. Dabei wurde jede Erregerdetektion, ungeachtet aus welchem Probenmaterial der Nachweis hervorging, berücksichtigt.

	Patientenanzahl		
	Frauen	Männer	Gesamt
negativ	12	31	43
positiv	15	24	39
	27	55	82
Einfachinfektion	4	21	25
Mehrfachinfektion	11	3	14
CT	7	8	15
NG	2	8	10
MG	1	2	3
MH	6	2	8
UP	13	3	16
UU	4	6	10
TV	0	1	1
	33	30	63

Die Prävalenzen der Erregerinfektionen sowie der Einfach- und Mehrfachinfektionen im untersuchten Patientenkollektiv werden in Tabelle 11 veranschaulicht. Im gesamten Patientenkollektiv wurden bei 30% eine Einfachinfektion und bei 17% eine Mehrfachinfektion nachgewiesen. Die häufigsten Pathogene aller Patienten waren UP und CT mit einer Prävalenz von 20% bzw. 18%. Die geringsten Prävalenzen verzeichneten in diesem Patientenkollektiv MG und TV mit 4% bzw. 1%

Tabelle 11 Prävalenzen der Erregerinfektionen im untersuchten Patientenkollektiv. Dargestellt sind die Erreger- und Infektionsprävalenzen getrennt für Frauen und Männer, sowie im gesamten Patientenkollektiv.

Infektion	Prävalenz [%]		
	Frauen	Männer	Gesamt
Einfachinfektion	15	38	30
Mehrfachinfektion	41	5	17
CT	26	15	18
NG	7	15	12
MG	4	4	4
MH	22	4	10
UP	48	5	20
UU	15	11	12
TV	0	2	1

Von acht Patienten wurden parallel Urethralabstrich und Urinprobe vermessen (Tabelle 12). Bei fünf dieser Patienten waren beide Probenmaterialien negativ. In einem Fall war der Urethralabstrich positiv für UP und NG, in der Urinprobe wurde allerdings nur NG detektiert. Bei einem weiteren Patienten wurde der Urethralabstrich positiv auf UP getestet und die Urinprobe negativ. Bei einem Patienten war der Urethralabstrich negativ, der Urin wurde mit der singleplex rt PCR positiv für NG getestet und mit der multiplex rt PCR ebenfalls negativ. Im Vergleich wurden im Urethralabstrich im Schnitt mehr Erreger nachgewiesen als in der dazugehörigen Urinprobe.

Tabelle 12 Parallele Untersuchung von Urethralabstrich und Urinprobe. Bei acht Patienten wurden parallel Urethralabstrich und Urinprobe mit folgenden Ergebnissen vermessen.

Patient	Urethralabstrich	Urinprobe
1-5	negativ	negativ
6	NG-positiv, UP-positiv	NG-positiv
7	UP-positiv	negativ
8	negativ	NG-positiv in singleplex rt PCR negativ in multiplex rt PCR

5.7 Durchführung der Testmethoden im Vergleich

Die Durchführungen der Standardtests auf einfache Infektionen, des zusätzlichen Standardtests für Mykoplasmen und Ureaplasmen und der multiplex rt PCR wurden bezüglich des zeitlichen Aufwands und der groben Einordnung der Geräte und Materialien in drei Preiskategorien miteinander verglichen.

Von Relevanz war die Arbeitszeit für das labortechnische Personal sowie die durchschnittliche Dauer bis mit dem jeweiligen Testverfahren ein Ergebnis vorlag (Tabelle 13). Die DNA-Extraktion aus der Probe, welche den NAATs der Standardtests und der multiplex rt PCR vorausgeht, wurde nur einmal durchgeführt. Ihr zeitlicher Aufwand wurde für die Vergleichbarkeit allerdings in jeden NAAT inkludiert. Die zusätzliche Zeitspanne für die extern durchgeführte bakterielle Kultur, welche den materialgerechten Transport nach Probeneingang bis zur Probenverarbeitung im Institut der TU Dresden beinhaltete, wurde in der Auflistung der Testverfahren nicht berücksichtigt. Dieser Zeitverlust, bis die externe bakterielle Kultur angelegt werden kann, darf in dieser Untersuchung jedoch nicht vernachlässigt werden.

Tabelle 13 Zeitaufwand der Testverfahren. Für die jeweiligen Standardtests und die multiplex rt PCR werden der personelle Arbeitsaufwand (hands-on-time) und die durchschnittliche Zeit bis zum Vorliegen des Ergebnisses veranschaulicht. Die Zeit für die Durchführung der DNA-Extraktion wurde in alle NAATs inkludiert. Die Verfahren der bakteriellen Kultur und die PCR + ELISA reverse Hybridisierung konnten nur allgemein auf das Vorhandensein von Ureaplasmen (U) testen, dagegen differenzierte die multiplex rt PCR zwischen UU und UP.

Erreger	Testverfahren	Hands-on-time	Ø-Zeit bis
		[min]	Ergebnis [min]
NG	rt PCR	60	180
CT	rt PCR	30	210
TV	Giemsa-Färbung + Mikroskopie	10	60
MH, UU	Kultur	10	4.320
MH, MG, U	PCR + ELISA reverse Hybridisierung	200	330
NG, CT, TV, MH, MG, UU, UP	multiplex rt PCR	50	300

Der personelle Arbeitsaufwand der multiplex rt PCR liegt 12 Minuten unter dem Durchschnitt der Standardtestverfahren mit 62 Minuten. Die durchschnittliche Zeit bis zum Vorliegen des Ergebnisses liegt sehr deutlich unter dem Durchschnitt der Standardtestverfahren mit 17 Stunden. Für die Erlangung eines ähnlich aussagekräftigen Infektionsprofils pro Probe müssten alle Standardtests parallel von einer Arbeitsgruppe oder nacheinander von einer labortechnischen Arbeitskraft abgearbeitet werden. Der personelle Aufwand (Arbeitszeit) für die reine Bearbeitung wäre 6-fach erhöht und die Zeit bis zum Vorliegen aller Ergebnisse wäre 17-fach erhöht im Vergleich zur multiplex rt PCR.

Ein Kostenvergleich der Erregertests gestaltet sich aufgrund verschiedener beeinflussender Parameter nur sehr schwierig. Die Verträge, die zwischen Geräteherstellern und Labor geschlossen werden, sind nicht öffentlich und

unterliegen hinsichtlich des Wettbewerbs einer gewissen Geheimhaltung. Die Abkommen können durch langjährige Zusammenarbeit, Leihgaben/Mietverträge, Inanspruchnahme von Service- und Wartungsleistungen, Mehrfachnutzung der Geräte für verschiedene Testverfahren, sowie Rabatte bei gewissen Durchsatzraten stark variieren (Baier 2018). So können die Kosten für Erregertests runtergerechnet auf einzelne Untersuchungen um ein vielfaches schwanken. Wegen der unterschiedlichen Kriterien dieser Abkommen mit den Herstellern, ist eine Gegenüberstellung auf der Grundlage gleicher Voraussetzungen unmöglich. Dennoch ist eine grobe Betrachtung der Kosten der durchgeführten Erregertests im Vergleich eine wichtige Komponente bei der Beurteilung der Nutzbarkeit der multiplex rt PCR für den Laboralltag.

Die grobe Darstellung des Kostenvergleichs unterteilt sich in die Probenvorbereitung und die Erregertests. Die DNA-Extraktion, welche allen NAAT vorangeht, wurde Erregertest-spezifisch mit zwei Geräten und zwei Reaktionskits durchgeführt (Tabelle 14). Für die Durchführung der NG rt PCR, der amplex PCR + ELISA reverser Hybridisierung und der multiplex rt PCR wurde die DNA-Extraktion einmalig mit dem EZ1 Advanced XL und dem EZ1 Virus Mini Kit v2.0 durchgeführt. Das DNA-Eluat wurde für die sich anschließenden Erregertests portioniert. Für die Durchführung der CT rt PCR wurden die Proben in dem Cobas AmpliPrep mit dem TNAI Reagent für die DNA-Eluat-Herstellung prozessiert.

Bei alleiniger Nutzung der multiplex rt PCR für die STI-Diagnostik könnte sich die DNA-Extraktion auf die Nutzung des EZ1 Advanced XL mit dem EZ1 Virus Mini Kit v2.0 reduzieren. Demnach auf ein Gerät der günstigeren Preisklasse und ein Reaktionskit der mittleren Preiskategorie. Eine Einsparung bezüglich der STI-Diagnostik könnte die DNA-Extraktion mittels Cobas AmpliPrep und TNAI Reagent für die CT rt PCR darstellen. Für die Wirtschaftlichkeit des Labors scheint dies nur relevant, wenn das Gerät nicht zusätzlich auch für andere Probenaufarbeitungen in der Routinediagnostik genutzt wird.

Tabelle 14 Semiquantitativer Kostenaufwand der DNA-Extraktionen. Die Geräte und Reaktionskits für die DNA-Extraktionen werden grob anhand ihrer Listenpreise in die Preiskategorien günstiger €, mittel €€ und preisintensiv €€€ eingeteilt (Baier 2018).

DNA-Extraktion für	Gerät	Geräte-preisklasse	Reaktionskit	Kosten pro Durchführung
NG rt PCR, multiplex rt PCR, amplex PCR	EZ1 Advanced XL (Qiagen)	€	EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen)	€€
CT rt PCR	Cobas AmpliPrep (Roche)	€€€	TNAI Reagent (Roche)	€

Die Erregertests könnten grob unter Einbeziehung der Listenpreise der verwendeten Geräte und der Reaktionskits bzw. Verbrauchsmaterialien in Preisklassen eingeordnet werden (Tabelle 15). Die Geräte für die Standardtestverfahren gehören hauptsächlich der mittleren Preisklasse an. Lediglich das Gerät für den CT-Nachweis liegt in der preisintensiveren Sparte. Vergleichbar dazu ist der Thermocycler für die multiplex rt PCR ein Gerät der mittleren Preisklasse. Die Kosten pro Untersuchung der Standardtestverfahren befinden sich ebenfalls durchschnittlich im mittleren Bereich. Der TV-Nachweis mit Giemsa-Färbung ist real ausgesprochen günstig und der externe Mykoplasmen-Nachweis mit bakterieller Kultur wegen des eingeschlossenen personellen Arbeitsaufwands sehr preisintensiv. Das Anyplex II STI-7 Reaktionskit für die multiplex rt PCR liegt ebenfalls im mittleren Preisbereich. Kosteneinsparungen bei der Durchführung der Testverfahren wären, ebenso wie bei der Probenaufreinigung, abhängig von der sonstigen Nutzungsrate der Geräte im Laboralltag der Routine-Diagnostik, sowie den Nutzungskriterien, wie sie in etwaigen Abkommen mit den Herstellern geregelt sind.

Unter Einbeziehung der in dieser Untersuchung spezifischen Nutzungsraten der Testverfahren wurden folgende Überschlagungen angestellt. Im Schnitt wurden 2,4 Erregertests und resultierend 2,4 Erreger-Ergebnisse pro eingesandte Probe von den Klinikern angefordert. Mit dem zusätzlich durchgeführten Standardtest auf Ureaplasmen und Mykoplasmen wurden 3,2 Testverfahren pro Probe durchgeführt, sodass im Schnitt 4,4 Erreger-Ergebnisse pro Probe zum Testvergleich erzielt

wurden. Über die multiplex rt PCR konnten durchgängig 7 Erreger-Ergebnisse pro Probe ermittelt werden. Hieraus ergeben sich über die Standardtests etwa 62% der Erreger-Ergebnisse pro Probe im Vergleich zur multiplex rt PCR. Dafür mussten aber im Schnitt 3,2 Testverfahren pro Probe durchgeführt werden. Mit der multiplex rt PCR musste für knapp 40% mehr Erreger-Ergebnisse nur 1 Testverfahren pro Probe durchgeführt werden.

Tabelle 15 Semiquantitativer Kostenaufwand der Testverfahren. Es werden die Kostenbereiche der Gerätepreise für die jeweiligen Testverfahren und die Kostenbereiche der Reaktionskits dargestellt. Die Kostenbereiche der Geräte und die Reaktionskits werden in günstiger €, mittel €€ und preisintensiv €€€ eingeteilt. Die Kosten der Giemsa-Färbelösung zur Durchführung des TV-Nachweises sind real ausgesprochen gering, weshalb der günstige Kostenbereich nochmals in Klammern gesetzt ist. Die Kosten für den Mykoplasmen-Nachweis mittels Kultur sind real bezüglich Brutschrank und Kulturplatten ebenfalls vergleichsweise gering. In dieser Kostenbetrachtung fällt diese Untersuchung in den preisintensiven Bereich infolge der externen Probenuntersuchung im Institut für Medizinische Mikrobiologie der TU Dresden und den daraufhin einbezogenen personellen Arbeitsaufwand.

Erreger	Testverfahren	Gerät	Geräte- preisklasse	Reaktionskit/ Material	Kosten pro Untersuchung
NG	rt PCR	LightCycler® 2.0 (Roche)	€€	GeneProof Neisseria gonorrhoeae PCR Kit (GeneProof)	€€
CT	rt PCR	Cobas TaqMan (Roche)	€€€	TaqMan CT Test v.2.0 (Roche)	€€
TV	Giemsa-Färbung + Mikroskopie	ZEISS Axio Imager (Zeiss)	€€	Giemsa's Solution (Merck)	(€)
UU, MH	Kultur	-	-	-	€€€
U, MH, MG	PCR + ELISA reverse Hybridisierung	eppendorf Mastercycler personal (eppendorf)	€	hyplex® + hyplex® STD ID (amplex Biosystems)	€€
NG, CT, TV, UU, UP, MG, MH	multiplex rt PCR	CFX96 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories)	€€	Anyplex II STI-7 (Seegene)	€€

6 Diskussion

6.1 Vergleich der Detektionsraten und Auswirkungen auf die Therapie

Der Vergleich der multiplex rt PCR mit den Standardtests beleuchtet die Detektionsrate, die Durchführung und die Auswirkung auf die Therapie. Die multiplex rt PCR mit dem Anyplex II STI-7 Panel zeigte eine sehr hohe beobachtete Übereinstimmung (99,5%) mit den Ergebnissen der durchgeführten Standardtests. Darüber hinaus wurden 40 der 67 individuell gezählten Erregerinfektionen allein durch die Anwendung der multiplex rt PCR entdeckt. Für knapp zwei Drittel der final detektierten Infektionen wurden keine Standardtests angefordert. Diese Infektionen wären unentdeckt und unbehandelt geblieben. Alle Mykoplasmen-Infektionen und der Großteil der Ureaplasmen-Infektionen fielen unter diese allein durch die multiplex rt PCR detektierten STI. Da diese Erreger am häufigsten an Mehrfachinfektionen beteiligt sind (Wang et al. 2016, Zeng et al. 2016), ist eine konsequente Behandlung besonders wichtig. Durch die ähnliche Symptomatik der STI-verursachenden Erreger entsteht eine hohe Rate an Standardtestanforderungen auf die in diesen Fällen nicht verursachenden Erreger. So gab es 159 Anforderungen der Standardtests auf CT und NG. Die relativ hohe Prävalenz dieser beiden STI und die unumstrittene Pathogenität der Erreger mögen dies rechtfertigen (Robert-Koch-Institut 2010a, Robert-Koch-Institut 2013). So konnten diese Erreger in 25 Fällen alleinig bzw. zusammen mit weiteren Erregern in einer Mehrfachinfektion für die Symptomatik der Patienten verantwortlich gemacht werden. Jedoch wurden in 38 Fällen der CT- und NG-Standardtestanforderungen andere Erreger als Infektionsverursacher in den Proben gefunden. In Anbetracht dessen, führen viele Testanforderungen, die aufgrund des klinischen Bildes gestellt werden, nicht zur Detektion des verursachenden Erregers. Unter Beachtung der nationalen und internationalen Leitlinien bezüglich der Behandlung von STI, bedarf es der genauen Kenntnis der symptomverursachenden Erreger und der an einer Mehrfachinfektion beteiligten Pathogene (Deutsche STI-Gesellschaft 2014).

Durch die Detektion aller an der Mehrfachinfektion beteiligten Pathogene, könnte sich das Antibiotikaregime aus den leitliniengerechten Wirkstoffen mit den erforderlichen Dosierempfehlungen für die jeweiligen Erreger zusammenstellen (Deutsche STI-Gesellschaft 2014). Inwieweit dieses infektionsspezifische Behandlungsregime infolge gleicher oder ähnlicher Wirkstoffgruppen und/oder Alternativmedikation der Erreger vereinfacht werden kann und inwieweit es an die Gegebenheiten des Patienten bezüglich der relativen und absoluten Kontraindikationen oder der zu erwartenden Compliance angepasst werden muss, bleibt (vorerst) eine Einzelentscheidung und Abwägung des Klinikers. Daraus ableitend, bleiben weitere Untersuchungen bezüglich der Auswirkung der genauen Kenntnis der an einer Mehrfachinfektion beteiligten Erreger auf die Therapie und deren Erfolg bei Antibiotikakombination wichtige Fragestellungen in zukünftigen Analysen.

Im Rahmen von denkbaren Screenings oder Untersuchungen an asymptomatischen Frauen und Männern sowie für die Abklärung einer Risikopopulation (Centers for Disease Control and Prevention 2014, Lee et al. 2016), kann die Unterscheidung der beiden Spezies *Ureaplasma parvum* und *Ureaplasma urealyticum* von Interesse sein (Sleha et al. 2016, Leli et al. 2018). Dieser große Vorteil der multiplex rt PCR könnte sich auf die Therapieentscheidung der Kliniker auswirken, da bei einer CT- und NG-negativen Urethritis am ehesten UU ursächlich ist und die Pathogenität von UP umstritten ist (Deutsche STI-Gesellschaft 2014). Viele Kriterien sollten nach Kenntnis des Erregers, unabhängig von der gesicherten oder fraglichen Pathogenität, bei der Therapieentscheidung eine Rolle spielen (Wagenlehner et al. 2016). Neben der Symptomatik, die bedeutungsvollerweise einen ausreichend hohen Leidensdruck verursacht, sodass der Patient ärztlichen Rat aufsucht, sollten Alter, Immunstatus, Co-Morbidität, Co-Infektionen, die Angehörigkeit des Patienten/der Patientin zu Risikogruppen, bestehende Gravidität, lokal vorherrschende Antibiotika-Resistenzlagen und nicht zuletzt die Erfahrung des behandelnden Klinikers ihren Weg in die Therapieentscheidung finden.

Die Einordnung der detektierten Infektionsprävalenzen und Mehrfachinfektionen im nationalen und internationalen Vergleich lässt sich aufgrund der geringen und stark variierenden Datenlagen nur bedingt vornehmen. Die Tatsache, dass in dieser Studie

nur symptomatische Patienten untersucht wurden, unterstreicht die erhöhten Prävalenzen der meisten Erreger im Vergleich zu deutschlandweiten Schätzungen. Die Infektionshäufigkeiten im Verhältnis zu einander ähneln diesen Werten allerdings (Robert-Koch-Institut 2010b). Auffällig ist die zahlreiche Beteiligung von Ureaplasmen an Mehrfachinfektionen. Das lässt sich aufgrund der generell relativ hohen Prävalenzen dieser beiden Arten erklären. Zudem scheinen sie von einem pathogen veränderten Mikromilieu durch die Anwesenheit anderer Erreger zu profitieren. Häufige Erreger in Mehrfachinfektionen sind zudem CT und NG. Aufgrund der hohen Pathogenität spielen sie eine besondere Rolle bei der Erwerbung weiterer Erreger z. B. hinsichtlich ihrer Transmissionswahrscheinlichkeit. Interessant ist das Ergebnis, dass bei dem einzigen TV-Nachweis in diesem Patientenkollektiv u. a. auch eine Co-Infektion mit MH detektiert wurde. Die symbiotische Beziehung dieser beiden obligat human pathogenen Erreger könnte bei diesem Patienten von Relevanz sein.

Für den Vergleich der Probenmaterialien bei parallel entnommener Urinprobe und Urethralabstrich war die eingesandte Stichprobenzahl zu gering, sodass keine signifikante Auswertung der vorliegenden Probenpaare vorgenommen werden konnte. In einer zuvor durchgeführten Studie von Jensen et al. zeigte sich eine bessere Detektionsrate im Erststrahlurin als im Urethralabstrich für den Nachweis von MG und CT (Jensen et al. 2004). Bei Frauen sollte die Probenentnahme allerdings durch einen Zervikalabstrich ergänzt werden. Eine andere Studie zog die Schlussfolgerung, dass Urinproben eine Ergänzung bei der CT-Detektion darstellen, die Entnahme von Urethralabstrichen aber nicht ersetzen (Jensen et al. 2003). Anzumerken ist, dass in den Untersuchungen für die Bestimmung der richtig-positiven Ergebnisse verschiedene Testverfahren, wie Kultur, Antigennachweis über ELISA oder Fluoreszenzfärbung oder PCR angewendet wurden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um Aussagen bezüglich der Übereinstimmung von Urinprobe und Urethralabstrich treffen zu können. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit der Detektion möglicherweise abhängig vom Tropismus der untersuchten Erreger und der intrazellulären bzw. extrazellulären Lebensweise. Bei vergleichbaren Detektionsraten könnte die Urinprobe eine alternative Probengewinnung darstellen, die zum einen nichtinvasiv ist und zum anderen ohne Arzt zuhause durchgeführt werden kann.

6.2 Vor- und Nachteile der Standardtests und der multiplex real-time PCR

Die Vor- und Nachteile der in dieser Studie durchgeführten Standardtests und der multiplex rt PCR spielen eine besondere Rolle bei der Betrachtung der Nutzbarkeit und der Performance des multiplex rt PCR-Verfahrens. Ebenso ist die Beleuchtung der Kosteneinsparungen ein wichtiger Punkt im Bezug auf den alltäglichen Probendurchsatz.

Die bakterielle Kultur als genutzte Standardmethode zum Nachweis von MH und UU testet auf lebende Mikroorganismen und erlaubt eine anschließende Testung auf Antibiotikaresistenzen. Dennoch ist diese Methode wegen des vorangehenden Probenverkehrs in ein externes Labor und die Notwendigkeit lebender Mikroorganismen für die erfolgreiche Durchführung des Erregernachweises relativ störanfällig. Außerdem wird teilweise unspezifisch UU sowie UP kultiviert, sodass die Detektion mittels bakterieller Kultur weniger verlässlich ist als die Detektion mittels multiplex rt PCR. Die in der Kultur UU-positiv getesteten Proben wurden zwar auch mit dem zusätzlich durchgeführten Standardtest für Mykoplasmen und Ureaplasmen als U-positiv bestätigt, jedoch stellten sich in der multiplex rt PCR einige UU-Infektionen der Kultur als UP-Infektionen heraus. Das spiegelte der im Vergleich relativ niedrige Kappa-Koeffizient innerhalb der Gesamt-Konkordanzanalyse wider. Der Kultivierung lebender Pathogene muss die Verwendung eines speziellen Transportmediums und eine schnelle und sorgfältige Probenbearbeitung vorausgehen, um falsch-negative Ergebnisse und eine resultierend fehlende Therapie zu vermeiden. Darüberhinaus ist die bakterielle Kultur zeitaufwändig, teuer und erfordert eine sachgenaue und schnelle Bearbeitung der Proben. Etablierte diagnostische Methoden wie die bakterielle Kultur galten bislang als Goldstandard für die Detektion der Mykoplasmen. Sie sind für den klinischen Laboralltag jedoch wenig praktikabel, da sie zeit- und arbeitsintensiv sind und fachlich erfahrenes Personal erfordern. Diese Kombination der Defizite macht die molekulare Diagnostik so ansprechend (Stellrecht et al. 2004).

Die zusätzlich durchgeführte Standardmethode für Mykoplasmen und Ureaplasmen, testet in einem Durchlauf auf MH, MG und U, ermittelt also mehr als ein Ergebnis pro Durchlauf und Probe. Dennoch bleibt auch hier eine Differenzierung zwischen UU

und UP unmöglich. Die Durchführung der Analyse mittels ELISA reverser Hybridisierung erfordert hohen personellen Zeitaufwand und bietet demnach viel Raum für arbeitstechnische Fehler. Für die Analyse des Farbumschlags wird zudem ein Photometer benötigt, das in regelmäßigen Abständen fachgerecht gewartet werden muss.

Die TV-Detektion mittels Mikroskopie oder Kultur ist derzeit laut Leitlinie das Mittel der Wahl. Jedoch müssen diese zeitnah durchgeführt werden und erfordern ähnlich den anderen Standardtests fachlich erfahrene Personal. Kann das nicht gewährleistet werden, tritt als diagnostische Methode ebenfalls ein NAAT in den Vordergrund (Wagenlehner et al. 2016).

Die singleplex rt PCR-Tests für CT und NG sind in der Bearbeitung der Proben und der Durchführung sehr ähnlich zur multiplex rt PCR. Der Zeit- und Kostenaufwand, sowie die Möglichkeiten und Limitationen des Testverfahrens an sich sind vergleichbar (siehe 7.3.) Es muss allerdings bedacht werden, dass die singleplex rt PCR pro Durchlauf und Probe nur Auskunft bezüglich des Vorhandenseins eines bestimmten Erregers gibt.

Bei Betrachtung der genutzten Testverfahren für die STI-Routine-Diagnostik basieren die meisten auf dem Nachweis bakterieller DNA oder der mikroskopischen Färbung des Pathogens. Die multiplex rt PCR testet auf die Erreger ebenso über den Nachweis von DNA. Da diese Testverfahren Teile oder Strukturen der Pathogene detektieren, müssen die Erreger nicht lebend bis zum Erregertest gebracht werden. Dies birgt einen deutlichen Vorteil bezüglich Materialgewinnung, Proben-transport und -lagerung. Lediglich die bakterielle Kultur für die MH und UU-Testung benötigt vitale Erreger für den erfolgreichen Pathogen-Nachweis. Der große Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit der anschließenden Testung auf Antibiotikaresistenzen. Für viele STI-Pathogene wird die Resistenzbestimmung infolge steigender Resistenzentwicklungen immer relevanter, insbesondere für Neisserien, Chlamydien und Mykoplasmen (Bissessor et al. 2015, Kong et al. 2016, Skiljevic et al. 2016, Mestrovic und Ljubin-Sternak 2018). Die durchgeführten Standardtests für diese Erreger lassen die anschließende Resistenztestung ebenso wenig zu, wie die multiplex rt PCR, sodass vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Denkbar wären zukünftig, und mit Blick auf die steigenden Resistenzentwicklungen, anschließende multiplex rt PCR-Verfahren mit Testung auf spezifische

Resistenzgene in der Erreger-DNA, welche für Resistenzmechanismen codieren (Laprade et al. 2016, Nummi et al. 2015, Mestrovic und Ljubin-Sternak 2018). Sie vermögen Aussagen über mögliche Antibiotika-Resistenzen zu geben, vorausgesetzt der jeweilige Resistenzmechanismus ist genetisch codiert, bekannt und der zugehörige Genabschnitt kann über die multiplex rt PCR detektiert werden. Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen notwendig.

Ein deutlicher Vorteil der multiplex rt PCR als STI-Routine-Diagnostikverfahren ist die zeitliche Einsparung. Sowohl in der hands-on-time als auch in der durchschnittlichen Zeit bis zum Vorliegen der Ergebnisse, schlägt die einmalige Durchführung der multiplex rt PCR die Gesamtheit der durchgeführten Standardtests um ein Vielfaches. Insbesondere wird der Mehrwert der einmalig durchgeführten multiplex rt PCR in der erhöhten Detektionsrate von Einfach- und Mehrfachinfektionen im Vergleich zu den Standardtestverfahren mit geringeren Ergebniszahlen deutlich. In die Betrachtung der möglichen finanziellen Vorteile der Integration der multiplex rt PCR in die STI-Routine-Diagnostik müssen viele Punkte einbezogen werden. Zum einen die stark variierenden und individuell geschlossenen Abkommen mit Geräte- und Kitherstellern und zum anderen die Durchsatzraten in der STI-Diagnostik sowie die sonstigen Nutzungsgebiete der ersetzten Geräte. Mit der Einführung der multiplex rt PCR würden im Schnitt zwei Drittel der hier durchgeführten Testverfahren für die eingesandte Probe entfallen und statt im Schnitt vier dann sieben Erreger-Ergebnisse zur Verfügung stehen. Eine relevante Kosteneinsparung durch die Integration der multiplex rt PCR in die Routine-Diagnostik von STI wird hier deutlich erkennbar. Wie die mögliche Einsparung von Geräten tatsächlich aussehe, hängt im Einzelnen von den sonstigen Einsatzgebieten und Nutzungsraten der Geräte für die Standardtestverfahren ab.

6.3 Die multiplex Testung für die Detektion von STI

Die Symptome verschiedener STI sind oftmals ähnlich, wodurch Symptome eines Erregers von denen eines weiteren Erregers überlagert werden können. Die labordiagnostische Erregersuche könnte z. B. bei der bakteriellen Vaginose (Hilbert et al. 2016) oder STI-Symptomen, die sich klinisch nicht eindeutig zuordnen lassen, zum Einsatz kommen (Kriesel et al. 2016). In Abhängigkeit von der jeweiligen

Erregerinfektion verlaufen bis zu 85% der Erkrankungen asymptomatisch (Robert-Koch-Institut 2010a, Robert-Koch-Institut 2013). Eine Therapie könnte jedoch Langzeitkomplikationen wie die Manifestation chronischer Entzündung im Rahmen der PID (inklusive der Ausbildung von Verwachsungen und möglicher Infertilitätskausalität) oder die Entstehung von Neoplasien verhindern und das Fortbestehen von Infektionsreservoirs unterbinden. Wie die Untersuchung zeigte, bleibt ein Großteil der Erregerinfektionen unentdeckt, solange lediglich den Testanforderungen der Kliniker nachgegangen wird. Die multiplex rt PCR stellt ein umfassendes Infektionsprofil mit Informationen über co-existierende Erreger bereit. Neben der Verwendung einer multiplex rt PCR stehen verschiedene Testmethoden für die Erfassung eines umfassenden Infektionsprofils zur Verfügung, wie z. B. Mikroskopie, bakterielle Kultur, Serologie und NAATs wie singleplex rt PCR oder PCR mit anschließender DNA-Analyse. Es müsste jede dieser Methode durchgeführt und alle Ergebnisse kombiniert werden, um eine ähnlich umfangreiche Auskunft zu erhalten. Um die alltägliche Laborarbeit zu vereinfachen und den Arbeitsaufwand sowie die Kosten erheblich zu reduzieren, könnte die Erregerdetektion mittels der multiplex rt PCR von einem Gerät innerhalb eines Durchlaufs durchgeführt werden. Mit der multiplex rt PCR können außerdem verschiedene Probenarten, wie Urethral-, Vaginal-/Zervikal-, Anal-/Rektal-, Oral-/Pharyngealabstrich, Urin, Exprimaturin, Sperma und Aszites untersucht werden. So besteht ein weites Feld diagnostischer Möglichkeiten. Voraussetzung hierfür ist die vorangegangene Validierung des genutzten Geräts und der verwendeten Reaktionskits sowie der Ausschluss möglicher Inhibitoren bezüglich der Vermessung unterschiedlicher Probenarten.

Übliche Limitationen der multiplex rt PCR wie geringere Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu den singleplex rt PCR-Tests und *carry-over*-Kontaminationen durch stark frequentierte Verwendung im Routine-Diagnostik-Labor sind in dieser Untersuchung nicht bzw. kaum zu finden. Mithilfe der anfangs beschriebenen DPO- und TOCE-Technologie sowie der UDG-Dekontamination lassen sich Limitationen dieser Art bei der multiplex rt PCR mit dem Anyplex II STI-7 Reaktionskit auf ein Minimum einschränken (Xu et al. 2015, Cho et al. 2013).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigen das gehäufte Auftreten von Mehrfachinfektionen (Wagenlehner et al. 2016). Um die Symptome zu lindern, eine

langfristige Genesung und Wiederherstellung des Milieus zu ermöglichen und die Übertragungswahrscheinlichkeiten anderer STI zu reduzieren, müssen alle an der Infektion beteiligten Erreger gezielt und erfolgreich therapiert werden (Deutsche STI-Gesellschaft 2014). Deshalb ist die Verwendung der multiplex rt PCR, insbesondere zur Detektion und erregeradaptierten Therapie von Mehrfachinfektionen von großer Bedeutung. Aufgrund ihrer zuvor erläuterten Vorteile, könnte die multiplex rt PCR zukünftig z. B. als mögliche Screeningmethode in Risikogruppen mit gehäuftem Auftreten von Mehrfachinfektionen zum Einsatz kommen (Fernandez et al. 2016, Wagenlehner et al. 2016).

6.4 STI-Pathogene für das Detektionspanel

Die Kombination der Erreger, auf welche mit einem multiplex Detektionspanel getestet wird, könnte aufgrund des Analyseverfahrens sehr ausgiebig und vielseitig bei Panelherstellung variiert werden. Es wurden bereits Ansätze umfänglicher STI-Tests untersucht, mit denen auf bis zu 18 Pathogene gleichzeitig mittels multiplex rt PCR getestet werden konnte. Die Pathogene, welche in einem Diagnostikpanel inkludiert sind, sollten in Anbetracht der Nutzbarkeit und Effizienz des Testverfahrens bestimmte Bedingungen erfüllen. Die Erreger sollten ähnliche Symptome verursachen, sodass die klinische Erregerfeststellung nur eine untergeordnete Rolle im Vergleich zur umfänglichen multiplex Testmethode einnehmen kann. Des Weiteren sollte die Detektion der ausgewählten Erreger Auswirkungen auf das vorhandene Therapieregime oder das Beobachtungsverhalten haben. Demzufolge ist die multiplex Testung besonders geeignet für die Abklärung eines klinischen Infektionsbildes, für dessen Ursache ein weites Spektrum an Erregern in Frage kommen kann und dessen Detektion einen therapeutischen Mehrwert hat. Das Testverfahren mag im Bereich der STI-Diagnostik auch bei viralen Infektionen, wie z. B. HSV oder HPV, Anwendung finden. Der therapeutische Mehrwert liegt hier in der Planung der Beobachtungsabstände kontrollbedürftiger Befunde nach auffälligem Zellabstrich bzw. in der Ergreifung von Schutzmaßnahmen bei sexuellem Kontakt oder der Indikation der antiviralen Therapie in der Schwangerschaft.

Währenddessen ein Durchlauf der multiplex rt PCR wenig gerechtfertigt ist für die Bestätigung eindeutiger klinischer Infektionssymptome mit typischem klinischen

Verlauf, für dessen schnelle und sensitive Detektion fest etablierte Testverfahren zur Verfügung stehen. Dies ist der Fall bei Syphilis im klinisch apparentem Stadium I und die zum Monitoring genutzte Serologie in den folgenden Stadien. Obwohl mit dem Verfahren der multiplex rt PCR auch Serum und EDTA-Blut untersucht werden können, ist die Diagnostik der Hepatitiden A, B und C mittels multiplex rt PCR denkbar, aber wenig sinnvoll. Der Vorteil der multiplex Testung besteht in der umfangreichen Untersuchung von Abstrichmaterialien und Proben aus lokal vorherrschenden Infektionsbereichen. Regionale Unterschiede in der Erregerprävalenz sollten ebenfalls bei der Erregerabdeckung des Panels berücksichtigt werden. So scheint die Prävalenz von TV im untersuchten Patientenkollektiv am UKJ im Vergleich zu Schätzungen für Deutschland erniedrigt zu sein (Robert-Koch-Institut 2010b). Die Ausdehnung der Analysen bezüglich der Erregerabdeckung sollte an regionale, klinische und therapeutische Gegebenheiten adjustiert sein.

6.5 Bedeutung der semiquantitativen Analyse der multiplex real-time PCR

Die Quantifizierung ist eines der wichtigsten Merkmale der rt PCR. Von Interesse ist die Betrachtung der Menge nachgewiesener DNA und des Schweregrads der klinischen Situation. Einige Studien untersuchten eine mögliche Korrelation der analysierten DNA-Kopien und der Erkrankungsschwere bei genetischen Erkrankungen (Feldkotter et al. 2002) und bei Bakteriämie mit und ohne Sepsis (Ziegler et al. 2014). In beiden Untersuchungen konnte ein Zusammenhang beider Parameter verdeutlicht werden. Eine Vorhersage über den weiteren Krankheitsverlauf wurde damit zu einem gewissen Grad ermöglicht. Allerdings ist zu vermerken, dass die vermessenen Proben Blutentnahmen waren, die in einem Fall zur Untersuchung der menschlichen DNA der Blutzellen und zum anderen zur Untersuchung der bakteriellen DNA in der Blutbahn genutzt wurden. Die Verteilung der untersuchten DNA in der Probe kann als homogen angesehen werden und eine Quantifizierung der DNA innerhalb der Probe spiegelt die Merkmalslast im Menschen relativ konstant wider. So sind weniger Unterschiede bei der Probenentnahme und demnach weniger untersucherbasierte Schwankungen in der Beeinflussung der Analyse denkbar, als das bei der Entnahme von Abstrichen der Fall ist.

Die Quantifizierung bakterieller DNA in klinischen Abstrichproben könnte ein kritischer Anhaltspunkt bei der Unterscheidung von Infektion und Kommensalismus darstellen. Dies könnte eine relevante Rolle bezüglich der Beschränkung des Antibiotikagebrauchs spielen. Die Indikation könnte durch Abschätzungen einer zu erwartenden Besserung für den Patienten oder einer gewünschten Limitierung der Übertragungswahrscheinlichkeiten gestellt und untermauert werden. In Anbetracht der relativ unkomplizierten Handhabung der multiplex rt PCR wären Kontrolluntersuchungen und Therapiemonitoring mittels dieser Methode wünschenswert. Da aber die DNA-Last lebender und abgestorbener Pathogene nachgewiesen und quantifiziert wird, würde dies erst acht Wochen nach Therapie in einer deutlichen Änderung der Ergebnisse resultieren. In diesem Zeitraum sind Reinfektion und Inkubation mit anderen Erregern möglich.

In der vorliegenden Untersuchung wurden positive Proben anhand der Nachweisrate während des Amplifizierungsprozesses in drei aufsteigende Stufen der DNA-Last eingeteilt. Innerhalb jeder Stufe wurden Einfach- und Mehrfachinfektionen detektiert. Die an Mehrfachinfektionen beteiligten Erreger trugen in unterschiedlichen Stufen zu der Infektion bei. Ein Zusammenhang zwischen detektierter DNA-Laststufe und klinischer Infektionsschwere konnte jedoch nicht verdeutlicht werden. Dazu ist das Verfahren der Probenentnahme von Abstrichmaterialien sehr untersucherabhängig und die Bakterienverteilung innerhalb des lokalen Infektionsgeschehens kann sehr inhomogen sein. Eine niedrig detektierte DNA-Last im Abstrich kann somit auch mit einer starken Infektion einhergehen und umgekehrt. Der Schweregrad der Infektion ist neben der Pathogenität und Virulenz der Erreger ebenso abhängig von patientenbezogenen Faktoren wie Immunstatus, Alter, Infektionsdauer, Co-Infektionen und Co-Morbidität.

7 Schlussfolgerung

Für die multiplex rt PCR im Vergleich zu den herkömmlich genutzten Standardtests auf einfache Infektionen konnte eine deutliche Vereinfachung der diagnostischen Vorgehensweise in Arbeitsaufwand und Durchführung gezeigt werden. Die multiplex rt PCR unter Nutzung des Anyplex II STI-7 Detektionspanels kann leicht in den mikrobiologischen Laboralltag integriert werden. Der geringe arbeitstechnische Aufwand und die vergleichsweise kurze Dauer bis zum Erhalt eines Ergebnisses sind große Vorteile in der Handhabung des Testverfahrens, insbesondere hinsichtlich des diagnostischen Mehrwerts durch die Erstellung eines umfangreichen Infektionsprofils. Eine grobe Gegenüberstellung der Kosten der verschiedenen laborrelevanten Testverfahren verdeutlicht das erhebliche Potential Kosten einzusparen, sollte die rt PCR in den Laboralltag zur STI-Detektion integriert werden. Für den Kliniker steht die deutlich erhöhte Detektionsrate von STI im Vordergrund, da keine Testvorauswahl von Nöten ist und somit die Anzahl fehlender und inkompletter Diagnosen deutlich reduziert werden kann. Ebenso ergibt sich aufgrund der verschiedenen Probenarten, die mit der multiplex rt PCR vermessen werden können, ein weites diagnostisches Spektrum, sowohl für den Kliniker als auch für den Patienten. Der Patient profitiert von der Erstellung eines umfangreichen Infektionsprofils, das eine schnelle und zielgerichtete Therapie ermöglicht. Die Analyse der Infektionshäufigkeiten bei den untersuchten Patienten zeigt das vermehrte Aufkommen von Mehrfachinfektionen. Zum einen könnte die Detektion aller an einer Mehrfachinfektion beteiligten Erreger für eine zugeschnittene Antibiotikatherapie und folgend für eine optimierte Behandlungsdauer und den Behandlungserfolg von Relevanz sein. Zum anderen ist die Abklärung eines multilokulären Infektionsgeschehens besonders wichtig für die Erkennung und Bekämpfung von Infektionsreservoirs. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, inwieweit die Detektion von Mehrfachinfektionen Auswirkungen auf das angewandte Therapieregime haben könnte. Eine Limitation der multiplex rt PCR in der STI-Diagnostik ist die fehlende Möglichkeit der Resistogramm-Erstellung. Die genaue Kenntnis resistenter Stämme wird bei Gonokokken, Chlamydien und Mykoplasmen aber immer relevanter. Außerdem wird die DNA sowohl von lebenden als auch von abgestorbenen Erregern nachgewiesen. Aufgrund der sehr sensitiven Testmethode

vermag die Detektion von Kommensalen, klinisch inapparenten Infektionen oder subklinischem Erregerbefall in Überdiagnose und Übertherapie zu resultieren. Hierzu sind weitere Untersuchungen bezüglich eines denkbaren Cut-offs notwendig und wie dieser an Gegebenheiten des Patienten angepasst werden müsste. Ein Vergleich der Ergebnisse von Urinprobe und zugehörigem Urethralabstrich konnte infolge der geringen Einsendung dieser Probenpaare nicht aussagekräftig vorgenommen werden. Umfangreichere Studien sind notwendig, um Aussagen bezüglich der Übereinstimmung treffen zu können und welche Kriterien bei der Urinprobengewinnung und -aufarbeitung beachtet werden müssten, damit diese Vergleichbarkeit gegeben ist. Eine Korrelation zwischen der semiquantitativen Ergebnisdarbietung der multiplex rt PCR, also der nachgewiesenen bakteriellen DNA-Last, und der Infektionsschwere, konnte nicht verdeutlicht werden. Aufgrund der stark untersucherabhängigen Entnahmetechnik bei Abstrichproben und der inhomogenen Verteilung der Erreger innerhalb des lokalen Infektionsgeschehens, unterliegen die in den Proben nachgewiesenen bakteriellen DNA-Lasten großen Schwankungen. Demzufolge scheinen auch die Betrachtungen der semiquantitativen Ergebnisse für die Therapiekontrolle oder für das Monitoring keine Rolle zu spielen. Die vielen zuvor genannten Vorteile der multiplex rt PCR weisen auf eine deutliche Nutzbarkeit des untersuchten Verfahrens für die laboralltägliche STI-Diagnostik durch erhöhte Detektionsraten, vereinfachtes Handling für Patient, Kliniker und Labormitarbeiter, vergleichbare Sensitivität und Spezifität, sowie erheblicher Kostenreduzierung hin.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

Alfano M, Graziano F, Genovese L, Poli G. 2013. Macrophage polarization at the crossroad between HIV-1 infection and cancer development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33 (6):1145-1152.

amplicon Biosystems. 2013. *hyplex® STD Mycoplasma Instructions for Use*

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. 2013. S2k-Leitlinie: Gonorrhoe bei Erwachsenen und Adoleszenten.

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. 2015. S1-Leitlinie: STI/STD-Beratung, Diagnostik und Therapie.

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. 2016. S2k-Leitlinie: Infektionen mit *Chlamydia trachomatis*.

Bachtiary B, Obermair A, Dreier B, Birner P, Breitenecker G, Knocke TH, Selzer E, Potter R. 2002. Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Int J Cancer*, 102 (3):237-243.

Baier M. 2018. *Kostenbetrachtung der Testverfahren im Vergleich*

Bercot B, Amarsy R, Goubard A, Aparicio C, Loeung HU, Segouin C, Gueret D, Jacquier H, Meunier F, Mougari F, Cambau E. 2015. Assessment of Coinfection of Sexually Transmitted Pathogen Microbes by Use of the Anyplex II STI-7 Molecular Kit. *J Clin Microbiol*, 53 (3):991-993.

Bissessor M, Whiley DM, Fairley CK, Bradshaw CS, Lee DM, Snow AS, Lahra MM, Hocking JS, Chen MY. 2015. Persistence of *Neisseria gonorrhoeae* DNA following treatment for pharyngeal and rectal gonorrhea is influenced by antibiotic susceptibility and reinfection. *Clin Infect Dis*, 60 (4):557-563.

- Bjornelius E, Lidbrink P, Jensen JS. 2000. Mycoplasma genitalium in non-gonococcal urethritis--a study in Swedish male STD patients. *Int J STD AIDS*, 11 (5):292-296.
- Bremer V, Meyer T, Marcus U, Hamouda O. 2006. Lymphogranuloma venereum emerging in men who have sex with men in Germany. *Euro Surveill*, 11 (9):152-154.
- Buder S, Schofer H, Meyer T, Bremer V, Kohl PK, Skaletz-Rorowski A, Brockmeyer N. 2019. Bakterielle sexuell übertragbare Infektionen. *J Dtsch Dermatol Ges*, 17 (3):287-317.
- Burgos R, Pich OQ, Querol E, Pinol J. 2007. Functional analysis of the Mycoplasma genitalium MG312 protein reveals a specific requirement of the MG312 N-terminal domain for gliding motility. *J Bacteriol*, 189 (19):7014-7023.
- Burgos R, Pich OQ, Ferrer-Navarro M, Baseman JB, Querol E, Pinol J. 2006. Mycoplasma genitalium P140 and P110 cytoadhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development. *J Bacteriol*, 188 (24):8627-8637.
- Centers for Disease Control and Prevention 2017. September 27. CDC Fact Sheet: Incidence, Prevalence, and Cost of Sexually Transmitted Infections in the United States Available at: <https://http://www.cdc.gov/std/stats/sti-estimates-fact-sheet-feb-2013.pdf>.
- Centers for Disease Control and Prevention 2017. April 30. Sexually Transmitted Diseases Surveillance: STDs in Men Who Have Sex with Men Available at: <https://http://www.cdc.gov/std/stats14/msm.htm>.
- Cho CH, Chulten B, Lee CK, Nam MH, Yoon SY, Lim CS, Cho Y, Kim YK. 2013. Evaluation of a novel real-time RT-PCR using TOCE technology compared with culture and Seeplex RV15 for simultaneous detection of respiratory viruses. *J Clin Virol*, 57 (4):338-342.

- Choe HS, Lee DS, Lee SJ, Hong SH, Park DC, Lee MK, Kim TH, Cho YH. 2013. Performance of Anyplex (TM) II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. *Int J Infect Dis*, 17 (12):E1134-E1140.
- Cox C, Saxena N, Watt AP, Gannon C, McKenna JP, Fairley DJ, Sweet D, Shields MD, S LC, Coyle PV. 2016. The common vaginal commensal bacterium *Ureaplasma parvum* is associated with chorioamnionitis in extreme preterm labor. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 29 (22):3646-3651.
- Da Ros CT, Schmitt Cda S. 2008. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Asian J Androl*, 10 (1):110-114.
- Dessi D, Delogu G, Emonte E, Catania MR, Fiori PL, Rappelli P. 2005. Long-term survival and intracellular replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* cells: potential role of the protozoon in transmitting bacterial infection. *Infect Immun*, 73 (2):1180-1186.
- Deutsche STI-Gesellschaft 2017. April 23. Leitfaden STI-Therapie https://m.thieme.de/viostatics/dokumente/vio-2/final/de/dokumente/klinik/sti_leitfaden_2.auflage_2014.pdf.
- Donders GG, Desmyter J, De Wet DH, Van Assche FA. 1993. The association of gonorrhoea and syphilis with premature birth and low birthweight. *Genitourin Med*, 69 (2):98-101.
- Dougan S, Evans BG, Elford J. 2007. Sexually transmitted infections in Western Europe among HIV-positive men who have sex with men. *Sex Transm Dis*, 34 (10):783-790.
- Edwards K, Logan J, Saunders N. 2004. Real-time PCR: an essential guide. Horizon Bioscience.
- Eron JJ, Jr., Gilliam B, Fiscus S, Dyer J, Cohen MS. 1996. HIV-1 shedding and chlamydial urethritis. *JAMA*, 275 (1):36.

- Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. 2002. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*, 70 (2):358-368.
- Fernandez G, Martro E, Gonzalez V, Saludes V, Bascunana E, Marco C, Rivaya B, Lopez E, Coll P, Matas L, Ausina V. 2016. Usefulness of a novel multiplex real-time PCR assay for the diagnosis of sexually-transmitted infections. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, 34 (8):471-476.
- Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, Cross PL, Whitworth JA, Hayes RJ. 2006. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS*, 20 (1):73-83.
- Gassen HG, Sachse GE, Schulte A. 1994. PCR Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion. Stuttgart ; Jena ; New York: Gustav Fischer.
- Gaydos C, Maldeis NE, Hardick A, Hardick J, Quinn TC. 2009. *Mycoplasma genitalium* as a contributor to the multiple etiologies of cervicitis in women attending sexually transmitted disease clinics. *Sex Transm Dis*, 36 (10):598-606.
- Gaydos CA. 2017. *Mycoplasma genitalium*: Accurate Diagnosis Is Necessary for Adequate Treatment. *J Infect Dis*, 216 (suppl_2):S406-S411.
- Gross G, Tyring SK. 2011. Sexually Transmitted Infections and Sexually Transmitted Diseases. Heidelberg: Springer.
- Guenther PC, Secor WE, Dezzutti CS. 2005. *Trichomonas vaginalis*-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1. *Infect Immun*, 73 (7):4155-4160.

- Gupta A, Gupta A, Gupta S, Mittal A, Chandra P, Gill AK. 2009. Correlation of mycoplasma with unexplained infertility. *Arch Gynecol Obstet*, 280 (6):981-985.
- Guven MA, Dilek U, Pata O, Dilek S, Ciragil P. 2007. Prevalance of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections in the unexplained infertile women. *Arch Gynecol Obstet*, 276 (3):219-223.
- Haggerty CL. 2008. Evidence for a role of Mycoplasma genitalium in pelvic inflammatory disease. *Curr Opin Infect Dis*, 21 (1):65-69.
- Handsfield HH, Rietmeijer CA. 2017. STI Versus STD: Coda. *Sex Transm Dis*, 44 (11):712-713.
- Hilbert DW, Smith WL, Chadwick SG, Toner G, Mordechai E, Adelson ME, Aguin TJ, Sobel JD, Gygax SE. 2016. Development and Validation of a Highly Accurate Quantitative Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Bacterial Vaginosis. *J Clin Microbiol*, 54 (4):1017-1024.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (16):7276-7280.
- Hu J, Liu K, Luo J. 2019. HIV-HBV and HIV-HCV Coinfection and Liver Cancer Development. *Cancer Treat Res*, 177:231-250.
- Huggett JF, O'Grady J. 2014. *Molecular Diagnostics: Current Research and Applications*. Norfolk: Caister Academic Press.
- Ikonomidis A, Venetis C, Georgantzis D, Giaslakitiotis V, Kolovos V, Efstathiou K, Moschou M, Kappaoutsiaris E, Panopoulou M. 2016. Prevalence of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma spp., Mycoplasma genitalium and Mycoplasma hominis among outpatients in central Greece: absence of tetracycline

resistance gene tet(M) over a 4-year period study. *New Microbes New Infect*, 9:8-10.

Imai H, Shinohara H, Nakao H, Tsukino H, Hamasuna R, Katoh T. 2004. Prevalence and risk factors of asymptomatic chlamydial infection among students in Japan. *Int J STD AIDS*, 15 (6):408-414.

Ison CA, Martin IM. 2003. Gonorrhoea. In: Morse SA, Ballard RC, Holmes KK, Moreland AA, Hrsg. *Atlas of Sexually Transmitted Diseases and AIDS*. Mosby, 109-139.

Jensen IP, Fogh H, Prag J. 2003. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in a sexually transmitted disease clinic: evaluation of a urine sample tested by enzyme immunoassay and polymerase chain reaction in comparison with a cervical and/or a urethral swab tested by culture and polymerase chain reaction. *Clin Microbiol Infect*, 9 (3):194-201.

Jensen JS. 2004. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 18 (1):1-11.

Jensen JS, Bjornelius E, Dohn B, Lidbrink P. 2004. Comparison of first void urine and urogenital swab specimens for detection of *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis* by polymerase chain reaction in patients attending a sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm Dis*, 31 (8):499-507.

Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H. 2016. 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 30 (10):1650-1656.

Johnston VJ, Mabey DC. 2008. Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Curr Opin Infect Dis*, 21 (1):56-64.

Keane FE, Thomas BJ, Gilroy CB, Renton A, Taylor-Robinson D. 2000. The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and

- Mycoplasma genitalium with bacterial vaginosis: observations on heterosexual women and their male partners. *Int J STD AIDS*, 11 (6):356-360.
- Kim Y, Kim J, Lee KA. 2015. Analytical Performance of Multiplex Real-Time PCR for Six Sexually Transmitted Pathogens. *Clinical Laboratory*, 61 (11):1749-1754.
- Kissinger P, Adamski A. 2013. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. *Sex Transm Infect*, 89 (6):426-433.
- Kissinger P, Amedee A, Clark RA, Dumestre J, Theall KP, Myers L, Hagensee ME, Farley TA, Martin DH. 2009. Trichomonas vaginalis treatment reduces vaginal HIV-1 shedding. *Sex Transm Dis*, 36 (1):11-16.
- Kong Y, Qiao Y, Song J, Ruan Z, Fei C, Huang J, Song T, Jin H, Ding H, Xie X, Zhang J. 2016. Comparative analysis of male and female populations on prevalence and antibiotic resistance of Mycoplasma hominis in China, 2005-2014. *J Glob Antimicrob Resist*, 6:69-72.
- Kreuzer KA, Bohn A, Lupberger J, Solassol J, le Coutre P, Schmidt CA. 2001. Simultaneous absolute quantification of target and control templates by real-time fluorescence reverse transcription-PCR using 4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoic acid as a dark quencher dye. *Clin Chem*, 47 (3):486-490.
- Kriesel JD, Bhatia AS, Barrus C, Vaughn M, Gardner J, Crisp RJ. 2016. Multiplex PCR testing for nine different sexually transmitted infections. *Int J STD AIDS*, 27 (14):1275-1282.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27 (2-3):95-125.
- Kucinskiene V, Sutaite I, Valiukeviciene S, Milasauskiene Z, Domeika M. 2006. Prevalence and risk factors of genital Chlamydia trachomatis infection. *Medicina (Kaunas)*, 42 (11):885-894.

- Kwak DW, Hwang HS, Kwon JY, Park YW, Kim YH. 2014. Co-infection with vaginal *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* increases adverse pregnancy outcomes in patients with preterm labor or preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 27 (4):333-337.
- Kwiecien R, Kopp-Schneider A, Blettner M. 2011. Concordance analysis: part 16 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int*, 108 (30):515-521.
- Laprade N, Cloutier M, Lapen DR, Topp E, Wilkes G, Villemur R, Khan IU. 2016. Detection of virulence, antibiotic resistance and toxin (VAT) genes in *Campylobacter* species using newly developed multiplex PCR assays. *J Microbiol Methods*, 124:41-47.
- Lee MY, Kim MH, Lee WI, Kang SY, Jeon YL. 2016. Prevalence and Antibiotic Susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in Pregnant Women. *Yonsei Med J*, 57 (5):1271-1275.
- Leli C, Mencacci A, Latino MA, Clerici P, Rassu M, Perito S, Castronari R, Pistoni E, Luciano E, De Maria D, Morazzoni C, Pascarella M, Bozza S, Sensini A. 2018. Prevalence of cervical colonization by *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* in childbearing age women by a commercially available multiplex real-time PCR: An Italian observational multicentre study. *J Microbiol Immunol Infect*, 51 (2):220-225.
- Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 93 (1):125-128.
- Manhart LE, Critchlow CW, Holmes KK, Dutro SM, Eschenbach DA, Stevens CE, Totten PA. 2003. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. *J Infect Dis*, 187 (4):650-657.
- Marovt M, Kese D, Kotar T, Kmet N, Miljkovic J, Soba B, Maticic M. 2015. *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* detected with the same

- frequency among women with and without symptoms of urogenital tract infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 34 (6):1237-1245.
- McClelland RS, Sangare L, Hassan WM, Lavreys L, Mandaliya K, Kiarie J, Ndinya-Achola J, Jaoko W, Baeten JM. 2007. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *J Infect Dis*, 195 (5):698-702.
- McIver CJ, Rismanto N, Smith C, Naing ZW, Rayner B, Lusk MJ, Konecny P, White PA, Rawlinson WD. 2009. Multiplex PCR testing detection of higher-than-expected rates of cervical mycoplasma, ureaplasma, and trichomonas and viral agent infections in sexually active Australian women. *J Clin Microbiol*, 47 (5):1358-1363.
- Mestrovic T, Ljubin-Sternak S. 2018. Molecular mechanisms of *Chlamydia trachomatis* resistance to antimicrobial drugs. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 23:656-670.
- Mistrangelo M, Dal Conte I, Gregori G, Castellano I, Famiglietti F, De Vries HJ. 2012. Rectal lymphogranuloma venereum. *Colorectal Dis*, 14 (11):e792-793.
- Mlynarczyk-Bonikowska B, Skulska E, Malejczyk M, Majewski S. 2015. Nucleic acid amplification methods in laboratory diagnostics of selected sexually transmitted diseases. *Postepy Mikrobiologii*, 54 (4):407-414.
- Müller HJ, Prange DR. 2016. PCR - Polymerase-Kettenreaktion. Berlin: Springer-Verlag.
- Munagala R, Dona MG, Rai SN, Jenson AB, Bala N, Ghim SJ, Gupta RC. 2009. Significance of multiple HPV infection in cervical cancer patients and its impact on treatment response. *Int J Oncol*, 34 (1):263-271.
- Mylonas I. 2016. Gonorrhö. Sexuell übertragbare Erkrankungen. Berlin, Heidelberg: Springer.

- Neves RG, Lupi O. 1997. Lymphogranuloma venereum. In: Borchardt KA, Noble MA, Hrsg. Sex Transm Dis. CRC Press LLC, 117-130.
- Ngandjio A, Clerc M, Fonkoua MC, Thonnon J, Njock F, Pouillot R, Lunel F, Bebear C, De Barbeyrac B, Bianchi A. 2003. Screening of volunteer students in Yaounde (Cameroon, Central Africa) for Chlamydia trachomatis infection and genotyping of isolated C. trachomatis strains. J Clin Microbiol, 41 (9):4404-4407.
- Nogueira Dias Genta ML, Martins TR, Mendoza Lopez RV, Sadalla JC, de Carvalho JPM, Baracat EC, Levi JE, Carvalho JP. 2017. Multiple HPV genotype infection impact on invasive cervical cancer presentation and survival. PLoS One, 12 (8):e0182854.
- Nummi M, Mannonen L, Puolakkainen M. 2015. Development of a multiplex real-time PCR assay for detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae and mutations associated with macrolide resistance in Mycoplasma pneumoniae from respiratory clinical specimens. Springerplus, 4:684.
- O'Farrell N. 1993. Soap and water prophylaxis for limiting genital ulcer disease and HIV-1 infection in men in sub-Saharan Africa. Genitourin Med, 69 (4):297-300.
- Patel MA, Nyirjesy P. 2010. Role of Mycoplasma and ureaplasma species in female lower genital tract infections. Curr Infect Dis Rep, 12 (6):417-422.
- Patton ME, Kidd S, Llata E, Stenger M, Braxton J, Asbel L, Bernstein K, Gratzer B, Jespersen M, Kerani R, Mettenbrink C, Mohamed M, Pathela P, Schumacher C, Stirland A, Stover J, Tabidze I, Kirkcaldy RD, Weinstock H. 2014. Extragenital gonorrhoea and chlamydia testing and infection among men who have sex with men--STD Surveillance Network, United States, 2010-2012. Clin Infect Dis, 58 (11):1564-1570.
- Pepin J, Labbe AC, Khonde N, Deslandes S, Alary M, Dzokoto A, Asamoah-Adu C, Meda H, Frost E. 2005. Mycoplasma genitalium: an organism commonly

associated with cervicitis among west African sex workers. *Sex Transm Infect*, 81 (1):67-72.

Pierce KE, Wangh LJ. 2004. Effectiveness and limitations of uracil-DNA glycosylases in sensitive real-time PCR assays. *Biotechniques*, 36 (1):44-46, 48.

Qiagen. 2004. Technical Note for the identification, prevention, and elimination of DNA and RNA contaminations: Decontamination Guideline.

Quatan N, Nair S, Harrowes F, Hay P. 2005. Should HIV patients be considered a high risk group for the development of prostate cancer? *Ann R Coll Surg Engl*, 87 (6):437-438.

Robert-Koch-Institut 2018. April 12. Chlamydiosen: Erkrankungen durch *Chlamydia trachomatis*
https://http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Chlamydiosen_Teil1.html.

Robert-Koch-Institut. 2010b. STD-Sentinel Surveillance in Deutschland 2003-2008.

Robert-Koch-Institut 2018. April 12. Gonorrhoe (Tripper)
https://http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Gonorrhoe.html - doc3763050bodyText9.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839):487-491.

Schmitt M, Depuydt C, Stalpaert M, Pawlita M. 2014. Bead-based multiplex sexually transmitted infection profiling. *J Infect*, 69 (2):123-133.

Schuchardt L, Rupp J. 2016. *Chlamydia trachomatis* as the Cause of Infectious Infertility: Acute, Repetitive or Persistent Long-Term Infection? *Curr Top Microbiol Immunol*.

- Sedlecki K, Markovic M, Rajic G. 2001. [Risk factors for Chlamydia infections of the genital organs in adolescent females]. *Srp Arh Celok Lek*, 129 (7-8):169-174.
- Seegene Inc. 2015. Anyplex II STI-7 Technical Manual
- Shafer MA, Pantell RH, Schachter J. 1999. Is the routine pelvic examination needed with the advent of urine-based screening for sexually transmitted diseases? *Arch Pediatr Adolesc Med*, 153 (2):119-125.
- Sherrard J, Ison C, Moody J, Wainwright E, Wilson J, Sullivan A. 2014. United Kingdom National Guideline on the Management of *Trichomonas vaginalis* 2014. *Int J STD AIDS*, 25 (8):541-549.
- Skiljevic D, Mirkov D, Vukicevic J. 2016. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in genital samples collected over 6 years at a Serbian university hospital. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 82 (1):37-41.
- Skulska E, Mlynarczyk-Bonikowska B, Walter de Walthoffen S, Mlynarczyk G, Malejczyk M, Majewski S. 2015. [The Comparison of Real-Time PCR and direct immunofluorescence in laboratory diagnostics of chlamydiosis in patients of Department of Dermatology and Venereology Medical University of Warsaw]. *Med Dosw Mikrobiol*, 67 (3-4):173-180.
- Sleha R, Bostikova V, Hampl R, Salavec M, Halada P, Stepan M, Novotna S, Kukla R, Slehova E, Kacerovsky M, Bostik P. 2016. Prevalence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in women undergoing an initial infertility evaluation. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 65 (4):232-237.
- STD Testing Near Me 2018. October. STD Awareness - Oral Sex STD Prevention <https://stdtestingnearme.org/prevent-stds-oral-sex/>.
- Steen R. 2001. Eradicating chancroid. *Bull World Health Organ*, 79 (9):818-826.

- Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, Venezia RA. 2004. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. *J Clin Microbiol*, 42 (4):1528-1533.
- Tang YW, Stratton CW. 2012. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Second Edition Aufl. New York: Springer Science + Business Media.
- Taylor-Robinson D, Rosenstein IJ. 2001. Is *Mycoplasma hominis* a vaginal pathogen? *Sex Transm Infect*, 77 (4):302.
- Thornton CG, Hartley JL, Rashtchian A. 1992. Utilizing uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in PCR: characterization of residual UDG activity following thermal cycling. *Biotechniques*, 13 (2):180-184.
- Totten PA, Schwartz MA, Sjostrom KE, Kenny GE, Handsfield HH, Weiss JB, Whittington WL. 2001. Association of *Mycoplasma genitalium* with nongonococcal urethritis in heterosexual men. *J Infect Dis*, 183 (2):269-276.
- Uuskula A, Kohl PK. 2002. Genital mycoplasmas, including *Mycoplasma genitalium*, as sexually transmitted agents. *Int J STD AIDS*, 13 (2):79-85.
- Van Der Pol B, Williams JA, Orr DP, Batteiger BE, Fortenberry JD. 2005. Prevalence, incidence, natural history, and response to treatment of *Trichomonas vaginalis* infection among adolescent women. *J Infect Dis*, 192 (12):2039-2044.
- Vouga M, Greub G, Prod'hom G, Durussel C, Roth-Kleiner M, Vasilevsky S, Baud D. 2014. Treatment of genital mycoplasma in colonized pregnant women in late pregnancy is associated with a lower rate of premature labour and neonatal complications. *Clin Microbiol Infect*, 20 (10):1074-1079.
- Wagenlehner FM, Brockmeyer NH, Discher T, Friese K, Wichelhaus TA. 2016. The Presentation, Diagnosis, and Treatment of Sexually Transmitted Infections. *Dtsch Arztebl Int*, 113 (1-02):11-22.

- Wang QY, Li RH, Zheng LQ, Shang XH. 2016. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in female outpatients, 2009-2013. *J Microbiol Immunol Infect*, 49 (3):359-362.
- Ward BJ, Plourde P. 2006. Travel and sexually transmitted infections. *J Travel Med*, 13 (5):300-317.
- Weiss HA, Thomas SL, Munabi SK, Hayes RJ. 2006. Male circumcision and risk of syphilis, chancroid, and genital herpes: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect*, 82 (2):101-109; discussion 110.
- WHO Press. 2007. *Global Strategy for the Prevention and Control of Sexually Transmitted Infections: 2006-2015: Breaking the chain of transmission*. Geneva.
- Wilson JS, Honey E, Templeton A, Paavonen J, Mardh PA, Stray-Pedersen B, Group EUBCA. 2002. A systematic review of the prevalence of *Chlamydia trachomatis* among European women. *Hum Reprod Update*, 8 (4):385-394.
- Woo TH, Patel BK, Smythe LD, Norris MA, Symonds ML, Dohnt MF. 1998. Identification of pathogenic *Leptospira* by TaqMan probe in a LightCycler. *Anal Biochem*, 256 (1):132-134.
- World Health Organization. 2017. *WHO Fact Sheet: Sexually transmitted infections (STIs)*
- World Health Organization - Department of HIV/AIDS. 2001. *Global Prevalence and Incidence of selected Curable Sexually Transmitted Infections: overview and estimates*. Geneva.
- Xu YG, Liu ZM, Guan XT, Cui LC, Li SL. 2015. Dual priming oligonucleotide (DPO)-based multiplex PCR assay for specific detection of four diarrhoeagenic *Escherichia coli* in food. *Lett Appl Microbiol*, 61 (2):146-152.

Zeng XY, Xin N, Tong XN, Wang JY, Liu ZW. 2016. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Xi'an, China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 35 (12):1941-1947.

Ziegler I, Josefson P, Olcen P, Molling P, Stralin K. 2014. Quantitative data from the SeptiFast real-time PCR is associated with disease severity in patients with sepsis. *BMC Infect Dis*, 14:155.

9 Anhang

Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Publikation.....	IX
Ehrenwörtliche Erklärung.....	XVII
Danksagung.....	XVIII

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Zervizitis.....	11
Abb. 2 Endoskopisches Bild einer rektalen LGV-Infektion	12
Abb. 3 Gonorrhoe mit urethralem Ausfluss	13
Abb. 4 Orale STI-Infektion	14
Abb. 5 Laparoskopisches Bild der PID	16
Abb. 6 Arbeitsschritte einer PCR.....	23
Abb. 7 Hybridisierungssonde mit Reporter-Farbstoff und Quencher-Farbstoff	26
Abb. 8 Prinzip der multiplex rt PCR	27
Abb. 9 Dual Priming Oligonucleotide-Technologie	30
Abb. 10 Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension-Technologie.....	32
Abb. 11 Schmelztemperaturanalyse.....	34
Abb. 12 Probenanalyseplan der Standardtests	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Symptome, mögliche STI-Erreger und Differentialdiagnosen.....	8
Tabelle 2 Übersicht der Erregerdiagnostik und -therapie	20
Tabelle 3 Semiquantitative Ergebnisse der multiplex rt PCR.....	48
Tabelle 4 Erregerdetektion über die Testmethoden	49
Tabelle 5 Detektion der Einfach- und Mehrfachinfektionen über die Testmethoden.	50
Tabelle 6 Konkordanzanalyse	52
Tabelle 7 Probenauswertung.....	54
Tabelle 8 Erregerhäufigkeiten in Einfach- und Mehrfachinfektionen	55
Tabelle 9 Infektionsdetektion in den untersuchten Probenmaterialien	56
Tabelle 10 Infektionen der Patienten.....	57
Tabelle 11 Prävalenzen der Erregerinfektionen im untersuchten Patientenkollektiv.	58
Tabelle 12 Parallele Untersuchung von Urethralabstrich und Urinprobe	59
Tabelle 13 Zeitaufwand der Testverfahren.....	60
Tabelle 14 Semiquantitativer Kostenaufwand der DNA-Extraktionen	62
Tabelle 15 Semiquantitativer Kostenaufwand der Testverfahren.....	64

Publikation

DE GRUYTER

J Lab Med 2018; aop

Infectiology and Microbiology

Edited by: P. Ahmad-Nejad/B. Ghebremedhin

Nicole Wendt, Jörg Tittelbach, Marc-Oliver Grimm, Cornelia Scheungraber, Bettina Löffler, Michael Baier and Matthias Karrasch*

Prospective evaluation study on the benefit of the simultaneous detection of seven sexually transmitted pathogens for the clinical management of patients suffering from sexually transmitted diseases

<https://doi.org/10.1515/labmed-2018-0021>

Received March 1, 2018; accepted September 10, 2018

Abstract

Background: Sexually transmitted infections (STIs) represent a growing relevant public health problem. Early and accurate STI diagnosis is capable of preventing the spread and severe complications of curable STIs through pathogen adapted antibiotic treatment regimens. Limitations of current STI diagnostic tools are the lack of simultaneous pathogen detection and result quantification.

Methods: A prospective analysis of clinical specimens (n=100, from 82 symptomatic patients) from different sites of infections was performed. All samples were processed with multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) assay Anyplex™ II STI-7, using thermal cycler CFX96™. The Anyplex™ II STI-7 detection assay covers *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Mycoplasma hominis* (MH), *Ureaplasma parvum* (UP), *Ureaplasma urealyticum* (UU) and *Trichomonas vaginalis* (TV). STI-7 results were compared to standard methods and transferred to the attending physician for treatment adjustment.

Results: Compared to performed standard method results the assay achieved sensitivities ranging from 90.9% to 100%, respectively, and specificities of 100%, with

negative predictive values (NPV) ranging from 98.5% to 100%, respectively, and positive predictive values (PPV) of 100%. The Anyplex™ II STI-7 detection assay measured a Cohen's kappa of 1.00 for UU/UP, MH, and MG and a Cohen's κ agreement of 0.95 and 0.96 for NG and CT, respectively.

Conclusions: The Anyplex™ II STI-7 assay can easily be introduced into the microbiological laboratory work flow due to its short hands-on-time and PCR multiplexity. The simultaneous detection of seven STI pathogens provides a comprehensive profile for each patient, enabling clinicians to decide on best treatment options, decreasing antibiotic misuse and infection spreading risk. The semi-quantitative results enables clinicians to gain a complete package of diagnostic information including disease diagnosis, disease degree severity and treatment monitoring, although. Further clinical studies on this topic are needed.

Keywords: antibiotic stewardship; multiplex real-time PCR; sexually transmitted diseases (STD).

Summary

The clinical evaluation of a new culture-independent diagnostic tool for the fast and simultaneous detection of seven sexually transmitted pathogens in 82 symptomatic patients showed good sensitivity/specificity in pathogen detection compared to standard methods. In addition, insight could be gained towards co-infection rates, resulting pathogen-adapted antibiotic treatment option and potential treatment cost reduction for each individual patient.

Introduction

Sexually transmitted infections (STIs) are a growing health problem worldwide [1]. Due to the rising

*Correspondence: Matthias Karrasch, MD, Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Jena University Hospital, Jena, Germany; and Institute of Medical Microbiology, Jena University Hospital, Jena, Germany, Phone: +4936419325073, E-Mail: matthias.karrasch@med.uni-jena.de

Nicole Wendt, Bettina Löffler and Michael Baier: Institute of Medical Microbiology, Jena University Hospital, Jena, Germany

Jörg Tittelbach: Department of Dermatology, Jena University Hospital, Jena, Germany

Marc-Oliver Grimm: Department of Urology, Jena University Hospital, Jena, Germany

Cornelia Scheungraber: Department of Gynecology, Jena University Hospital, Jena, Germany

incidence and developing antibiotic resistance of STI pathogens, health systems get confronted with increasing long-term complications and costs [2]. Four of the most prevalent infections, next to HPV, HSV-2, HIV and HBV, are currently curable: chlamydia, gonorrhea, syphilis and trichomoniasis [1]. Depending on the causative pathogen, STIs show unspecific symptoms, such as dysuria, urethral or vaginal discharge, pelvic pain and acyclic bleeding, but have serious reproductive health consequences beyond the immediate impact of the infection itself [3]. Symptoms of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infection are mild, but a chronic colonization leads to latent disturbed natural microbial flora and might increase the risk of acquisition of other pathogens [4]. Further they are associated with pelvic inflammatory disease (PID), which might lead to infertility [5, 6], and intra amniotic and postpartum infections. Different STI pathogens may cause similar symptoms, thus the distinction between them is often challenging. Multiple infections with different STI pathogens are increasing due to the high susceptibility in certain population groups, especially in men having sex with men (MSM) [7] and sex workers [8]. Current diagnostic STI screening methods are mainly single pathogen tests. Thus, multiple tests need to be performed for pathogen-adapted antibiotic therapy. Nucleic acid amplification tests (NAATs) provide rapid and accurate results with high sensitivity and specificity and became more important in diagnosing STIs over the past years [9]. Multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) tests are suitable for STI diagnosis due to the variety of microorganisms causing similar clinical conditions [10]. Multiplex PCR panels might be provided to clarify special medical issues, like bacterial vaginosis [11] or STI symptoms [12]. The Anyplex™ II STI-7 (Seegene, Seoul, Korea) detection assay was evaluated and compared to standard methods, including other NAATs [13]. Clinical parameters were calculated for *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) and *Trichomonas vaginalis* (TV) [14]. The evaluation should be expanded by *Mycoplasma hominis* (MH), *Mycoplasma genitalium* (MG) and *Ureaplasma urealyticum* (UU), and *Ureaplasma parvum* (UP) to evaluate epidemic level with common co-infections and get in the position to assess sequelae [15, 16]. This study investigated the diagnostic performance of a multiplex real-time PCR concerning time-to-result and cost-efficiency and the clinical usefulness of a comprehensive STI profile. A second evaluation objective was to compare multiplex PCR results from urine with urethral swabs [17] as a less painful specimen collection, also in patients without urethral discharge.

Materials and methods

Subjects and samples

Patients seeking sexually transmitted disease (STD) testing and treatment at urological, dermatological and gynecological departments of Jena University Hospital from January 2016 to December 2016 were included. Urine samples, urethral, endocervical, rectal and oral swab samples were collected based on medical history and clinical symptoms. Some of the subjects had multiple samples collected, thus 100 samples from 82 symptomatic patients were included. Swab samples were placed in Remel M4RT® transport medium (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) or eSwab™ Liquid Amies Collection and Transport System (Copan Diagnostics, Murrieta, CA, USA). Urine samples were transferred to the laboratory in sterile containers. All specimens were processed on the day of transmittal for direct standard testing including DNA eluate preparation followed by real-time PCR and subsequent freezing.

Ethical considerations

The Ethical Review Committee of Jena University Hospital approved the study in May 2015.

Standard clinical testing

All specimens were sent in with selected test requests for single STI pathogens, according to symptoms and clinical situation. Standard tests for CT, NG and TV included real-time PCR or Giemsa staining and were performed in the microbiology laboratory of Jena University Hospital. Samples investigated for UU and MH by bacteriologic culture were sent to the laboratory of Technical University Dresden. To increase the number of comparable standard testing results for MG, MH and UP/UU, PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reverse hybridization were used.

Chlamydia trachomatis

For requested CT standard testing DNA extraction was performed using the Cobas AmpliPrep Instrument with TNAI CS4 Reagent (Roche, Mannheim, Germany) followed by real-time PCR using the Cobas TaqMan with TaqMan

CT Test v2.0 Kit (Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Germany). The Cobas AmpliPrep instrument was loaded with TNAI CS4 reagent rack, reaction mixture and 1 mL of untreated samples for DNA extraction according to manufacturers protocol. DNA amplification and CT analyzing was accomplished by Cobas TaqMan Thermocycler with 50 μ L of prepared Cobas TaqMan CT Test v2.0 MM and 50 μ L of DNA eluate.

Neisseria gonorrhoeae

For NG standard testing DNA extraction was performed using EZ1 Advanced XL with EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen, Hilden, Germany) followed by real-time PCR using LightCycler® 2.0 System (Roche, Basel, Switzerland) with GeneProof NG PCR Kit (GeneProof a.s., Víden-ská, Czech Republic). The transport media liquid of swab samples was used for purification of bacterial DNA. Urine was centrifuged at $18,000 \times g$ for 15 min, the supernatant, except for 300 μ L, was discarded. The pellet was resuspended in the remaining liquid. Following, 50 μ L of tissue lysis buffer (ATL) were added to 150 μ L of the concentrated urine sample and used for DNA extraction. The DNA was extracted from the specimens (swab liquid, pretreated urine) using the EZ1 Virus Mini Kit v2.0 according to manufacturers protocol including the use of internal control (IC). Bacterial DNA was purified in one step following the automated EZ1 Virus procedure. Bacterial DNA was eluted in a volume of 60 μ L and amplified using the GeneProof NG PCR Kit according manufacturers protocol. For the real-time PCR using the LightCycler® 2.0 System, 15 μ L of a ready-to-use Mastermix (MM) and 5 μ L of the DNA eluate were placed in capillaries. Remaining eluate was stored at -80°C for further experiments using multiplex real-time PCR with Anyplex™ II STD-7 detection assay.

Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum

Of the 100 samples, results from 81 samples were compared to an established gold standard (ELISA) for MH, MG and UU/UP. In method comparison. DNA extraction was performed as described with NG followed by PCR and ELISA reverse hybridization. DNA was amplified using the eppendorf Mastercycler personal (eppendorf AG, Hamburg, Germany) with the hyplex® protocol (amplex Biosystems, Gießen, Germany). Subsequent analysis (ELISA) was performed using the hyplex® STD ID panel according to manufacturers protocol.

Trichomonas vaginalis

For requested TV standard testing swab samples were dispensed onto an object slide, air-dried and afterwards fixed in methanol for 3–5 min. The slide was purged with H_2O , Giemsa stained for 30 min, purged and air-dried. Slides were investigated for TV protozoon and recorded as positive when at least one protozoon was found.

Multiplex real-time PCR testing

DNA extraction of samples was performed as described with NG using the EZ1 Advanced XL with EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen), according to manufacturers instructions. Elution fractions of extracted DNA were stored at -80°C and used for weekly STI-7 testing. For each sample reaction 5 μ L were used and mixed with 15 μ L of MM and 1 μ L of IC. Additionally, negative (RNase-free water) and positive controls were set up as described before. Test tubes were centrifuged at $13,000 \times g$ for 3 min and put into the CFX96™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). According to STI-7 protocol real-time PCR and fluorescent analyzing were performed. Bio-Rad software presented semi-quantitative results such as negative and three levels of positive, according to in which cycle target DNA was detected by fluorescent analysis. Anyplex™ II STI-7 semi-quantitative results contained three levels of positivity, according to the appearance of bacterial DNA during amplification procedure – “+++” first cyclic Catcher Melting Temperature Analysis (CMTA) point, “++” second, “+” third.

Analysis of results and statistical comparisons

The specimens were tested with diagnostic standard for those pathogens clinicians requested. Additional positive results detected by Anyplex™ II STI-7 were considered missed by the clinician. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and kappa-index were calculated for the pathogens tested in parallel. Results from UP and UU were not analyzed individually as the used methods, such as Amplex PCR and hybridization or bacterial culture, were not able to distinguish between these pathogens. SPSS Statistics version 24.0 was used to determine quality criteria of the evaluated diagnostic method and to measure concordance between standard testing and multiplex real-time PCR.

Results

Clinical incidence of seven STI pathogens in 82 subjects

The distribution of microorganisms in the clinical samples is shown in Table 1. The total group of 82 patients consisted of 43 patients who had negative test results, 25 patients who were positive for a single pathogen, and 14 patients who were positive for multiple microorganisms (2–4 pathogens). From all negative patients 31 were male and 13 were female patients. Regarding patients who were single microorganism positive, 21 were male and four were female patients. Approximately 80% of STIs with multiple pathogens occurred in women. The most prevalent pathogens were UP and CT with 19% and 18%, respectively. The most frequently detected pathogen in female patients was UP ($n=13$), whereas NG was most frequent in male patients ($n=10$). Among the 100 tested samples, 42 were positive for at least one pathogen. Of the positive samples 15 (36%) showed multiple pathogen infections. Double infection was detected in eight, triple infection in four, and fourfold infection in three samples. Constellations of STI single and multiple infections are shown in Table 2. The most prevalent microorganisms in multiple

infections were UP, CT and UU, with 67%, 60%, and 53%, respectively.

Performance of the real-time multiplex PCR

Anyplex™ II STI-7 detected CT in 14, NG in 12, UP in 16, MG in three, MH in eight, UU in 11 and TV in one of the analyzed samples. The panel missed one CT (vaginal swab) and one NG (urine) infection compared to standard test results. The Anyplex™ II STI-7 panel identified 11 additional mono-infections and 15 additional multiple infections in samples not tested with standard methods (Table 3). The individually counted pathogen infections summed up to 67, of these 40 were detected only by using the STI-7 panel, because clinicians did not request standard testing for the causing pathogens (Table 4). Compared to performed standard method results and the additionally performed hyplex PCR and ELISA analysis, the assay achieved sensitivities ranging from 90.9% to 100%, and specificities of 100%, with NPV ranging from 98.5% to 100%, and PPV of 100%. Urine and urethral swab samples of eight patients were tested in parallel. Five of those patients had all negative results in both specimens. Two were detected positive for UP in urethral swab sample, but negative in urine. In one case urine was detected positive for NG only

Table 1: Distribution of pathogen infections in the clinical samples.

Organism	Total no.	Female samples ($n=33$)		Male samples ($n=67$)	
		No. positive, %	No. positive, %	No. positive, %	No. positive, %
Sample positive	42	16	48.5	26	38.8
<i>Chlamydia trachomatis</i>	15	7	21.2	8	11.9
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	13	3	9.1	10	14.9
<i>Mycoplasma genitalium</i>	3	1	3.0	2	3.0
<i>Mycoplasma hominis</i>	8	6	18.2	2	3.0
<i>Ureaplasma parvum</i>	16	13	39.4	3	4.5
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	11	4	12.1	7	10.4
<i>Trichomonas vaginalis</i>	1	0	0.0	1	1.5
All negative results	58	17	51.5	41	61.2
Single microorganism detected	27	5	15.2	22	32.8
Multiple microorganisms detected	15	11	33.3	4	6.0

Organism distribution exceeds 100% because multiple microorganism positivity was counted individually.

Table 2: Set-up of microorganisms in the positive samples.

Infection	Total no.	Pathogens
Single	27	8 × NG; 6 × UP; 6 × CT; 3 × UU; 2 × MG; 2 × MH
Double	8	2 × UU + CT; 2 × UP + CT; UU + UP; UP + NG; UU + NG; UP + MH
Triple	4	2 × UP + MH + CT; UU + NG + CT; UU + UP + MH
Fourfold	3	UP + MG + MH + CT; UU + UP + NG + CT; UU + MH + NG + TV

Table 3: Pathogen infections additionally detected by Anyplex™ II STI-7 in samples without clinicians request for standard testing.

Organism positive	Total		Female samples		Male samples	
	Infections	Pos. S	Infections	Pos. S	Infections	Pos. S
Any pathogen	40	26	25	15	15	11
Single pathogen	11	11	4	4	7	7
Multiple pathogens	29	15	21	11	8	4

The total amount and distribution of single and multiple pathogen infections in positive female and male samples (S) are shown.

Table 4: Additionally detected pathogen infections by Anyplex™ II STI-7 and share of total infections.

Organism positive	Share of total infections	Female samples	Male samples
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1/15 Inf.	0	1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2/13 Inf.	1	1
<i>Mycoplasma genitalium</i>	3/3 Inf.	1	2
<i>Mycoplasma hominis</i>	8/8 Inf.	6	2
<i>Ureaplasma parvum</i>	16/16 Inf.	13	3
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	9/11 Inf.	4	5
<i>Trichomonas vaginalis</i>	1/1 Inf.	0	1

by the standard method, while the swab sample was negative in both tests, standard and multiplex real time PCR. The total of 65 pathogen detections comprised 17× at first CMTA, 41× at second CMTA and 7× at third CMTA. Single and multiple infections were detected at any of the three points of CMTA. NG set up the largest part (7/18 infections) of first CMTA point positivity. UU, UP and CT were mostly detected by second CMTA point with 12, nine, and eight of 42 infections, respectively.

Clinical sensitivity, specificity, PPV and NPV

The sensitivity, specificity, PPV and NPV for CT, NG, MH, MG, UU/UP and UU using the gold standard method. Anyplex™ II STI-7 had 100% sensitivity and 100% specificity for MH, MG and UU/UP within the 81 standard tested samples using Amplex PCR and hybridization. Twenty-six samples were sent to Technical University of Dresden for culture testing. The results showed a sensitivity of 66.7% and specificity of 95.7% for UU compared to bacteriologic culture. All 26 specimens were detected negative for MH, by culture and by Anyplex™ II STI-7. From the 84 samples tested with Cobas TaqMan, one vaginal swab sample was discordant for the detection of CT. It showed a sensitivity of 92.9% and specificity of 100% for CT. It missed one NG infection (urine) in 75 samples tested in parallel, leading to sensitivity of

90.9% and specificity of 100% for NG. In the 28 samples tested for TV, neither the staining nor Anyplex™ II STI-7 detected an infection, representing an agreement of 100% between the two tests. The Anyplex™ II STI-7 detection assay measured a Cohen's κ of 1.00 for UU/UP, MH and MG, and a Cohen's κ agreement for NG and CT of 0.95 and 0.96, respectively.

Discussion

Comparison to standard tests

The Anyplex™ II STI-7 detection assay showed good concordance to the performed standard real-time PCR for CT and NG detection. Bacteriologic culture as a standard method for MH and UU testing may detect living microorganisms for antibiotic susceptibility testing, but is not very reliable due to the interference-prone transport and detection procedure. To cultivate sensitive pathogens, rapid and accurate processing of the specimens with living microorganisms is needed. MH and UU culture is time-consuming, expensive and difficult to perform. Additionally, culture is not very specific for UU, because UU and UP cultures look alike. All MH infections and the majority of *Ureaplasma* infections were detected in samples with no request for the standard tests. These infections were detected by the STI-7 panel and approved by the additional reference Amplex PCR and hybridization. This led to a high rate of infections that would have been missed by the clinician due to inconclusive clinical symptoms. Long-established diagnostic methods, such as culture and serology are not suitable for mollicutes, because of the criteria set out above. Whereas the panel showed high agreement using the Amplex PCR and hybridization as reference method, though the reference method was not able to differentiate between UU and UP. It is a major advantage of the STI-7 panel to distinguish between these two species, because UP are considered commensals without or at least with controversial pathogenicity [5, 6].

In this study, only symptomatic patients were enrolled. Especially young patients showed persistent clinical signs, thus pathogenicity seems to be relevant – nevertheless treatment is necessary in patients showing signs of inflammation and infection [18]. One further advantage of multiplex real-time PCR testing in comparison to standard diagnostic methods is the improved hands-on-time and total time to results for detecting multiple pathogens (Table 2). Therefore multiplex testing is considered a cost-effective and timesaving diagnostic method in a diagnostic microbiology laboratory.

Multiplex testing for STI detection

Infection symptoms from one pathogen might be superimposed by clinical symptoms from another pathogen, or might even be similar. Multiplex assay results provide infection profiles with information about co-existing pathogens [19]. Various gold standard procedures are available in microbiological laboratories, such as Gram stain, culture, NAATs or different PCRs. In order to simplify laboratory work, the detection of multiple pathogens causing similar clinical symptoms might be combined in one device. That means lower effort and complexity of time consuming diagnostic methods to generate a comprehensive infection profile. Testing specimens from different infection sites and various sample types, such as swabs, urine, sperm, ex-primate urine, leads to a wide range of diagnostic possibilities. Though STIs are showing similar clinical symptoms, different antibiotic therapy is indicated. Due to the comprehensive and specific pathogen detection, antibiotic class can be selected for successful treatment. Limitations of NAATs are discussed, such as problems with their specificity in pharyngeal and anal swab sample diagnostics. The reason for this are false positive results of non-pathogenic *Neisseria* [20]. High specificity for NG of the reference test and Anyplex™ II STI-7 detection assay has been approved before [21]. The detection without cultivation of living microorganisms lacks consecutive antibiograms. Developing resistance in STI pathogens, especially for NG and mollicutes, should be considered in case of low response to antibiotic treatment [22, 23].

Pathogens included in detection panels

Approaches have been made for comprehensive STI tests covering up to 18 pathogens [24, 25]. The pathogens included in diagnostic panels should have similar

infection symptoms, so that clinical assessment is in inferior position to the comprehensive test method. In addition pathogen selection should impact on therapy or observation options to entail best treatment. Therefore, multiplex PCR testing is reasonable in analyzing the cause of unspecific symptoms and should include various microorganisms causing similar clinical situations. The detection method might not be indicated for viral infections without subsequent therapy option and high infestation, such as HSV-2. It is less indicated for STIs with typical symptoms and clinical course with a highly established and sensitive gold standard method, for example, syphilis considering clinically apparent stage I and monitoring serology in the following stages [20]. Also regional differences in pathogen prevalence should be considered, for example, TV in this study cohort. The extent of the analysis in terms of time and size, considering pathogen selection, should be adjusted to regional, clinical and therapeutic situation.

Semi-quantitative results

To limit the use of antibiotics to the cases indicated [26], cutoffs for detecting infection and questionable correlation of germ load and severity should be considered. Quantification is one of the most important features of real-time PCR. To find out whether the semi-quantitative results correlate with the severity of infection, its distribution was examined through single and multiple infection patterns. Control screening and therapy monitoring with real-time PCR and semi-quantitative results is conceivable, though further analysis concerning correlation of pathogen load and infection severity is needed. Due to detecting DNA of both living and dead microorganisms, a control test should be performed at least 8 weeks after antibiotic treatment. During that period of time, reinfection and incubation with other pathogens are possible [27].

Conclusions

The Anyplex™ II STI-7 assay can easily be introduced into the microbiological laboratory workflow due to its short hands-on-time and PCR multiplexity. The simultaneous detection of STI pathogens and semi-quantitation might enable clinicians to better diagnose STD disease severity, treatment and monitoring. This assay might thus be able to serve as an antibiotic stewardship program and an

early STD infection control tool, but further clinical prospective studies are needed. Different sample types can be measured using the Anyplex™ II STI-7 multiplex real-time PCR, but whether urine is as conclusive as urethral swab samples in infection diagnosing could not be determined in this study.

Acknowledgments: The authors would like to thank Beate Haschke, Institute of Medical Microbiology, Jena University Hospital for valuable technical assistance with specimen handling. Furthermore, the authors would like to thank Sung Zun Park, MBA (Seegene Germany, Eschborn, Germany), Younjung Shim, BSc and Soung Youl Kim, PhD (both Seegene Inc., Seoul, South Korea) for supporting this trial by providing Seegene Anyplex™ II STI-7 hardware and software for free during the evaluation period.

Author contributions: All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

Research funding: The Anyplex™ II STI-7 system was provided for free during the trial period from Seegene Inc, Seoul, Korea. MK received a travel grant to present preliminary study results at the European Conference for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2017 in Vienna, Austria.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

Competing interests: The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

References

- World Health Organization. Media centre: sexually transmitted infections (STIs) – fact sheets 2017. Accessed: 26 Apr 2017.
- Centers for Disease Control and Prevention. CDC fact sheet: incidence, prevalence, and cost of sexually transmitted infections in the United States 2013. Available at: <https://www.cdc.gov/std/stats/sti-estimates-fact-sheet-feb-2013.pdf>. Accessed: 30 Apr 2017.
- Schuchardt L, Rupp J. Chlamydia trachomatis as the cause of infectious infertility: acute, repetitive or persistent long-term infection? *Curr Top Microbiol Immunol* 2016;412:159–82.
- Paulsen LK, Dahl ML, Skaare D, Grude N. Prevalence of *M. genitalium* and *U. urealyticum* in urine tested for *C. trachomatis*. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2016;136:121–5.
- Sleha R, Bostikova V, Hampl R, Salavec M, Halada P, Štěpán M, et al. Prevalence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in women undergoing an initial infertility evaluation. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2016;65:232–7.
- Cox C, Saxena N, Watt AP, Gannon C, McKenna JP, Fairley DJ, et al. The common vaginal commensal bacterium *Ureaplasma parvum* is associated with chorioamnionitis in extreme preterm labor. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29:3646–51.
- Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases surveillance: STDs in men who have sex with men 2014. Available at: <https://http://www.cdc.gov/std/stats14/msm.htm>. Accessed: 4 Aug 2017.
- Centers for Disease Control and Prevention. HIV risk among persons who exchange sex for money or nonmonetary items 2016. Available at: <https://www.cdc.gov/hiv/group/sexworkers.html>. Accessed: 4 Aug 2017.
- Skulska E, Mlynarczyk-Bonikowska B, Walter de Walthoffen S, Mlynarczyk G, Malejczyk M, Majewski S. The comparison of real-time PCR and direct immunofluorescence in laboratory diagnostics of chlamydiosis in patients of Department of Dermatology and Venereology Medical University of Warsaw. *Medycyna doswiadczalna i mikrobiologia* 2015;67:173–80.
- Yu B, An Y, Xu G, Shan H. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* based on cross-priming amplification. *Lett Appl Microbiol* 2016;62:399–403.
- Hilbert DW, Smith WL, Chadwick SG, Toner G, Mordechai E, Adelson ME, et al. Development and validation of a highly accurate quantitative real-time PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 2016;54:1017–24.
- Kriesel JD, Bhatia AS, Barrus C, Vaughn M, Gardner J, Crisp RJ. Multiplex PCR testing for nine different sexually transmitted infections. *Int J STD AIDS* 2016;27:1275–82.
- Choe HS, Lee DS, Lee SJ, Hong SH, Park DC, Lee MK, et al. Performance of Anyplex (TM) II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. *Int J Infect Dis* 2013;17:E1134–40.
- Fernandez G, Martro E, Gonzalez V, Saludes V, Bascuñana E, Marcó C, et al. Usefulness of a novel multiplex real-time PCR assay for the diagnosis of sexually-transmitted infections. *Enferm Inec Micr Cl* 2016;34:471–6.
- Ikonomidis A, Venetis C, Georgantzis D, Giaslaktiotis V, Kolovos V, Efstathiou K, et al. Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* among outpatients in central Greece: absence of tetracycline resistance gene tet(M) over a 4-year period study. *New Microbes New Infect* 2016;9:8–10.
- Lee MY, Kim MH, Lee WI, Kang SY, Jeon Y. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *Yonsei Med J* 2016;57:1271–5.
- Gueye SB, Diop-Ndiaye H, Gningue A, Ndiaye O, Mbengue AS, Gaye-Diallo A, et al. Performance of the Abbott Real Time CT/NG assay in urines and cervico-vaginal samples from Senegal. *J Infect Dev Countr* 2014;8:898–903.
- Zeng XY, Xin N, Tong XN, Wang JY, Liu ZW. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Xi'an, China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016;35:1941–7.
- Kim Y, Kim J, Lee KA. Prevalence of sexually transmitted infections among healthy Korean women: implications of multiplex PCR pathogen detection on antibiotic therapy. *J Infect Chemother* 2014;20:74–6.
- Mlynarczyk-Bonikowska B, Skulska E, Malejczyk M. Nucleic acid amplification methods in laboratory diagnostics of selected sexually transmitted diseases. *Postep Mikrobiol* 2015;54:407–14.
- Seegene Inc. Anyplex II STI-7 Technical Manual. 2015.

22. Wang QY, Li RH, Zheng LQ, Shang XH. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in female outpatients, 2009–2013. *J Microbiol Immunol Infect* 2016;49:359–62.
23. Skiljevic D, Mirkov D, Vukicevic J. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in genital samples collected over 6 years at a Serbian university hospital. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2016;82:37–41.
24. Schmitt M, Depuydt C, Stalpaert M, Pawlita M. Bead-based multiplex sexually transmitted infection profiling. *J Infect* 2014;69:123–33.
25. Kweon OJ, Choi JH, Song UH, Park AJ. Performance evaluation of a DNA chip assay in the identification of major genitourinary pathogens. *J Microbiol Methods* 2015;109:117–22.
26. Kim Y, Kim J, Lee KA. Analytical performance of multiplex real-time PCR for six sexually transmitted pathogens. *Clin Lab* 2015;61:1749–54.
27. Bissessor M, Whiley DM, Fairley CK, Bradshaw CS, Lee DM, Snow AS, et al. Persistence of *Neisseria gonorrhoeae* DNA following treatment for pharyngeal and rectal gonorrhoea is influenced by antibiotic susceptibility and reinfection. *Clin Infect Dis* 2015;60:557–63.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. Matthias Karrasch und Dr. Stefanie Deinhardt-Emmer,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift nicht zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Dr. Matthias Karrasch und Dr. Stefanie Deinhardt-Emmer, meiner wissenschaftlichen Betreuung, die mir den Zugang zu dieser Thematik eröffneten, sowie für die kritische Auseinandersetzung und die Durchsicht meiner Arbeit.

Daneben soll hier Herrn Dr. Baier für die hilfsbereite Zuarbeit und geduldigen Ergänzungen gedankt werden.

Mein außerordentlicher Dank gilt Beate Haschke und dem Team der medizinisch-technischen Labormitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie für die mühevollen Geduld bei der Einarbeitung und der kontinuierlichen Beihilfe zur Datengewinnung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Carolin für die Hilfestellung bei der Auswertung und bei meinem Bruder Henry für die Durchsicht meiner Arbeit bedanken.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinen Großeltern, Bärbel und Otfried, für die flexible und liebevolle Urenkelbetreuung und die Ermutigungen bedanken.

Tief verbunden und dankbar bin ich meinem Freund Kristof für den stetigen moralischen Beistand, sein Verständnis, sowie seine Unterstützung bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Birgit und Mario, mit unendlicher Unterstützung und Motivation, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten und denen ich diese Arbeit widme.

