Nachweis von atypischen Pneumonie Erreger mittels Allplex™ PneumoBacter Assay

Suwanna Beer, BMA 22-25
Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF
Institut für Infektionskrankheiten (IFIK), Universität Bern, Molekulare Analytik

01 Zusammenfassung

Am Institut für Infektionskrankheiten der Universität Bern wurde das Multiplex-PCR-Kit Allplex™ PneumoBacter Assay von Seegene zur Ablösung des obsoleten Anyplex™ II RB5 Detection Assay validiert. Das neue Assay erweitert das diagnostische Spektrum der bestehenden fünf Erreger um *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae.* Dabei wird die Nukleinsäureextraktion und Mastermix-Herstellung auf dem Microlab STARlet IVD durchgeführt, während die Amplifikation weiterhin auf dem CFX96 erfolgt. Zur Evaluation wurden 152 Proben (retrospektives Patienten-material, QC-Proben, Bakterienkulturen) analysiert und die Resultate verglichen. Die Konkordanz wurde mittels Cohen's Kappa bestimmt. Mit einem Wert von κ = 0.954 konnte eine nahezu vollständige Übereinstimmung nachgewiesen werden, womit die zuverlässige Detektion bestätigt und das Assay in der Routinediagnostik implementiert wurde.

02 Einleitung

Am IFIK wurde bisher der Anyplex™ II RB5 Detection Assay für den Nachweis von fünf Pneumonie Erregern eingesetzt, der jedoch nicht mehr produziert wird. Mit dem Allplex™ PneumoBacter Assay steht ein Nachfolgetest zur Verfügung, der zusätzlich *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae* erfasst und eine andere Detektionsmethodik nutzt. Parallel zum Kitwechsel soll der bisher dreistufige Arbeitsprozess mithilfe des Microlab STARlet IVD automatisiert und auf einen Arbeitsplatz reduziert werden.

Da sich typische und atypische Pneumonien klinisch nur schwer unterscheiden lassen und CAP sowie HAP unterschiedliche Erregerspektren und Resistenzlagen aufweisen, ist eine präzise mikrobiologische Diagnostik entscheidend. Moderne Multiplex-PCR-Systeme ermöglichen eine schnelle und zuverlässige Erregeridentifikation, unterstützen die gezielte Therapie und reduzieren unnötige Antibiotikagaben.

03 Ziele und Fragestellungen

Das Ziel dieser Diplomarbeit war der Nachweis von

- *Chlamydophila pneumoniae*
- *Myoplasma pneumoniae*
- *Legionella pneumophila*
- *Bordetella pertussis*
- *Bordetella parapertussis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*

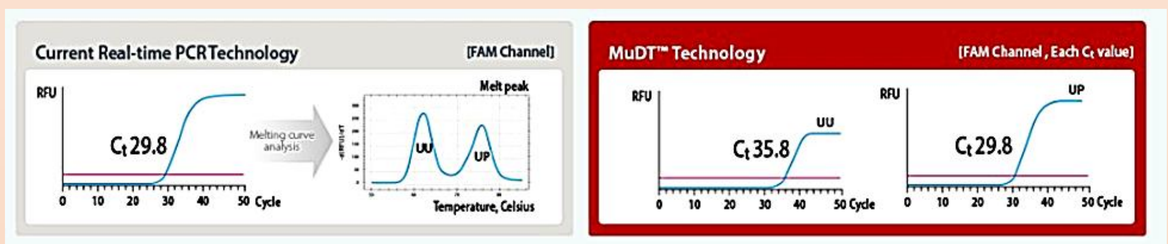
durch Allplex™ PneumoBacter Assay auf dem Microlab STARlet IVD.

Fragestellung 1: Detektiert das Allplex™ PneumoBacter Assay die gefragten Erreger zuverlässig, wenn gemäss Herstellerangaben gearbeitet wird?

Fragestellung 2: Ist Allplex™ PneumoBacter Assay spezifisch für die angegebenen Pathogene oder kommt es zu Kreuzreaktionen durch Proben, welche positiv auf andere Erreger getestet wurden (SARS-CoV-2, influenza-A, Influenza-B, Non- *pneumoniae Mycoplasma* und Non- *pneumophila Legionella*?

04 Methodik und Material

Der Allplex™ PneumoBacter Assay integriert die DPO™-, TOCE™- und MuDT™-Technologie, wodurch eine erhöhte Spezifität, eine erweiterte Multiplexing-Kapazität sowie die Bestimmung von Ct-Werten ermöglicht werden. [1]



Clinical sample No.	Tm-based Assay								Clinical sample No.	MuDT™ based Assay (Ct value)							
	FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar 670			FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar 670	
	UU	UP	MG	MH	NG	CT	TV	IC		UU	UP	MG	MH	NG	CT	TV	IC
1	+	+	-	+	-	-	-	+	1	35.8	29.8	-	32.7	-	-	-	28.5
2	-	-	+	+	-	-	-	+	2	-	-	28.3	35.9	-	-	-	29.0
3	-	+	-	-	-	+	-	+	3	-	26.2	-	-	-	28.6	-	29.1

▸ UU : *U. urealyticum*, UP : *U. parvum*, MG : *M. genitalium*, MH : *M. hominis*, NG : *N. gonorrhoeae*, CT : *C. trachomatis*, TV : *T. vaginalis*, IC : Internal Control

Abb. 1: Schmelzkurvenanalyse (links) im Vergleich zu PCR mit MuDT™ - Technologie (rechts) [Seegene, o.J.]

Für die Validierung der Fragestellung standen 152 Proben zur Verfügung, bestehend aus Patientenmaterial, Qualitätskontrollproben sowie in vitro kultivierten Ansätzen. Ausgangsmaterial waren dabei klinische respiratorische Proben oder artifiziell hergestellte Proben mit den erforderlichen Erregern. Die Verarbeitung erfolgte mit dem Microlab STARlet IVD, einem vollautomatischen Liquid-Handling-Roboter, der Nukleinsäureextraktion, MasterMix-Herstellung und den Transfer in die 96-Well-Platte in einem Workflow vereint. Die erzielten Resultate wurden mit den retrospektiven Befunden abgeglichen und mittels Cohen's Kappa statistisch bewertet, um ein Gesamtresultat für beide Fragestellungen zu erhalten. Für die erste Fragestellung wird die Sensitivität berechnet.

05 Ergebnisse/Resultate

Unter der Berücksichtigung, dass gesamthaft 17 Proben ausgeschlossen wurden, wird eine Sensitivität von 98% in der Auswertung erreicht.

Tabelle 1: Überbick der Messergebnisse für die zu nachweisenden Erreger. Beer, 2025

Analyt	Sensitivität	
	TP/(TP+FN)	%
Chlamydophila pneumoniae	10/11	91%
Mycoplasma pneumoniae	18/19	95%
Legionella pneumophila	17/17	100%
Bordetella pertussis	20/20	100%
Bordetella parapertussis	20/20	100%
Streptococcus pneumoniae	22/22	100%
Haemophilus influenzae	26/26	100%
Total		98%

06 Diskussion

Das Allplex™ PneumoBacter Assay detektiert die gefragten Erreger mit hoher Zuverlässigkeit. Mit einer Sensitivität von 98 % und einem Cohen's Kappa von 0.954 konnte eine nahezu vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse erreicht werden.

Alle im Anyplex™ II RB5 Detection Assay enthaltenen Erreger sowie die neu hinzugefügten *H. influenzae* und *S. pneumoniae* wurden zuverlässig nachgewiesen. Abweichungen in Einzelfällen liessen sich vor allem durch verdünntes oder degradiertes Probenmaterial erklären. Insgesamt bestätigt die Validierung die klinische Einsetzbarkeit des Allplex™ PneumoBacter Assay.

Referenzen
[1] Seegene Inc. (o. J.). Systems. Abgerufen am 7. September 2025, von https://www.seegene.de/system

Abbildungen
Abb. 1: Seegene Inc. (o. J.). *MuDT™ technology* [Diagramm]. Abgerufen am 7. September 2025, von https://www.seegene.de/technologies/mudt

Tabellen
Tabelle 1: Beer. (2025). Sensitivität-Messergebnisse