

## Molekulare Antibiotika-Resistenztestung bei Bakterien und Parasiten

### Allgemeine Hinweise

Die molekulare Resistenztestung erfolgt mit Hilfe unterschiedlicher PCR-Methoden und Testkonzepten. Bei dieser Untersuchungsart werden mittels PCR spezielle Bereiche mit sog. resistenzvermittelnden Mutationen innerhalb des Bakteriengenoms oder bakterieller Plasmide amplifiziert und analysiert.

Aufgrund der Vielzahl möglicher biochemischer Resistenzmechanismen, deren bisher nur teilweise erfassten oder bekannten Komplexität und vor allem aufgrund der dynamischen Veränderung von resistenzvermittelnden Mutationen innerhalb des Bakteriengenoms können derzeit verfügbare Verfahren zur molekularen Resistenztestung bestenfalls den jeweils aktuellen Erkenntnisstand abbilden. Damit liefern sie zwar einen hilfreichen Hinweis für das wahrscheinliche Vorliegen einer Resistenz gegen bestimmte Antibiotika oder Antibiotikagruppen – für eine endgültige Beurteilung muss nach wie vor das Ergebnis der konventionellen (phänotypischen) Empfindlichkeitstestung abgewartet werden.

### Anforderung an das Untersuchungsmaterial

Die molekulare Resistenztestung wird in der Regel nicht isoliert, sondern stets ergänzend zu kulturellen Untersuchungsverfahren durchgeführt. Bitte Hinweise zu Probeentnahme und Transport für Proben zur molekularbiologischen Diagnostik beachten!

Für die meisten PCR-Untersuchungen ist (sofern nicht anders vermerkt) eine erfolgreiche Anzucht und damit eine **Reinkultur des entsprechenden Erregers** als Ausgangsmaterial erforderlich.

Kultur: Einzelkolonie bzw. 200 µl einer Reinkultur (für externe Einsender)

Andere Arten von Probenmaterial nach Rücksprache.

### Termine

Das Material wird während der regulären Öffnungszeiten entgegengenommen.

Die Bearbeitung erfolgt werktags.

### Durchschnittliche Bearbeitungsdauer

bei negativem Befund: 1 bis 2 Arbeitstage

bei positivem Befund: bis zu 3 Arbeitstage

### Telefonische Befundmitteilung

Immer bei positivem Befund.

## Molekulare Antibiotika-Resistenztestung bei Bakterien und Parasiten

### Bemerkungen

Bei PCR-gestützten molekularen Resistenztestungen von Bakterien handelt es sich jeweils um laborintern validierte diagnostische Verfahren. Dies sind i.d.R. Spezialuntersuchungen, deren Zuverlässigkeit, Spezifität und Sensitivität in hohem Maße vom verwendeten Testsystem und der jeweiligen Fragestellung abhängig ist.

Der negative Nachweis (bzw. die Abwesenheit) von resistenzvermittelnden Mutationen in den entsprechenden Zielgenen kann methodenbedingt nicht zum definitiven Ausschluss einer *in vivo* Resistenz herangezogen werden. Ein Nachweis von resistenzvermittelnden Mutationen in den entsprechenden Zielgenen deutet jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Vorliegen einer phänotypisch ebenfalls ausgeprägten (*in vivo*) Resistenz hin.

### First- und Second-Line Antituberkulotika Resistenztestung bei *Mycobacterium tuberculosis*

Bei gezielter Anforderung des MTB-Direktnachweises aus klinischem Probenmaterial mittels Xpert MTB/RIF Real-time PCR (Fa. Cepheid) wird neben dem Nachweis von *M. tuberculosis* DNA auch gleichzeitig die Anwesenheit von resistenzvermittelnden Mutationen für Rifampicin abgeprüft. Dieses Untersuchungsverfahren ist vom Hersteller für respiratorische Probenmaterialien validiert und das Ergebnis der Rifampicin-Resistenztestung gilt (zumindest bei mikroskopisch-positivem Probenmaterial) als zuverlässig. Zudem gilt das Vorliegen einer Rifampicin-Resistenz bei *M. tuberculosis* als guter Marker für das Vorliegen einer sog. Multiresistenz.

Ist bereits eine bewachsene Mykobakterienkultur oder mikroskopisch hochpositives Probenmaterial verfügbar, so kann auf spezielle Anforderung hin vor der eigentlichen phänotypischen Empfindlichkeitstestung eine "orientierende" molekulare Resistenztestung gegen First- und Second-Line-Antituberkulotika durchgeführt werden. Durch Detektion der häufigsten resistenzvermittelnden Mutationen kann eine mögliche Resistenz gegen Rifampicin (*rpoB* Gen), Isoniazid (*katG* und *inhA* Gene), Pyrazinamid (*pncA*), Fluorchinolone (*gyrA* Gen), injizierbare Antibiotika wie Viomycin, Kanamycin, Amikacin oder Capreomycin (*rrs*) sowie Ethambutol (*embB*) abgeprüft werden.

In der Regel korrelieren die entsprechenden Ergebnisse der molekularen Resistenztestung zu über 90% mit denen der konventionellen phänotypischen Empfindlichkeitstestung, sind aber mit einem oftmals entscheidenden Zeitgewinn von 20 bis 30 Tagen verbunden.

Für spezielle Fragestellungen und nach Rücksprache können diese molekularen Resistenztestungen experimentell auch bei anderen Bakterienspezies mit vergleichbaren Resistenzmechanismen durchgeführt werden.

### Clarithromycin-Resistenztestung bei *Helicobacter pylori*

Bei gezielter Anforderung der molekularen Clarithromycin-Resistenztestung wird die Anwesenheit von bekannten resistenzvermittelnden Mutationen innerhalb der 23S rRNA analysiert. Die 23S rRNA ist als Bestandteil der 50S Untereinheit bakterieller Ribosomen in der Nähe des Peptidyltransferase-Zentrums lokalisiert, das als molekularer Angriffspunkt von Clarithromycin innerhalb der Bakterienzelle gilt. Punktmutationen führen zu verminderter Bindung des Makrolids und in der Folge zur Resistenz.

Die Clarithromycin-Resistenztestung wird nur bei einem positiven *Helicobacter pylori* PCR-Nachweis durchgeführt.

Je nach klinischer Fragestellung können sowohl Nativmaterial (Magenbiopsie) als auch bereits kultivierte *H. pylori* Organismen als Untersuchungsmaterial eingesetzt werden.

### Methicillin-Resistenztestung bei Staphylokokken

Bei gezielter Anforderung der molekularen Methicillin-Resistenztestung wird das Probenmaterial mittels *Real-time PCR* Verfahren auf die Anwesenheit des *mecA*-Gens hin untersucht. Das von *mecA* Gen kodierte, veränderte Penicillin-bindende Protein (PBP2a) ist sowohl bei *S. aureus* als auch bei Koagulase-negativen Staphylokokken für die phänotypische Ausprägung einer Methicillin-Resistenz verantwortlich. Der *mecA* Gennachweis wird i.d.R. nur bei einem positiven Staphylokokken-Nachweis durchgeführt.

Je nach klinischer Fragestellung können sowohl Nativmaterial (Nasen- oder Wundabstriche, Liquor, Biopsien) als auch bereits kultivierte Staphylokokken als Untersuchungsmaterial eingesetzt werden.

Bei gleichzeitigem Vorliegen von *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken im untersuchten Probenmaterial kann die Herkunft des nachgewiesenen *mecA* Gens nicht speziesspezifisch zugeordnet werden. Für den sensitiven und selektiven Nachweis von MRSA steht eine spezielle PCR-Untersuchungsart zur Verfügung, die aber getrennt angefordert werden muss.

## Molekulare Antibiotika-Resistenztestung bei Bakterien und Parasiten

### ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase)-Resistenztestung bei gramnegativen Bakterien

Bei gezielter Anforderung der ESBL-Resistenztestung wird das Probenmaterial mittels *Real-time* bzw. konventioneller PCR-Verfahren und anschließender DNA Sequenzierung auf die Anwesenheit der resistenzvermittelnden CTX-M-, SHV- und TEM-Gene hin untersucht. Für den gezielten Nachweis des bla<sub>KPC</sub> (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase)- und des NDM-1 Gens sowie bestimmter CTX-M-Resistenzgene stehen spezifische *Real-time PCR* Protokolle zur Verfügung. Da im Rahmen der molekularen ESBL-Resistenztestung die Interpretation der PCR-Ergebnisse in hohem Masse von der Art der zugrundeliegenden Spezies abhängig und in der Zusammenschau mit den Ergebnissen der phänotypischen Resistenztestung möglich ist, wird diese Untersuchung i.d.R. von bereits kultivierten und speziesdifferenzierten gramnegativen Bakterien durchgeführt. Eine direkte Untersuchung von nativem klinischem Probenmaterial ist nur sehr eingeschränkt interpretierbar und kann damit lediglich in bestimmten Ausbruchssituationen orientierende Information liefern.

### Vancomycin-Resistenztestung bei Enterokokken

Bei gezielter Anforderung der VRE-Resistenztestung wird das Probenmaterial mittels *Real-time* bzw. konventioneller PCR-Verfahren auf die Anwesenheit der resistenzvermittelnden VanA, VanB, VanC, und VanD Gene hin untersucht. Parallel dazu wird eine molekulare Enterokokken-Speziesdifferenzierung durchgeführt, da im Rahmen der Befundinterpretation die Art der zugrundeliegenden Enterokokkenspezies sowohl unter therapeutischen als auch krankenhaushygienischen Aspekten relevant sein kann. Diese Untersuchung wird in der Regel aus bewachsenem Selektivmedium (Vancomycin-haltiges Enterococcosel-Medium mit Farbindikator) durchgeführt. Eine direkte Untersuchung von nativem klinischem Probenmaterial ist nur für ausgewählte CTX-M-Gene (sofern verfügbar) und in Ausbruchssituationen sinnvoll.

### Sulfonamid (Antifolat)-Resistenztestung bei *Pneumocystis jiroveci*

Bei gezielter Anforderung der Sulfonamid-Resistenztestung wird genomische DNA von *P. jiroveci* innerhalb des eingesandten Probenmaterial mittels *Real-time* bzw. konventioneller PCR-Verfahren und DNA Sequenzierung auf die Anwesenheit von bekanntermaßen resistenzvermittelnden Punktmutationen (SNPs) innerhalb des chromosomalen folP (*sulA*) Gens von *P. jiroveci* hin untersucht, das für die parasiteneigene Dihydropteroat Synthetase (DHPS) kodiert. Resistenz gegenüber Sulfonamiden (z.B. TMP-SMX; Trimethoprim-Sulfamethoxazol) kann schon bei einzelnen charakteristischen Punktmutationen innerhalb des *sulA* Gens vorliegen, häufig zeigen resistente Parasiten jedoch multiple Mutationen.

Da *P. jiroveci* Organismen nicht kulturell vermehrt werden können, ist die Untersuchung von nativem klinischem Probenmaterial nur bei nachgewiesener hoher Parasitenlast erfolgversprechend. Zudem haben die Ergebnisse der molekularen Sulfonamid-Resistenztestung lediglich orientierenden Charakter, da Mischinfektionen mit resistenten und sensiblen Erregern nicht ausgeschlossen werden können.