

## Molekularbiologisches Untersuchungsspektrum

- ❖ Anaplasma phagocytophilum
- ❖ Bartonellen (B. henselae, B. quintana, B. clarridgeiae)
- ❖ Borrelia burgdorferi sensu lato
- ❖ Chlamydia pneumoniae
- ❖ Chlamydia trachomatis
- ❖ Helicobacter pylori
- ❖ Legionella pneumophila
- ❖ Leptospira interrogans
- ❖ MRSA-Direktnachweis (Schnelltest)
- ❖ Mycobacterium tuberculosis und ubiquitäre Mykobakterien
- ❖ Mycoplasma pneumoniae
- ❖ Pneumocystis jirovecii
- ❖ Toxoplasma gondii
- ❖ Tropheryma whipplei
- ❖ Universelle (eubakterielle) PCR (16S rRNA-Gen)

### Allgemeine Hinweise:

Bei der molekularen Diagnostik wird mittels einer Nukleinsäureamplifikationstechnik (NAT) ein für den jeweiligen Erreger spezifisches Gen nachgewiesen. Die molekularen biologischen Verfahren ergänzen die konventionelle kulturelle und serologische Erregerdiagnostik. Sie ersetzen diese nicht.

Folgende NAT kommen zur Zeit zum Einsatz:

- konventionelle nested PCR-Verfahren mit Agarosegelelektrophorese und Sequenzierung
- Strand displacement amplification (SDA), ein isothermales Amplifikationsverfahren
- Light Cycler PCR
- Multiplex PCR mit reverser Hybridisierung

Einsatzgebiet der NAT ist der Nachweis von

- nicht- oder nur schwer kultivierbaren Erregern
- sehr langsam wachsenden Erregern
- Resistenzgenen (z. B. MRSA-Schnelltest, H. pylori)

Bei den Nukleinsäurenachweisen handelt es sich um sehr empfindliche Methoden, die auch geringste Nukleinsäuremengen des Erregers nachweisen können. Es ist folgendes bei der Materialentnahme und beim Transport zu beachten:

- möglichst Kontaminations-freie Entnahme
- Mindestmaterialmengen bei der Abnahme beachten (siehe Tabelle)
- Lagerung bei 4°C wenn sich der Transport verzögert, z. B. über Nacht
- der Transport kann bei Raumtemperatur erfolgen

Die molekularbiologischen Untersuchungen werden von uns grundsätzlich zweimal pro Woche angeboten. Die Durchführung molekularbiologischer Sofortdiagnostik muss mit dem zuständigen Laborarzt (Tel.-Nr. 17-65370) unter Berücksichtigung therapeutischer bzw. klinikhygienischer Konsequenzen abgesprochen werden.

Interpretation der NAT-Ergebnisse:

- Der Nachweis Erreger-spezifischer DNA ist häufig signifikant. Allerdings kann nicht zwischen einer Kontamination und einer Infektion unterschieden werden.
- Bereits abgetötete Erreger (z. B. unter Antibiose) können ggf. noch nachgewiesen werden.
- Der Nachweis spezifischer DNA kann für eine Infektion beweisend sein, ein negatives Ergebnis schließt jedoch eine Infektion mit dem Erreger nicht sicher aus.

Bei Fragen stehen Ihnen unsere Mitarbeiter unter der Tel.-Nr. 17-65370 zur Verfügung. Über diese Nummer werden Sie auch mit dem zuständigen Laborarzt verbunden.

## Anaplasma phagocytophilum

<b>Indikation</b>	V. a. humane granulozytäre Ehrlichiose (=Anaplasmosse)
<b>Untersuchungs-material / Materialmenge</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EDTA-Blut: 500 µl</li> <li>• KM-Aspirat: 500 µl</li> <li>• Liquor: 2 - 5 ml</li> </ul>
<b>Untersuchungs-methode / Dauer</b>	nested PCR + ggf. Sequenzierung / 2 Tage
<b>Sensitivität</b>	5 Kopien pro PCR-Ansatz
<b>Interpretation</b>	Der Nachweis von Anaplasma-DNA ist diagnoseweisend
<b>Durchführung im Labor</b>	bei Bedarf
<b>Bemerkungen</b>	Die Durchführung einer Ehrlichien-Serologie wird empfohlen!

## Bartonellen (*B. henselae*, *B. quintana*, *B. clarridgeiae*)

<b>Indikation</b>	V. a. Katzenkratzkrankheit, bazilläre Angiomatose, Peliosis hepatis, Endokarditis
<b>Untersuchungs-material / Materialmenge</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lymphknoten</li> <li>• Abstrich: Primärläsionen, Konjunktiven (bei Parinaud's okuloglandulärem Syndrom)</li> <li>• Organbiopsie (Haut, Leber)</li> <li>• Herzklappe</li> <li>• EDTA-Blut (bei Immunsuppression): 500 µl</li> </ul> Gewebeprobe: mind. stecknadelkopfgroß
<b>Untersuchungs-methode / Dauer</b>	nested PCR + ggf. Sequenzierung / 2 Tage

<b>Sensitivität</b>	10 Kopien pro PCR-Ansatz.
<b>Interpretation</b>	Der Nachweis von Bartonellen-DNA ist diagnoseweisend. Bei länger zurückliegenden Infektionen kann die PCR trotz weiter bestehender klinischer Symptomatik (z. B. Lymphknotenschwellung) negativ sein.
<b>Durchführung im Labor</b>	bei Bedarf
<b>Bemerkungen</b>	Die Durchführung einer Bartonellen-Serologie wird empfohlen!

### Borrelia burgdorferi sensu lato

<b>Indikation</b>	V. a. Borreliose
<b>Untersuchungs-material / Materialmenge</b>	Liquor: 2 - 5 ml Gelenkpunktat: mind. 500 µl Synoviabiopsie: mind. stecknadelkopfgroß Hautstanze (aus dem Randbereich des Erythema migrans): mind. stecknadelkopfgroß
<b>Untersuchungs-methode / Dauer</b>	nested PCR + ggf. Sequenzierung / 2 Tage
<b>Sensitivität</b>	10 Kopien pro PCR-Ansatz
<b>Interpretation</b>	Der Nachweis von Borrelia burgdorferi-DNA ist diagnoseweisend
<b>Durchführung im Labor</b>	bei Bedarf
<b>Bemerkungen</b>	Die Durchführung einer Borrelienserologie ist obligat! Bei gezielter Indikationsstellung ist die Borrelien-PCR ein hilfreiches Zusatzverfahren zur Serologie. Als Suchtest ist die PCR nicht geeignet. Ein negativer PCR-Befund kann eine Lyme-Borreliose nicht ausschließen. Sensitivität des Erregernachweises mittels PCR: Haut (Erythema migrans, Acrodermatitis) 50 - 70% Liquor (Neuroborreliose, Stadium II) 10 - 30% Gelenkpunktat (Lyme-Arthritis) 50 - 70%

### Chlamydia pneumoniae

<b>Indikation</b>	V. a. atypische Pneumonie
<b>Untersuchungs-material / Materialmenge</b>	Respiratorisches Material (Rachenspülwasser, Nasopharyngealsekret, Sputum, Trachealsekret, Bronchialsekret, Bronchiallavage): mind. 500 µl
<b>Untersuchungs-methode / Dauer</b>	nested PCR + ggf. Sequenzierung / 2 Tage
<b>Sensitivität</b>	10 Kopien pro PCR-Ansatz
<b>Interpretation</b>	Der Nachweis von C. pneumoniae-DNA ist diagnoseweisend
<b>Durchführung im Labor</b>	bei Bedarf
<b>Bemerkungen</b>	-

## Chlamydia trachomatis

<b>Indikation</b>	V. a. urogenitale Infektion durch <i>C. trachomatis</i> , Pneumonie bei Neugeborenen
<b>Untersuchungs-material / Materialmenge</b>	Erststrahlurin: 15 - 20 ml (bis 60 ml) Abstrich (LCx STD Probenentnahme- und Transportkit von BD) Normale Abstrichtupfer Abstrich-Abnahmelokalisation: Endocervix (Frau), Urethra (Frau, Mann) Ejakulat: mind. 500 µl Punktat; mind. 500 µl Resp. Material (von Kindern < 2 Jahre): mind. 1000 µl
<b>Untersuchungs-methode / Dauer</b>	SDA / 1 Tag
<b>Sensitivität</b>	Die Nachweisgrenze der verschiedenen <i>C. trachomatis</i> Serovare liegt zwischen 5 und 200 Elementarkörperchen pro Reaktionsansatz. Der Test weist spezifisch <i>C. trachomatis</i> aller 15 Serovare nach.
<b>Interpretation</b>	Der Nachweis von <i>C. trachomatis</i> -DNA ist diagnoseweisend
<b>Durchführung im Labor</b>	2 x pro Woche
<b>Bemerkungen</b>	-

## Helicobacter pylori

<b>Indikation</b>	Rescue Diagnostik bei fehlgeschlagener Kultur und/oder Empfindlichkeitstestung
<b>Untersuchungs-material / Materialmenge</b>	Magenbiopsie: mind. stecknadelkopfgroß
<b>Untersuchungs-methode / Dauer</b>	RealTime PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse (Clarithromycinresistenz) oder Multiplex PCR mit Reverser Hybridisierung (Clarithromycin- und Chinolonresistenz) / 1Tag
<b>Sensitivität</b>	94-100% (Clarithromycinresistenz; Literaturangaben) 87% (Chinolonresistenz; Literaturangaben)
<b>Interpretation</b>	Der Nachweis typischer Resistenz-vermittelnder Mutationen hat eine Konsequenz für die Auswahl der zur Eradikation eingesetzten Antibiotika.
<b>Durchführung im Labor</b>	2 x pro Woche
<b>Bemerkungen</b>	Bei der Anlage der Magenbiopsien müssen die Hinweise zur molekularen <i>H. pylori</i> Diagnostik beachtet werden.

## Legionella pneumophila

<b>Indikation</b>	V. a. atypische Pneumonie
<b>Untersuchungs- material / Materialmenge</b>	Respiratorisches Material (Sputum, Trachealsekret, Bronchialsekret, Bronchiallavage): mind. 500 µl
<b>Untersuchungs- methode / Dauer</b>	nested PCR + ggf. Sequenzierung / 2 Tage
<b>Sensitivität</b>	10 Kopien pro PCR-Ansatz
<b>Interpretation</b>	Der Nachweis von L. pneumophila-DNA ist diagnoseweisend
<b>Durchführung im Labor</b>	bei Bedarf
<b>Bemerkungen</b>	Die Einsendung von Urin zum Nachweis von Legionella pneumophila – Antigen ist erforderlich. Grundsätzlich wird von allen Materialien soweit ausreichend auch eine Legionellenkultur angelegt!

## Leptospiren

<b>Indikation</b>	V. a. Leptospirose
<b>Untersuchungs- material / Materialmenge</b>	<b>1. Krankheitswoche:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• EDTA-Blut: mind. 500 µl</li> <li>• Liquor: 2 – 5 ml</li> <li>• Bronchiallavage: mind. 500 µl</li> <li>• Gewebe: mind. stecknadelkopfgroß</li> </ul> <b>2. Krankheitswoche</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Urin: 5 – 10 ml (mind. 500 µl)</li> <li>• Liquor</li> <li>• Bronchiallavage</li> <li>• Gewebe</li> </ul>
<b>Untersuchungs- methode / Dauer</b>	nested PCR + ggf. Sequenzierung / 2 Tage
<b>Sensitivität</b>	10 Kopien pro PCR-Ansatz
<b>Interpretation</b>	Der Nachweis von L. interrogans-DNA ist diagnoseweisend
<b>Durchführung im Labor</b>	bei Bedarf
<b>Bemerkungen</b>	Die Einsendung von Serum in der 1. und 2. Krankheitswoche zur Dokumentation der Serokonversion und Serovarbestimmung ist erforderlich. Mit dem Antikörperanstieg ist zw. dem 6. – 10 Krankheitstag zu rechnen.

## MRSA-Direktnachweis (Schnelltest)

<b>Indikation</b>	Eingangsscreening auf MRSA
<b>Untersuchungs-material / Materialmenge</b>	Abstrich von Nase, Rachen, Leiste u. andere Abnahmelokalisationen (z. B. Wunden)
<b>Untersuchungs-methode / Dauer</b>	LightCycler PCR 1 Tag (bei Probeneingang bis 13:00 Uhr Testdurchführung + Befundung am gleichen Tag) Grundsätzlich wird von allen Materialien auch eine Kultur angelegt!
<b>Sensitivität</b>	Die analytische Sensitivität beträgt 15 Genomkopien / Reaktion bzw. 5 KBE / Reaktion. Auf einen Abstrichtupfer bezogen, beträgt die Nachweisgrenze 325 KBE (Herstellerangaben). Auswertung der Ergebnisse des Schnelltestes im Vergleich mit der Kultur 2008 / 2009: Nase, Rachen, Leiste: Sensitivität: 93,8%                      PPV: 88,2% Spezifität: 90,5%                      NPV: 99,1% Andere Abnahmelokalisationen: Sensitivität: 100%                      PPV: 66,7% Spezifität: 84,6%                      NPV: 100%
<b>Interpretation</b>	Der positive prädiktive Wert des Schnelltestes liegt in aktuellen Studien zwischen 70 und 90%, d. h. ein positives Ergebnis im MRSA-Schnelltest muss kulturell bestätigt werden, da es zu falsch positiven DNA-Nachweisen kommen kann. Ursächlich für „falsch“ positive Schnellteste können sein: 1. höhere Sensitivität des DNA-Nachweises im Vergleich mit der Kultur 2. Fragmente der MecA-Genkassette bei fehlendem MecA-Genin Oxacillinempfindlichen Staphylococcus-aureus-Isolaten, die somit falsch positive Ergebnisse im Schnelltest zeigen 3. DNA-Kontaminationen Der MRSA-Schnelltest zeichnet sich durch einen hohen negativen prädiktiven Wert (>95%) aus, d. h. eine MRSA-Besiedlung kann bei negativem Ergebnis mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.
<b>Durchführung im Labor</b>	Mo – Fr bei Bedarf
<b>Bemerkungen</b>	Der MRSA-Schnelltest ist validiert für Nasenabstriche. In Studien wurden vergleichbare Sensitivitäten + Spezifitäten für die Abstrichlokalisationen Rachen sowie Leiste / Perineum nachgewiesen. Abstriche von anderen Abnahmelokalisationen, wie z. B. Wunden führen in 20% der untersuchten Fälle zu einem nicht auswertbaren Ergebnis in der PCR aufgrund von Inhibition. Aktuell wird zur Verbesserung der Sensitivität bei Wundabstrichen eine modifizierte DNA-Präparation getestet.

## Mycobacterium tuberculosis und ubiquitäre Mykobakterien

<b>Indikation</b>	V. a. Mykobakterien-Infektion (Lungentuberkulose, extrapulmonale Tuberkulose), nicht-tuberkulöse Mykobakteriose
<b>Untersuchungs-material / Materialmenge</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atemwegssekrete: Sputum: mind. 1 ml (2 – 5 ml) Tracheal- u. Bronchialsekret: mind. 1 ml (2 – 5 ml) Bronchiallavage: 2 - 5 ml (10 – 30 ml)</li> <li>• Magensaft: 10 ml</li> <li>• Gewebe: mind. 2 stecknadelkopfgroße Biopsien</li> <li>• Knochenmark: 500 µl Knochenmark(steriles Röhrchen, Antikoagulation mit EDTA); <b>für die Kultur</b> 10 ml Knochenmark in Blutisolatorröhrchen (ISO-BK-Röhrchen)</li> <li>• Punktate: Liquor: mind. 5 ml (10 – 15 ml) Pleuraerguß: mind. 5 ml (10 – 15 ml) Drainagesekret: mind. 5 ml (10 – 15 ml)</li> <li>• Urin: 30 – 50 ml</li> </ul>
<b>Untersuchungs-methode / Dauer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nested PCR + ggf. Sequenzierung / 2 Tage</li> <li>• SDA / 1 Tag (nur M. tuberculosis Komplex)</li> </ul>
<b>Sensitivität</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nested PCR: 10 Plasmidkopien pro PCR-Ansatz</li> <li>• SDA: 9 Kolonie-bildende Einheiten (KBE) pro Reaktion bzw. 125 KBE pro ml</li> </ul>
<b>Interpretation</b>	Ein einmaliger DNA-Nachweis erfordert weitere Kontrollen und lässt nicht sicher auf eine behandlungsbedürftige Mykobakterieninfektion schließen.
<b>Durchführung im Labor</b>	2 x pro Woche
<b>Bemerkungen</b>	Die Mykobakterien-NAT erfolgt immer in Verbindung mit den konventionellen Nachweisverfahren (Mikroskopie, Kultur). Deshalb sollten möglichst die rot markierten Materialmengen eingesandt werden.

## Mycoplasma pneumoniae

<b>Indikation</b>	V. a. atypische Pneumonie
<b>Untersuchungs-material / Materialmenge</b>	Respiratorisches Material (Rachenspülwasser, Nasopharyngealsekret, Sputum, Trachealsekret, Bronchialsekret, Bronchiallavage): mind. 500 µl
<b>Untersuchungs-methode / Dauer</b>	nested PCR + ggf. Sequenzierung / 2 Tage
<b>Sensitivität</b>	20 Kopien pro PCR-Ansatz
<b>Interpretation</b>	Der Nachweis von M. pneumoniae-DNA ist diagnoseweisend
<b>Durchführung im Labor</b>	bei Bedarf
<b>Bemerkungen</b>	Die Durchführung einer M. pneumoniae-Serologie wird empfohlen!

## Pneumocystis jirovecii

<b>Indikation</b>	V. a. Pneumocystis jirovecii-Pneumonie
<b>Untersuchungs-material / Materialmenge</b>	Respiratorisches Material (Sputum, Trachealsekret, Bronchialsekret, Bronchiallavage): mind. 500 µl Bei V. a. extrapulmonale Manifestation der Lokalisation entsprechendes Material, z. B. Gewebeproben mind. stecknadelkopfgroß
<b>Untersuchungs-methode / Dauer</b>	nested PCR + ggf. Sequenzierung / 2 Tage
<b>Sensitivität</b>	10 Kopien pro PCR-Ansatz
<b>Interpretation</b>	Da die P. jirovecii-PCR sehr sensitiv ist, kann auch eine asymptomatische Kolonisation der Atemwege nachgewiesen werden. Der Nachweis von P. jirovecii-DNA ist nicht gleichbedeutend mit einer therapiebedürftigen Infektion.
<b>Durchführung im Labor</b>	bei Bedarf
<b>Bemerkungen</b>	Die NAT wird ergänzend zum mikroskopischen Erregernachweis (indirekte Immunfluoreszenz, Giemsapräparat) in der BAL durchgeführt.

## Toxoplasma gondii

<b>Indikation</b>	V. a. pränatal erworbene Toxoplasmose V. a. Primärinfektion oder Reaktivierung bei Immunsuppression
<b>Untersuchungs-material / Materialmenge</b>	Fruchtwasser: 2 – 5 ml, mind. 500 µl EDTA-Blut: mind. 500 µl Liquor: 2 – 5 ml, mind. 500 µl Gewebe: mind. stecknadelkopfgroß (z. B. Gehirnbiose, Lymphknoten)
<b>Untersuchungs-methode / Dauer</b>	PCR + ggf. Sequenzierung / 2 Tage
<b>Sensitivität</b>	1000 Kopien pro PCR-Ansatz
<b>Interpretation</b>	Der Nachweis von T. gondii-DNA ist signifikant für das Vorliegen einer Infektion.
<b>Durchführung im Labor</b>	bei Bedarf
<b>Bemerkungen</b>	Aktuell ist zur Verbesserung der Sensitivität ein modifiziertes PCR-Verfahren in Erprobung!

## Tropheryma whipplei

<b>Indikation</b>	V. a. Morbus Whipple
<b>Untersuchungs-material / Materialmenge</b>	Gewebeproben mind. stecknadelkopfgroß (z. B. Dünndarm-, Synovia-, Lymphknoten- u. a. Organbiopsien) Gelenkflüssigkeit: mind. 500 µl Liquor: 2 – 5 ml Operationspräparate (z. B. Herzklappen)
<b>Untersuchungs-methode / Dauer</b>	nested PCR + ggf. Sequenzierung / 2 Tage
<b>Sensitivität</b>	10 Kopien pro PCR-Ansatz
<b>Interpretation</b>	Der Nachweis von T. whipplei-DNA in Dünndarmbiopsien ist nicht beweisend für das Vorliegen eines M. Whipple. Eine histologische Untersuchung ist zusätzlich erforderlich. Der Nachweis von T. whipplei-DNA in primär sterilen Materialien ist signifikant.
<b>Durchführung im Labor</b>	bei Bedarf
<b>Bemerkungen</b>	Histopathologische Untersuchungen sollten immer ergänzend durchgeführt werden!

## Universelle (eubakterielle) PCR (16S rRNA-Gen)

<b>Indikation</b>	Nachweis von nicht oder nur schwer zu kultivierenden bakteriellen Erregern in <b>primär sterilen</b> Materialien
<b>Untersuchungs-material / Materialmenge</b>	Primär sterile Patientenmaterialien bei besonderen Fragestellungen: Gewebeproben mind. stecknadelkopfgroß (z. B. Organbiopsien, Operationspräparate, wie z. B. Herzklappen) Punktate: mind. 500 µl (z. B. Gelenkflüssigkeit, Liquor) Primär sterile, mikroskopisch positive aber kulturnegative Materialien (z. B. unter Antibiotikatherapie)
<b>Untersuchungs-methode / Dauer</b>	nested PCR + Sequenzierung / 2 Tage
<b>Sensitivität</b>	100 Kopien pro PCR-Ansatz
<b>Interpretation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Der Nachweis bakterieller DNA in primär sterilen Materialien ist in Abhängigkeit vom klinischen Bild, der detektierten Erregerart und anderen Untersuchungsbefunden zu interpretieren.</li> <li>• Die eubakterielle PCR ist weniger sensitiv als spezies-spezifische NAT. Ein negativer Befund („kein Nachweis bakterieller DNA“) schließt das Vorliegen eines bakteriellen Infektes nicht aus.</li> </ul> <p>Die eubakterielle PCR erfolgt immer in Verbindung mit den konventionellen Nachweisverfahren (Mikroskopie, Kultur).</p>
<b>Durchführung im Labor</b>	Mo – Fr, 2x pro Woche
<b>Bemerkungen</b>	Es kann bakterielle DNA von Erregern nachgewiesen werden, die mit den konventionellen Methoden nicht anzüchtbar sind, z. B.

*Tropheryma whipplei*, *Bartonella spp.*, *Coxiella burnetii*. Auch Bakterien, die unter laufender Antibiotika-Therapie nicht mehr in der Kultur wachsen, können so nachgewiesen werden.

Voraussetzung hierfür ist:

- das Material stammt aus einer primär sterilen Lokalisation. Untersuchungsproben aus Regionen mit physiologischer Flora sind ungeeignet!
- das Material muss steril entnommen worden sein
- es liegt eine Monoinfektion vor, d. h. eine Infektion bei der nur eine Bakterienart erwartet wird (Bsp.: Endokarditis)

Grenzen der Methode:

- eingeschränkte Sensitivität im Vergleich mit spezies-spezifischen NAT
- das Amplifikat der eubakteriellen PCR ergibt in der Sequenzierung eine Mischsequenz. Ursächlich kann das Vorliegen einer Mischinfektion sein. Auch bakterielle DNA der Hautflora als Kontamination bei der Abnahme kann eine Rolle spielen. Spuren von bakterieller DNA in PCR-Reagenzien und DNA-Präparationsreagenzien können zu Mischsequenzen führen.
- bei Mischinfektionen wird ggf. nur der in der Keimzahl dominierende Erreger nachgewiesen. Dies kann zu Fehlinterpretationen hinsichtlich des Vorliegens einer Monoinfektion führen.

Um telefonische Rücksprache bei der Interpretation der Ergebnisse wird gebeten.