

# **PCR-RESISTENZTESTUNG BEI H. PYLORI: BEST OF IM VERGLEICH**

**PUTTINGER MARIA-CHRISTINA BSC., OA DR. HALABI MILO, WALDHÖR KARIN**

---

# HELICOBACTER PYLORI

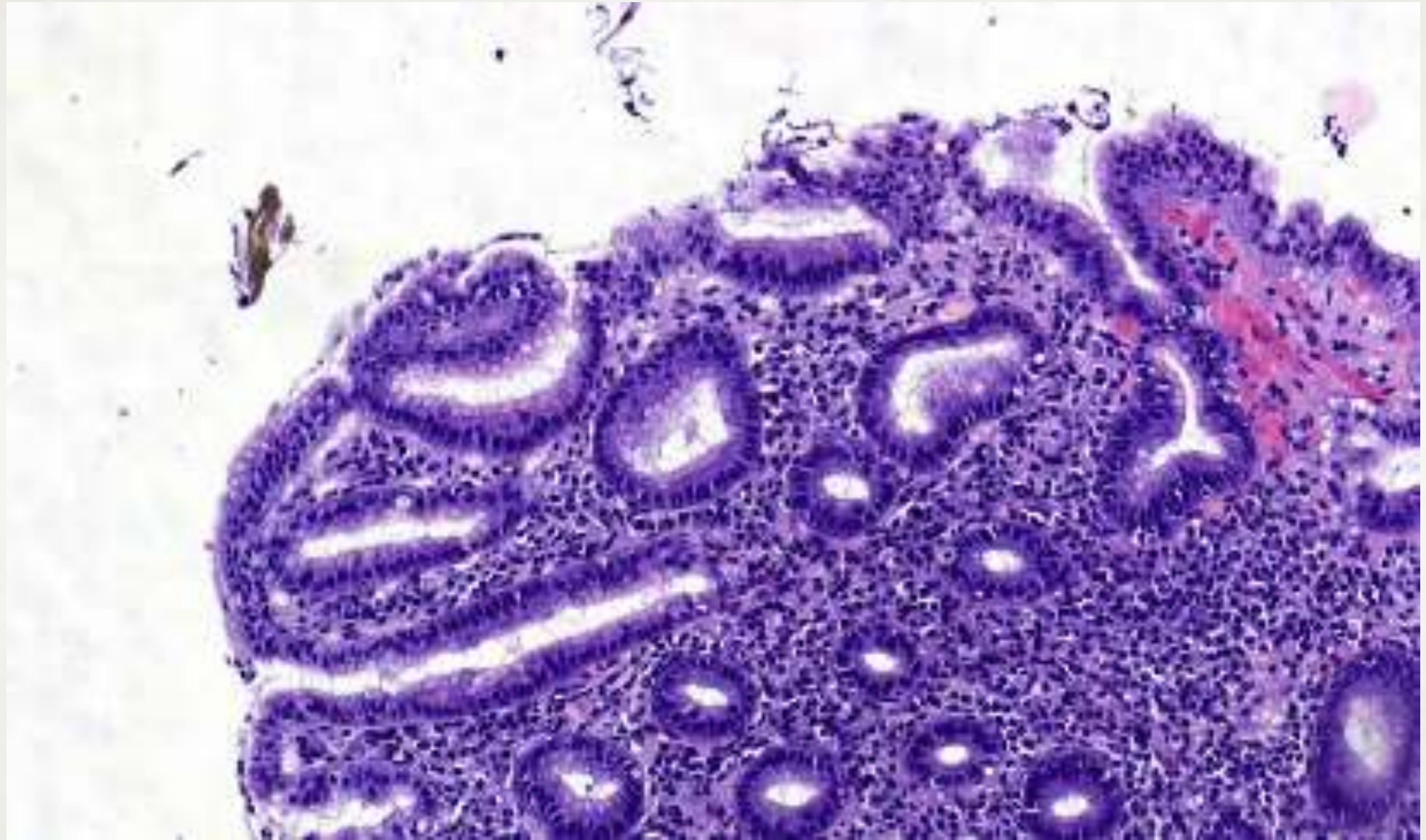
- Warren and Marshall 1983
  - gramnegatives einfach gebogenes oder spiralförmiges Bakterium
  - Äußerst beweglich durch Flagellen
  - Zahlreiche Virulenzfaktoren (z.B: Urease)
  - Verursacht Gastritiden, Ulzerationen und bösartige neoplastische Erkrankungen in der Magenschleimhaut und im Zwölffingerdarm
-

# NACHWEIS

		Sensitivität (%)	Spezifität (%)
<b>Invasive Methoden</b>	Kultur	79-90	100
	Histologie	80-98	90-98
	Urease-Schnelltest	90-95	90-95
	PCR	90-95	90-95
<b>Nicht invasive Methoden</b>	Harnstoff-Atemtest	85-95	85-95
	Stuhlantigentest	85-95	85-95
	Immunglobulin G (IgG)- Antikörpernachweis im Serum	70-90	70-90







# THERAPIE

Therapiechema	Dauer (Tage)	Eradikationsraten	Kommentar
<b>Standard Triple-Therapie</b>			
PPI 2x1 + Amoxicillin 2x2g, danach PPI + Clarithromycin 500mg (2x1mg) + Metronidazol 2x500mg	5-6	90-95%	Dauer von Clarithromycin und PPI
PPI 2x1 + Amoxicillin 2x2g, danach PPI + Clarithromycin 500mg + Metronidazol 2x500mg	5-6	80-90%	Bei Clarithromycin Resistenz: Metronidazol-Eradikationsebene als Intertherapie
<b>Quadruple-Therapie</b>			
PPI 2x1 + Clarithromycin 2x500mg + Amoxicillin 2x2g + Metronidazol 2x500mg	5-14	90-95%	Bei Clarithromycin Resistenz: Metronidazol-Eradikationsebene als Intertherapie
PPI + Amoxicillin 2x2g + Levofloxacin 2x500mg (Moxifloxacin) + Metronidazol 2x500mg	5-10	90-95%	Dauer von Clarithromycin, Spätkost und PPI
<b>8-tägige Quadruple-Therapie</b>			
PPI 2x7 + Levofloxacin 2x500mg oder Moxifloxacin 2x400mg + Clarithromycin 2x500mg + Metronidazol 2x500mg	7	85%	Kostenfrage, Nebenwirkungen häufig, nicht bei allen wirksam
Protonenpumpenhemmer 2x1 + Clarithromycin 2x500mg + Levofloxacin 2x500mg + Metronidazol 2x500mg + Erythromycin 2x1	10	95%	bei Clarithromycin Resistenz: Levofloxacin nicht ableiten, häufige Nebenwirkungen, hohe Kosten im Vergleich zu Eradikation

Quelle: ÖGGH (Österreichische Gesellschaft für Gastroenterologie und Hepatologie (2013))

# PROBLEMATIK

- Resistenzdaten einer europäischer Multicenterstudie:
  - **Clarithromycinresistenz: 37%**
  - **Levofloxacinresistent: 23%**

# CLARITHROMYCIN

- Erstlinienmedikament, im Rahmen einer Standard-Tripel-Therapie (2xAB +PPI)
- Makrolid, bakteriostatisch
- Clarithromycin-Resistenz bei *H.pylori* durch **Änderung der Zielstruktur** bedingt durch Punktmutation
- Zielstruktur: 50S-Untereinheit der Ribosomen (durch Mutation im 23S rRNA-Gen → A zu G oder A zu C)
- Goldstandard der Resistenztestung derzeit: Agardiffusionsmethode



# AGARDIFFUSION

- Durchführung:
  - Bakteriensuspension nach McFarland 3 auf Müller-Hinton mit Clarithromycin beimpft
  - Mikroaerophile Bebrütung bei 36°C, 3-4 Tage
  - Ablesen der Hemmhöfe
- Problematiken:
  - Lange Bebrütungszeiten
  - Kontaminationsgefahr
  - Individuelle Messergebnisse
- **Alternative: PCR**

# MOLEKULARBIOLOGISCHEN RESISTENZBESTIMMUNG

- Verkürzter Analyseprozess
  - Erleichterte Auswertung
  - Probenmaterial: Paraffin eingebettete Biopsie → Erstbiopsie (keine zusätzliche Belastung für den Patienten)
  - Eventuelle Verhinderung von Fehltherapien
-

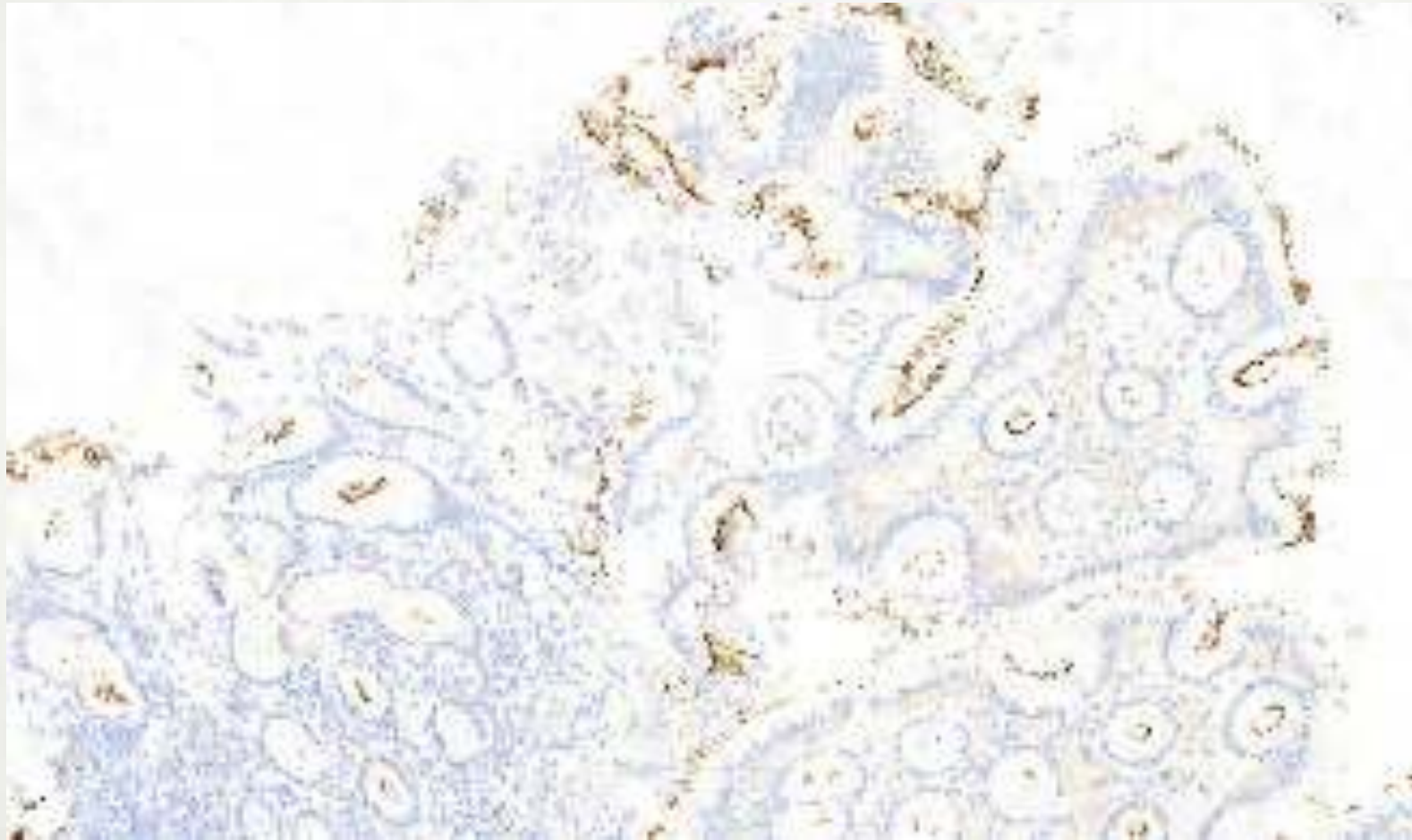
# ZIEL DES DIESER ARBEIT

- **RIDA Gene Helicobacter pylori (Fa. R-biopharm), GenoType HelicoDR Kit (Fa. Hain) und *H.pylori* ClariRes Assay (Fa. Ingenetics)**
    - 1. Sensitivität und Spezifität** im Vergleich zu mikrobiologisch bestätigten Fällen inkl. Resistenz
    - 2. Vergleich untereinander: Handhabung, Zeitaufwand und Preis-Leistungsverhältnis**
-

# PROJEKTAUFBAU

- Probenmaterial: formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Biopsien
  - Auswahl der Proben:
    - Vergleich aller histologischen *H.pylori*-Befunde mit zeitnahen mikrobiologischen Resistenzbestimmungen
    - Auswahl aller mikrobiologisch bestätigten **resistenten Fälle (10)**
    - Zufällige Auswahl von mikrobiologisch bestätigten **empfindlichen Fällen (5)**
    - Ausschluss einer Probe aufgrund von fehlendem Material
    - Bestätigung aller Proben mittels immunhistochemischer Färbung
  - **Gesamtzahl an Proben: 14**
-

# IMMUNHISTOCHEMIE





# PROJEKTAUFBAU

- Anschließende Auswertung der **Sensitivität** und **Spezifität**

- Sensitivität:  $\frac{\text{richtig positiv}}{\text{richtig positiv} + \text{falsch negativ}}$

- Spezifität:  $\frac{\text{richtig negativ}}{\text{richtig negativ} + \text{falsch positiv}}$

- Fisher' Exakter Test für mehrere unverbundene Stichproben zur Überprüfung ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Sensitivitäten und Spezifitäten der Tests besteht

# PROJEKTAUFBAU

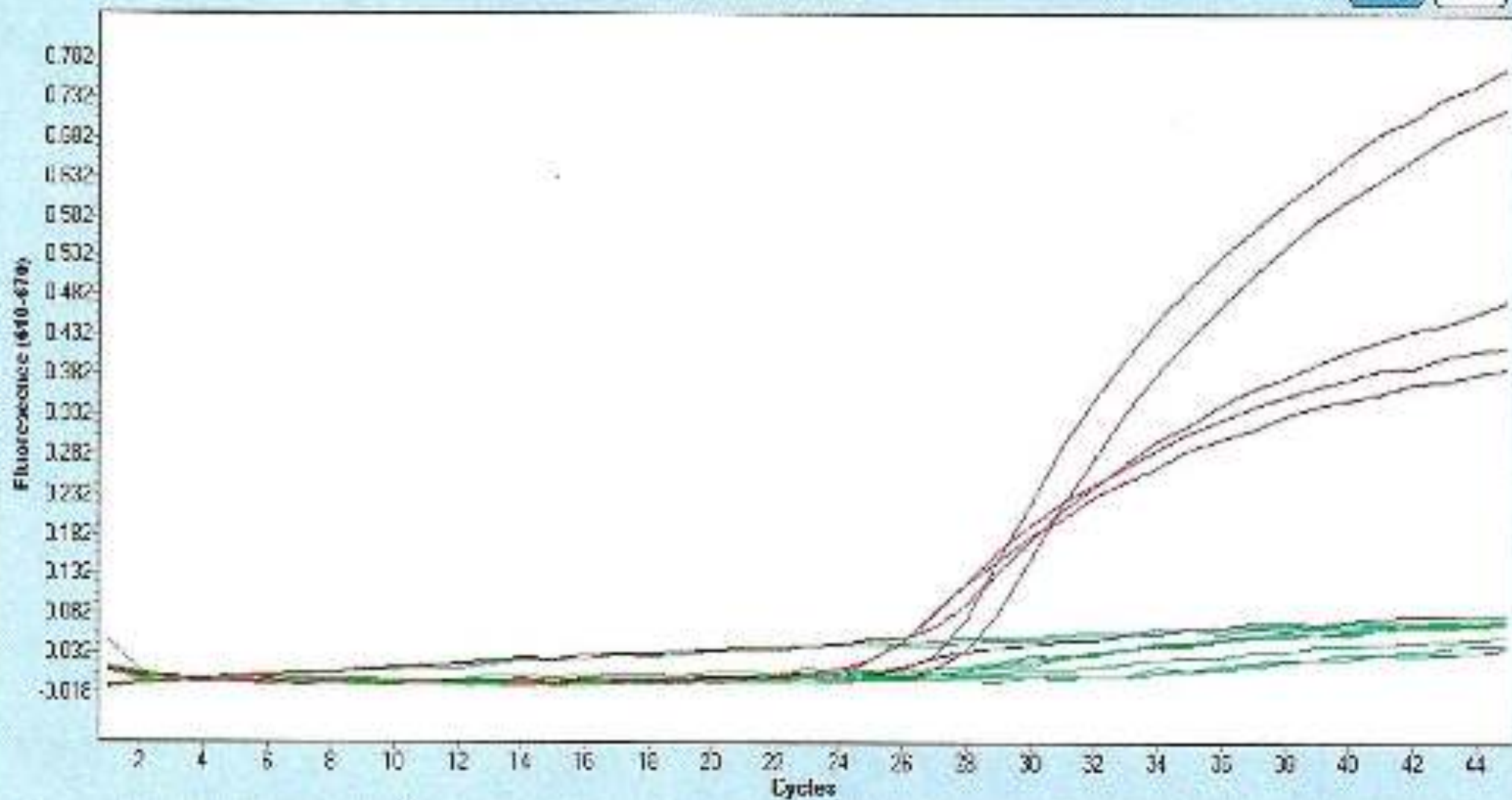
- **Überprüfung auf Handhabung, Preis-Leistungsverhältnis und Zeitaufwand mittels Punktesystems:**

<b>Handhabung</b>	<b>Punkte</b>
Leichte Handhabung/wenig Aufwand	1 Punkt
Schwierigere Handhabung/ mehr Aufwand	2 Punkte
Schwere Handhabung/ hoher Aufwand	3 Punkte
<b>Preis</b>	
Im Vergleich preiswert	1 Punkt
Im Vergleich neutral	2 Punkte
Im Vergleich teuer	3 Punkte
<b>Zeitaufwand</b>	
Kurzweilig	1 Punkt
Mittel	2 Punkte
Langwierig	3 Punkte

# RIDA GENE HELICOBACTER PYLORI (FA. R-BIOPHARM)

- Real-Time-PCR am LightCycler 480II
- Amplifikation und Detektion der 16S rRNA und der 23S rRNA
- Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten Hydrolyse-Sonden (Quencher-Reporter)
- Auswertung mittels Real-Time-PCR-Amplifikationskurven
- Bei vorhandener Resistenz = Anstieg der Kurve

## Amplification Curves

[Select](#) [Zoom](#)

# GENOTYPE HELICODR KIT (FA. HAIN)

- DNA STRIP®-Technologie
- Nachweis von Chlarythromycin (23S rRNA-Gen)- und Fluorochinolonresistenz (gyrA-Gen)
- Amplifikation der DNA mit Biotin-markierten Primern (Thermocycler), anschließende Hybridisierung an einen Teststreifen für den Nachweis (TwinCubator®)
- Auswertung: Auswertungsbogen-und Schablone



## GenoType HelicoDR 12

VER 1.0  
00017-0211-12-2

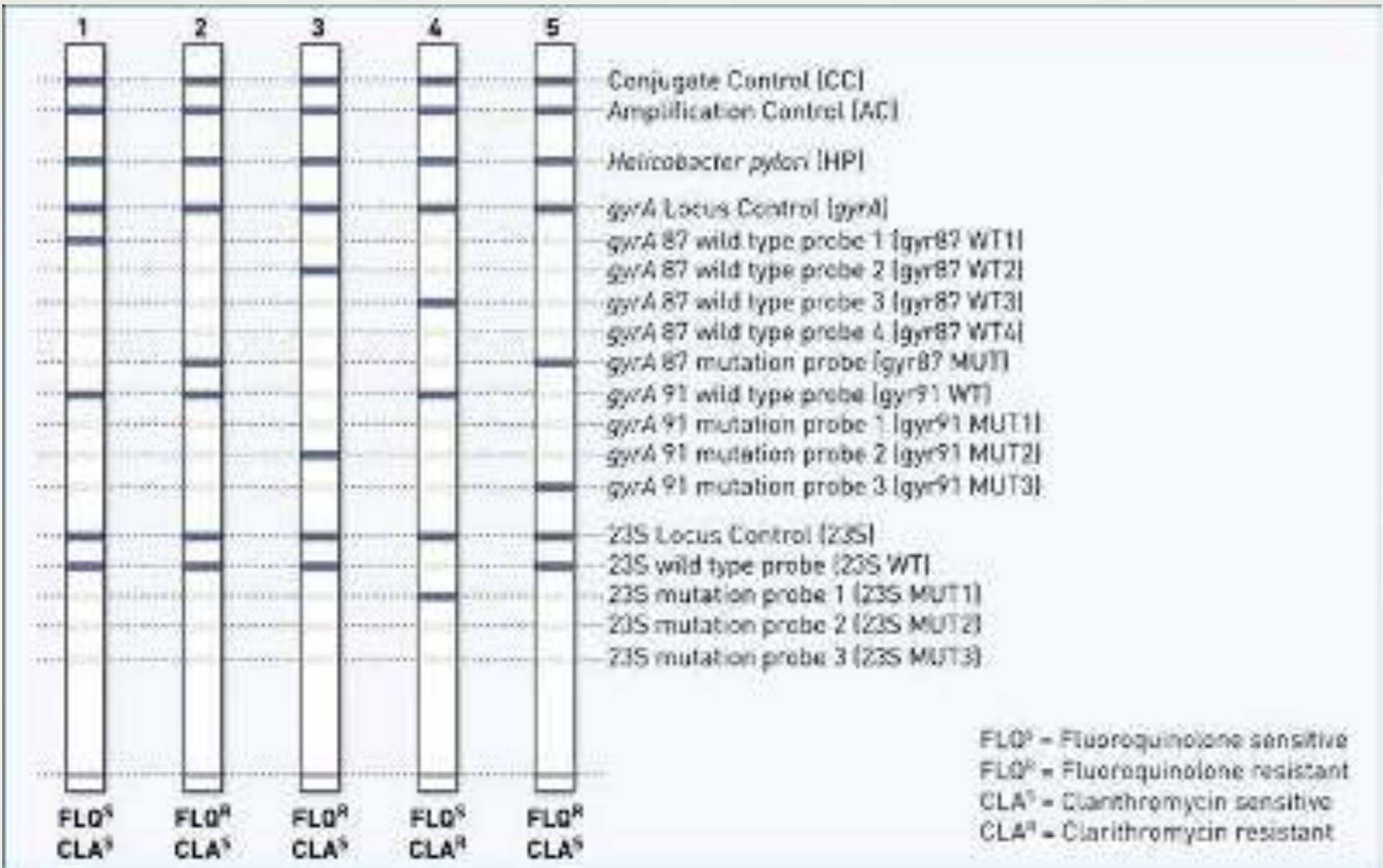
OD    MPV    YIELD

#					HP	gyrA WT	gyrA MUT	235 WT	235 MUT	FLO sensitive resistant	CLA sensitive resistant
---	--	--	--	--	----	---------	----------	--------	---------	-------------------------------	-------------------------------

54	B1										
55	B2										
56	B3										
57	B4										
58	B5										

## GenoType HelicoDR

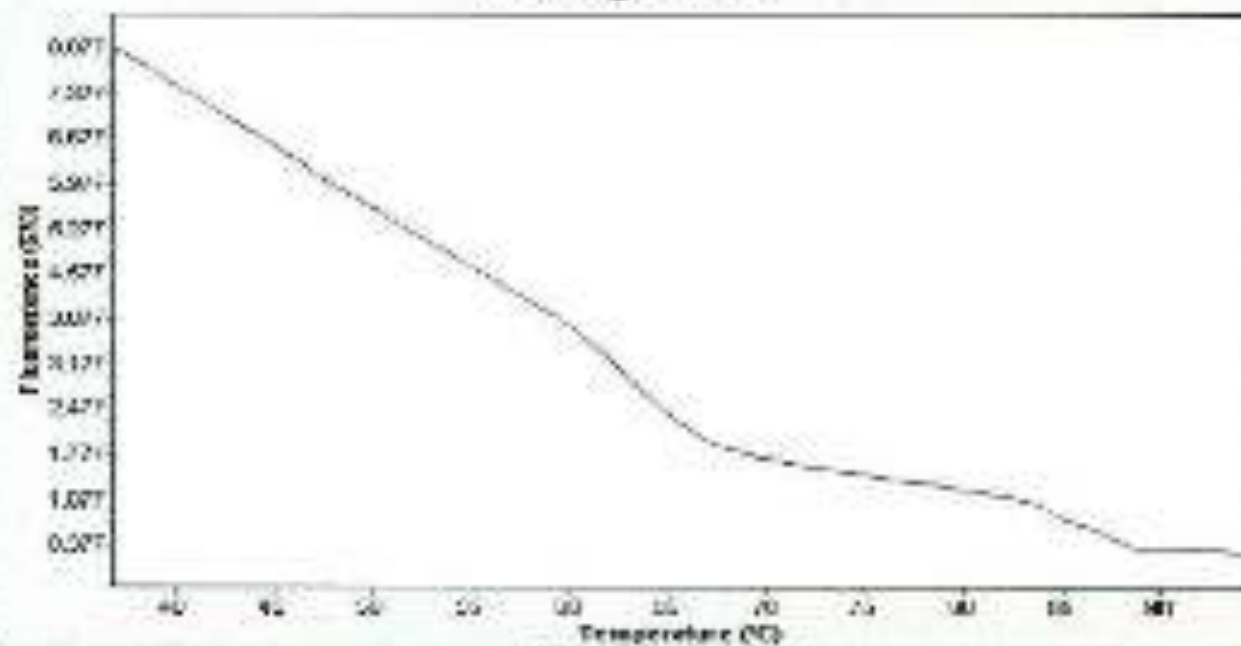
VER 1.0  
00335-2211-14-2



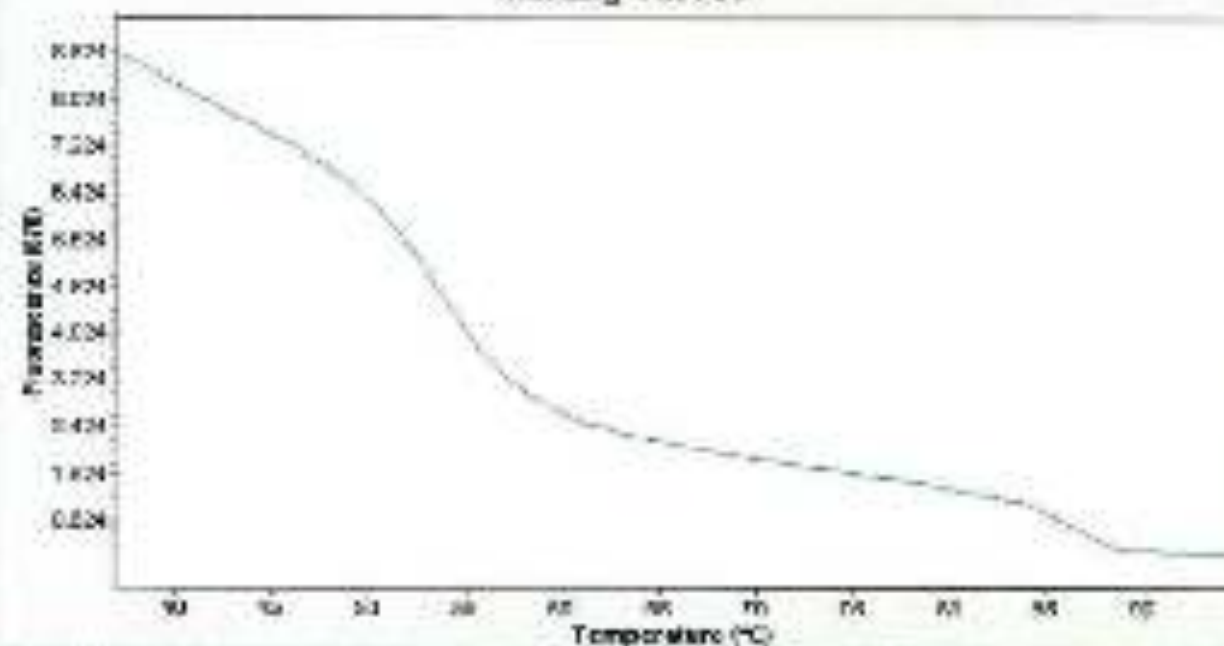
## ***H.PYLORI CLARIRES ASSAY (FA. INGENETICS)***

- Real-Time-PCR am LightCycler 2.0
  - Detektion der 23S rRNA
  - Mutationsnachweis mittels Fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden
  - Probenmaterial: formalinfixierten Biopsien oder gefrorenen Stuhlproben
  - Amplifikation und nachfolgendenden Schmelzkurvenanalyse (Nachweis)
  - Auswertung: Begutachtung der Schmelzkurvenanalysen mithilfe einer beigelegten Tabelle
-

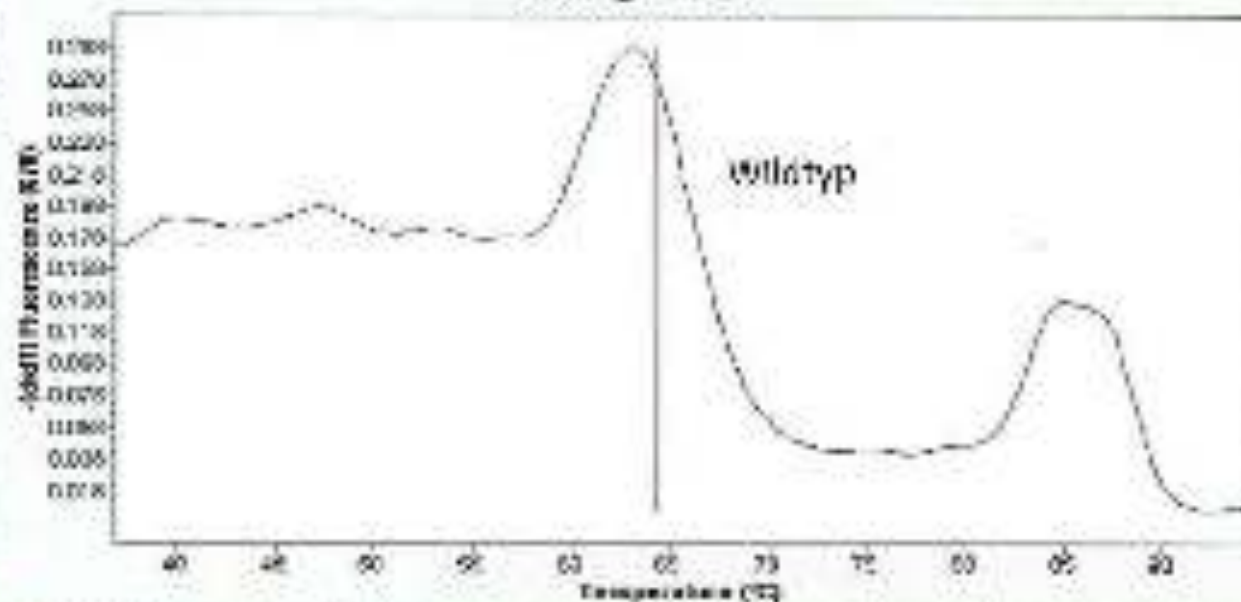
Melting Curves



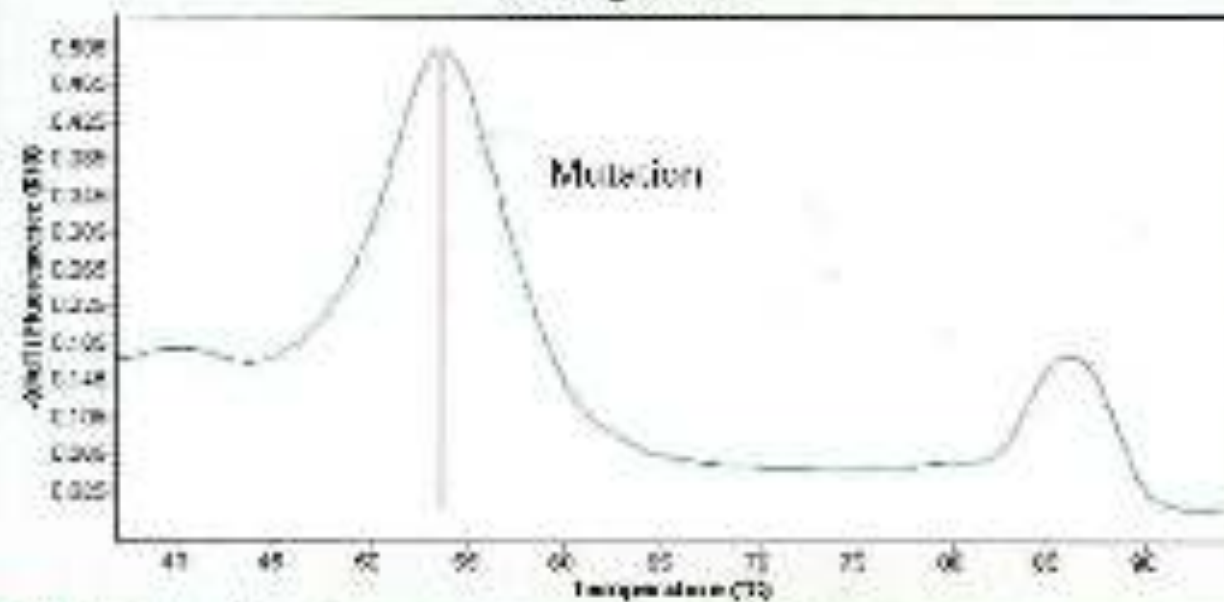
Melting Curves



Melting Peaks



Melting Peaks



■ 1e-1  
■ 1e-2  
14.75

■ 1e-1  
■ 1e-2  
14.75



Schmelztemperatur T <sub>m</sub>	Nachweis	Interpretation
47°C	Interne Positivkontrolle (IC)	PCR-Reaktion ist nicht inhibiert
63°C (+/-1°C)	Wildtyp	Probe enthält H.pylori (Clarithromycin empfindlicher Stamm)
58°C (+/-1°C)	Mutante A2142C	Probe enthält H.pylori (Clarithromycin resistenter Stamm)
54°C (+/-1°C)	Mutante A2142G oder A2143G	Probe enthält H.pylori (Clarithromycin resistenter Stamm)
63°C (+/-1°C) + 58°C (+/-1°C)	Wildtyp + Mutante A2142C	Probe enthält H.pylori (Clarithromycin empfindlicher+ resistenter Stamm)
63°C (+/-1°C) + 54°C (+/-1°C)	Wildtyp + Mutante A2142G oder A2143G	Probe enthält H.pylori (Clarithromycin empfindlicher+ resistenter Stamm)
54°C (+/-1°C) + 58°C (+/-1°C)	Mutante A2142C + Mutante A2142G oder A2143G	Probe enthält H.pylori (2 verschiedene Clarithromycin resistente Stämme)
75°C-85°C	SYBR® Green I Signal durch spezifische oder unspezifische PCR-Produkte, Primerdimere	Keine Interpretation von Schmelzkurven > 70°C, eine diagnostische Aussage ist nicht möglich



# ERGEBNISSE

	Sensitivität	Spezifität
<b>RIDA Gene (R-Biopharm)</b>	100%	50%
<b>GenoType (Hain)</b>	100%	40%
<b>ClariRes (Ingenetics)</b>	100%	50%

Fisher's Exakter Test: statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen den Sensitivitäten und Spezifitäten

Probe	R-BIOPHARM	HAIN	INGENETICS	AGARDIFFUSION
1	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent
2	H.pylori neg.	H.pylori neg.	Resistent	Resistent
3	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent
4	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent
5	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent
6	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent
7	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent
8	H.pylori neg.	Resistent	Resistent	Resistent
9	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent
10	<b>H.pylori neg.</b>	<b>Resistent</b>	<b>H.pylori neg.</b>	<b>Empfindlich</b>
11	<b>Resistent</b>	<b>Resistent</b>	<b>Resistent</b>	<b>Empfindlich</b>
12	Empfindlich	Empfindlich	Empfindlich	Empfindlich
13	<b>Resistent</b>	<b>Resistent</b>	<b>Resistent</b>	<b>Empfindlich</b>
14	Empfindlich	Empfindlich	Empfindlich	Empfindlich

# ERGEBNISSE

Test	Testgröße	Punkte
<b>RIDA Gene (R Biopharm)</b>	Zeitaufwand	7 Punkte
	Preis	1 Punkt
	Handling	3 Punkte
	<b>Gesamt:</b>	<b>11 Punkte</b>
<b>GenoType (Hain)</b>	Zeitaufwand	9 Punkte
	Preis	3 Punkte
	Handling	8 Punkte
	<b>Gesamt:</b>	<b>20 Punkte</b>
<b>ClariRes (Ingenetics)</b>	Zeitaufwand	7 Punkte
	Preis	1 Punkt
	Handling	4 Punkte
	<b>Gesamt:</b>	<b>12 Punkte</b>

# PUNKTEZUSAMMENFASSUNG



# CONCLUSIO

- Kein Unterschied bezüglich Sensitivität und Spezifität der einzelnen Tests
  - RIDA Gene Helicobacter pylori (Fa. R-biopharm) schnitt am besten ab bezüglich Handhabung/Preis/Zeitaufwand
  - Hain weist zusätzlich auch Fluorochinolonresistenz nach
  - Ingenetics ermöglicht die Bestimmung nicht nur aus einer Biopsie, sondern auch aus Stuhl
  - Vergleich zur Resistenztestung (Neuer Goldstandard?)
-



**Danke für Ihre Aufmerksamkeit!**