Aktuelle mikrobiologische Untersuchungsmethoden bei Mykobakterien

Current Microbiological Methods in the Investigation of Mycobacteria

Autoren E. Richter, S. Andres, D. Hillemann

Institut Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien

eingereicht 9.3.2015
akzeptiert nach Revision 23.3.2015

Bibliografie
DOI http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1391960
Pneumologie 2015; 69: 276–281
© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
ISSN 0934-8387

Korrespondenzadresse
PD Dr. Elvira Richter
Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien
Parkallee 18
23845 Borstel
elvira.richter@labor-limbach.de

Zusammenfassung

Der schnelle und sichere Nachweis einer Tuberkulose ist das primäre Ziel der mikrobiologischen Untersuchungen. Er dient nicht nur der frühen Diagnosestellung und damit einem frühzeitigen Start einer adäquaten Therapie, sondern auch der Unterbrechung der Transmission und damit auch der Verbreitung der Erkrankung. Voraussetzung für den erfolgreichen Nachweis von Mykobakterien ist die sorgfältige Auswahl des Untersuchungsguts und die adäquate Entnahme und Versendung. Neben den klassischen mikrobiologischen Verfahren, d. h. der Färbung auf säurefeste Stäbchen und den kulturellen Methoden, bekommen zunehmend molekularbiologische Nachweisverfahren (PCR; NAT) Bedeutung. Außer dem Nachweis von Tuberkulosebakterien können resistenzassoziierte Genmutationen bereits direkt im Untersuchungsmaterial analysiert werden und so schon einen frühen Hinweis auf resistente Stämme geben. Von jeder positiven Kultur muss eine Identifizierung zeigen, ob Tuberkulosebakterien oder nicht-tuberkulöse Mykobakterien nachgewiesen wurden. Eine alle Erstlinienmedikamente umfassende Empfindlichkeitsprüfung muss bei Tuberkulosebakterien von einem Erstisolat jedes Patienten durchgeführt werden und sollte wiederholt werden, wenn nach ca. 2 Monaten Therapie weiterhin Tuberkulosebakterien nachgewiesen werden. Die Testung von Zweitlinienmedikamenten muss bei Vorliegen von Resistenzen oder Unverträglichkeiten folgen.

Abstract

The rapid and reliable detection of tuberculosis is the main goal of microbiological analyses. This is not only of great value for an early diagnosis and early start of an adequate therapy, but also helps to stop transmission and spread of the disease. Prerequisites for successful detection of mycobacteria are careful selection of patient specimens, proper sampling and appropriate shipping. In addition to the classical microbiological methods such as staining for acid-fast bacteria and culture procedures, newer molecular methods are gaining greater importance (PCR; NAT). TB bacteria and resistance-associated mutations can be detected from the specimens directly, providing an early hint about resistant strains. In positive cultures, *M. tuberculosis* complex and non-tuberculous mycobacteria must be discriminated from each other. Drug susceptibility testing (DST) of all first-line drugs has to be performed from one isolate of each patient and repeated if TB bacteria are still isolated after 2 months of therapy. DST of second-line drugs should follow in case of drug resistance or drug intolerance.

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Einleitung

Den mikrobiologischen Verfahren kommt in der Diagnostik einer durch Mykobakterien verursachten Infektionskrankheit ein hoher Stellenwert zu. Nur durch den Nachweis von Mykobakterien mit mikroskopischen, kulturellen und/oder molekularbiologischen Verfahren kann eine Verdachtsdiagnose einer Mykobakteriose mit Sicherheit bestätigt werden. Der Nachweis von Tuberkulosebakterien und nicht-tuberkulösen Mykobakterien (NTM) erfolgt prinzipiell mit den gleichen Verfahren. Unterschiede bei den kulturellen und molekularbiologischen Methoden werden in den jeweiligen Kapiteln erläutert.

Keine Bedeutung in der Laboratoriumsdiagnostik haben der Nachweis von Antikörpern (serologische Verfahren) und der Tierversuch.

Untersuchungsmaterial

Für den mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Nachweis von Mykobakterien kann eine Vielzahl von Untersuchungsmaterialien eingesetzt werden, abhängig von der möglichen Lokalisationen der Mykobakteriose. Aufgrund der vorwiegenden Erkrankungslokalisation sind respiratorische Untersuchungsproben wie Sputum, Bronchialsekret, bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit, aber auch Magennüchternsekret oder Magenspülflüssigkeit oder transbronchiale Biopsien am häufigsten. Extrapulmonale Proben umfassen Biopsiematerial (z. B. von Lymphknoten, Haut), Punktate (z. B. Pleurapunktate, Liquor, Pericardpunktat), Urin, Blut und Knochenmark [1, 2].

In der Regel werden die Untersuchungsproben nativ, ohne Zusätze zur Untersuchung benötigt. Magennüchternsekret und Magenspülflüssigkeit müssen durch Zusatz von Phosphatpuffer neutralisiert werden. Biopsien sollen in wenig (1 – 2 ml) physiologische Kochsalzlösung gegeben werden, um ein Austrocknen zu verhindern. Abstrichtupfer sind weniger gut geeignet, sie sollten v. a. nicht in ein spezielles Transportmedium gegeben, sondern mit steriler physiologischer Kochsalzlösung versetzt werden. Blut und Knochenmark sind nur bei immunsupprimierten Patienten sinnvoll; sie müssen durch Antikoagulantia stabilisiert werden, am besten ist Heparin geeignet, aber auch Na-Citrat.

Ein mikroskopischer Nachweis im Urin wird wegen der Häufigkeit von nicht-tuberkulösen Mykobakterien nicht empfohlen. Für den molekularbiologischen Nachweis durch Nukleinsäureamplifikation (NAT) können alle Materialien mit Ausnahme von Blut und Knochenmark eingesetzt werden.

Bei noch nicht gesicherter Diagnose sind, wenn möglich, drei, zu verschiedenen Zeiten, möglichst an verschiedenen Tagen, gewonnene Proben zu untersuchen (z. B. Atemwegssekrete, Urin). Bei gesicherter Diagnose sind Kontrollen im Abstand von 2 bis 4 Wochen sinnvoll.

Mikroskopie

Die Mikroskopie ist trotz moderner Techniken immer noch das erste und ein sehr wichtiges diagnostisches Verfahren zum Nachweis von Mykobakterien. Ein Nachweis säurefester Stäbchen in respiratorischen Materialien ist ein starker Hinweis auf eine offene Lungentuberkulose und damit auch auf die Infektiosität des Patienten, sodass die notwendigen Maßnahmen, wie z. B. Isolierung des Patienten, sehr schnell eingeleitet werden können. Der mikroskopische Nachweis der Mykobakterien beruht auf der durch ihre typische Zellwand hervorgerufenen Säurefestigkeit. Säurefest, zumindest partiell, können auch den Mykobakterien nahe verwandte Bakterien wie z. B. *Nocardia* oder *Rhodococcus* sein, aber auch Pilz- und Bakteriensporen können säurefest erscheinen. Die Sensitivität der Mikroskopie ist im Vergleich zur Kultur geringer (benötigt werden mindestens 10^4 Keime/ml Untersuchungsmaterial), darüber hinaus kann mit der Mikroskopie nicht zwischen Tuberkulosebakterien und NTM bzw. zwischen lebenden und toten Mykobakterien unterschieden werden [3].

Für die Analyse sind die gängigsten Verfahren die lichtmikroskopische Untersuchung/Hellfeldmikroskopie sowie die Fluoreszenzmikroskopie. Mit der ersten Methode werden die mit der klassischen Ziehl-Neelsen-(ZN-)Methode und der schnelleren Kinyoun-Methode gefärbten Präparate untersucht. Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe wie Auramin, Auramin-Rhodamin oder Acridinorange können für den färberischen Nachweis eingesetzt werden [4].

Der Nachweis säurefester Stäbchen im Sputum ist nach IFSG meldepflichtig [5].

Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT)

Der schnelle Nachweis einer Tuberkuloseinfektion ist von großer therapeutischer und infektionshygienischer Bedeutung. Aus diesem Grund werden molekularbiologische Nachweisverfahren von Tuberkulosebakterien mehr und mehr in die Diagnostik einbezogen.

NAT basieren auf verschiedenen in vitro-Amplifikationsverfahren wie der klassischen PCR oder alternativen isothermalen Verfahren zum Nachweis von kurzen, für den Erreger spezifischen Nukleinsäuresequenzen (DNA oder RNA). Es steht eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Verfahren zum TB-Nachweis zur Verfügung, die den sog. ‚home made'-Verfahren vorzuziehen sind. Wegen der geringeren infektionshygienischen Relevanz von NTM gibt es bislang fast ausschließlich ‚home-made'-Techniken für deren Direktnachweis [2].

Bei Patienten mit mikroskopisch positiven Untersuchungsmaterialien kann durch den Einsatz von molekularbiologischen Verfahren sehr schnell unterschieden werden, ob es sich um eine isolierungspflichtige Tuberkulose oder um eine Mykobakteriose durch NTM handelt, da diese Verfahren in der Regel integrierte Inhibitionskontrollen enthalten, sodass falsch negative Ergebnisse unwahrscheinlich sind. Bei Patienten mit mikroskopisch negativen Untersuchungsmaterialien, aber hohem klinischen Verdacht, kann der molekularbiologische Nachweis von Tuberkulosebakterien die richtige Diagnose erheblich beschleunigen.

Da die Sensitivität der molekularbiologischen Verfahren bei mikroskopisch negativen Materialien nur 80 bis 90 % beträgt, kann eine TB durch ein negatives Ergebnis nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Spezifität der molekularbiologischen Verfahren bei mikroskopisch negativen Materialien ist ebenfalls geringer als 100 % [6]. Positive Befunde sollten daher stets mit dem einsendenden Arzt besprochen und gegebenenfalls durch Mehrfachuntersuchungen bestätigt werden.

Über den reinen Nachweis von Tuberkulosebakterien hinaus sind in den letzten Jahren Methoden entwickelt worden, mit denen bereits im Untersuchungsgut ein Nachweis von Resistenzen gegen bestimmte Antibiotika möglich ist. Bei Mykobakterien basieren Resistenzen gegenüber Antibiotika auf spezifischen Mutationen in der genomischen DNA. Die molekularbiologische

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.



Abb. 1 Das Cepheid GeneXpert System mit einer Xpert MTB/RIF-Kartusche zur Detektion von *M. tuberculosis*-Komplex Bakterien und der Rifampicin-Resistenz.

Analyse der relevanten Gene der Tuberkulosebakterien ermöglicht eine schnelle Einschätzung einer Resistenz. Das z. Zt. schnellste Verfahren ermöglicht den Nachweis einer Resistenz gegen Rifampicin (RMP) (GeneXpert; Cepheid, USA) in der Patientenprobe innerhalb von 2 Stunden [7] (**Abb. 1**). Ein Nachweis einer Resistenz gegen RMP und Isoniazid (INH) (GenoType® MTBDRplus; HAIN Lifescience) sowie gegen Ethambutol, Fluorchinolone und injizierbare Antibiotika (Amikacin, Capreomycin) (GenoType® MTBDRsl; HAIN Lifescience) ist mit der sogenannten ‚Line Probe'-Technologie möglich [8, 9]. Die beiden Methoden sind vor allem bei mikroskopisch positiven Proben sehr aussagekräftig. Jedoch werden mit diesen Verfahren nicht alle Resistenzen gegenüber den untersuchten Antibiotika und auch nicht alle Erstrangmedikamente erfasst. Darüber hinaus werden vor allem bei RMP Mutationen im relevanten Genbereich (rpoB-Gen) beobachtet, die keine phänotypische Resistenz gegen RMP hervorrufen. Aus diesen Gründen sollte mindestens ein Isolat jedes Patienten mit einer phänotypischen Sensibilitätsprüfung untersucht werden.

Mit diesen Methoden kann jedoch heute innerhalb von wenigen Stunden nicht nur ein Tuberkuloseverdacht bei einem Patienten, sondern zusätzlich auch noch die Diagnose einer multiresistenten (Multi Drug Resistant; MDR) Tuberkulose hoch wahrscheinlich gemacht werden.

Eine ausschließlich auf NAT beruhende Mykobakteriendiagnostik ohne kulturelle Verfahren ist derzeit nicht ausreichend und adäquat. Die Verfahren sind nicht ausreichend sensitiv, sodass Proben mit geringen Keimzahlen nicht erfasst werden. Ebenso sind NAT nicht zur Verlaufskontrolle einer Tuberkulosetherapie geeignet, da DNA auch von geschädigten oder abgestorbenen Tuberkulosebakterien noch nachgewiesen werden kann. Darüber hinaus werden Kulturen zur phänotypischen Resistenzbestimmung wie auch zur Differenzierung der Spezies innerhalb des TB-Komplexes benötigt. Auch werden nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM) mit den Methoden zum TB-Nachweis nicht erkannt und können nur kulturell nachgewiesen werden. NAT-Verfahren, die in ihrem Nachweis auch NTM mit einschließen, erfassen in der Regel nicht alle Mycobacterium-Spezies [2].

Primärisolierung von Mykobakterien mittels kultureller Verfahren

Der kulturelle Nachweis ist immer noch der Gold-Standard in der Mykobakteriendiagnostik, sodass bei Verdacht auf eine Tuberkulose oder Mykobakteriose immer eine kulturelle Untersuchung angestrebt werden muss [10, 11]. Der kulturelle Nachweis beweist das Vorliegen vermehrungsfähiger Mykobakterien und ist die Voraussetzung für eine umfassende Empfindlichkeitstestung, für die exakte taxonomische Identifizierung und die Feintypisierung von v. a. Tuberkulose-Stämmen für epidemiologische Analysen. Die Nachweisgrenze liegt bei 10 – 100 Bakterien pro ml Patientenprobe [3].

Da sich Mykobakterien sehr langsam vermehren, muss jedes nicht-sterile Untersuchungsmaterial vorbehandelt werden, um schneller wachsende Begleitkeime abzutöten. Die Vorbehandlung, üblicherweise mit N-Acetyl-L-Cystein-NaOH (NALC-NaOH), beinhaltet eine Homogenisierung und Dekontamination mit anschließender Konzentration durch Zentrifugation [10, 2].

Die Anzucht der Mykobakterien aus der vorbehandelten Patientenprobe erfolgt in Flüssig- und auf Festmedien, dabei ist die Kultur in Flüssigmedien die schnellste und sensitivste Methode [11, 12]. Durch verschiedene Indikatorsysteme, abhängig vom gewählten Verfahren, wird das Wachstum in der Flüssigkultur angezeigt. Der Nachweis von Tuberkulosebakterien ist dabei im Durchschnitt zwei Wochen früher erkennbar als auf den festen Kulturmedien. Bei unbehandelten Patienten können sie in der Regel bereits nach 1 – 2 Wochen nachgewiesen werden. Einige NTM-Spezies, wie z. B. *M. avium*, können in Flüssigkulturen häufig bereits innerhalb weniger Tage wachsen.

Die Inkubation der Kulturmedien erfolgt in der Regel bei 36 °C ± 1 °C bis zum Nachweis von Mykobakterien bzw. bei negativen Kulturen sechs (Flüssigmedien) bzw. acht (Festmedien) Wochen lang. Bei Haut- und Lymphknoten- und anderen Proben aus der Körperperipherie, aber auch bei Sputumproben von Patienten mit cystischer Fibrose müssen weitere Kulturmedien beimpft und bei 30 °C ± 2 °C bebrütet werden. Die Untersuchungsmaterialien können NTM enthalten, die bei 37 °C nicht oder schlechter, aber bevorzugt bei niedrigeren Temperaturen wachsen *(z. B. M. malmoense, M. marinum, M. abscessus*) [10].

Besonders bei mikroskopisch positiven Untersuchungsmaterialien kann es bei der Vorbehandlung leicht zu einer Übertragung von Mykobakterien von einer Probe zur nächsten kommen. Wegen der schwerwiegenden Konsequenzen eines Nachweises von Tuberkulosebakterien müssen strikte Verfahrensabläufe zum Vermeiden von Laborkontaminationen eingehalten werden, wie z. B. der Einsatz von Einmalpipetten, die für jede Probe einzeln verwendet werden, und das konsequente Abarbeiten in der nummerischen Reihenfolge [13, 14].

Die Möglichkeit einer Laborkontamination sollte überprüft werden, wenn z. B. nur eine von vielen Untersuchungsmaterialien eines Patienten positiv ist oder eine Probe eines nicht therapierten Patienten sehr spät und typischerweise nur auf einem Nährboden positiv wird. Wurden Patientenproben mit einer hohen Keimzahl (mikroskopisch positiv) davor (direkt oder auch mehrere Probennummern vorher) verarbeitet, sollte eine molekularbiologische Abklärung (durch z. B. Spoligotyping [15]) erfolgen, bevor ein möglicherweise falsch positiver Tuberkulosebefund herausgegeben wird.

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Auch ein behandelnder Arzt sollte die Möglichkeit einer Laborkontamination in Betracht ziehen, wenn nur ein einziger kultureller Nachweis trotz mehrerer untersuchter Proben erfolgte und ein klares klinisches Korrelat fehlt.

Identifizierung

Bei jedem kulturellen Nachweis von Mykobakterien ist die unverzügliche Unterscheidung von Tuberkulosebakterien und NTM vor der Befunderstellung zwingend erforderlich. Der Befund-Bericht einer positiven Kultur muss immer eindeutig darlegen, ob Tuberkulosebakterien oder NTM nachgewiesen wurden [10].

Die Identifizierung von Mykobakterien erfolgt mit Hilfe molekularbiologischer Methoden (Gensonden, Streifenhybridisierungstests, PCR-Analysen, Sequenzierung), aber auch massenspektrometrische Verfahren (MALDI-TOF) und immunochromatografische Verfahren werden zunehmend erfolgreich eingesetzt.

Von jedem Patienten mit positivem Tuberkulosenachweis sollte aus epidemiologischen und therapeutischen Gründen von mindestens einem Isolat eine weitergehende Differenzierung innerhalb der Tuberkulosebakterien durchgeführt werden. Auch dies ist mit molekularbiologischen Verfahren schnell und einfach durchführbar [16].

Der kulturelle Nachweis von Tuberkulosebakterien ist meldepflichtig.

Werden in der Kultur NTM nachgewiesen, ermöglicht eine Identifizierung der Spezies die Einschätzung der klinischen Relevanz. Da inzwischen mehr als 150 nicht-tuberkulöse Mykobakterienspezies beschrieben sind, gestatten konventionelle Methoden keine ausreichende Differenzierung mehr. Analysen der Zellwandzusammensetzung durch HPLC oder Massenspektrometrie (z. B. MALDI-TOF-Massenspektrometrie) werden zunehmend auch für Mykobakterien eingesetzt und könnten nach einer umfangreichen Evaluierung ein schnelles Werkzeug zur Speziesidentifizierung werden. Molekularbiologische Methoden, die eine Speziesidentifizierung durch die Analyse spezieller Genabschnitte erlauben, sind zurzeit die am besten etablierten Verfahren. Die gängigen Verfahren sind Gensonden (für nur wenige Mykobakterienarten), Streifenhybridisierungstests (14 bzw. 30 Arten), die Sequenzierung spezifischer Gene oder Genabschnitte (z. B. Gen der 16S-rRNA, ITS, *hsp*65, *rpo*B) und mit einigen Einschränkungen auch die PCR-Restriktionsenzymanalyse des 65-kDa *hsp*-Gens [17 – 20]. Mit diesen Methoden kann die Identifizierung der Spezies in 2 Stunden bis ca. 2 Tagen durchgeführt werden. Ein wichtiger Vorteil der Streifenhybridisierungstests ist die Möglichkeit, Mischkulturen zu erkennen, die dann anschließend durch andere Methoden bestätigt werden sollten. Andererseits ermöglicht nur die Sequenzanalyse eine exakte Identifizierung von vielen neuen, erst jüngst beschriebenen Arten oder Subspezies (z. B. Subspezies von *M. abscessus*) oder von unbekannten, noch nicht beschriebenen Spezies.

Alle mit molekularbiologischen Methoden erhaltenen Ergebnisse sollten, auch nach der Befunderstellung, auf ihre Plausibilität hin überprüft werden. Dazu muss von allen positiven Flüssigkulturen mindestens eine Subkultur auf Festmedien erfolgen, üblicherweise auf einem Löwenstein-Jensen-Medium. Daran können einige wichtige physiologische Parameter überprüft werden wie Wachstumsgeschwindigkeit, Koloniemorphologie und Pigmentbildung. Werden Kulturen noch bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert, kann auch noch die Temperaturpräferenz analysiert werden.

Die klinische Bewertung eines NTM-Nachweises erfolgt in der Zusammenschau einer Vielzahl von Aspekten. Bei Nachweis aus einem sterilen Untersuchungsgut (z. B. *M. avium* aus Halslymphknoten eines Kindes) ist die klinische Relevanz als hoch einzuschätzen. Anders dagegen ist die Bewertung aus primär nicht sterilem Untersuchungsgut, wie z. B. pulmonalen Proben. Hier müssen für die Diagnose einer Mykobakteriose durch NTM klinische, radiologische und bakteriologische Kriterien erfüllt sein [21, 22].

Empfindlichkeitsprüfung

Im Rahmen der Tuberkulosediagnostik muss immer eine Empfindlichkeitsprüfung zumindest von einem der Erstisolate jedes Patienten durchgeführt werden, da auch in Deutschland resistente Stämme isoliert werden [23]. Die Testung umfasst primär die „klassischen" Antibiotika Isoniazid (INH), Rifampicin (RMP), Pyrazinamid (PZA) und Ethambutol (EMB). Streptomycin (SM) wird nicht mehr als Erstrangmedikament empfohlen. Bei Nachweis einer Resistenz gegen mindestens eines dieser Erstrangmedikamente muss eine Testung von Reserveantibiotika (z. B. Protionamid, Fluorchinolone (Levofloxacin, Moxifloxacin), Capreomycin, Amikacin, Rifabutin, Cycloserin oder Linezolid) erfolgen. Empfindlichkeitsprüfungen der beiden im Jahr 2014 zur Behandlung der MDR-TB zugelassenen Antibiotika Bedaquilin und Delamanid sind bislang nur im Studienrahmen durchgeführt worden, sodass es noch keine allgemein anerkannten Testverfahren gibt.

Die Empfindlichkeitsprüfung muss wiederholt werden, wenn der Erfolg der klinischen Therapie ausbleibt, aber auch wenn nach anfänglicher Regredienz eine Befundverschlechterung eintritt.

Als Referenzmethode gilt die modifizierte Proportionsmethode auf Löwenstein-Jensen-Medium. Im Rahmen der Patientenversorgung spielt sie jedoch keine Rolle mehr, da die Inkubation der Kulturen ca. 3 – 4 Wochen benötigt und damit deutlich langsamer ist als die Prüfung in modernen Flüssigkulturen.

Weltweit am weitesten verbreitet ist die Empfindlichkeitsprüfung im BACTEC MGIT 960-Flüssigkulturmedium (Becton Dickinson) mit einer Verfahrenszeit von 7 – 10 Tagen [24, 25]. Mit Ausnahme des Cycloserins können alle Antibiotika mit diesem Verfahren getestet werden.

Das Ergebnis der Empfindlichkeitsprüfung ist nach dem Infektionsschutzgesetz meldepflichtig.

Molekulare Resistenzbestimmung

Wie bereits oben beschrieben, kennt man heute für die meisten Antibiotika die Gene, in denen Mutationen für Resistenzen verantwortlich sind. Positive TB-Kulturen enthalten in der Regel ausreichend Keimzahlen, sodass molekularbiologische Verfahren zum Nachweis dieser Mutationen sehr viel einfacher als direkt in der Patientenprobe durchzuführen sind. So können schnell Resistenzen erkannt werden, bevor die komplette Empfindlichkeitsprüfung abgeschlossen ist. Eingesetzt werden können die schon bei der NAT beschriebenen Verfahren Streifenhybridisierungstests [GenoType® MTBDR*plus*-Resistenzen gegen INH und RMP und GenoType® MTBDR*sl*-Resistenzen gegen EMB, Fluorchinolone und injizierbare Antibiotika (Amikacin, Capreomycin)]. Kommerziell sind weitere Streifenhybridisierungstest zum Nachweis von Resistenzen gegen INH und RMP, gegen Aminoglykoside/cyclische Peptide sowie gegen Fluorochinolone und EMB

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

erhältlich [TB Resistance Assay Module Isoniacid/Rifampicin, Module Streptomycin/Kanamycin/Amikacin/Capreomycin, Modul Fluoroquinolones/Ethambutol (AID, Strassberg)] [26]. Für Mutationsanalysen anderer Gene werden vor allem Sequenzierverfahren eingesetzt (z. B. pncA-Gen zum Nachweis der Pyrazinamid-Resistenz) [27].

Die Übereinstimmung zwischen den molekularen Ergebnissen und der phänotypischen Testung ist nicht vollständig. Für Rifampicin ist die Vorhersagekraft sowohl für ein sensibles als auch ein resistentes Ergebnis sehr hoch (95 bis 99 %), aber nicht 100 %. D. h., es werden sowohl resistente Stämme nicht erkannt als auch sensible Stämme als falsch resistent bewertet. Für die anderen Antibiotika ist die Aussagekraft eines resistenten Ergebnisses ebenfalls sehr hoch. Dagegen ist die Sensitivität, d. h. die Aussagekraft eines sensiblen Ergebnisses meistens geringer und liegt, abhängig vom Antibiotikum, bei etwa 60 bis 95 % [8, 28, 29]. Somit sind diese Verfahren sehr hilfreich zum frühzeitigen Erkennen einer MDR/XDR (Extensively Drug Resistant)-Tuberkulose, jedoch nicht geeignet für eine sichere Therapieempfehlung.

Daher müssen die Tuberkulosebakterien immer auch mit einer phänotypischen Testung untersucht werden.

Empfindlichkeitsprüfung von NTM

Die Empfindlichkeitsprüfung von NTM ist nicht ausreichend für alle Spezies validiert, es können jedoch gute Ergebnisse für viele langsam wachsende Mykobakterien erzielt werden. Dazu kann wie bei Tuberkulosebakterien das BACTEC MGIT 960-Flüssigkulturmedium verwendet werden. Für schnell wachsende Mykobakterien, wie z. B. *M. abscessus, M. chelonae* oder *M. fortuitum,* gibt es z. Zt. kein standardisiertes Verfahren. Empfindlichkeitsprüfungen von NTM sollten nur Laboratorien durchführen, die über ausreichend Erfahrung auf diesem Gebiet verfügen. Molekularbiologische Analysen zum Nachweis von Resistenzen bei NTM sind beschränkt auf sehr wenige Antibiotika (Mutationen im 23S rRNA-Gen zur Clarithromycin-Resistenz bei *M. avium* oder *M. abscessus*; erm-Gen bei *M. abscessus* zur induzierbaren Clarithromycin-Resistenz; Mutationen im rrs-Gen zur Amikacin-Resistenz) [30, 31].

Ausblick

Der Anstieg sowohl der Fallzahlen als auch der resistenten Stämme in den letzten Jahren in Deutschland [23] unterstreicht die Bedeutung von schnellen, einfachen und verlässlichen Methoden zum Nachweis und zur Resistenzbestimmung der Tuberkulose. In den letzten Jahren ist eine Vielzahl neuer Verfahren entwickelt worden, trotzdem gibt es aktuell immer noch keine patientennahen Tests (point of care-Diagnostik), die vor allem in Schwellenländern mit einer hohen TB-Inzidenz die Diagnostik deutlich verbessern könnten.

Interessenkonflikt

Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1 Medizinische Mikrobiologie – Tuberkulosediagnostik – Teil 4: Primärproben zur Tuberkulose- und Mykobatkeriosediagnostik – Qualitative und quantitative Anforderungen, Gewinnung, Transport und Aufbewahrung. DIN 58943-4, Ausgabe: 2009-02; Text Deutsch und Englisch

2 *Richter E, Beer J, Diel R* et al. MIQ 05: Tuberkulose Mykobakteriose. In: Podbielski A, Mauch H, Herrmann M, Kniehl E, Rüssmann H, Hrsg. Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. 2. Aufl. München: Elsevier, Urban und Fischer; 2010: 1 – 78

3 *Pfyffer GE, Palicova F.* Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection and staining procedures/472, Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. Manual of Clinical Microbiology Washington, DC: ASM Press; 2011

4 Mikroskopische Methoden zum Nachweis von Mykobakterien – Teil 32 (DIN 58943-32:1995)

5 Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen – (Infektionsschutzgesetz – IfSG). Vom 20.07.2000 (BGBl. I. S. 1045), zuletzt geändert durch Artikel 16 des Gesetzes vom 17. Dezember 2008 (BGBl. I. S. 2586).

6 *Ling DI, Flores LL, Riley LW* et al. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. PloS One 2008; 3: e1536

7 *Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D* et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med 2010; 363: 1005 – 1015

8 *Hillemann D, Rüsch-Gerdes S, Richter E.* Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of Mycobacterium tuberculosis strains and clinical specimens. J Clin Microbiol 2009; 47: 1767 – 1772

9 *Hillemann D, Rüsch-Gerdes S, Richter E.* Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis strains and clinical specimens. J Clin Microbiol 2007; 45: 2635 – 2640

10 Medizinische Mikrobiologie – Tuberkulosediagnostik – Teil 3: Kulturelle Methoden zum Nachweis von Mykobakterien. DIN 58943-3, Ausgabe: 2011-03; Text Deutsch und Englisch

11 WHO. WHO | TB diagnostics and laboratory strengthening – WHO policy. http://www.who.int/tb/laboratory/policy_liquid_medium_for_culture_dst/en/

12 *Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM.* New diagnostic methods for tuberculosis. Curr Opin Infect Dis 2009; 22: 174 – 182

13 Medizinische Mikrobiologie – Tuberkulosediagnostik – Teil 4: Primärproben zur Tuberkulose- und Mykobakteriosediagnostik – Qualitative und quantitative Anforderungen, Gewinnung, Transport und Aufbewahrung – Beiblatt 1: Verhütung von Kontaminationen der Patientenproben mit Mykobakterien bei der Aufarbeitung im Labor. DIN 58943-4 Beiblatt 1, Ausgabe: 2011-03; Text Deutsch und Englisch

14 *Rodrigues C, Almeida D, Shenai S* et al. Dedicated decontamination: A necessity to prevent cross contamination in high throughput mycobacteriology laboratories. Indian J Med Microbiol 2007; 25: 4 – 6

15 *Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A* et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997; 35: 907 – 914

16 Medizinische Mikrobiologie – Tuberkulosediagnostik – Teil 5: Molekularbiologische Identifizierung und Differenzierung von Tuberkulosebakterien. DIN 58943-5, Ausgabe: 2011-03; Text Deutsch und Englisch

17 *Richter E, Rüsch-Gerdes S, Hillemann D.* Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for identification of mycobacterial species from cultures. J Clin Microbiol 2006; 44: 1769 – 1775

18 *Kirschner P, Springer B, Vogel U* et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. J Clin Microbiol 1993; 31: 2882 – 2889

19 *Telenti A, Marchesi F, Balz M* et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 1993; 31: 175 – 178

20 *Adékambi T, Colson P, Drancourt M.* rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol 2003; 41: 5699 – 5708

21 *Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA* et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med 2007; 175: 367 – 416

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

22 *Schönfeld N*, *Haas W*, *Richter E* et al. Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie nichttuberkulöser Mykobakteriosen des Deutschen Zentralkomitees zur Bekämpfung der Tuberkulose (DZK) und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP). Pneumologie 2013; 67: 605 – 633
23 *Brodhun B*, *Altmann D*, *Hauer B* et al. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2013. 2014. http://edoc.rki.de/docviews/abstract.php?lang=ger&id=3736
24 *Rüsch-Gerdes S*, *Pfyffer GE*, *Casal M* et al. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis to classical second-line drugs and newer antimicrobials. J Clin Microbiol 2006; 44: 688 – 692. DOI 10.1128/JCM.44.3.688-692.2006
25 *Rüsch-Gerdes S*, *Domehl C*, *Nardi G* et al. Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to first-line drugs. J Clin Microbiol 1999; 37: 45 – 48
26 *Ritter C*, *Lucke K*, *Sirgel FA* et al. Evaluation of the AID TB resistance line probe assay for rapid detection of genetic alterations associated with drug resistance in Mycobacterium tuberculosis strains. J Clin Microbiol 2014; 52: 940 – 946
27 *Zhang Y*, *Shi W*, *Zhang W* et al. Mechanisms of pyrazinamide action and resistance. Microbiol Spectr 2013; 2: 1 – 12
28 *Kiet VS*, *Lan NTN*, *An DD* et al. Evaluation of the MTBDRsl test for detection of second-line-drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 2010; 48: 2934 – 2939
29 *Brossier F*, *Veziris N*, *Aubry A* et al. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis complex isolates. J Clin Microbiol 2010; 48: 1683 – 1689
30 *Griffith DE*, *Brown-Elliott BA*, *Langsjoen B* et al. Clinical and molecular analysis of macrolide resistance in Mycobacterium avium complex lung disease. Am J Respir Crit Care Med 2006; 174: 928 – 934
31 *Bastian S*, *Veziris N*, *Roux A-L* et al. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the Mycobacterium abscessus group by erm(41) and rrl sequencing. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 775 – 781

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.