

S. Rüsç-Gerdes • Forschungszentrum Borstel, Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien, Borstel

Diagnostik der Tuberkulose

Zum Thema

Die Mykobakteriendiagnostik dauert derzeit mit konventionellen Methoden bis zum Vorliegen einer positiven Tuberkulosekultur und nachfolgender Empfindlichkeitsprüfung durchschnittlich 4 Wochen. Bis zur Mitteilung eines negativen Ergebnisses vergehen 7 bis 8 Wochen. Auch wenn einzelne diagnostische Schritte durch neue Verfahren, z. B. mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) und Direktsonden schneller Resultate liefern, haben diese zur Zeit noch nicht die gewünschte hohe Sensitivität.

Die weltweit beunruhigende epidemiologische Situation des Infektionsrisikos für Tuberkulose lassen keinen Zweifel aufkommen an der notwendigen Weiterentwicklung von Methoden mit hoher Sensivität und Spezifität, die in möglichst kurzer Zeit gestatten, Tuberkulosebakterien nachzuweisen, zu differenzieren und auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Antituberkulotika zu testen.

Nachweis von Mykobakterien

Das Material und die Versandart sollte den in Deutschland geltenden Richtlinien entsprechen [1–4]. Mit Ausnahme von Magensaft (nur in vom Laboratorium zur Verfügung gestellten Röhrchen mit Phosphatpuffer versenden) und Gewebeproben oder Abstriche (mit ca. 1 ml phys. NaCl versetzen), werden alle Materialien nativ zur Untersuchung versandt. Zum Nachweis von Mykobakterien bei immunsupprimierten Patienten ist v. a. Venenblut das geeignete Untersuchungsgut. Für das radiometrische Verfahren werden hierfür 5 ml Citrat- oder Heparinblut benötigt.

Kulturverfahren

Obwohl das Ergebnis der Mikroskopie bereits nach ca. 1 h vorliegt, sollte immer eine Kultur angelegt werden, da es mit Hilfe dieser Methode nicht möglich ist, zwischen lebenden und toten Bakterien sowie zwischen Tuberkulosebakterien und ubiquitären Mykobakterien zu unterscheiden.

Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien vermehren Mykobakterien sich sehr langsam (Generationszeit von ca. 20 h). Mit Ausnahme von steril gewonnenem Untersuchungsgut muß daher jedes Material vorbehandelt werden, da die Begleitflora sonst die Nährmedien verunreinigen würde. Durch zahlreiche Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß heute N-Acetyl-L-Cystein-NaOH die Vorbehandlungsmethode der Wahl ist. Mit früher verwendeten Methoden wurden nicht nur Tuberkulosebakterien, sondern v. a. ubiquitäre Mykobakterien abgetötet [5, 6].

Nach der Vorbehandlung werden sowohl feste als auch flüssige Nährmedien beimpft. Nur diese Kombination führt zu einer hohen Positivrate. Als Flüssigmedium ist z. Z. in Deutschland am verbreitetsten das radiometrische Verfahren (BACTEC 460 TB mit Midd-

lebrook-7H9-Medium). Es beruht auf der Messung des $^{14}\text{CO}_2$, das durch wachsende Bakterien aus markierter Palmitinsäure freigesetzt und als Wachstumsindex bestimmt wird [7]. Daneben gibt es zahlreiche andere Flüssigmedien, die in Zukunft das BACTEC 460 TB-System ersetzen werden. Im Durchschnitt liegt ein positives Ergebnis mit Hilfe der Festkultur nach 3–4 Wochen, mit dem BACTEC-System dagegen nach 1–2 Wochen vor.

„Polymerase chain reaction“ (PCR) und Direktsonden

Diese Methoden basieren auf dem Nachweis von DNA oder RNA aus der Bakterienzelle. Hierfür wird die Nukleinsäure durch bestimmte enzymatische Verfahren vermehrt, so daß schon eine geringere Anzahl von Mykobakterien ausreicht, um ein positives Ergebnis zu erzielen. Ein weiterer Vorteil ist die Schnelligkeit; das Ergebnis liegt bereits in 1 bis 2-Tagen vor.

Als käufliche Testkits stehen AMPLICOR (La Roche) und AMTDT (Genprobe) zur Verfügung [8]. Ausreichend evaluiert und publiziert sind diese Testkits allerdings nur für pulmonologisches Material.

Schwierigkeiten bereiten v. a. Materialien wie Pleurapunktate und Liquores, bei denen es falsch-negative Resultate geben kann. Wahrscheinlich liegt es an bestimmten Hemmstoffen im Untersuchungsgut, die die Amplifikation verhindern, so daß nach effektiven Vorbehandlungsmethoden z. Z. gesucht wird.

Eine Tuberkulosedagnostik ausschließlich mit diesen molekularbiologischen Methoden durchzuführen, kann und darf zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht erfolgen, da

Dr. Sabine Rüsç-Gerdes
Forschungsinstitut Borstel, Parkallee 18,
D-23845 Borstel

1. ausreichende Evaluationen für alle Arten von Materialien nicht vorliegen,
2. die beiden genannten Testkits ausschließlich Tuberkulosebakterien (nicht ubiquitäre Mykobakterien) detektieren,
3. kein Material für die Empfindlichkeitsprüfung vorliegt und
4. auch nicht lebende Bakterien (Therapiekontrolle) nachgewiesen werden.

Gezielt eingesetzt, können diese Methoden natürlich zu einer schnellen Diagnostik führen, allerdings sollte jedes Ergebnis mit dem behandelnden Arzt besprochen werden.

Immunologische Nachweismethoden

Zur Zeit gibt es keine ausreichend sensitiven und spezifischen immunologischen Methoden in der TB-Diagnostik.

Typendifferenzierung

Bei jedem Nachweis von Mykobakterien sollte immer eine Typendifferenzierung erfolgen, da es neben den Tuberkulosebakterien (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, BCG) noch ca. 80 verschiedene ubiquitäre Mykobakterienarten gibt. Dieses geschieht heute mit konventionellen Methoden (Kombination von biochemischen Reaktionen, Temperaturverhalten usw.) und mit Hilfe von Gensonden, die speziesspezifische Sequenzen der ribosomalen RNA detektieren [9]. Mit der erstgenannten Methode liegt das Ergebnis nach 3–4 Wochen vor, mit den Sonden bereits nach 2 h. Allerdings gibt es diese Sonden z. Zt. nur für Tuberkulosebakterien, *M. gordonae*, *M. kansasii* und für *M. avium*-Komplex.

Mit Hilfe der Sequenzierung ist es dagegen möglich, annähernd alle Arten zu bestimmen. Diese Methode basiert auf der Kenntnis der RNA-Basensequenz, die in bestimmten Abschnitten spezifisch für eine Art ist [10]. Das Ergebnis liegt in 2 Tagen vor.

Daneben ist es möglich, mit Hilfe von chromatographischen Methoden Mykobakterien zu differenzieren. So können mit der „high performance liquid chromatography“ (HPLC) qualitative und quantitative Unterschiede in der Mykolsäurezusammensetzung der Zellwand festgestellt [11] und mit der „gas liquid chromatography“ (GLC) die

zellulären Fettsäuren bestimmt werden [12].

Tabelle 1 zeigt die am häufigsten isolierten, ubiquitären Mykobakterien und ihre klinische Bedeutung.

Da ubiquitäre Mykobakterien überall in der Umwelt vorkommen können und damit auch im Untersuchungsgut nachgewiesen werden, muß immer geklärt werden, ob es sich um eine Zufallsisolierung (Kolonisation) oder aber um eine Infektion handelt. Für eine Infektion müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

1. mehrere Isolate desselben Keims in ausreichender Koloniezahl;
2. es muß ein klinisches Bild für eine Mykobakteriose vorhanden sein.

Empfindlichkeitsprüfung

Auch in Deutschland werden resistente Stämme von Tuberkulosebakterien isoliert, wenn auch nicht in dem Umfang, wie aus anderen Ländern publiziert wird [13]. Ein Vergleich der Daten aus den Jahren 1993 und 1996 ist in Tabelle 2 dargestellt. Allerdings handelt es sich nur um Zahlen aus Borstel.

Die Daten für 1991 und 1992 sind vom Arbeitskreis Mykobakterien bereits publiziert worden [14].

Auf jeden Fall sollte von jedem Erstisolat eine Empfindlichkeitsprüfung durchgeführt werden. Dieses geschieht entweder mit dem Löwenstein-Jensen-Nährboden oder mit dem bereits geschilderten radiometrischen Verfahren. Ein Ergebnis mit dem Festmedium liegt nach 3–4 Wochen vor, während BAC-

Tabelle 1

Mykobakterien und ihre klinische Bedeutung

| Art | Klinische Relevanz |
|----------------------------|--|
| <i>M. kansasii</i> | Häufig pathogen |
| <i>M. marinum</i> | Häufig pathogen (Haut) |
| <i>M. gordonae</i> | Häufig nicht pathogen |
| <i>M. xenopi</i> | Häufig nicht pathogen |
| <i>M. chelonae</i> | Häufig nicht pathogen |
| <i>M. fortuitum</i> | Häufig nicht pathogen |
| <i>M. terrae</i> | Häufig nicht pathogen |
| <i>M. nonchromogenicum</i> | Häufig nicht pathogen |
| <i>M. flavescens</i> | Häufig nicht pathogen |
| <i>M. szulgai</i> | Häufig pathogen |
| <i>M. avium-complex</i> | Häufig pathogen, v. a. bei HIV-Patienten |
| <i>M. celatum</i> | Häufig pathogen |

TEC bereits nach 4–7 Tagen ein Resultat liefert. Beide Methoden sind allerdings uneingeschränkt nur für Tuberkulosebakterien anwendbar. Nur für diese wurden die in vitro gewonnenen Daten mit denen in vivo korreliert.

Neue molekularbiologische Methoden zur Resistenzbestimmung, mit denen in sehr kurzer Zeit ein Ergebnis vorliegt, sind z. Zt. noch in der Erprobung. So ist es möglich, Resistenzgene mit Hilfe der PCR zu bestimmen [15]. Bei einem weiteren Verfahren wird mit Hilfe von Phagen oder Plasmiden das Luciferasegen in die Mykobakterien-DNA integriert. Wachstum von Mykobakterien in Gegenwart von Chemotherapeutika kann dann biolumetrisch gemessen werden [16].

Eine Zusammenfassung der Tuberkulosedagnostik ist in Abb. 1 dargestellt.

Fazit für die Praxis

Material zum Nachweis von Mykobakterien muß, ausgenommen von sterilen Materialien, von der Begleitflora durch N-Acetyl-L-Cystein-NaOH dekontaminiert werden. Die Mikroskopie erlaubt zwar den Nachweis von Mykobakterien, nicht jedoch die Differenzierung zwischen lebenden und toten sowie Tuberkulose- oder ubiquitären Mykobakterien.

Kulturen müssen in flüssigen und festen Medien angesetzt werden. Als Flüssigmedium kommt das radiometrische Verfahren zur Anwendung, das beim Vorliegen von Tuberkulosebakterien im Durchschnitt nach 2 Wochen Ergebnisse liefert, während dies bei Festmedien 3–4 Wochen dauert. Die Ty-

Tabelle 2

Anzahl der resistenten *M. tuberculosis*-Stämme (Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien, Borstel)

| Gesamtzahl der getesteten <i>M. tuberculosis</i> -Stämme = Patienten | resistent gegen | | | | | | Gesamtzahl der resistenten <i>M. tuberculosis</i> -Stämme = Patienten |
|--|-----------------|------------|------------|------------|----------------|----------------|---|
| | INH | RMP | EMB | PZA | multiresistent | | |
| | | | | | mit INH + RMP | ohne INH + RMP | |
| 1993: 2592 100% | 128 4,9% | 52 2,0% | 21 0,8% | 21 0,8% | 47 1,8% | 23 0,9% | 152 5,9% |
| 1994: 2495 100% | 158 6,3% | 72 2,9% | 33 1,3% | 43 1,7% | 70 2,8% | 20 0,8% | 171 6,8% |
| 1995: 2212 100% | 161 7,3% | 95 4,3% | 54 2,4% | 50 2,3% | 87 3,9% | 34 1,5% | 186 8,4% |
| 1996: 2156 100% | 180 8,3% | 91 4,2% | 50 2,3% | 53 2,4% | 85 3,9% | 38 1,8% | 202 9,4% |

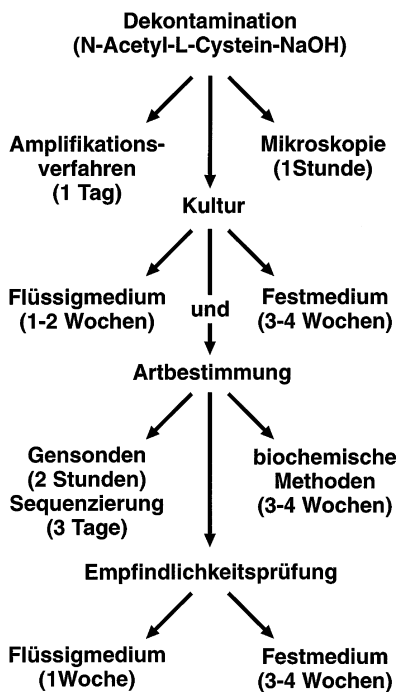


Abb. 1 ▲ Konventionelle Mykobakteriendiagnostik

pendifferenzierung nimmt mit konventionellen Methoden weitere 3 bis 4 Wochen in Anspruch, während es mit Hilfe von Gensonden in 2 Stunden möglich ist. Allerdings gibt es diese Sonden nur für den Nachweis von 4 Mykobakterienarten.

Von jedem Isolat sollte eine Empfindlichkeitsprüfung durchgeführt werden. Es ist möglich, nicht nur Einzelmedikamente, son-

dern auch Tuberkulostatika in Kombinationen zu testen. Je nach Verfahren dauert die Resistenzbestimmung 4 bis 7 Tage (radiometrisches Verfahren), bzw. 3 bis 4 Wochen (feste Nährmedien).

Literatur

1. Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose (1994) 20. Informationsbericht, Eigenverlag
2. Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose (1991) **Die Bakteriologie der Tuberkulose**. Pneumologie Sonderheft 13: 753–774
3. DGHM-Verfahrensrichtlinien für die Mikrobiologische Diagnostik (1990) **Isolierung und Identifizierung von Mycobacteriaceae**. Mycobacteriaceae 2.17, Lieferung 5. Fischer
4. DIN-Norm 58943, Teil 9 (1992) **Methoden zur Isolierung von Mykobakterien**. Beuth, Berlin Köln
5. Rüsck-Gerdes S et al. (1987) **2. Isolierung von Mycobacterium tuberculosis aus Sputum. Vergleich der radiometrischen mit der konventionellen Methode**. Prax Klin Pneumol 41: 219–222
6. Rüsck-Gerdes S et al. (1988) **Untersuchung mit dem System Bactec 460. 3. Isolierung von Mycobacterium tuberculosis aus Sputum. Vergleich der radiometrischen mit der konventionellen Methode nach Pankreatin-De-sogen-Laurylsulfat- und N-Acetyl-L-Cystein-NaOH-Vorbehandlung**. Prax Klin Pneumol 42: 172–174
7. Roberts GD, Goodman NL et al. (1983) **Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis from acid-fast smear-positive specimens**. J Clin Microbiol 18: 689–696
8. Jonas V et al. (1993) **Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis directly from sputum sediments by amplification of rRNA**. J Clin Microbiol 31: 2410–2416
9. Reisner BS, Gatson AM, Woods GL (1994) **Use of Gen-Probe AccuProbes to identify Mycobacterium avium complex, Mycobacterium tuberculosis complex, Mycobacterium kansasii, and Mycobacterium gordonae directly from BACTEC TB broth cultures**. J Clin Microbiol 32: 2995–2998
10. Böttger EC (1989) **Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA**. FEMS Microbiol Lett 65: 171–176
11. Thibert L, Lapiere S (1993) **Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria**. J Clin Microbiol 31: 1759–1763
12. Tisdall PA et al. (1982) **Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas-liquid chromatography: a 10-month follow-up study**. J Clin Microbiol 16: 400–402
13. Frieden R, Sterling T, Paabloz-Menez A et al. (1993) **The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York**. NEJM 328: 521–526
14. Arbeitskreis Mykobakterien: Erhebungen zur Resistenzlage der Tuberkulosebakterien in Deutschland für das Jahr 1991 und 1992. Pneumologie 48: 28–29
15. Telenti A et al. (1993) **Direct, automated detection of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis**. Antimicrob Agents Chemother 37: 2054–2058
16. Cooksey RC et al. (1995) **Bioluminescence method to evaluate antimicrobial agents against Mycobacterium avium**. Antimicrob Agents Chemother 39: 754–756