

Aus der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. Jan Rupp

In Zusammenarbeit mit dem

Forschungszentrum Borstel

Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

Direktor: Prof. Dr. S. Ehlers

**Evaluation eines auf LATE-PCR basierenden Diagnostik-
Verfahrens in der mykobakteriellen Routinediagnostik**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Aus der Sektion Medizin-

Vorgelegt von

Carsten Haasis

Aus Sulingen

Lübeck 2018

- 1. Berichtstatterin/Berichtstatter: Prof. Dr. med. Jan Rupp**
- 2. Berichtstatterin/Berichtstatter: Prof. Dr. med. Jan Kramer**

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.01.2020

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

„Im Grunde genommen ist Naturwissenschaft nichts
Anderes, als die Suche nach **Wahrheit**“

-Zitat aus dem „Labor Journal“ September 2017-

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. Tuberkulose – aktuelle Problematik	1
1.2. Epidemiologie der Tuberkulose	1
1.3. Ätiologie der Tuberkulose	4
1.4. Erscheinungsformen der Tuberkulose	5
1.5. Therapie der Tuberkulose	5
1.6. Resistenz gegenüber Tuberkulose	6
1.6.1. Resistenzmechanismen.....	7
1.7. Mikrobiologischer Erregernachweis	8
1.7.1. Mikroskopie	8
1.7.2. Kultur	9
1.7.3. Molekulare Verfahren	10
1.7.4. Labornetzwerk.....	11
1.8. Mikrobiologischer Resistenznachweis	11
1.8.1. Phänotypische Resistenztestung.....	11
1.8.2. Genotypische Resistenztestung	11
1.9. Molekulare Verfahren	13
1.10. FluoroType® MTBDR	17
1.11. Fragestellung.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Untersuchungsentwurf	21
2.1.1. Untersucher	22

2.1.2. Untersuchungsort	22
2.2. Material	23
2.2.1. Untersuchungsmaterial	23
2.2.2. Material für die DNA-Isolation nach FluoroLyse®-Methode	25
2.2.3. Material für die DNA-Isolation nach intern entwickelter Methode	26
2.2.4. Material für die DNA-Analyse mittels FluoroType®-Verfahren	27
2.2.5. Material für die DNA-Analyse mittels Genotype® MTBDR <i>plus</i>	28
2.2.6. Material für die Sequenzierung nach Sanger	29
2.2.7. Für die Gelelektrophorese verwendete Reagenzien/Chemikalien	30
2.2.8. In der Arbeit verwendete Testkits	31
2.3. Methoden	33
2.3.1. DNA-Isolation	33
2.3.2. FluoroType®-Verfahren	34
2.3.3. Genotype® MTBDR <i>plus</i>	35
2.3.4. Sequenzierung	37
2.3.5. Datensammlung	40
2.3.6. Statistische Auswertung	40
2.3.7. Ethik	41
3. Ergebnisse	42
3.1. Sensitivität und Spezifität zum Nachweis von MTBC und Resistenzen von respiratorischem Primärmaterial (Sputum)	42
3.1.1. Erregernachweis	42
3.1.2. Resistenznachweis	43
3.2. Sensitivität und Spezifität zum Nachweis von MTBC von extrapulmonalem Primärmaterial (Lymphknoten)	45
3.3. Sensitivität und Spezifität zum Nachweis von Resistenzen von kulturellen Isolaten	46

3.4. Vergleich zweier DNA-Extraktionsmethoden zur Anpassung an routinediagnostische Abläufe am NRZ Borstel	48
4. Diskussion	49
4.1. Evaluation der Ergebnisse.....	49
4.2. Vergleich des FluoroType® MTBDR mit aktuell empfohlenen NATs	49
4.3. Strukturelle Analyse des FluoroType® MTBDR	52
4.4. Stärken und Schwächen dieser Arbeit	53
4.5. Resümee.....	53
5. Zusammenfassung.....	55
6. Literaturverzeichnis.....	56
7. Appendix	63
7.1. Ethikvotum.....	63
7.2. Ergebnistabellen.....	64
7.2.1. Respiratorisches Primärmaterial (Sputum)	64
7.2.2. Extrapulmonales Primärmaterial (Lymphknoten).....	67
7.2.3. Kulturelle Isolate	68
7.2.4. Vergleich zweier DNA-Extraktionsmethoden	71
8. Danksagungen	73
9. Lebenslauf Carsten Haasis	74
9.1. Publikationsliste.....	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Gegenüberstellung phänotypischer und genotypischer Nachweismethoden ..	12
Tabelle 1-2: Vergleich häufig eingesetzter NATs	16
Tabelle 2-1: Untersuchungsabschnitte.....	22
Tabelle 2-2: Material für die DNA-Isolation nach FluoroLyse®-Methode	25
Tabelle 2-3: Material für die DNA-Isolation nach intern entwickelter Methode.....	26
Tabelle 2-4: Material für die DNA-Analyse mittels FluoroType®-Verfahren	27
Tabelle 2-5: Material für die DNA-Analyse mittels GenoType® MTBDRplus	28
Tabelle 2-6: Material für die Sequenzierung nach Sanger	29
Tabelle 2-7: Für die Gelelektrophorese verwendete Reagenzien/Chemikalien	30
Tabelle 2-8: in der Arbeit verwendete Testkits	31
Tabelle 2-9: PCR-Protokoll für Primärmaterial in Vorbereitung auf den GenoType® MTBDRplus	35
Tabelle 2-10: PCR-Protokoll für Kulturmateriale in Vorbereitung auf den GenoType® MTBDRplus	36
Tabelle 2-11: Hybridisierungsprotokoll	37
Tabelle 2-12: PCR-Protokoll für Sequenzierung (vor Aufreinigung).....	38
Tabelle 2-13: PCR-Protokoll für Sequenzierung (nach Aufreinigung).....	39
Tabelle 3-1 Vergleich Sensitivität und Spezifität von FluoroType® MTBDR und GenoType® MTBDRplus von respiratorischem Primärmaterial.....	43
Tabelle 3-2 Vergleich Sensitivität und Spezifität FluoroType® MTBDR und GenoType® MTBDR von extrapulmonalem Primärmaterial	45
Tabelle 3-3 Vergleich Sensitivität und Spezifität FluoroType® MTBDR und GenoType® MTBDRplus von kulturellen Isolaten	46
Tabelle 7-1 Analyseergebnisse von respiratorischem Primärmaterial (Sputum) zum Nachweis von MTBC-DNA und Resistenzen	64
Tabelle 7-2 Analyseergebnisse von extrapulmonalem Primärmaterial (Lymphknoten) zum Nachweis von MTBC-DNA	67
Tabelle 7-3 Analyseergebnisse von kulturellen Isolaten zum Nachweis von Resistenzen gegenüber INH und RMP	68
Tabelle 7-4 Vergleich zweier DNA-Extraktionsmethoden mittels FluoroType® MTBDR	71

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 globale Inzidenz der TB pro 100.000 Einwohner pro Jahr (WHO 2017)	2
Abb. 1-2 globale Inzidenz der MDR-TB pro Jahr (WHO 2017).....	3
Abb. 1-3 schematischer Aufbau der Zellwände von Mykobakterien im Vergleich mit Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien.	4
Abb. 1-4 schematischer Ablauf des FluoroType®-Verfahrens, modifiziert nach Herstellerbroschüre.....	18
Abb. 2-1 schematischer Arbeitsablauf zu Fragestellungen a-c	21

Abkürzungsverzeichnis

CFU – colony forming units (d.: Kolonie bildende Einheiten)

DS-TB – drug susceptible tuberculosis (d.: Medikamenten sensible Tuberkulose)

EPTB – extrapulmonale Tuberkulose

EMB – Ethambutol

HBC – high burden country (d.: Hochinzidenzland)

INH – Isoniazid

Kg KG – Kilogramm Körpergewicht

KI – Konfidenzintervall

LATE-PCR – Linear-after-the-exponential-PCR (d.: “Linear-nach-Exponentiellem- PCR”)

LIMS – Labor-Informations- und Management-System

LOD – limit of detection (d.: Detektionsschwelle)

LPA – Line probe assay (d.: Streifenhybridisierungstest)

MDR-TB – Multi-drug resistant tuberculosis (d.: multiresistente Tuberkulose)

MGIT – Mycobacterial Growth Indicator Tube® (d.: myko. Wachstumsindikatorröhrchen)

MTBC – *Mycobacterium tuberculosis* complex

NATs – Nukleinsäureamplifikationstestverfahren

NRZ – Nationales Referenzzentrum

NTM– Nicht-tuberkulöse Mykobakterien

pDST – phenotypic drug susceptibility testing (d.: phänotypische Resistenztestung)

PTB – pulmonale Tuberkulose

PZA – Pyrazinamid

RMP – Rifampicin

RR-TB – rifampicin resistant tuberculosis (d.: Rifampicin resistente Tuberkulose)

SSM- – sputum smear microscopy negative (d.: mikroskopisch Negative aus Sputum)

TB – Tuberkulose

WHO –World Health Organisation (d.: Weltgesundheitsorganisation)

XDR-TB – extensive drug resistant tuberculosis (d.: extrem resistente Tuberkulose)

1. Einleitung

1.1. Tuberkulose – aktuelle Problematik

Tuberkulose (TB) ist, wenn auch in den westlichen Medien wenig beachtet, eine der größten Gesundheitsherausforderungen weltweit (Global Fund 2018). Mit jährlich ca. 10,4 Millionen neu Erkrankten ist TB neben AIDS und Malaria global eine der drei häufigsten Infektionskrankheiten (WHO 2017; Global Fund 2018). Obwohl TB im Prinzip heilbar ist (Tiberi et al. 2017) und günstige und effektive Therapiemöglichkeiten verfügbar sind (Grange und Zumla 2002), sterben jedes Jahr etwa 1,7 Millionen Menschen an den Folgen von TB (WHO 2017). Damit ist TB die neunthäufigste Todesursache weltweit (WHO 2017). Globalisierung, Flüchtlingsströme und vermehrte Transportaufkommen tragen zur Verbreitung der TB bei. Die Weltgesundheitsorganisation (engl.: „World Health Organisation“, WHO) verfolgt mit der „End-TB-strategy“ bis 2035 das Ziel, die Inzidenz- und Mortalitätsrate der TB um bis zu 95% zu senken (WHO 2015a). Der Erfolg der „End-TB-Strategy“ wird unter anderem davon abhängen, ob das seit den 90er Jahren zunehmende Auftreten von multiresistenten TB-Fällen (engl.: „multi-drug-resistant tuberculosis“, MDR-TB) eingedämmt werden kann (WHO 2015a). Eine MDR-TB ist definiert als TB-Erkrankung verursacht durch einen Erreger mit Resistenzen gegenüber den zwei wichtigsten Erstlinienmedikamenten Isoniazid (INH) und Rifampicin (RMP) (Falzon et al. 2015; WHO 2015a; Nourzad et al. 2017; WHO 2017). Die MDR-TB ist gegenüber der Medikamentensensiblen Variante (engl.: Drug-susceptible-TB, DS-TB) mit höheren Kosten, längeren Therapiedauern und erhöhter Mortalität verbunden (Gandhi et al. 2006). Um die TB effektiv zu behandeln, bedarf es guter, universal einsetzbarer Diagnostika, die über den Nachweis des Erregers *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) hinaus schnelle Auskunft über das Vorliegen von Resistenzen geben (WHO 2015a). In dieser Arbeit soll das FluoroType®-Verfahren, ein neues, auf LATE-PCR („linear-after-the-exponential-PCR“, s. Abschnitt 1.10.) basierendes Diagnostik-Verfahren zur Detektion von MTBC-DNA und potentiellen Resistenzen gegenüber INH und RMP, evaluiert und verglichen werden.

1.2. Epidemiologie der Tuberkulose

Die Inzidenz der TB-Erkrankungen ist weltweit leicht rückläufig (WHO 2017). 90% der geschätzten 10 Millionen neu aufgetretenen TB-Erkrankungen pro Jahr konzentrieren sich heute vor allem auf 30 Hochinzidenzländer (engl.: „high burden countries“, HBC). 22 dieser

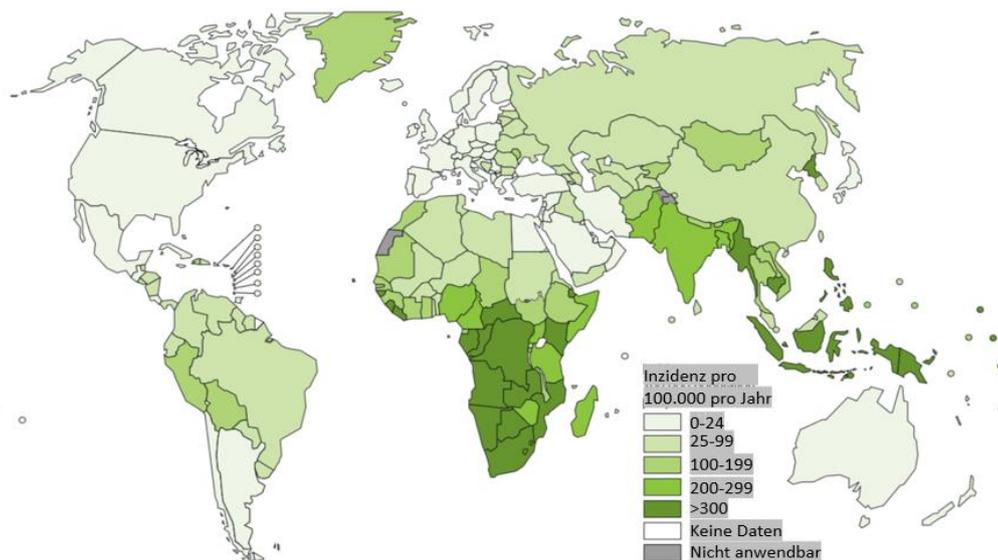


Abb. 1-1 globale Inzidenz der TB pro 100.000 Einwohner pro Jahr (WHO 2017)

HBC liegen in Subsahara-Afrika und Südostasien (s. auch Abb. 1-1; WHO 2017). Die TB ist eine Erkrankung, die stark mit Armut und häufig mit einer HIV-Erkrankung assoziiert ist (Kayser et al. 2014): Der Großteil (95%) der TB-Patienten leben in Niedriglohnländern, geschätzte 90% in Armut (WHO 2017).

Ein zunehmendes Auftreten von MDR-TB (z.B. Ausbruchsgeschehen in New York City 1992) und die steigende HIV-assoziierte TB-Inzidenz führten dazu, dass die Vereinten Nationen die TB-Epidemie im Jahre 1993 zur „öffentlichen Gesundheitskrise“ erklärten (Davies 2000; Grange und Zumla 2002). Seither wurden in 153 Nationen Patienten mit MDR-TB diagnostiziert (Nourzad et al. 2017). Mittlerweile schätzt die WHO die Zahl der MDR-TB-Fälle auf 490.000 jährlich. Davon treten die meisten (47%) in den bevölkerungsreichen Ländern Indien, China und Russland auf (s. auch Abb. 1-2, WHO 2017). Resistente Formen der TB haben gegenüber der DS-TB eine schlechtere Prognose (Greinert et al. 2007). Vereinfacht gilt: Je ausgeprägter die Medikamentenresistenz, desto ungünstiger die Prognose (Greinert et al. 2007). Patienten mit einer extrem arzneimittelresistenten TB (TB-Erreger, die auch gegenüber Zweitlinienmedikamenten resistent sind, engl: „extended drug resistant TB“, XDR-TB) haben unter optimaler Therapie nur eine 30% Chance auf Heilung durch Chemotherapeutika (WHO 2017). Dies entspricht den Selbstheilungsraten vor Einführung antibakterieller Therapieregime.

Auch Resistenzen gegenüber einem Erstlinienmedikament (z.B. INH) sind bereits mit einer schlechteren Prognose verbunden (Gegia et al. 2017). Die schlechteste Prognose haben Patienten, deren Erreger resistent gegenüber RMP sind (Tomasicchio et al. 2016). Der Anteil

der RMP-Monoresistenzen ist verglichen mit dem Anteil der INH-Monoresistenzen eher gering (WHO 2017). INH-Monoresistenzen treten im globalen Mittel in 8,5% aller TB-Fälle auf, RMP-Monoresistenzen in ca. 2% aller Fälle (WHO 2017). Die Häufigkeit des Auftretens von INH-Monoresistenzen ist regional unterschiedlich. In Südostasien treten INH-Monoresistenzen mit ca. 5% am seltensten auf, während im Gebiet der ehemaligen Sowjetunion Prävalenzen von bis zu 20% vorliegen (Crudu et al. 2012; Gegia et al. 2017; Stagg et al. 2017; WHO 2017).



Abb. 1-2 globale Inzidenz der MDR-TB pro Jahr (WHO 2017)

Etwa ein Drittel aller TB-Fälle bleiben undiagnostiziert. Von den im Jahr 2016 geschätzten 10,4 Millionen Neuerkrankten wurden nur 6,6 Millionen TB-Fälle diagnostiziert und gemeldet (WHO 2017). Ähnlich verhält es sich beim Nachweis der MDR-TB: 153.000 der geschätzten 490.000 Fälle wurden als MDR-TB diagnostiziert (WHO 2017). Die Gründe für die Diskrepanz zwischen gemeldeten und geschätzten TB- und MDR-TB-Fällen sind vielfältig: unterentwickelte Labornetzwerke bzw. Infrastruktur, suboptimale Gesundheitsversorgung der betroffenen Bevölkerung und daraus resultierende, frühzeitige Todesfälle (Ormerod 2005; Naidoo et al. 2017). Der frühzeitige Erregernachweis durch einen hochempfindlichen und hochspezifischen Test ist entscheidend, wenn sich ein Patient mit unspezifischen Symptomen vorstellt. Der Kontakt mit dem öffentlichen Gesundheitssystem findet wegen begrenzter finanzieller Mittel oft nur ein einziges Mal statt, sodass es wichtig ist, diese Gelegenheit zur Diagnose mit einem aussagekräftigen Test bestmöglich zu nutzen. Weltweit wurden im Jahr 2016 schätzungsweise 41% aller TB-Fälle auf eine RMP-Resistenz bzw. Multiresistenz geprüft. Im selben Jahr wurde in etwa 22% aller MDR-TB-Fälle eine adäquate Therapie eingeleitet (WHO 2017).

1.3. Ätiologie der Tuberkulose

Die TB ist eine durch Aerosole übertragbare Erkrankung (Ziegler et al. 2012). Als Erreger der TB sind acht Spezies von Mykobakterien, zusammengefasst unter dem Terminus MTBC, bekannt (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis ssp. bovis*, *M. bovis ssp. caprae*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, Impfstamm *M. bovis BCG*). Die meisten (95%) Erkrankungen im Menschen werden von *M. tuberculosis* verursacht (Hoffmann et al. 2015). Die Erreger der TB zeichnen sich vor allem durch ihr langsames Wachstum (Brennan und Nikaido 1995), Säurefestigkeit in der Anfärbung (Neelsen 1883), ein hohes Maß an genomischer Übereinstimmung (Brosch et al. 2002) und ihren besonderen Wandaufbau (s. auch Abb. 1-3) aus (Jarlier und Nikaido 1994). Dieser macht MTBC gegenüber vielen Antibiotika und Desinfektionsmitteln unempfindlich (Brennan und Nikaido 1995). Während andere Bakterien durchschnittlich eine Generationenzeit von Minuten bis wenigen Stunden haben, wachsen die unbeweglichen Stäbchen des MTBC bei einer Generationenzeit von 12-18 Stunden über mehrere Wochen, bevor eine Festkultur makroskopisch Wachstum zeigt (Kayser et al. 2014). Dies ist unter anderem bedingt durch die besonders dicke, stark lipidhaltige Zellwand (s. auch Abb. 1-3), die eine Nährstoffaufnahme verlangsamt und das Bakterium vor Umwelteinflüssen abschirmt (Brennan und Nikaido 1995).

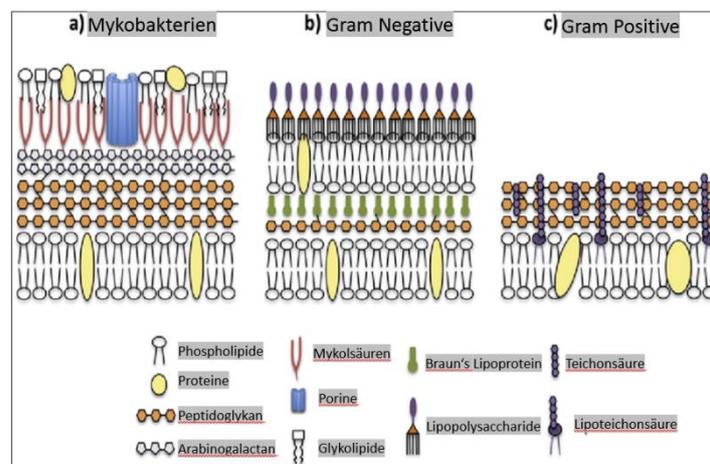


Abb. 1-3 schematischer Aufbau der Zellwände von Mykobakterien im Vergleich mit Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien.

Die Zellwand von Mykobakterien zeichnet sich durch das Vorliegen von langkettigen Mykolsäuren (Kayser et al. 2014) aus, die über Arabinogalactanketten mit einer Schicht Peptidoglykan verlinkt sind. Pathognomonisch sind auch die niedrige Anzahl an Porinen (Mailaender et al. 2004) und die Oberflächenmoleküle Phosphoinositolmannose und Lipoarabinomannan (Brennan und Nikaido 1995). Modifiziert nach Silva et al. 2016.

1.4. Erscheinungsformen der Tuberkulose

Die Eintrittspforte des TB-Erregers ist am häufigsten die Lunge. In 85% aller TB-Erkrankungen manifestiert sich eine TB-Erkrankung zunächst in der Lunge (WHO 2017). Prinzipiell kann jedes Organ betroffen sein (Arastéh et al. 2009). Man unterscheidet zwischen pulmonaler und extrapulmonaler TB (PTB bzw. EPTB). Eine PTB äußert sich durch chronischen (>2 Wochen), produktiven Husten (Steingart et al. 2014). Weitere Symptome sind Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust, Inappetenz und Hämoptysen (Arastéh et al. 2009). Die Symptome entwickeln sich über einen längeren Zeitraum, manchmal bleiben Symptome jedoch auch gänzlich aus (Hoffmann et al. 2015). EPTB-Fälle machen etwa 15% aller TB-Fälle aus (Chang et al. 2012; WHO 2017). Diese Rate ist bei HIV-Koinfizierten höher (Kumari et al. 2016). Häufigste Manifestation der EPTB ist eine zervikale Lymphadenitis (Biadglegne et al. 2013). EPTB sind häufig paucibacillär (= haben eine niedrige Bakterienlast), was einen Keimnachweis und die damit verbundene mikrobiologische Diagnostik erschwert (Kumari et al. 2016).

1.5. Therapie der Tuberkulose

Die Therapie der TB ist abhängig vom Resistenzprofil der TB-Erreger, beruht aber stets auf einer Kombination mehrerer wirksamer Antibiotika, um Resistenzentwicklungen vorzubeugen (Jarlier und Nikaido 1994; Gillespie 2002; Daniel 2006; Loddenkemper und Hauer 2010; Cambau und Drancourt 2014). Eine gegenüber anderen bakteriellen Krankheiten relativ lange Therapiedauer (Monate) ist notwendig, um auch metabolisch inaktive Erreger zu eradizieren. Ist eine TB gegenüber den Erstlinienmedikamenten INH, RMP, Pyrazinamid (PZA) und Ethambutol (EMB) sensibel, empfiehlt die WHO eine Vierfachkombination von INH, RMP, PZA und EMB für zwei Monate (Intensivphase), gefolgt von einer Zweifachtherapie mit INH und RMP für weitere vier Monate (Kontinuitätsphase) (Singhal und Myneedu 2015; Gygli et al. 2017; Tiberi et al. 2017; WHO 2017). Dieses sechsmonatige Standard-Therapieschema erzielt durchschnittlich Heilungsraten von 83% (Davies 2000; Ormerod 2005; Greinert et al. 2007; Falzon et al. 2015; WHO 2017). Liegt hingegen eine Resistenz gegenüber INH und RMP vor, sind alternative Behandlungsschemata notwendig. Diese werden als Kombinationstherapien von vier bis fünf Medikamenten, darunter ein Fluorchinolon und ein Medikament der Gruppe „injizierbare Medikamente,“ für 9-20 Monate verabreicht (WHO 2016c). Eine Therapie einer MDR-TB ist langwieriger als eine Therapie von DS-TB, birgt stärkere Nebenwirkungen und bis zu zweihundertfache Behandlungskosten (Falzon et al. 2015).

Zudem sind Therapieerfolge nur bei 50% der behandelten MDR-TB-Fälle zu verzeichnen (Koul et al. 2011; Falzon et al. 2015; Nourzad et al. 2017; WHO 2017). Um eine TB adäquat und erfolgreich zu behandeln ist daher die Durchführung einer Resistenztestung zur Auswahl des Therapieregimes unbedingt notwendig.

1.6. Resistenz gegenüber Tuberkulose

Im Gegensatz zu anderen Bakterien entstehen Resistenzen in Mykobakterien nicht durch einen Transfer von Resistenzplasmiden, sondern vor allem durch sequentielle Anreicherung von Resistenz-assoziierten Mutationen auf dem mykobakteriellen Chromosom (Trauner et al. 2014; Miotto et al. 2017). Zunächst nahm man an, dass eine Resistenzmutation mit einem Fitness-Verlust einhergeht, d.h. dass resistente Isolate gegenüber sensiblen Isolaten auf Grund von Mutationen eine niedrigere Überlebenschance bzw. ein langsames Wachstum haben. Es hat sich jedoch gezeigt, dass der Fitness-Verlust durch kompensatorische Mutationen ausgeglichen werden kann (Gillespie 2002; Gagneux 2009; Trauner et al. 2014; Gygli et al. 2017). TB-Bakterienpopulationen haben stets eine geringe Anzahl Bakterien, die eine Unempfindlichkeit gegenüber bestimmten Antibiotika aufweisen (Canetti et al. 1969). Diese unempfindlichen Erreger zeigen einen signifikant niedrigeren Grad an Empfänglichkeit gegenüber einem Medikament im Vergleich zu einem Wildtyp-Erreger (Mitchison 1969). Die natürlichen Resistenzraten gegenüber INH und RMP liegen bei $1:10^6$ und $1:10^8$ (Gillespie 2002). Bei ausgedehntem Lungenbefall beträgt die geschätzte Erregeranzahl 10^8 bis 10^9 , sodass ein Patient in der Regel zumindest einen resistenten Erreger trägt (Greinert et al. 2007). Eine manifeste, phänotypische Resistenz kann sich durch die Selektion dieser resistenten Erreger entwickeln.

Suboptimale Therapie erhöht das Risiko, einen resistenten Erreger durch die Therapie zu selektionieren (Heifets und Cangelosi 1999; Greinert et al. 2007; Trauner et al. 2014; Dean et al. 2017). Die Prävalenz der MDR-TB beträgt 19% unter Patienten mit vorangegangener Therapie und 4,1% unter neu diagnostizierten Patienten (WHO 2017). Eine empirische Therapie, die ohne das Wissen einer möglichen Resistenz eingeleitet wird, erhöht die Chancen, bei bereits vorliegender Resistenz (z.B. INH-Monoresistenz) weitere Resistenzen zu akquirieren (Miotto et al. 2017) und so die Prognose des Patienten zu verschlechtern. Wird beispielsweise ein Patient mit einer INH-Monoresistenz mit einer sechsmonatigen Standardtherapie behandelt, erhält er in der Kontinuitätsphase de facto eine RMP-Monotherapie. Dies kann - bei hoher Bakterienlast - die Selektion resistenter Erreger fördern (Greinert et al. 2007).

Besonders in Niedriglohnländern ist es aufgrund mangelnder Infrastruktur und großer Armut für Patienten oftmals schwierig, über einen Zeitraum von 6 Monaten regelmäßig Medikamente einzunehmen (Davies 2000). Begonnene, aber nicht beendete Therapie oder intermittierende Einnahme von Medikamenten können dazu führen, dass Erreger Resistenzen entwickeln (Ormerod 2005) und diese Erreger an Kontaktpersonen übertragen werden. Der Anteil der MDR-TB-Fälle, die auf Transmission resistenter Erreger zurückzuführen sind, nimmt vor allem in Ländern mit unzureichender MDR-TB-Diagnostik zu (Naidoo et al. 2017; Nourzad et al. 2017). Ziel der mykobakteriellen Diagnostik und Therapie ist es, durch frühzeitige Erreger- und Resistenznachweise die Transmission der TB, insbesondere resistenter Formen, zu verhindern.

1.6.1. Resistenzmechanismen

Einige Resistenzmechanismen gegenüber den Erstlinien-Medikamenten sind seit langem bekannt und ausführlich beschrieben (Zhang und Yew 2015). Da diese Arbeit die Diagnose von INH- und RMP-Resistenzen behandelt, werden diese Resistenzmechanismen im Detail dargestellt.

INH wird erst nach Umwandlung durch das erregereigene Enzym KatG aktiviert (Zhang und Yew 2009). Dabei fungiert KatG im Erreger sowohl als Katalase (Abbau H_2O_2), als auch als Peroxidase (Aktivierung INH) (Mo et al. 2004). Besteht eine Mutation im KatG codierenden *katG*-Gen, liegt in der Regel eine „high-level“ Resistenz vor, die INH gänzlich ineffektiv macht (Trauner et al. 2014). Zwischen 50 bis 94% aller Resistenzen gehen auf das Vorliegen einer Mutation im *katG*-Gen vor (Zhang und Yew 2015). Dabei liegt die Mutation S315T am häufigsten vor (Vilchèze und Jacobs 2014). Wird INH aktiviert, bindet es an die NADH-abhängige Enoyl-Acyl-Reduktase *InhA* und inhibiert auf diesem Wege ein für die Mykolsäuresynthese (Zellwand) essentielles Enzym. Mutationen in der regulatorischen Region des *inhA*-Gens führen zu einer Überexpression des Enzyms. Die erhöhte Konzentration des Enzyms führt dazu, dass INH die Enzymaktivität nur bedingt inhibiert. Dadurch ergibt sich im TB-Erreger eine „low-level“ Resistenz (Winder et al. 1970; Takayama et al. 1972; Bollela et al. 2016; Stagg et al. 2017). Erhöhte INH-Dosen (16-18mg/kg KG) könnten bei solchen Patienten sinnvoll sein (Gillespie 2002; Trauner et al. 2014). Da Protionamid und Ethionamid das gleiche Enzym inhibieren, besteht bei *inhA*-Überexpression meist auch eine Resistenz gegenüber diesen beiden Zweitlinienmedikamenten (Vilchèze und Jacobs 2014). Da Spontanmutationsraten, die zur

Entwicklung von INH-Resistenz führen, höher liegen als jene von RMP (David 1970), kommt diese insgesamt auch häufiger vor (Stagg et al. 2017; WHO 2017).

Mutationen, die zu einer RMP-Resistenz führen liegen in 95% in einer 81 Basenpaar kurzen Region des Bakteriengenoms (*rpoB*) (Gillespie 2002; Zhang und Yew 2015). Bei Sensibilität interferiert RMP bei der RNA-Synthese durch Binden an die β -Untereinheit der RNA-Polymerase (Zhang und Yew 2015). Mutationen im *rpoB*-Gen führen zu verringerter Affinität von Rifampicin zur β -Untereinheit der RNA-Polymerase (Gygli et al. 2017) und somit zur Resistenz.

1.7. Mikrobiologischer Erregernachweis

Welches Probenmaterial für den Erregernachweis am besten geeignet ist, hängt vom Krankheitsbild ab. Neben Sputum und Bronchialsekreten (PTB) können auch Urin, Stuhl, Lymphknotenpunktate, Liquor oder Magennüchternsekret (v.a. bei Kindern) als Ausgangsmaterial dienen (Procop 2016). Häufigstes Ausgangsmaterial ist jedoch Sputum (Crudu et al. 2012). Sputum, das vor Therapiebeginn, kurz nach dem Aufstehen gewonnen wird ist am besten geeignet (Ssengooba et al. 2012; Procop 2016). Zum optimalen Nachweis sollte eine Mindestmenge von 2-5 ml untersucht werden. Zu untersuchende Proben werden mittels NALC-NaOH-Methode (CLSI 2008) vor Untersuchung dekontaminiert und aufgereinigt (nähere Beschreibung s. Methodenteil).

1.7.1. Mikroskopie

Die mikroskopische Untersuchung auf säurefeste Stäbchen ist das am meisten genutzte Verfahren zur Diagnose der TB (Unitaid 2017). Nach Erstdarstellung von Robert Koch (Koch 1882) wurden Methoden vor allem von Franz Ziehl und Friedrich Neelsen, sowie dem Amerikaner Joseph Kinyoun weiterentwickelt (Neelsen 1883; Cambau und Drancourt 2014). Die nach ihnen benannten Färbungen mit Carbolfuchsin und Methylenblau werden noch heute eingesetzt. Vorteile der Mikroskopie gegenüber anderen Verfahren sind die niedrigen Kosten, die kurze Bearbeitungszeit, ein verhältnismäßig geringer Schulungsaufwand von Mitarbeitern und die starke Korrelation von Positivität der Mikroskopie und Infektiosität/Bakterienlast des Patienten (Steingart et al. 2014). Nachteil ist unter anderem die niedrige analytische Spezifität: TB-Bakterien können nicht von nichttuberkulösen Mykobakterien (NTM) und anderen säurefesten Erregern (Nokardien, Cyclospora, Cryptospora, etc.) unterschieden werden (Caulfield und Wengenack 2016;

Procop 2016). Ebenfalls kann die Mikroskopie nicht zwischen einem stoffwechselaktiven und einem bereits durch Therapie abgetöteten Erreger unterscheiden. Die Nachweisgrenze (engl.: „limit of detection“, LOD) der Mikroskopie ist mit etwa 10^4 - 10^5 Erregern/ml im Vergleich zu Kultur und molekularen Verfahren relativ hoch (Kayser et al. 2014; Singhal und Myneedu 2015). Dies bedingt eine niedrige Sensitivität, die zwischen 56 und 68% liegt (Barnard et al. 2012; Kayser et al. 2014; Steingart et al. 2014; Procop 2016). Zusätzlich sind einige Probematerialien (z.B. Urin und Stuhl) nicht für die Mikroskopie geeignet (Kayser et al. 2014). Bei hohem Probenumsatz ist der Zeitaufwand der Färbung und Mikroskopie, die zumeist manuell durchgeführt werden, beträchtlich. Die Fluoreszenzmikroskopie mit Auramin/Rhodamin-Färbung besitzt eine 10% höhere Sensitivität als die lichtmikroskopische Untersuchung von Ziehl-Neelsen gefärbten Präparaten (Steingart et al. 2006; Caulfield und Wengenack 2016; Procop 2016). Da die Beurteilung der mikroskopischen Präparate mittels Fluoreszenzmikroskop zudem schneller ist (2 Min. vs. 5 Minuten pro Präparat) (Bhalla et al. 2013), wird die Fluoreszenzmikroskopie als Mikroskopieverfahren von der WHO empfohlen (WHO 2015b).

1.7.2. Kultur

Als Referenzstandard der mykobakteriellen Diagnostik gilt die Kultur. Es wird zwischen Fest- und Flüssignährmedien unterschieden. Während Festmedien auf Eibasis (Löwenstein-Jensen, Stonebrink) oder Agarbasis (Middlebrook) ein erleichtertes optisches Beurteilen von Wachstum ermöglichen (i.d.R. eugon, cremefarben, trocken und fest am Medium anhaftend), sind Flüssignährmedien sensitiver und unterstützen ein schnelleres Wachstum (Koch 1882; Wilson et al. 1995; Chihota et al. 2010; Caulfield und Wengenack 2016; Procop 2016). Flüssignährmedien sind teurer als Festnährmedien (Procop 2016), dafür ist eine automatische und kontinuierliche Überwachung des Wachstums möglich. Diese bedarf jedoch einer kontinuierlichen Stromversorgung und ist mit hohen Anschaffungskosten verbunden. Beispiele sind das MGIT® (Mycobacteria Growth Indicator Tube, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), das BacT/ALERT (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Frankreich) sowie das Mycolor TK (Salubris, Maltepe, Türkei) System (Procop 2016). Zumeist erfolgt ergänzend die simultane Anzucht auf Fest- und Flüssignährmedien (Procop 2016). Erste positive Ergebnisse können nach 7 bis 14 Tagen in Flüssignährmedien erwartet werden. Nach 8-12 Wochen (abhängig von Ausgangsmaterial) werden Kulturen als negativ (=kein Wachstum) beurteilt (Procop 2016). Die Nachweisgrenze der Kultur liegt

bei etwa 2-10 Kolonie-bildenden Einheiten (engl.: colony forming units, CFU) (Procop 2016).

Kulturelle Verfahren erfordern hohe Laborsicherheitsstandards und geschulte Mitarbeiter, sodass diese vor allem in zentralisierten Laboren eingesetzt werden. Die Bebrütungsdauer ist mit 8 Wochen sehr lang. Im Falle einer Kontamination durch begleitende Keime ist das Ergebnis der Kultur nicht aussagekräftig. Der Nachweis von TB-Erregern in der Kultur ist ein eindeutiger Hinweis auf das Vorhandensein von vermehrungsfähigen MTBC-Organismen in der Patientenprobe (Heifets und Cangelosi 1999). Diese Aussage ist bei positivem, molekulargenetischem Nachweis nicht möglich, da die molekularen Verfahren nicht zwischen abgetöteten und replikationsfähigen Organismen differenzieren können (Arastéh et al. 2009). Dies ist ein Vorteil der Kultur als diagnostisches Verfahren, insbesondere bei der Überprüfung des Therapieerfolges.

1.7.3. Molekulare Verfahren

Nukleinsäureamplifikationstestverfahren (NATs) haben in der Mykobakteriologie, wie auch in anderen Disziplinen der Mikrobiologie in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Vorteil von NATs ist vor allem ihre schnelle Bearbeitungszeit (Stunden) bis zum Nachweis von MTBC-DNA, insbesondere wenn der Nachweis „*direkt*“ unter Verwendung von Primärmaterial (=Patientenproben) erfolgt. Nachteile von NATs sind hohe Kosten, sowie die Notwendigkeit einer ausreichenden Laborinfrastruktur und Mitarbeiterexpertise (Heifets und Cangelosi 1999; Ziegler et al. 2012; Lessem 2017). Bei NATs erfolgt zunächst die Extraktion von DNA aus einer Patientenprobe, gefolgt von einer Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl.: „Polymerase-chain-reaction“, PCR). Das PCR-Produkt kann (wenn vorhanden) mittels verschiedener Verfahren, wie beispielsweise fluoreszenzmarkierten Sonden, Hybridisierungssonden oder DNS-Sequenzierung nachgewiesen werden. Dabei kann der Test entweder *direkt* das eingesandte Primärmaterial untersuchen oder *indirekt* die zuvor vom Primärmaterial angelegte, positive Kultur. Der Vorteil indirekter Verfahren ist ihre Robustheit, die durch höhere Konzentration der Bakterien (=“Bakterienlast“) bedingt ist (Unitaid 2017). Indirekte Verfahren erfordern jedoch eine langwierige Kulturanlage. Dadurch verlängert sich die Bearbeitungszeit von Probenentnahme bis zum Ergebnis und der gewünschte Effekt der verkürzten Nachweiszeit von NATs geht verloren.

1.7.4. Labornetzwerk

Entscheidend für eine schnelle Diagnose ist der Zugang zu hochqualitativer Diagnostik (Peeling und Mabey 2010). Die WHO unterscheidet vier Ebenen der diagnostischen Dezentralisierung (Denkinger et al. 2013; WHO 2017):

Level 1: Gesundheitsposten, die die Primärversorgung von ambulanten Patienten sichern;
Level 2: Mikroskopiecenter; Level 3: Regionalkrankenhäuser und intermediäre Labore;
Level 4: Referenzlabore und Tertiärkrankenhäuser. Während Erstere in vielen Ländern die (Fluoreszenz-)Mikroskopie als Standarddiagnostikum für den Nachweis einer TB einsetzen, nutzen Letztere zusätzlich kulturelle und molekulare Verfahren (Unitaid 2017).

1.8. Mikrobiologischer Resistenznachweis

1.8.1. Phänotypische Resistenztestung

Nach Erregernachweis sollte für ein Isolat eines jeden Patienten eine Resistenztestung erfolgen.

Phänotypische Methoden stellen aktuell den Referenzstandard mykobakterieller Resistenztestung dar (WHO 2017). Diese brauchen verglichen mit molekularbiologischen Methoden länger (Chihota et al. 2010) und benötigen eine Infrastruktur, die den Arbeitsschutz der Mitarbeiter gewährleistet (Procop 2016). In Ländern mit ausreichenden Ressourcen und finanziellen Mitteln bedeutet dies ein Labor der Schutzstufe 3, in Niedriglohnländern mindestens aber eine Biosicherheitswerkbank der Stufe 1 oder 2.

In der Regel erfolgt die phänotypische Resistenztestung (engl.: phenotypic drug susceptibility testing, pDST) nach der sog. „Proportionsmethode“ (Canetti et al. 1969; Heifets und Cangelosi 1999). Eine Resistenz liegt vor, wenn im Vergleich zur verdünnten Kontrollkultur („Proportion“ 1:100) eine Kultur trotz Zugabe einer kritischer Konzentration Antibiotikums Wachstum zeigt (Crudu et al. 2012). Die Proportionsmethode kann unter Verwendung von Fest- und Flüssigkulturen durchgeführt werden.

1.8.2. Genotypische Resistenztestung

Molekulare Methoden weisen die DNA TB-spezifischer Resistenzgene (s. Miotto et al. 2017) nach. Diese Methodik verkürzt die Zeit bis zur Diagnose (Cambau und Drancourt

2014; Steingart et al. 2014; Unitaid 2015). Genotypische (=molekularbiologische) Methoden haben den Vorteil, dass diese in kurzer Zeit Auskunft über die konkret vorliegenden Mutationen geben. Der Nachweis einzelner Mutationen erlaubt die Interpretation der Resistenz, z.B. als „High-Level“, „Low-Level“ und „diskutable Resistenz“. Der Nachweis auf diese Art ist dadurch aber ebenso eingeschränkt, da nur bekannte, Resistenz-assoziierte oder -definierende Mutationen nachgewiesen werden können.

Phänotypische Methoden haben den Vorteil, dass Resistenzen auch ohne die Kenntnis der konkreten Mutation ermittelt werden können. Diese brauchen jedoch länger und erfordern höhere Labor-Sicherheitsstandards.

Eine Gegenüberstellung phänotypischer und genotypischer Methoden zeigt Tabelle 1-1:

Tabelle 1-1: Gegenüberstellung phänotypischer und genotypischer Nachweismethoden

	phänotypisch	genotypisch
Benötigte Infrastruktur	Hoch (S3-Labor)	Mittel (Raumtrennung, S1 Labor)
Komplexität des Verfahrens	Hoch: Sicherheitstraining und Dekontamination erforderlich	Mittel: geschultes Personal mit molekularbiologischem Wissen erforderlich
Kosten	Niedrig	Mittel-Hoch
Nachweis abgetöteter Erreger	Nein	Ja
Für Therapiemonitoring	Geeignet	Ungeeignet
TB- und Resistenz-Nachweis	Erreger- und Resistenz-Nachweis separat	z.T. in einem Arbeitsschritt möglich
Zeit bis zum Nachweis	7 Tage bis Wochen	Stunden bis zu 2 Tagen
Platzierung im Gesundheitssystem	Regionalkrankenhäuser und Referenzlabore	Primäre Gesundheitsposten bis Referenzlabore
Automatisierungspotenzial	Gering	Hoch
Probenumsatz	Durch Aufwand limitiert	Hohe Probenzahlen möglich
Anpassung an Resistenzen neuer Medikamente	Zur Testung neuer Medikamente einsetzbar	Erst, wenn Resistenz-assoziierte/definierende Mutation bekannt ist

Eine gute Korrelation von genotypischen (=molekularbiologischen) und phänotypischen Resistenzen gibt es bereits für einige der Erstlinienmedikamente (v.a. INH, RMP und PZA). Bisher sind jedoch nicht alle Resistenzmechanismen der hauptsächlich genutzten Tuberkulosemedikamente aufgeklärt (Ziegler et al. 2012; Zhang und Yew 2015).

1.9. Molekulare Verfahren

Viele der molekularen Verfahren integrieren die Erreger- und Resistenzdiagnostik in ein Testverfahren. Dabei können Prozesse manuell, semi- oder vollautomatisiert ablaufen. Je automatisierter das Verfahren, desto geringer der Schulungsbedarf der Labormitarbeiter und desto einfacher die Implementierung. Darüber hinaus können molekulare Verfahren in geschlossene Systeme und offene Systeme eingeteilt werden. Geschlossene Systeme sind gegenüber offenen System robuster gegenüber Kontaminationen, da sie Prozessschritte innerhalb eines Testgerätes miteinander verbinden, ohne dass eine Probe transferiert werden muss.

Im folgenden Abschnitt werden die kommerziell verfügbaren und von der WHO empfohlenen NATs vorgestellt, um einen Vergleich zum in dieser Arbeit getesteten FluoroType® MTBDR zu ermöglichen (s. auch Tabelle 1-2):

Der GeneXpert® MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, USA) ist das weltweit am meisten eingesetzte NAT zur Diagnose der TB (Unitaid 2017; WHO 2017) und kann parallel zur Detektion von TB eine RMP-Resistenz ermitteln. Seit 2011 wird der Test von der WHO empfohlen (WHO 2011). Der Test ist einfach durchzuführen, sodass der Schulungsbedarf gering ist (Small und Pai 2010; Steingart et al. 2014; Unitaid 2017). Die anfangs zugegebene Pufferlösung führt zu einer schnellen Inaktivierung der Probe (Banada et al. 2010), sodass der Test unter geringen Biosicherheitsanforderungen durchgeführt werden kann. Das Gerät kann auch per Batterie betrieben werden. Dies ermöglicht den Einsatz in entlegeneren Regionen mit geringer Infrastruktur. Nach Zugabe von Pufferlösung zur Probe und Bestückung der Testkartusche erfolgen DNA-Extraktion, -Amplifikation und -Detektion des PCR-Produktes vollautomatisiert in einem geschlossenen System. Die sonst übliche räumliche Trennung der Prä-PCR, PCR- und post-PCR-Arbeitsschritte ist nicht notwendig. Zur Detektion von TB und RMP-Resistenz nutzt der Xpert® molekulare Beacon-Sonden (Wang et al. 2009) mit 5 Farben, die jeweils einen Genabschnitt des *rpoB*-Gens überspannen. Die Sensitivität für die Detektion einer TB liegt zwischen 82,9% und 90,4%, bei einer Spezifität von 98,0% (Chang et al. 2012; Steingart et al. 2014; Lessem 2017). Die

Sensitivität bzw. Spezifität für die Detektion einer RMP-Resistenz liegen bei 94,1% bzw. 97,0% (Steingart et al. 2014). Für extrapulmonale Proben liegen Sensitivität und Spezifität bei 80,4% und 86,1% (Steingart et al. 2014). Die Rate nicht eindeutig auswertbarer Ergebnisse einer möglichen RMP-Resistenz beträgt für den GeneXpert® 3,7% (Boehme et al. 2010).

Der Xpert® Ultra (Cepheid, Sunnyvale, USA) ist der Nachfolger des GeneXpert® MTB/RIF. Der Test ist ebenfalls vollautomatisiert und läuft in einem geschlossenen System ab. Verkürzte Laufzeit (1,5 statt 2 Stunden) und niedrigeres LOD (16 statt 112 CFU/ml) sind die wichtigsten Verbesserungen gegenüber dem Vorläufermodell (Unitaid 2017; WHO 2017). Außerdem kann der Xpert® Ultra zwei stille Mutationen (Mutationen, die vom Wildtyp abweichen, aber zu keinem Austausch von Aminosäuren führen) von Resistenz-definierenden Mutationen unterscheiden (Chakravorty et al. 2017; Unitaid 2017). Der neue Test ist darüber hinaus in der Lage Mischinfektionen mit sensiblen und resistenten Erregern, die eine S531L Mutation aufweisen, als resistent zu identifizieren (Unitaid 2017). Der Xpert® Ultra hat eine Sensitivität und Spezifität von 87,5% bzw. 98,7% im Nachweis von MTBC-DNA und erkennt eine RMP-Resistenz mit einer Sensitivität bzw. Spezifität von 92,7% bzw. 99,0% (Chakravorty et al. 2017). Wie auch sein Vorgänger kann der Xpert® Ultra keine Aussagen über das Vorliegen einer INH-Resistenz treffen.

Das Loopamp™ Detection Kit (Eiken, Toyko, Japan) nutzt isothermale Amplifikationszyklen und Fluoreszenzsonden zum Nachweis von TB-typischen DNA-Abschnitten (engl.: loop mediated isothermal amplification=LAMP) (Lessem 2017; Unitaid 2017). Der geringe instrumentelle Aufwand und die Einfachheit des Verfahrens führten 2016 zu einer Empfehlung der WHO, vor allem im Bereich der ambulanten Versorgung, insbesondere in Niedriglohnländern (WHO 2016a). Das Verfahren ist schnell (weniger als eine Stunde) und günstig (7\$/Probe), ermöglicht jedoch keine Detektion von Resistenzen (Lessem 2017). Das Loopamp™ Detection Kit hat eine Sensitivität bzw. Spezifität von 80,3% bzw. 97,7% für den Nachweis von MTBC-DNA (Unitaid 2017). Das Verfahren ist semi-automatisiert und offen.

Der GenoType® MTBDR*plus* (HainLifescience, Nehren, Deutschland) ist ein molekularbiologisches Verfahren zum simultanen Nachweis von MTBC-DNA und INH- und RMP-Resistenz, das seit 2008 von der WHO empfohlen wird (Matabane et al. 2015; WHO 2016b). Das Verfahren nutzt 17 auf einem Streifen fixierte Sonden, die komplementär

zu den Wildtypsequenzen und häufigsten Mutationen der Gene *rpoB*, *katG* und *inhA* sind (Maurya et al. 2013). Nach Amplifikation mit biotinylierten Primern und chemischer Denaturierung wird mittels reverser Hybridisierung in einer Substrat-Farbreaktion das Binden von Sonden an MTBC-typische Nukleotidsequenzen dargestellt (Meaza et al. 2017). Vorteil des Verfahrens ist die gleichzeitige Detektion von MTBC-DNA und Mutationen, die mit INH- und RMP-Resistenz assoziiert sind (Barnard et al. 2012; Matabane et al. 2015; Tomasicchio et al. 2016; WHO 2016b). Der Hain MTBDR*plus*® V. 2.0 hat eine Rate von ca. 4% nicht eindeutig auswertbarer Resistenzen (Tomasicchio et al. 2016) und besitzt eine Sensitivität von 85,0% zur Detektion von TB, bei einer Spezifität von 97,8% (Nathavitharana et al. 2017). Resistenzen gegenüber INH bzw. RMP werden mit einer Sensitivität von 89,2% bzw. 96,3% erkannt, bei einer Spezifität von 98,2% bzw. 98,4% (Nathavitharana et al. 2017). Nachteil des Hain MTBDR*plus*® ist die Kontaminationsanfälligkeit auf Grund des offenen Systems. Die Durchführung des Tests erfordert multiple Geräte und Arbeitsplätze. Eine strikte räumliche Trennung der Arbeitsschritte ist notwendig.

Die Abbott RealTime Plattform (Abbott, Chicago, USA) ermöglicht ein Testverfahren, das mit zwei separaten Testkits Proben zunächst auf die Anwesenheit von MTBC-DNA prüft und anschließend bei positivem Ergebnis eine „Reflexetestung“ auf mögliche Resistenzen gegenüber INH und RMP anbietet. Auf diese Art können innerhalb von 7 Stunden bis zu 94 Proben semi-automatisiert auf TB-Erreger und INH- und RMP-Resistenzen überprüft werden (Unitaid 2017). Wie auch beim MTBDR*plus*® werden zum Resistenznachweis die Gene *rpoB*, *inhA* und *katG* untersucht (Kostera et al. 2016). Der Abbott RealTime MTB hat ein LOD von 32 CFU/ml und eine Sensitivität bzw. Spezifität von 92,1% bzw. 97,0% für die Detektion von TB (Lessem 2017; Ruiz et al. 2017). Der Abbott RealTime MTB RIF/INH hat ein LOD von 60 CFU/ml. INH- bzw. RMP-Resistenzen werden mit einer Sensitivität von 88,3% bzw. 94,8% erkannt, bei einer Spezifität von 94,3% bzw. 100% (Lessem 2017). Die Abbott RealTime Plattform ist ein geschlossenes System und damit geringfügig kontaminationsanfällig.

Tabelle 1-2 zeigt eine Übersicht über die gängigsten bzw. von der WHO empfohlenen NATs und ihre Vor- und Nachteile:

Tabelle 1-2: Vergleich häufig eingesetzter NATs

	GeneXpert® MTB/RIF	GeneXpert® Ultra	Loopamp™ MTBC Detection Kit	MTBDRplus® V 2.0	Abbott RealTime® MTB und RIF/INH
Gen Targets	<i>rpoB</i> ¹	<i>rpoB, IS6110, IS1081</i> ¹	<i>gyrB, IS6110</i> ²	<i>rpoB, katG, inhA</i> ³	<i>IS6110, rpoB, katG, inhA</i> ¹⁴
Amplifikationsverfahren	Semi-nested Real-Time PCR ⁵	Nested Real-Time PCR ⁵	LAMP ⁶	Separate PCR ³	Real-Time PCR ⁴
Nachweismethode	Schmelzkurvenanalyse ⁵	Schmelzkurvenanalyse ⁵	Fluoreszenz, manuell ⁶	Line Probe Assay ³	Schmelzkurvenanalyse ⁴
Sensitivität Nachweis TB	89,0% (KI: 85,0-92,0%) ⁷	87,5% (KI: 82,1-91,7%) ¹	78,0% (KI: 71,0-83,0%) ⁸	85,0% (KI: 70,0-93,3%) ⁹	93,0% (KI: 88,0-96,0%) ⁶
Spezifität Nachweis TB	99,0% (KI: 98,0-99,0%) ⁷	98,7% (KI: 93,0-100%) ¹	98,0% (KI: 96,0-99,0%) ⁸	98,0% (KI: 96,2-99,0%) ⁹	97,0% (KI: 95,0-98,0%) ⁶
Sensitivität Nachweis RMP	95,0% (KI: 90,0-97,0%) ⁷	92,7% (KI: 80,1-98,5%) ¹	-	95,0% (KI: 91,6-97,0%) ⁹	94,8% (KI: 88,3-98,3%) ⁴
Spezifität Nachweis RMP	98,0% (97,0-99,0%) ⁷	98,0% (KI: 92,8-99,9%) ¹	-	98,3% (KI: 97,2-99,0%) ⁹	100% (KI: 97,0-100%) ⁴
Sensitivität Nachweis INH	-	-	-	93,6% (KI: 90,4-95,8%) ⁹	88,3% (KI: 80,0-94,0%) ⁴
Spezifität Nachweis INH	-	-	-	99,1% (KI: 95,6-99,8%) ⁹	94,3 (KI: 88,6-97,7%) ⁴
LOD TB	112,6 (KI: 91,9-158,2) ⁷	15,6 (KI: 12,2-23,1) ¹	97,4 (KI: 64,9-185,3) ¹⁰	160 ¹¹	32 (KI: 16-183) ⁴
LOD Resistenz	112,6 (KI: 91,9-158,2) ⁷	105,4 (KI: 78,8-178,8) ¹	-	160 ¹¹	60 ¹²
Preis pro Probe	9,98 ¹²	9,98 ¹²	7 ¹²	7,5 ¹²	Keine Auskunft
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> • Vollautomatisiert • Geschlossenes System • Weit verbreitet • Geringer Schulungsbedarf • Individuelle Proben ansetzbar • Geringe Hands-on-time (15 Min.) • Auch extrapulmonale Proben 	siehe Xpert MTB/RIF, außerdem: <ul style="list-style-type: none"> • Niedrigeres LOD • Erkennt zwei stille Mutation 	<ul style="list-style-type: none"> • Für Level 2 (Mikroskopie-Center) geeignet • Schnelles Ergebnis 	<ul style="list-style-type: none"> • INH-/RMP-Resistenztestung • Ähnliches Konzept für XDR (sl) • Weit verbreitet 	<ul style="list-style-type: none"> • Semi-Automatisiert • Geschlossenes System • Auf EPTB anwendbar
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> • Keine INH-Testung • Temp. nur bis 30°C tolerabel 	siehe Xpert® MTB/RIF	<ul style="list-style-type: none"> • Offenes System • Nicht automatisiert • Keine Resistenz 	<ul style="list-style-type: none"> • Offenes System • Nicht automatisiert 	<ul style="list-style-type: none"> • Zwei separate Testkits für MTB und Resistenz
Max. Probenanzahl	16 ¹²	16 ¹²	14 ¹²	48 ¹¹	94 ¹²
Zeit in Stunden	2 ⁷	1,5 ¹	<1 ¹²	5 ¹¹	7 ¹²
WHO Empfehlung	Ja ¹³	Ja ¹²	Eingeschränkt ⁸	Ja ³	Nein

¹= Chakravorty et al. 2017 ²= Unitaid 2012 ³= WHO 2016b ⁴= Kostera et al. 2016 ⁵= Matabane et al. 2015 ⁶= Lessem 2017 ⁷= Steingart et al. 2014
⁸= WHO 2016a ⁹= Nathavitharana et al. 2017 ¹⁰= Yuki et al. 2016 ¹¹= Auskunft Hain ¹²= Unitaid 2017 ¹³= WHO 2011 ¹⁴= Hoffmann-Thiel et al. 2016

Sensitivitäten und Spezifitäten der dargestellten Verfahren sind relativ vergleichbar. Im Allgemeinen haben alle Verfahren bei Untersuchung von mikroskopisch negativen und kulturell positiven Sputumproben (engl.: sputum smear microscopy negatives, SSM-) eine niedrigere Sensitivität verglichen mit mikroskopisch und kulturell positiven Proben (Steingart et al. 2014; Chakravorty et al. 2017; Lessem 2017; Nathavitharana et al. 2017; Ruiz et al. 2017; Unitaid 2017). Für den Xpert® MTB/RIF wurde für SSM- Proben Sensitivitäten zwischen 44,5% und 67,0% ermittelt (Steingart et al. 2014), der neue Xpert® Ultra erreicht zwischen 61,0% und 78,0% (Chakravorty et al. 2017). Der MTBDR*plus* 2.0 erreichte in einer Studie 44,4%, eine ähnliche Sensitivität wurde für das Loopamp MTBC Detection Kit (40,3%) bestimmt (Lessem 2017; Nathavitharana et al. 2017; Unitaid 2017). Für letztere lagen im Vergleich zum GeneXpert® weniger Vergleichsdaten vor. Auch aus extrapulmonalen Proben, die in der Regel geringere Bakterienzahlen als Sputumproben aufweisen, werden TB- Erreger mit einer geringeren Sensitivität als Sputumproben detektiert.

1.10. FluoroType® MTBDR

Der FluoroType® MTBDR (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland) ist ein neuer, auf der FluoroType®-Plattform basierender Test zum schnellen Nachweis von TB und möglicher INH- und RMP-Resistenz (Unitaid 2017). Die FluoroType® Plattform kann zur Diagnostik verschiedener Erkrankungen wie z.B. MRSA und EBV-Infektion eingesetzt werden (Lessem 2017). Der als Nachfolger des FluoroType® MTB geltende FluoroType® MTBDR bedient sich einer Technologie, die eine LATE-PCR mit einer „Lights-on/Lights-off“-Detektion kombiniert (Papaventsis 2015; Unitaid 2015; Unitaid 2017). Die LATE-PCR, wie beschrieben bei Sanchez et al. (2004), ermöglicht im Gegensatz zur klassischen, symmetrischen PCR (ausgeglichenes Verhältnis von Primern für beide Stränge) nach exponentieller Vermehrung beider DNA-Stränge höhere Alleldiskrimination und Signalstärke bindender Proben durch lineare Vermehrung eines Einzelstranges (ermöglicht durch ungleiche Primerkonzentrationen) (engl.: „**Linear-after-the-exponential-PCR**“) (Sanchez et al. 2004). Die Darstellung der auf dieser Weise hergestellten, im Überschuss vorliegenden Einzelstränge gelingt mittels eines Gemisches aus molekularen „Beacons“, die entweder nur einen Quencher („lights-off“, Fluoreszenz unterdrückend) oder sowohl einen Fluorophor, als auch einen Quencher tragen („lights-on“). Durch Bindung und Dissoziation von „Lights-on“ und „Lights-off“ Sonden entsteht ein für MTBC-DNA und bekannte

Resistenzen typisches Fluoreszenzmuster. Dieses kann mittels Schmelzkurvenanalyse - einem „Fingerprinting“ ähnlich - jede, bis auf das Basenpaar spezifische Allelvariante von TB-Erregern ermitteln und gilt als höchst reproduzierbar (Rice et al. 2012).

Abbildung 1-4 zeigt einen beispielhaften Ablauf des etwa zweistündigen Prozesses im FluoroType® MTBDR:

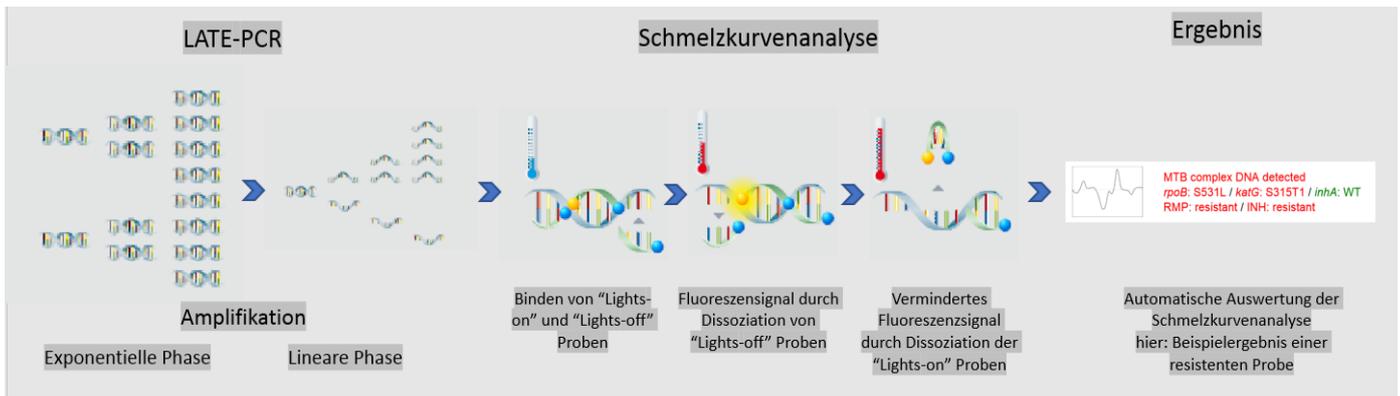


Abb. 1-4 schematischer Ablauf des FluoroType®-Verfahrens, modifiziert nach Herstellerbroschüre

Vorteil des FluoroType® MTBDR ist die hohe Anzahl an Proben, die in einem diagnostischen Durchgang verarbeitet werden kann. Die Bearbeitung von 94 Proben dauert von Probeneingang bis zum Ergebnis weniger als 5 Stunden. Somit eignet sich der FluoroType® MTBDR vor allem für Referenzlabore (Unitaid 2017). Die Verarbeitung der Proben erfolgt in einem geschlossenem System und ist daher weniger anfällig für DNA-Kontaminationen als Verfahren, die ein offenes System verwenden (wie z.B. der GenoType® MTBDR*plus*) (Procop 2016; Lessem 2017). Die FluoroType®-Plattform ermöglicht die Verarbeitung von *direktem* oder *indirektem* Probenmaterial. Die Anzahl der identifizierbaren *rpoB*-, *katG*- und *inhA*-Mutationen ist gegenüber dem GenoType® MTBDR*plus* erhöht (54 gegenüber 34) (Unitaid 2017). Die automatisch interpretierten Ergebnisse können direkt in ein Labor-Informations-System übertragen werden (Doshi et al. 2017). Ähnlich dem Xpert® ermöglicht der hohe Grad an Automatisierung eine schnelle Erlernbarkeit und Durchführung des Verfahrens (Unitaid 2015; Rönnefarth 2017).

Zur Durchführung des Tests bedarf es einer Zentrifuge, eines 96 Well-Platten-Versieglers und eines Computers. Eine kontinuierliche Stromversorgung ist notwendig. Die DNA-Extraktion erfolgt vorab und kann manuell (FluoroLyse®-Verfahren) oder automatisiert (GenoXtract®) durchgeführt werden. Daher gilt das FluoroType®-Verfahren als semi-automatisiert.

Für den FluoroType® MTBDR wurden bis Arbeitsbeginn (August 2017) noch keine unabhängigen, externen Validierungen durchgeführt. Validierungen des Vorgängers FluoroType® MTB geben für den Nachweis von TB von pulmonalen Proben eine Sensitivität von 85,4-90,2% (Papaventsis 2015; Unitaid 2017) bei einer Spezifität von ca. 97% an. Bei Validierungen des Vorgängers wurden wenige extrapulmonale Proben untersucht. Papaventsis et al. geben hierfür bei kleiner Stichprobe eine Sensitivität von 40% an (Papaventsis 2015). Hain Lifescience gibt ein LOD von 22 CFU/ml für die Detektion von MTBC-DNA und Resistenzmutationen bei Verwendung von Direktmaterial an.

1.11. Fragestellung

Da Validierungsdaten für den FluoroType® MTBDR bisher nicht vorliegen, untersucht diese Arbeit die Sensitivität und Spezifität des FluoroType® MTBDR für die Detektion von MTBC-DNA, INH- und RMP-Resistenz unter Verwendung verschiedener Probematerialien. Dazu wurden am Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Mykobakterien am Forschungszentrum Borstel respiratorische Rückstellproben, Rückstellproben von Lymphknotenbiopsaten und MTBC-positive Kulturen mit dem FluoroType® MTBDR und vergleichend mit dem GenoType® MTBDR*plus* getestet. Ergebnisse der molekularen Methoden wurden für den TB-Erregernachweis in Referenz zu kulturellem Wachstum (Referenzstandard) gesetzt. Für den Nachweis einer INH- bzw. RMP-Resistenz wurden Ergebnisse von FluoroType® MTBDR und GenoType® MTBDR*plus* mit der pDST (Referenzstandard) verglichen. Dabei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- a. Wie hoch sind Sensitivität und Spezifität des FluoroType®- Verfahrens zur Diagnose von TB (Nachweis MTBC-DNA) aus respiratorischem Primärmaterial (dekontaminiertes Sediment respiratorischer Proben)?
Wie hoch sind Sensitivität und Spezifität des FluoroType®- Verfahrens zur Detektion von INH- und RMP-Resistenz aus respiratorischem Primärmaterial (dekontaminiertes Sediment respiratorischer Proben)?
- b. Wie hoch sind Sensitivität und Spezifität des FluoroType®-Verfahrens zur Diagnose von TB aus extrapulmonalem Primärmaterial (Lymphknotenbiopsien oder -aspirate)?
- c. Wie hoch sind Sensitivität und Spezifität des FluoroType®- Verfahrens zur Bestimmung einer INH- und RMP-Resistenz bei Verwendung von Kulturisolaten?
- d. Lassen sich Teilschritte des FluoroType®-Verfahrens an diagnostische Abläufe in mykobakteriellen Routinelaboren anpassen (am Beispiel NRZ Borstel)?

Zu Letzterem wurde eine intern entwickelte DNA-Extraktionsmethode mit der von Hain Lifescience empfohlenen FluoroLyse®-Methode hinsichtlich Resistenzdetektion verglichen.

Nicht erhoben wurden Daten zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Intraassaypräzision).

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsentwurf

Zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität des FluoroType® MTBDR wurde von drei unterschiedlichen Probematerialien (respiratorisches Primärmaterial, extrapulmonales Primärmaterial und kulturelle Isolate) DNA isoliert und mittels FluoroType®-Verfahren analysiert. Ergebnisse des FluoroType® MTBDR wurden für den Nachweis von TB-Erregern mit dem kulturellen Referenzstandard verglichen. Das vom FluoroType® MTBDR ermittelte Resistenzprofil wurde mit Daten der pDST abgeglichen. Zusätzlich wurden alle Proben, die mit dem FluoroType® MTBDR untersucht wurden auch mit dem GenoType® MTBDRplus untersucht. Der GenoType® MTBDRplus erbringt ebenfalls den Nachweis von TB und gibt Auskunft über die gleichen Zielgene *katG*, *inhA* und *rpoB* und wurde in dieser Arbeit als Vergleich zum FluoroType® MTBDR hinzugezogen. Bei Diskrepanzen zwischen FluoroType® MTBDR, GenoType® MTBDRplus und pDST wurde zur Aufklärung einer potentiellen Resistenz eine Sanger-Sequenzierung einzelner Genabschnitte durchgeführt. Zu allen Versuchen wurden zum Ausschluss einer Kontamination Negativkontrollen angefertigt, die in dieser Arbeit stets negativ verblieben.

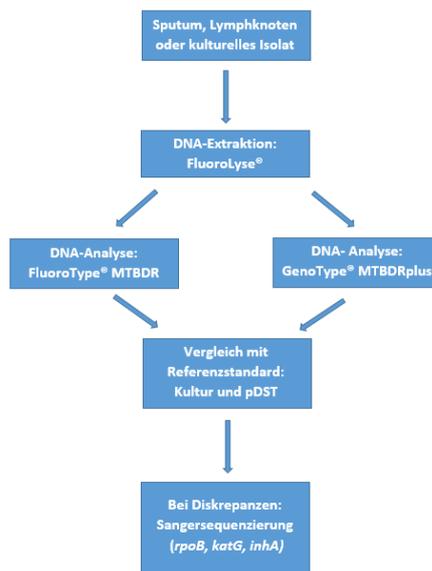


Abb. 2-1 schematischer Arbeitsablauf zu Fragestellungen a-c

Für die Fragestellung, ob sich Teilschritte des FluoroType®-Verfahrens an individuelle Laborabläufe anpassen lassen, wurden zwei unterschiedliche DNA-Extraktionsverfahren in der FluoroType® MTBDR Analyse verglichen. Hierzu wurde eine intern entwickelte und im NRZ Borstel standardmäßig eingesetzte DNA-Isoliermethode mit der vom Hersteller empfohlenen Methode verglichen.

2.1.1. Untersucher

Die vollzogenen Versuche, deren Auswertung und Interpretation wurden selbstständig durchgeführt. Lediglich Versuche, die lange Erfahrung im molekularbiologischen Arbeiten und hohe Sicherheitsstandards erforderten bzw. ein unverhältnismäßig hohes Risiko darstellten, wurden teilweise von ausgebildeten Laborkräften des NRZ Borstel durchgeführt (z.B. Inaktivierung von kulturellen Isolaten, bei denen ein hochgradiger Verdacht auf eine Multiresistenz vorlag).

Die Ergebnisse anderer Testverfahren waren dem Untersucher zum Untersuchungszeitpunkt zur Vorbeugung der Beeinflussung nicht bekannt.

2.1.2. Untersuchungsort

Die Untersuchungen wurden am Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien am Leibniz-Forschungszentrum Borstel bearbeitet. Das NRZ Borstel verfügt über Laborbereiche, die den Labor-Schutzstufen S1-S3 entsprechen (nach Biostoffverordnung, Bundesministerium für Arbeit und Soziales 2013).

Die Versuche wurden in folgenden Bereichen bearbeitet:

Tabelle 2-1: Untersuchungsabschnitte

Versuch	Bereich	Sicherheitsstufe	Untersuchungsschritt
FluoroLyse®	Prä-PCR	S3	DNA-Isolation
FluoroType®	Prä-PCR	S1	Mastermix Vorbereitung
MTBDR	PCR	S1	DNA-Vervielfältigung und -Analyse
GenoType®	Prä-PCR	S1	Mastermix Vorbereitung
MTBDR _{plus}	PCR	S1	DNA-Vervielfältigung
	Post-PCR	S1	DNA-Analyse
Sequenzierung	Prä-PCR	S1	Mastermix Vorbereitung
	PCR	S1	DNA-Vervielfältigung
	Post-PCR	S1	Gelelektrophorese, Sequenzierung

Prä-PCR, PCR und post-PCR Arbeitsschritte wurden entsprechend der für molekulare Arbeiten vorgeschriebenen Vorgehensweise streng voneinander getrennt (CLSI 2008).

2.2. Material

2.2.1. Untersuchungsmaterial

Alle Proben, die für diese Arbeit verwendet wurden, stammen aus der Routinediagnostik des NRZ oder wurden im Rahmen supranationaler Tätigkeiten des NRZ akquiriert. Es wurden sowohl Primärproben (Sputum, Lymphknotengewebe), als auch kulturelle Isolate für die Arbeit untersucht.

Von der Studie ausgeschlossen wurden Proben von Patienten, die zum Zeitpunkt des Probeneingangs am Forschungszentrum Borstel bereits eine antituberkulöse Therapie gestartet hatten. Diese würden in der Kultur kein Wachstum zeigen (=negativ ausfallen), während molekulare Verfahren noch MTBC-DNA nachweisen. Daraus würde eine hohe Rate falsch positiver Ergebnisse resultieren. Des Weiteren wurden Proben selektiert, die die für die Analyse notwendigen 500µl enthielten und nicht stark blutig untersetzt waren, da der Hersteller eine mangelnde Auswertbarkeit für diese Proben angibt. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Patientenproben, in denen die Kultur als ‚kontaminiert‘ (z.B. durch NTM oder Kokken) ausgewertet wurde oder Daten zur pDST fehlten.

2.2.1.1. Primärproben

Für die Untersuchung von Primärproben aus dem Respirationstrakt und von Lymphknoten wurden Rückstellproben aus dem NRZ verwendet. Als Rückstellproben wird das Material bezeichnet, das nach Abschluss aller routinediagnostischen Untersuchungen verfügbar bleibt und für Bedarfsfälle (Nachforderungen, Wiederholung analytischer Verfahren) aufbewahrt wird. Am NRZ werden Rückstellproben routinemäßig bei -20°C für 3-4 Monate gelagert und anschließend verworfen. Für diese Arbeit wurden Rückstellproben auch nach Ablauf der normalen Aufbewahrungszeit zurückgehalten. Insgesamt wurden zwischen März und Dezember 2017 473 Proben untersucht.

Vor Kulturanlage werden unsterile Proben (z.B. Sputum) vorbehandelt, um die Probe zu homogenisieren, begleitende Keime zu eliminieren und Mykobakterien anzureichern. Am NRZ Borstel wird hierzu das NALC-NaOH Verfahren verwendet (zur Methode, s. Kent 1985; und CLSI 2008). Dabei dient N-Acetyl-L-Cystein der Homogenisierung des Sputums,

während NaOH bakterizide Wirkung auf potentiell kontaminierende Erreger ausübt (Caulfield und Wengenack 2016). Nach Neutralisierung, Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wird das Sediment in Phosphatpuffer aufgenommen (Endvolumen ca. 2ml). Nach Durchführung aller diagnostischen Tests enthalten Rückstellproben in der Regel ein Volumen zwischen 0,5 und 1,3ml.

Da es sich bei Lymphknotengewebe (extrapulmonales Primärmaterial) um prinzipiell steriles Material handelt und wie oben beschrieben in der Regel verhältnismäßig wenige Erreger in der Probe enthalten sind, werden diese am NRZ nicht dekontaminiert, sondern direkt gehexelt und in 2ml Phosphatpuffer aufgenommen. Die Rückstellproben des Lymphknotenmaterials wurden nach Arbeitsbeginn prospektiv über einen Zeitraum von 6 Monaten gesammelt. Insgesamt wurden 64 Proben untersucht.

2.2.1.1. Kulturisolate

Für die Validierung des FluoroType® Testverfahrens wurden zunächst im NRZ bereits erhobene Daten aus dem Jahre 2016 verwendet. Damals wurden in einem Vorläuferprojekt 101 kulturelle Isolate mittels GenoType® MTBDR*plus* und FluoroType® MTBDR analysiert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Datensatz von 2016, der zum großen Teil vollständig sensible Isolate enthielt, auf 180 Isolate erweitert. Die zusätzlichen Isolate wurden so ausgewählt, dass eine größere Anzahl an resistenten Isolaten zur Analyse zur Verfügung stand. Als Ausgangsmaterial dienten Festkulturen vom Typ Löwenstein-Jensen und Stonebrink, sowie Flüssigkulturen vom Typ MGIT® (Mycobacteria growth indicator tubes®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

Für den Vergleich zweier DNA-Isolierungsverfahren wurden 122 positive, kulturelle Isolate untersucht. Das hierfür verwendete Material wurde MGIT®-Flüssigkulturen entnommen.

In den nachfolgenden Tabellen sind alle Materialien aufgelistet, die für den experimentellen Teil der Arbeit genutzt wurden. Dabei wurde Material in Verbrauchsmaterialien, verwendete Geräte und Hilfsmittel differenziert.

2.2.2. Material für die DNA-Isolation nach FluoroLyse®-Methode

Tabelle 2-2: Material für die DNA-Isolation nach FluoroLyse®-Methode

	Material	Modell/Hersteller
Verbrauchsmaterialien	Einmal-Handschuhe	Dahlhausen
	50ml Röhrchen	Sarstedt
	Transferpipetten	Sarstedt Transfer Pipette 3,5 ml
	1,5ml Schraubröhrchen	Sarstedt
	2ml Schraubröhrchen	Sarstedt
	Sterile Pipettenspitzen	Nerbe plus 10, 100, 1000µl
	Verwendete Geräte	50ml Röhrchen Zentrifuge
Etikettendrucker		TSC TTP 343-C
Werkbank Sicherheitsklasse II		ScanLaf MarsPro 1200 safeclass 2
Aerosolsichere Tischzentrifuge		Eppendorf 5418
Vortexer		IKA Vortex 1
Wasserbad		Thermo Scientific Precision GP2S
Weitere Hilfsmittel		Kühltruhe (-20°C)
	Kühlschrank (6°C)	Privileg
	50ml Röhrchen Ständer	Nalgene
	1,5ml Schraubröhrchen Ständer	Nalgene
	0,5-10µl Pipette	Pipet4u Performance
	10-100µl Pipette	Pipet4u Performance
	100-1000µl Pipette	Pipet4u Performance
	Lagerbox für Schraubröhrchen	Sarstedt 9x9
	Abwurfbehälter	DispoSafe
	Zeitmesser	

2.2.3. Material für die DNA-Isolation nach intern entwickelter Methode

Tabelle 2-3: Material für die DNA-Isolation nach intern entwickelter Methode

	Material	Modell/Hersteller
Verbrauchsmaterialien	Einmal-Handschuhe	Dahlhausen
	Impföse	Sarstedt Impfschlinge 10µl
	Transferpipetten	Sarstedt Transfer Pipette 3,5 ml
	1,5ml Schraubröhrchen	Sarstedt
	2ml Schraubröhrchen	Sarstedt
	Sterile Pipettenspitzen	Nerbe plus 10, 100, 1000µl
	Verwendete Geräte	Etikettendrucker
Werkbank Sicherheitsklasse II		Scanlaf Mars Pro Cytosafe
Aerosolsichere Tischzentrifuge		ThermoScientific Heraeus Megafuge 8
Vortexer		IKA UF2
Wasserbad		Renner GmbH Basis 935
Weitere Hilfsmittel		Kühlschrank (6°C)
	1,5ml Schraubröhrchen Ständer	Nalgene
	0,5-10µl Pipette	Pipet4u Performance
	10-100µl Pipette	Pipet4u Performance
	100-1000µl Pipette	Pipet4u Performance
	Lagerbox für Schraubröhrchen	Sarstedt 9x9
	Abwurfbehälter	DispoSafe
	Zeitmesser	

2.2.4. Material für die DNA-Analyse mittels FluoroType®-Verfahren

Tabelle 2-4: Material für die DNA-Analyse mittels FluoroType®-Verfahren

	Material	Modell/Hersteller
Verbrauchsmaterialien	Einmal-Handschuhe	Showa Best Glove NitriCare
	Sterile Pipettenspitzen	Nerbe plus / Biosphere 10, 100, 1000µl
	DNA/RNA Cleanser	DNA Exitus (AppliChem), DanKlorix
	Transferröhrchen	Sarstedt Multiply pro cup 0,5ml
	96-well PCR-Platte	4titude Framestar 96 well qPCR plate
	Klebefolie für Well Platten	4titude clear weld seal mark II
Verwendete Geräte	Zentrifuge	Biozym Sprout
	Vortexer	IKA Vortex 1
	DNA/RNA-Cleaner Kabine	Kisker Biotech UVC/ T-M-AR
	Folienschweißgerät	4titude 4s3 HT121TS/4B
	Wellplattenzentrifuge	Labnet mini plate spinner 1000
	DNA-Analyse-Gerät	FluoroCycler® 96
	PC	HP mit IVD FluoroType® Software
Weitere Hilfsmittel	Kühlfach (-20°C)	Liebherr Premium Nofrost
	1,5ml Schraubröhrchen	VWR
	Ständer	
	5-50µl Pipette	Biozym Precision
	0,5-10µl Pipette	Pipet4u Performance
	10-100µl Pipette	Pipet4u Performance
	100-1000µl Pipette	Pipet4u Performance
	Lagerbox für Schraubröhrchen	Sarstedt 9x9
	Abfallbehälter	

2.2.5. Material für die DNA-Analyse mittels Genotype® MTBDR_{plus}

Tabelle 2-5: Material für die DNA-Analyse mittels Genotype® MTBDR_{plus}

	Material	Modell/Hersteller
Verbrauchsmaterialien	Einmal-Handschuhe	Showa Best Glove NitriCare
	Sterile Pipettenspitzen	Nerbe plus / Biosphere 10, 100, 1000µl
	PCR-Strips	Sarstedt Multiply µStrip 8er
	DNA/RNA Cleanser	DNA Exitus (AppliChem), DanKlorix
	Hybridisierungswanne	Hain Lifescience
	Saugpapier	
Verwendete Geräte	Kleine Zentrifuge	Biozym Sprout
	Vortexer	IKA Vortex 1
	DNA/RNA-Cleaner Kabine	UVP UV3 HEPA PCR cabinet
	PCR-Maschine	BIO-RAD C1000 Thermal Cycler
	Wasserbad	Elma Transsonic T460/H
	Hybridisierungsgerät	Hain Lifescience GT-Blot 48 TwinCubator
Weitere Hilfsmittel	Kühlfach (-20°C)	Gorenje
	Kühlschrank (6°C)	Liebherr Comfort
	1,5ml Schraubröhrchen Ständer	VWR
	Ständer für PCR-Strips	VWR
	0,5-10µl Pipette	Pipet4u Performance
	10-100µl Pipette	Pipet4u Performance
	100-1000µl Pipette	Pipet4u Performance
	50ml Röhrchen	Sarstedt
	50ml-Röhrchen Ständer	VWR
	Pinzette	
Abfallbehälter		

2.2.6. Material für die Sequenzierung nach Sanger

Tabelle 2-6: Material für die Sequenzierung nach Sanger

	Material	Modell/Hersteller
Verbrauchsmaterial	Aqua Dest.	Carl Roth
	Einmal-Handschuhe	Showa Best Glove NitriCare
	Sterile Pipettenspitzen	Nerbe plus 10, 100, 300, 1000µl
	DNA/RNA Cleanser	DNA Exitus (AppliChem), DanKlorix
	96-Well Platte	Sarstedt
	500µl PCR Röhrchen	Sarstedt
	96 Well Reaction Platte	Applied Biosystems 3500 series
	MultiScreen 96 Well Platte	Merck Millipore
Verwendete Geräte	DNA/RNA Cleaner Kabine	Kisker Biotech UVC/ T-M- AR
	Zentrifuge	BioZym Sprout, VWR 1814, Kisker Biotech Combi-Spin, Hettich Universal 320
	PCR-Maschine	BIO-RAD C1000 Thermal Cycler
	Vortexer	IKA Vortex 1
	Kontaktthermometer	Ikamag® RCT
	Gelelektrophorese-System	BIO-RAD SubCell GT
	Stromquelle	BIO-RAD PowerPac™ Basic 150 VA
	UV-Lampe und -Kamera mit Computeranschluss und Drucker	Intas UV-Systeme
	Sequenzierer	Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer
	Weitere Hilfsmittel	0,5-10µl Pipette Pipet4u Performance

10-100µl Pipette	Pipet4u Performance
100-1000µl Pipette	Pipet4u Performance
Abzug	
Waage	
Mikrowelle	
Gelträger	
Probenkämme	
Rührfisch	
pH Meter	
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research plus
50-300µl	SL-Pette XE
0,5/1,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt
Ständer	
96 Well Septen	ABI 96 Well Septa
Zeitmesser	

2.2.7. Für die Gelelektrophorese verwendete Reagenzien/Chemikalien

Tabelle 2-7: Für die Gelelektrophorese verwendete Reagenzien/Chemikalien

	Material	Modell/Hersteller	
Reagenzien	Aqua dest.	Carl Roth	
	Agarose	Invitrogen	
	Ethidiumbromid	Carl Roth	
	TAE-Puffer Stammlösung	MP Biomedicals	
	Essigsäure	Merck	
	TAE-Puffer Gebrauchslösung	MP Biomedicals	
	0,5M EDTA Gebrauchslösung	AppliChem	
	Marker		Gene Ruler 100bp
			DNA Ladder, Thermo Scientific
		Schwerepuffer	DNA Loading Dye, Thermo Scientific

2.2.8. In der Arbeit verwendete Testkits

Tabelle 2-8: in der Arbeit verwendete Testkits

Kit	Verwendung	Hersteller	Inhalt
FluoroLyse® 96 Vers. 1.0	DNA-Isolation	Hain Lifescience, Nehren, D	Lysispuffer, Neutralisationspuffer
FluoroType® MTBDR Vers. 1.0	DNA-Analyse: MTBC und Resistenz RMP/INH	Hain Lifescience, Nehren, D	Master-Mix, Anteil A Master-Mix, Anteil B Interne Kontrolle Positivkontrolle
GenoType® MTBDR <i>plus</i> Vers. 2.0	DNA-Analyse: MTBC und Resistenz RMP/INH	Hain Lifescience, Nehren, D	Master-Mix, Anteil A Master-Mix, Anteil B Denaturierungsreagenz Hybridisierungsreagenz String-Wash Lösung Rinse Konjugatpuffer Substratpuffer Konjugatreagenz Substratreagenz Amplikonstreifen Dokumentationsbogen
innuPREP PCRpure Kit	Aufreinigung PCR-Produkt vor Sequenzierung	Analytik Jena, Jena, D	Bindungspuffer Elutionspuffer Aufbereitungssäulen Auffangröhrchen Elutionsröhrchen
BigDye® Terminator V. 3.1 Cycle Sequencing Kit	Sequenzierung	Applied Biosystems, Foster City, USA	Sequenzierungsreaktionsmix, Sequenzierpuffer

Illustra Sephadex	Aufreinigung	GE Healthcare,	Sephadex Platte
G-50 Fine DNA	PCR-Produkt vor	Little Chalfont,	
Grade	Sequenzierung	UK	
Sequenzier Kit	Sequenzierung	Applied	Kathodenpuffer
Container 3500		Biosystems,	Anodenpuffer
Series		Foster City,	POP-7 Polymer
		USA	Formamid

2.3. Methoden

2.3.1. DNA-Isolation

2.3.1.1. DNA-Isolation nach FluoroLyse®-Methode

Zur Aufbereitung der mykobakteriellen DNA für nachfolgende PCR-Verfahren wurde das FluoroLyse®-Verfahren (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland) angewendet. Die FluoroLyse®-Methode beruht auf dem Konzept einer kombinierten Lyse durch Alkalisierung (Lysispuffer) und Hitze (Wasserbad). Die Anwendung erfolgte gemäß den Herstellerangaben im Labor der Sicherheitsschutzstufe S3 und unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II. In Kürze:

Zur Vorbereitung der Isolierung von mykobakterieller DNA aus Primärmaterial wurden die Rückstellproben bei mindestens 3000 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden 500µl der Rückstellprobe in ein 1,5ml Schraubröhrchen überführt. Für die Aufarbeitung aus Festkulturen wurde mittels Impföse Bakterienmaterial aus Löwenstein-Jensen-Agar entnommen und in 500µl 0,9% NaCl suspendiert. Für die Aufarbeitung aus Flüssigkultur wurden 500µl Bodensatz aus einem MGIT®-Röhrchen entnommen.

Die aliquotierte Probe wurde bei 10000 x g in einer aerosol-sicheren Tischzentrifuge für 15 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und dem Pellet 100 µl eines Gemischs aus Lysispuffer und interner Kontrolle (Verhältnis 50:1) zugefügt. Mittels Vortexer wurde das Zellpellet im Lysispuffer resuspendiert. Die resuspendierten Proben wurden anschließend für 5 Minuten in einem 95°C heißen Wasserbad inkubiert. In Folge wurde nach 30 Sekunden Zentrifugieren bei 4000 x g 100 µl Neutralisationspuffer zugegeben und die Probe mit einem Vortexer vermischt. Zum Abschluss des Isolationsverfahren wurden die Proben bei maximaler Drehzahl (hier: 16873 x g) für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand zur Lagerung in ein neues Schraubröhrchen überführt. Die DNA Proben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Für jeden FluoroLyse®-Lauf (15 Proben) wurde eine Negativkontrolle angelegt. Diese wurde aus 100 µl Lysispuffer, 100 µl Neutralisationspuffer und 2 µl interner Kontrolle erstellt.

2.3.1.2. DNA-Isolation nach interner Methode

Die im Haus entwickelte DNA-Isolationsmethode beruht im Gegensatz zur FluoroLyse®-Methode auf Lyse durch Hitze. Die Isolation erfolgte aus MGIT®-Röhrchen. Hierzu wurden

500µl der Flüssigkultur entnommen und in ein 1,5ml Schraubröhrchen überführt. Anschließend wurden die Proben bei 3260 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 250 µl des Überstands verworfen. Im verbleibenden Überstand wurde das Pellet resuspendiert. Zuletzt wurden die Proben für 20 Minuten zur Lyse und Keimabtötung in einem 95°C heißen Wasserbad inkubiert. Die DNA Proben wurden anschließend ebenfalls bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gekühlt gelagert. Für jeden Isolationslauf (15 Proben) wurde eine Negativkontrolle mit Aqua dest. angelegt.

2.3.2. FluoroType®-Verfahren

2.3.2.1. FluoroType® MTBDR aus Primärmaterial

Die Analyse zuvor mittels FluoroLyse® isolierter DNA erfolgte mit dem FluoroType®-Verfahren gemäß den Herstellerangaben (Hain Lifescience, Nehren, D). Es wurden bis zu 94 Proben in einem Ansatz untersucht. Je Probe wurden 6µl Master-Mix Komponente A und 14µl der Mastermix-Komponente B gut vermischt in die Vertiefungen einer 96-Well Platte pipettiert. Danach wurden 20µl der isolierten DNA hinzugefügt und mittels Auf- und Abpipettieren mit dem Mastermix vermischt. Nach Zugabe aller Proben und Versiegelung der 96-Well Platte wurde die Platte für 30 Sekunden zentrifugiert und in den FluoroCycler® geladen. Unter Angabe der Labortagebuchnummer wurden die zu untersuchenden Proben mit der IVD FluoroType® Software eingegeben und die PCR gestartet.

Der FluoroType® MTBDR generiert aus der Analyse der Schmelzkurven automatisch ein Auswertungsschema für den Nachweis von MTBC-DNA und Resistenzen gegenüber INH und RMP. Ist eine Probe nicht durch inhibierende Faktoren (z.B. sehr blutiges Sputum) oder fehlerhafte Probenpräparation (z.B. fehlerhafte Zugabe der internen Kontrolle) nicht auswertbar (,invalide‘) wird zwischen An- und Abwesenheit des MTBC unterschieden. Für die Analyse von Resistenzen gibt es für jedes der drei Zielgene (*rpoB*, *katG*, *inhA*) vier potentielle Ausgänge: 1. Nachweis eines Wildtyp-Allels (,WT‘); 2. Nachweis einer von 54 bekannten Mutation (z.B. S531L auf dem *rpoB*-Gen); 3. Nachweis einer nicht näher definierten Mutation bei Abwesenheit des Wildtyp-Allels (,MUT‘); 4. Nicht eindeutig auswertbarer Unterschied zwischen Wildtyp und Mutation (,indeterminate‘).

Nach ca. 2 Stunden FluoroType®-Programm wurden die Ergebnisse gesichtet und auf einen externen PC transferiert. Pro Ansatz wurden zusätzlich eine vom Hersteller mitgelieferte Positiv- und die zugehörigen Negativkontrollen getestet.

2.3.2.2. FluoroType® MTBDR aus Kulturisolaten

Die mittels FluoroLyse® isolierten Kulturisolate wurden analog dem Primärmaterial verarbeitet. Lediglich das Programm der FluoroType® Software wurde auf kulturelle Isolate ausgerichtet.

Um die DNA-Isolation den bisherigen Routineabläufen anzupassen, wurde die Kompatibilität der hausintern entwickelten Methode mit dem FluoroType®-Verfahren ermittelt. Dazu wurden im Anschluss an die DNA-Isolation vor Starten des FluoroType®-Verfahrens auf diese Art isolierte Proben mit einem „Suspensionsmix“ aus Lysispuffer, Neutralisationspuffer und interner Kontrolle verdünnt (Verhältnis 50:50:1). Die Verdünnung erfolgte in Absprache mit dem Hersteller in einer Relation von 1:5 (DNA zu Suspensionsmix, 6µl zu 24µl). Anschließend wurden 20µl der verdünnten DNA-Probe zu 20µl Mastermix hinzugegeben. Alle weiteren Schritte (Versiegelung, Zentrifugation, Beladen des FluoroCyclers®, Auswertung) erfolgten analog den Schritten des FluoroType®-Verfahrens aus Primärmaterial.

2.3.3. GenoType® MTBDRplus

Für die DNA-Analyse mittels Line-Probe Assay (LPA) GenoType® MTBDRplus wurde dieselbe DNA verwendet, die auch mittels FluoroType®-Verfahren analysiert worden war. Die Analyse mittels GenoType® MTBDRplus (Hain Lifescience, Nehren, D) erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Für jede Probe wurden 10µl der Mastermix-Komponente A und 35µl der Mastermix-Komponente B einem PCR-Gefäß zugefügt. 5µl der isolierten DNA wurden mit dem Mastermix vermischt. Die daraus resultierenden 50µl wurden mittels PCR amplifiziert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle (mit 5µl Aqua dest. statt DNA) mitgetestet.

Es wurden folgende PCR-Protokolle verwendet:

Tabelle 2-9: PCR-Protokoll für Primärmaterial in Vorbereitung auf den GenoType® MTBDRplus

PCR-Protokoll:	Temperatur	Zeit	Zyklen
Aktivierung Taq-Polymerase	95°C	15 Minuten	1
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	} 20
Annealing	65°C	2 Minuten	

Denaturierung	95°C	25 Sekunden	} 30
<i>Annealing</i>	50°C	40 Sekunden	
Elongation	70°C	40 Sekunden	
Endsynthese	70°C	8 Minuten	1

Tabelle 2-10: PCR-Protokoll für Kulturmateriale in Vorbereitung auf den GenoType® MTBDRplus

PCR-Protokoll:	Temperatur	Zeit	Zyklen
Aktivierung Taq-Polymerase	95°C	15 Minuten	1
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	} 10
<i>Annealing</i>	65°C	2 Minuten	
Denaturierung	95°C	25 Sekunden	} 20
<i>Annealing</i>	50°C	40 Sekunden	
Elongation	70°C	40 Sekunden	
Endsynthese	70°C	8 Minuten	1

Nach der PCR wurden die Reagenzien für die Hybridisierung vorbereitet. Hierzu wurden die Hybridisierungslösung und die String-Wash-Lösung in einem Wasserbad bei 45°C erhitzt. Pro Probe wurden je 10µl Konjugat- und Substratkonzentrat mit je 1ml Konjugat- und Substratpuffer vermischt. Nach Vorbereiten aller Reagenzien wurde der GT-Blot mit Hybridisierungsreagenz, String-Wash-Lösung, Rinse-Waschlösung, Aqua dest., Substratgemisch und Konjugatgemisch im Überschuss bestückt. In einer Hybridisierungswanne wurden 20µl Denaturierungsreagenz (DEN) mit 20µl der amplifizierten DNA mittels Auf- und Abpipettieren vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation wurde der GT-Blot mit der Wanne bestückt und das Hybridisierungsprotokoll gestartet. Für die Hybridisierung wurde das folgende Protokoll verwendet:

Tabelle 2-11: Hybridisierungsprotokoll

Hybridisierungsprotokoll:	Temperatur	Zeit	Menge
Denaturierung	Raumtemperatur	5 Minuten	20µl DEN + 20µl DNA
Hybridisierung	45°C	30 Minuten	1,5 ml
Zufügen des Streifens			
String-Wash Lösung	45°C	15 Minuten	1,5 ml
Rinse	Raumtemperatur	2 Minuten	1ml
Konjugatgemisch	Raumtemperatur	30 Minuten	1ml
Rinse	Raumtemperatur	2 Minuten	1ml
Rinse	Raumtemperatur	2 Minuten	1ml
Aqua dest.	Raumtemperatur	2 Minuten	1ml
Substratgemisch	Raumtemperatur	6 Minuten	1ml
Aqua dest.	Raumtemperatur	2 Minuten	1ml
Aqua dest.	Raumtemperatur	2 Minuten	1ml

Nach Abschluss des Hybridisierungsprotokolls wurden die getrockneten Streifen auf einen Auswertungsbogen geklebt und mittels mitgelieferter Auswertungsschablone manuell ausgewertet.

Für den Nachweis eines TB-Erregers müssen Kontrollbanden und TUB-Bande positiv sein. Der Nachweis einer Resistenz ist bei Vorliegen einer Mutationsbande auf den Zielgenen *rpoB*, *katG* und *inhA* oder bei Abwesenheit einer Wildtypbande indiziert. Bei unklaren Bandenmustern können einzelne Genbereiche (z.B. *katG*) nicht ausgewertet werden (,indeterminate‘).

2.3.4. Sequenzierung

Zur Auflösung von Diskrepanzen zwischen Ergebnissen der molekularen Testverfahren FluoroType® MTBDR und GenoType® MTBDR_{plus} und der pDST wurden einzelne Genabschnitte mittels Sanger-Technik sequenziert.

Hierzu wurde zunächst ein Mastermix zur PCR unter einer DNA-Werkbank zusammengestellt. Dieser enthielt für die Analyse von Primärmaterial oder Kultur: 33,8 µl H₂O, 5 µl Puffer, 2 µl MgCl₂, 2,5 µl Primer 1, 2,5 µl Primer 2, 1 µl desoxy-Nukleosidtriphosphate (dNTPs), 2,5 µl Dimethylsulfoxid und 0,1 µl Taq-Polymerase. Die

Verwendung von Primern richtet sich nach der Zielsequenz, die analysiert werden soll. Für die Gene *rpoB*, *katG* und *inhA* sind dies (Telenti et al. 1997):

1. *rpoB* 1 und 2 für die Sequenzierung von *rpoB*
2. TB 86 und 87 für die Sequenzierung von *katG*
3. TB 92 und 93 für die Sequenzierung von *inhA*

Dem Mastermix von 50 µl wurden 3 µl der zu untersuchenden DNA hinzugefügt. Zur darauffolgenden Amplifikation wurde folgendes Protokoll verwendet:

Tabelle 2-12: PCR-Protokoll für Sequenzierung (vor Aufreinigung)

PCR-Protokoll:	Temperatur	Zeit	Zyklen
Aktivierung Taq-Polymerase	95°C	15 Minuten	1
Denaturierung	94°C	30 Sekunden	} 38/38/35
Annealing	62°C/62°C/67°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	45 Sekunden	
Endsynthese	72°C	10 Minuten	1
Reaktionsstop	4°C		

Die Annealing-Temperatur und Zykluszahl sind von Primer zu Primer unterschiedlich. Dargestellt sind Zyklen-Angaben für PCR-Protokolle, die am NRZ erstellt und evaluiert wurden, v.l.n.r. *rpoB*, *katG* und *inhA*.

Im Anschluss an die PCR wurde als Kontrolle der PCR-Reaktion eine Gelelektrophorese zur Überprüfung der DNA-Fragmente durchgeführt. Hierzu wurden in das mit Ethidiumbromid ausgestattete Agarosegel mit 2,5µl Schwerepuffer versetzte 5 µl DNA-Proben in die Probenaschen pipettiert. Mittels Gleichstrom (120VA) trennten sich die DNA-Fragmente über 15 Minuten nach ihrer Größe auf. Zu jedem Lauf wurde eine Positiv-Bandenkontrolle angelegt (Gene Ruler 100bp DNA ladder, Thermo Scientific, Waltham, USA). Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde zur Dokumentation des Ergebnisses ein Foto unter UV-Licht angefertigt.

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden in Vorbereitung auf die Sequenzierung mittels innuPREP PCRpure Kit (Analytik Jena, Jena, Deutschland) aufgereinigt. Hierzu wurden 500 µl Bindungspuffer als Lösungsmittel genutzt. Nach Zufügen des PCR-Produktes zur Säule

wurden die Proben für 2 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde das Auffangröhrchen für den Bindungspuffer verworfen und 10 bis 40 µl Elutionspuffer, abhängig von der Bandenstärke im UV-Licht Foto (je stärker, desto mehr Puffer) zur Säule hinzugefügt. Die Säule wurde auf ein weiteres Auffangröhrchen gesetzt, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut für eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde zur Sequenz-PCR verwendet.

Für den Ansatz der Sequenz-PCR wurde folgende Zusammenstellung gewählt: 7,5 µl H₂O, 2 µl Sequenzpuffer, 4 µl BigDye®-Reaktionsmix (beide ABI), sowie 0,5 µl Primer (Auswahl s.o.). Zu den daraus resultierenden 14 µl wurden 6 µl aufgereinigter DNA gegeben und mit folgendem PCR-Programm amplifiziert:

Tabelle 2-13: PCR-Protokoll für Sequenzierung (nach Aufreinigung)

PCR-Protokoll:	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	96°C	15 Sekunden	} 24
Annealing und Synthese	60°C	90 Sekunden	
Reaktionsstop	4°C		

Nach Abschluss des zweiten PCR-Protokolls wurden die PCR-Produkte erneut aufgereinigt. Dazu wurden je 300 µl Aqua dest. mit einer Mehrkanalpipette in eine mit Sephadexpulver bestückte Filtrationsplatte pipettiert. Nach einer Quellzeit von einer Stunde wurde die Filtrationsplatte zusammen mit einer Auffangplatte bei 500 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen der abfiltrierten Flüssigkeit aus der Auffangplatte wurden 10 µl des Sequenz-PCR-Produktes zur ersten Filtrationsplatte hinzugegeben und diese auf eine weitere Auffangplatte gestellt. Zum Abschluss der Aufreinigung wurden die beiden Platten für weitere fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert.

Für die Sequenzierung wurden 15µl Formamid in eine Sequenzierplatte (ABI) vorgegeben und 4µl des aufgereinigten Sequenzproduktes darin suspendiert. Anschließend wurde die Sequenzierplatte, mit einem Gummiseptum verschlossen und bei 500 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Kapillarsequenzierer 3500 (ABI) wurde mit der Sequenzierplatte beladen und am Computer gestartet.

Nach Abschluss der Sequenzierung wurden die Ergebnisse des Elektropherogramms mit den Sequenzen eines H37Rv-Stammes aus der Datenbank verglichen und auf Unterschiede in der zu untersuchenden Zielsequenz (engl.: „single nucleotide polymorphisms“) überprüft.

2.3.5. Datensammlung

Die aus den DNA-Analyse-Tests erhobenen Daten wurden aus der FluoroType®-Software in eine Excel-Datei importiert und auf einen externen Computer transferiert. Die ausgewerteten GenoType® MTBDR*plus* Ergebnisse wurden ebenfalls in einer Excel-Datei festgehalten. Sequenziererergebnisse wurden in einer Vergleichstabelle Ergebnissen von FluoroType® und GenoType® gegenübergestellt.

Zusätzlich zu den Ergebnissen der molekularen Verfahren wurden aus dem laborinternen Informations- und Management-System (kurz: LIMS) Ergebnisse aus der Routinediagnostik (Kultur, pDST, Mikroskopie) extrahiert.

Ergebnisse aller Verfahren wurden nach Ausgangsmaterial und Probennummern sortiert und anonymisiert in einer Sammeltabelle in Excel zusammengefasst. Über die Ergebnisse der einzelnen Verfahren hinaus wurden keine weiteren Daten zur Person erhoben.

2.3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Stata Version 14.1.

Für die Auswertung der erhobenen Daten im Ergebnisteil wurden folgende Definitionen festgelegt:

$$\text{Sensitivität TB} = \frac{\text{Anzahl aller richtig Positiven im molekularen Verfahren}}{\text{Anzahl aller Positiven in Kultur (Referenzstandard)}}$$

$$\text{Spezifität TB} = \frac{\text{Anzahl aller richtig Negativen im molekularen Verfahren}}{\text{Anzahl aller Negativen in Kultur (Referenzstandard)}}$$

$$\text{Sensitivität Resistenz} = \frac{\text{Anzahl aller richtig Resistenten im molekularen Verfahren}}{\text{Anzahl aller Resistenten in pDST (Referenzstandard)}}$$

$$\text{Spezifität Resistenz} = \frac{\text{Anzahl aller richtig Sensiblen im molekularen Verfahren}}{\text{Anzahl aller Sensiblen in pDST (Referenzstandard)}}$$

Als richtig Positive, Negative, Resistente bzw. Sensible gelten die Proben, die sowohl im molekularen Verfahren, als auch im Referenzverfahren (Kultur bzw. pDST) positiv, negativ, resistent bzw. sensibel ausfallen.

2.3.7. Ethik

Für die Studie „Evaluation eines auf LATE-PCR basierenden Diagnostik-Verfahrens in der mykobakteriellen Routine-Diagnostik“ wurde an der Universität zu Lübeck ein Ethikantrag (Aktenzeichen 17-368) zur Arbeit mit Biomaterialien gestellt. Diesem wurde stattgegeben (siehe Appendix, 7.1.).

3. Ergebnisse

3.1. Sensitivität und Spezifität zum Nachweis von MTBC und Resistenzen von respiratorischem Primärmaterial (Sputum)

Für die Analyse von Sensitivität und Spezifität wurden nach Ausschlusskriterien (s. 2.2.1.) insgesamt 343 Proben analysiert (s. Tabelle 7-1, Appendix).

3.1.1. Erregernachweis

Von den 343 analysierten Proben waren in der Kultur 278 TB negativ. Sowohl FluoroType® MTBDR, als auch GenoType® MTBDR erkannten 277 der 278 Proben als richtig MTBC negativ. Dies entspricht einer Spezifität von 99,6% (95% KI: 98,0-100%). In einem Fall zeigten beide Testsysteme für die gleiche Probe ein falsch positives Testergebnis an. Da die in der Testreihe vorangegangene Probe ebenfalls positiv und vollständig sensibel gegenüber Erstlinienmedikamenten war, ist in diesem Falle von einer Kontamination der Probe (z.B. während der DNA-Extraktion) auszugehen.

Von den 343 analysierten Proben zeigten in der Kultur 65 Wachstum. Die Mehrheit der positiven Sputa konnten als *M. tuberculosis* (n=59) identifiziert werden. Die übrigen Sputa waren TB-Erreger vom Typ *M. africanum* (n=6).

Von den 65 kulturell positiven Sputa konnten im FluoroType® MTBDR 61 als richtig positiv detektiert werden. Dies entspricht einer Sensitivität von 93,8% (95% KI: 85,0-98,3%). Im Vergleich dazu konnten im GenoType® MTBDR*plus* 59 als richtig positiv detektiert werden. Für die vier Fälle, die in beiden Testsystemen falsch negativ ausgegeben wurden, lagen zusätzlich Ergebnisse des GeneXpert® MTB/RIF aus der Routinediagnostik vor. Diese waren ebenfalls negativ. Für beide Fälle, die im FluoroType® MTBDR richtig positiv, jedoch im GenoType® MTBDR*plus* falsch negativ ausfielen, konnte der FluoroType® MTBDR kein vollständiges Resistenzprofil ermitteln.

Von den 65 kulturell positiven Sputa waren 52 (80%) mikroskopisch positiv. Der FluoroType® MTBDR identifizierte alle 52 als richtig positiv. Der GenoType® MTBDR*plus* erkannte 51 von 52 mikroskopisch Positiven als richtig positiv. Dies entspricht Sensitivitäten von 100,0% (95% KI: 93,2-100,0%) bzw. 98,1% (95% KI: 89,7-100,0%) von FluoroType® MTBDR und GenoType® MTBDR*plus* von mikroskopisch Positiven. Von den 13 (20%) mikroskopisch negativen Proben konnten im FluoroType® MTBDR 9 von 13

als richtig positiv detektiert werden, im GenoType® MTBDR*plus* 8 von 13. Dies entspricht Sensitivitäten von 69,2% (95% KI: 38,6-90,9%) bzw. 61,5% (95% KI: 31,6-86,1%) von FluoroType® MTBDR und GenoType® MTBDR*plus* von mikroskopisch Negativen.

3.1.2. Resistenznachweis

Von den 65 kulturell positiven Sputa waren in der pDST 24 (36,9%) pansensibel, sieben INH-monoresistent (10,8%), eine Probe RMP-monoresistent (1,5%) und 33 (50,8%) multiresistent.

Die Anzahl der nicht eindeutig auswertbaren Resistenzergebnisse des FluoroType® MTBDR waren auch nach einmaliger Wiederholung von Analyseverfahren und DNA-Extraktion für *rpoB* 7 (11,4%), für *katG* 15 (24,6%) und für *inhA* 10 (15,4%). Diese lagen beim GenoType® MTBDR*plus* bei 1 für *rpoB* (1,7%), 2 für *katG* (3,4%) und 1 für *inhA* (1,7%).

Einen Überblick über Sensitivitäten und Spezifitäten zum Nachweis von MTBC und INH- und RMP-Resistenzen liefert Tabelle 3-1:

Tabelle 3-1 Vergleich Sensitivität und Spezifität von FluoroType® MTBDR und GenoType® MTBDRplus von respiratorischem Primärmaterial

<i>Testverfahren</i>	<i>FluoroType® MTBDR</i>	<i>GenoType® MTBDRplus</i>
<i>Anzahl Proben</i>	343	343
<i>Sensitivität TB</i>	61/65 = 93,8% (95% KI: 85,0-98,3%)	59/65 = 90,8% (95% KI: 81,0-96,5%)
<i>Spezifität TB</i>	277/278 = 99,6% (95% KI: 98,0-100,0%)	277/278 = 99,6% (95% KI: 98,0-100,0%)
<i>Sensitivität TB SSM+</i>	52/52 = 100% (95% KI: 93,2-100,0%)	51/52 = 98,1% (95% KI: 89,7-100,0%)
<i>Sensitivität TB SSM-</i>	9/13 = 69,2% (95% KI: 38,6-90,9%)	8/13 = 61,5% (95% KI: 31,6-86,1%)
<i>Sensitivität INH</i>	19/26 = 73,1% (95% KI: 61,2-95,0%)	24/35 = 68,6% (95% KI: 50,7-83,1%)
<i>Spezifität INH</i>	21/21 = 100% (95% KI: 83,9-100,0%)	21/21 = 100% (95% KI: 83,9-100,0%)
<i>Nicht auswertbar INH</i>	14/65 = 21,5% (95% KI: 12,3-33,5%)	3/59 = 5,1% (95% KI: 1,1-14,1%)
<i>Sensitivität RMP</i>	28/29 = 96,6% (95% KI: 82,2-99,9%)	32/33 = 97,0% (95% KI: 84,2-99,9%)
<i>Spezifität RMP</i>	24/25 = 96% (95% KI: 79,6-99,9%)	24/25 = 96% (95% KI: 79,6-99,9%)
<i>Nicht auswertbar RMP</i>	7/65 = 10,8% (95% KI: 4,4-20,9%)	1/59 = 1,7% (95% KI: 0,0-9,1%)

Die folgenden Mutationen konnten mit dem FluoroType® MTBDR nachgewiesen werden: Für *katG* die Mutation S315T1 (n=12), für *inhA* die Mutation C-15T (n=5) und für *rpoB* die Mutationen S531L (n=15), H526P (n=2), H526D (n=2), D516Y (n=1), H526Y (n=1), S531W (n=1) und L533P (n=1). In acht Fällen konnte eine nicht näher spezifizierte Mutation nachgewiesen werden, davon sechs auf *rpoB* und zwei auf *inhA*. Diese konnten mittels GenoType® MTBDR*plus* und Sanger-Sequenzierung als H526D (n=1), Q513K (n=1), seltene Insertion bei 509/510 (n=1), S531L (n=1), Wildtyp (n=1), C-8T (n=1), -17G/T (n=1) und Heteroresistenz von H526D, S531L und Wildtyp (n=1) identifiziert werden. Insgesamt lag in drei Probenanalysen eine Heteroresistenz vor. In zwei Fällen (S531L vs. H526P und L533P vs. S531L) herrschten Diskrepanzen zwischen GenoType® MTBDR*plus* und FluoroType® MTBDR. Diese wurden zugunsten der Ergebnisse des GenoType® MTBDR*plus* mittels Sequenzierung aufgelöst.

3.2. Sensitivität und Spezifität zum Nachweis von MTBC von extrapulmonalem Primärmaterial (Lymphknoten)

Für die Analyse von Sensitivität und Spezifität wurden nach Ausschlusskriterien insgesamt 45 Proben analysiert (s. Tabelle 7-2, Appendix).

Im FluoroType® MTBDR konnte für alle 45 Proben ein Ergebnis zum Nachweis von MTBC erbracht werden. Im GenoType® MTBDR $plus$ waren vier Proben (8,9%) nicht eindeutig auswertbar (z.B. fehlende TUB-Bande).

Von den 45 analysierten Proben waren in der Kultur 34 negativ. Sowohl FluoroType® MTBDR, als auch GenoType® MTBDR $plus$ erreichten für alle hinsichtlich MTBC auswertbaren Ergebnisse eine Spezifität von 100% (s. Tabelle 3-2).

Von den 45 analysierten Proben waren in der Kultur 11 positiv. Davon konnten die Mehrheit (n=10) als *M. tuberculosis* identifiziert werden, die Ausnahme stellte die Identifikation von einem Stamm *M. bovis ssp. bovis* dar (n=1).

Im FluoroType® MTBDR konnten sechs der elf positiven Proben als richtig positiv identifiziert werden. Dies entspricht einer Sensitivität von 54,5% (95% KI: 23,4-83,3%). Alle im FluoroType® MTBDR falsch Negativen waren mikroskopisch negativ. Im GenoType® MTBDR $plus$ konnten vier von acht auswertbaren Proben als richtig positiv identifiziert werden. Dies entspricht einer Sensitivität von 50,0% (95% KI: 15,7-84,3%).

Der FluoroType® MTBDR ergab für alle sechs MTBC positiv getesteten Proben auswertbare Resistenzergebnisse.

Tabelle 3-2 Vergleich Sensitivität und Spezifität FluoroType® MTBDR und GenoType® MTBDR von extrapulmonalem Primärmaterial

<i>Testverfahren</i>	<i>FluoroType® MTBDR</i>	<i>GT® MTBDRplus</i>
<i>Anzahl Proben</i>	45	41
<i>Sensitivität TB</i>	6/11 = 54,5% (95% KI: 23,4-83,3%)	4/8 =50,0% (95% KI: 15,7-84,3%)
<i>Spezifität TB</i>	34/34 =100,0% (95% KI: 89,7-100,0%)	33/33 = 100% (95% KI: 90,3-100,0%)

3.3. Sensitivität und Spezifität zum Nachweis von Resistenzen von kulturellen Isolaten

Für die Analyse von Sensitivität und Spezifität zum Nachweis von Resistenzen gegenüber INH und RMP wurden insgesamt 180 positive Kulturisolate untersucht. Die Mehrheit der Kulturen konnte als *M. tuberculosis* (n=173) identifiziert werden, gefolgt von *M. africanum* (n=5), *M bovis ssp. bovis* (n=1) und *M bovis var. BCG* (n=1).

Es wurden 85 Isolate (47,2%) als phänotypisch sensibel gegenüber INH und RMP getestet, 7 waren INH-monoresistent (3,9%) und 7 RMP-monoresistent (3,9%), sowie 81 multiresistent (45,0%) (s. Tabelle 7-3).

Im FluoroType® MTBDR konnten für *katG* drei (1,7%) und für *inhA* eine (0,6%) Probe nicht eindeutig ausgewertet werden. Im GenoType® MTBDRplus konnte *katG* einmalig (0,6%) nicht ausgewertet werden. Eine Interpretation der RMP-Resistenz war mit beiden Testverfahren für alle Isolate möglich.

Einen Überblick über Sensitivitäten und Spezifitäten zum Nachweis von INH- und RMP-Resistenzen liefert Tabelle 3-3:

Tabelle 3-3 Vergleich Sensitivität und Spezifität FluoroType® MTBDR und GenoType® MTBDRplus von kulturellen Isolaten

Testverfahren	FluoroType® MTBDR	GenoType® MTBDRplus
Anzahl Proben	180	180
Sensitivität INH	77/84 = 91,7% (95% KI: 83,6-96,6%)	84/87 = 96,6% (95% KI: 90,3-99,3%)
Spezifität INH	92/92 = 100% (95% KI: 96,1-100,0%)	92/92 = 100% (95% KI: 96,1-100,0%)
Sensitivität RMP	87/88 = 98,9% (95% KI: 93,8-100,0%)	85/87 = 97,7% (95% KI: 92,0-99,7%)
Spezifität RMP	92/92 = 100% (95% KI: 96,1-100,0%)	92/92 = 100% (95% KI: 96,1-100,0%)

Die folgenden Mutationen konnten mit dem FluoroType® MTBDR nachgewiesen werden: Für *katG* S315T1 (n=72) und S315T2 (n=1), für *inhA* die Mutationen C-15T (n=9) und T-8C (n=2), sowie für *rpoB* die Mutationen S531L (n=56), D516V (n=6), D516Y (n=2), H526D (n=5), H526N (n=1), H526P (n=3), H526R (n=1), H526Y (n=4) und L533P (n=2). In acht Fällen wurde eine nicht näher spezifizierte Mutation nachgewiesen, davon sieben *rpoB* Mutationen und eine *katG* Mutation. Diese konnten mittels GenoType® MTBDRplus

und Sanger-Sequenzierung als H526L (n=3), S531L (n=1), Q513K (n=1), D516Y (n=1), S315T1 (n=1) und Heteroresistenz von H526D und S531L identifiziert werden.

Insgesamt wurden vier Heteroresistenzen entdeckt. Zusätzlich zu dem bereits beschriebenen Fall lag in einer Kultur eine Mischung von Isolaten mit einer *rpoB* D516Y und S531L Mutation vor. Der FluoroType® MTBDR identifizierte die seltenere Mutation (D516Y), während der GenoType® MTBDR*plus* die Heteroresistenz erkannte. In einer Kultur lag eine Heteroresistenz von Wildtyp und L533P vor. Der FluoroType® MTBDR erkannte die Mutation, der GenoType® den Wildtyp. In einer weiteren Kultur fehlinterpretierte der FluoroType® MTBDR eine Heteroresistenz von H526D und S531L als H526R, während der GenoType® MTBDR*plus* die Heteroresistenz richtig erkannte.

In drei Kulturisolaten identifizierte der FluoroType® MTBDR eine H526P Mutation, die in der Sequenzierung eine H526L Mutation ergab. Bei vier Kulturisolaten ermittelte der FluoroType® MTBDR einen Wildtyp, während der GenoType® MTBDR*plus* die Probe als richtig resistent ausgewertete. Dies führte zu einer höheren Sensitivität des GenoType® MTBDR*plus* gegenüber dem FluoroType® MTBDR für den Nachweis einer INH-Resistenz.

3.4. Vergleich zweier DNA-Extraktionsmethoden zur Anpassung an routinediagnostische Abläufe am NRZ Borstel

Die Auswirkung der DNA-Extraktionsmethode auf die Auswertbarkeit der FluoroType® MTBDR Ergebnisse wurde unter Verwendung von 122 positiven, kulturellen Isolaten analysiert.

Für alle der 122 Isolate konnten mit beiden Methoden Resistenzen zumindest teilweise ausgewertet werden. Keine der beiden Methoden ergab nicht auswertbare Ergebnisse über alle Genloci. Mit der FluoroLyse®-Methode ergaben sich für drei Kulturen (2,5%) Ausfälle im *inhA*. Mit der intern entwickelten Methode konnten bei zwei Kulturen (1,6%) INH-Resistenzen nicht ausgewertet werden: Ein Ausfall auf *katG* und einer auf *inhA*.

Im Vergleich der beiden Methoden wurden Wildtypen übereinstimmend (284/284) als Wildtypen identifiziert werden. Auch resistente Kulturen wurden übereinstimmend als resistent getestet. In einem Kulturisolat ergab sich eine Differenz der zu Grunde liegenden Mutation auf *rpoB* (S531L statt H526P), sodass diesbezüglich eine 98,7% Übereinstimmung (78/79) ermittelt wurde. *katG* und *inhA* Ergebnisse waren für alle Proben konkordant.

4. Diskussion

4.1. Evaluation der Ergebnisse

Bei der Fragestellung, wie hoch Sensitivität und Spezifität zum Nachweis von MTBC-DNA von respiratorischem Primärmaterial (Sputum) sind, konnte gezeigt werden, dass der FluoroType® MTBDR gegenüber dem GenoType® MTBDR*plus* sogar eine gesteigerte Sensitivität zum Nachweis von MTBC-DNA besitzt (93,8% gegenüber 90,8%). Dies könnte durch ein niedrigeres LOD bedingt sein. Auch für den Nachweis einer Resistenz gegenüber den wichtigsten Erstlinienmedikamenten konnten höhere Sensitivitäten und gleiche Spezifitäten ermittelt werden. Schwachpunkt des FluoroType®-Verfahrens ist die Rate an nicht auswertbaren Resistenzergebnissen, die gegenüber dem GenoType® MTBDR*plus* deutlich erhöht ist.

Bei der anschließenden Fragestellung, wie hoch Sensitivität und Spezifität zum Nachweis von MTBC-DNA von extrapulmonalem Primärmaterial (Lymphknoten) sind, zeigte sich, dass der FluoroType® MTBDR auch bei paucibacillären Proben mehr als 50% aller MTBC positiven Proben detektiert. Die Detektion hing vor allem vom mikroskopischen Befund bzw. der zu Grunde liegenden Bakterienlast ab.

Die Untersuchung von Kulturisolaten ergab eine relativ hohe Sensitivität und sehr hohe Spezifität zum Nachweis einer INH-Resistenz und eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität zum Nachweis einer RMP-Resistenz. Gegenüber dem GenoType® MTBDR konnte ein größeres Spektrum an Mutationen detektiert werden.

Im Vergleich zweier DNA-Extraktionsmethoden wurde erfolgreich gezeigt, dass sich Teilschritte des FluoroType®-Verfahrens an individuelle Laborabläufe anpassen lassen. Insgesamt zeigte sich eine sehr große Übereinstimmung zwischen Ergebnissen beider DNA-Extraktionsmethoden.

4.2. Vergleich des FluoroType® MTBDR mit aktuell empfohlenen NATs

Im Vergleich mit anderen, kommerziell verfügbaren Verfahren erreicht der FluoroType® MTBDR in dieser Arbeit für den Nachweis von TB-Erregern ein sehr gutes Ergebnis. Mit einer Sensitivität von 93,8% zum Nachweis von MTBC aus Direktmaterial ist der FluoroType® MTBDR in dieser Arbeit sensitiver als der GeneXpert® MTB/RIF (Meta-Analyse von Steingart et al. 2014). Der Cochrane Review des GeneXpert® MTB/RIF

ermittelt eine Sensitivität von 89,0% (95% KI: 85,0-92,0%) für respiratorische Proben. Diese Sensitivität wurde für eine Mischung aus mikroskopisch positiven und negativen Proben berechnet. Der in dieser Arbeit ebenfalls getestete GenoType® MTBDR_{plus} erreicht in einem systematischen Review von Nathavitharana et al. eine Sensitivität von 85,0% (95% KI: 70,0-93,3%) für den Nachweis von TB-Erregern aus respiratorischen Proben (Nathavitharana et al. 2017). In dieser Arbeit wurde für den GenoType® MTBDR_{plus} eine Sensitivität von 90,8% (95% KI: 81,0-96,5%) ermittelt. Diese gegenüber anderen Studien erhöhte Sensitivität ist unter anderem durch einen hohen Anteil mikroskopisch positiver Proben in dieser Arbeit bedingt (80%). Die Spezifität des FluoroType® MTBDR (99,6%, 95% KI 98,0-100,0%) entspricht ähnlichen Daten von Nathavitharana et al. (2017) und Steingart et al. (2014) für Spezifitäten des GenoType® MTBDR_{plus} (100,0%, 95% KI: 91,0%-100,0%) und des GeneXpert MTB/RIF (98,0%, 95% KI: 97,0-99,0%).

Proben, die in der Kultur ein Wachstum zeigen, aber in der Mikroskopie negativ sind, haben eine niedrigere Bakterienlast. Aus diesem Grund ist die Sensitivität für mikroskopisch negative Proben niedriger als für mikroskopisch positive Proben. So ermittelten Steingart et al. für den GeneXpert® MTB/RIF eine Sensitivität von 98,0% (95% KI: 97,0-99,0%) für mikroskopisch positive Proben und 67,0% (95% KI: 60,0-74,0%) für mikroskopisch negative Proben (Steingart et al. 2014). Nathavitharana et al. berechneten für den GenoType® MTBDR_{plus} eine Sensitivität von 94,4% (95% KI: 89,4-99,4%) für mikroskopisch positive Proben und eine Sensitivität von 44,4% (95% KI: 20,2-71,7%) für mikroskopisch negative Proben (Nathavitharana et al. 2017). In dieser Arbeit ermittelten wir für den FluoroType® MTBDR eine Sensitivität von 100% (95% KI: 93,2-100,0%) für mikroskopisch positive Proben und eine Sensitivität von 69,2% (95% KI: 38,6-90,9%) für mikroskopisch negative Proben.

Schwächen zeigen der FluoroType® MTBDR und der GenoType® MTBDR_{plus} beim Nachweis einer INH-Resistenz. Die Sensitivität zum Nachweis einer INH-Resistenz betrug für den FluoroType® MTBDR 91,7% für Kulturoisolate und 73,1% für Direktmaterial. Ähnliche Ergebnisse wurden für den GenoType® MTBDR_{plus} ermittelt. Dies könnte Hinweis auf alternative Resistenzmechanismen für INH sein, die mit den beiden Verfahren nicht abgedeckt werden (z.B. auf dem *ahpC*-Gen) (Unissa et al. 2016). Beide Verfahren sind 100% spezifisch für den Nachweis einer INH-Sensibilität.

Über die moderate Sensitivität zum Nachweis einer INH-Resistenz hinaus zeigte der FluoroType® MTBDR vergleichsweise hohe Raten an nicht auswertbaren Ergebnissen bei der Auswertung von Resistenzprofilen aus Primärmaterial. Im Gegensatz dazu berichteten die Meta-Analysen von Steingart et al. (2014) und Nathavitharana et al. (2017) beim GeneXpert® MTB/RIF von 1,0% und beim GenoType® MTBDR*plus* von 5,3% nicht auswertbaren Resistenzergebnissen. In dieser Arbeit wurde eine Rate von 11,5% nicht auswertbarer Ergebnisse zum Nachweis einer RMP-Resistenz von Direktmaterial ermittelt. Mängel zeigte der FluoroType® MTBDR beim Nachweis einer INH-Resistenz: 23,5% aller INH-Resistenzergebnisse konnten bei einer Untersuchung von Direktmaterial nicht ausgewertet werden. Bei der Untersuchung von Kulturoisolen erzielte der FluoroType® MTBDR ähnlich niedrige Raten nicht auswertbarer Ergebnisse wie der GenoType® MTBDR*plus* (0,5-1,0%).

Für den Nachweis einer Resistenz gegenüber RMP lieferte der FluoroType® MTBDR in dieser Arbeit gegenüber anderen molekularen Verfahren vergleichbare Ergebnisse. So weist der GenoType® MTBDR*plus* nach Analysen von Nathavitharana et al. (2017) eine RMP-Resistenz bei Untersuchung von Kulturoisolen mit einer Sensitivität von 96,9% (95% CI 95,5–98,0%) nach. Im Vergleich erreichte der FluoroType® MTBDR in dieser Arbeit eine Sensitivität von 98,9% (95% KI: 93,8-100,0%). Auch Spezifitäten unterscheiden sich nur geringfügig. Für den Nachweis einer RMP-Resistenz von Direktmaterial erreicht der vor allem auf die Direktverarbeitung ausgerichtete GeneXpert® MTBDR eine Sensitivität von 95,0% (95% KI: 90,0-97,0%) (Steingart et al. 2014). FluoroType® MTBDR und GenoType® MTBDR*plus* übertreffen diese marginal (96,6 bzw. 96,3%). Spezifitäten unterscheiden sich kaum, wobei der GenoType® MTBDR*plus* die höchste Spezifität aufweist (98,2%, 95% KI:97,2–98,8%).

Für den Nachweis von TB von extrapulmonalem Primärmaterial mit molekularen Verfahren existieren bisher wenige Daten. Für den ursprünglich nicht auf extrapulmonale Materialien ausgelegten GenoType® MTBDR*plus* geben Kumari et al. eine Sensitivität bzw. Spezifität von 92,8 bzw. 97,3% für die Detektion von MDR-TB an (Kumari et al. 2016). In besagter Studie wurden hauptsächlich Eiter und Magensaft untersucht, während in unserer Arbeit paucibacilläres Gewebe (Lymphknotenbiopsate) untersucht wurden. Mehr Daten existieren für den GeneXpert® MTB/RIF (Denkinger et al. 2014). In einem systematischen Review geben Denkinger et al. (2014) eine Sensitivität von 81,3% (95% CI 71,4–90,7%) für den Nachweis von TB von Lymphknotenaspiraten oder -biopsien an. Negative Proben erkenne

der GeneXpert® MTB/RIF mit einer Spezifität von 93,6% (95% CI 87,9–96,8%). Für den FluoroType® MTBDR existieren bisher keine veröffentlichten Daten zur Untersuchung extrapulmonaler Materialien. In einer kleinen Studie aus Griechenland geben Papaventsis et al. für den Vorgänger FluoroType® MTB eine Sensitivität bzw. Spezifität von 40,0% bzw. 97,7% für den Nachweis von Lymphknotenmaterial an (Papaventsis 2015). In dieser Arbeit konnte bei kleiner Probenzahl für den Nachweis von MTBC aus von Lymphknotenmaterial mit dem FluoroType® MTBDR eine Sensitivität von 54,5% (95% KI: 23,4-83,3%) gezeigt werden. Damit lag die Sensitivität in dieser Arbeit höher als die Sensitivität des ebenfalls getesteten GenoType® MTBDR*plus* mit 50,0% (95% KI: 15,7-84,3%). Die Spezifität des FluoroType® MTBDR lag in dieser Arbeit bei 97,3% (95% KI: 85,8%-99,9%).

4.3. Strukturelle Analyse des FluoroType® MTBDR

Während die Detektion von INH-Resistenzen aus Direktmaterial Verbesserungsbedarf zeigt, liefert der FluoroType® MTBDR insgesamt eine Leistung, die mit von der WHO empfohlenen molekularen Verfahren vergleichbar ist. Neben technischen Daten liefert der FluoroType® MTBDR auch strukturelle Vorteile:

Das geschlossene System des FluoroType® MTBDR ist im Vergleich zu offenen Systemen wie z.B. dem GenoType® MTBDR*plus* weniger kontaminationsanfällig. Der hohe Grad an Automatisierung erfordert einen geringen Schulungsbedarf, der dem GeneXpert® MTB/RIF vergleichbar ist und eine schnelle Implementierung in vorhandene Diagnostikalgorithmien erlaubt. Ergebnisse sind durch automatisierte Interpretation weniger anfällig für Auswertefehler verglichen mit manueller Auswertung, wie z.B. beim GenoType® MTBDR*plus*. Die FluoroType® Plattform ermöglicht mit einem einzelnen Gerät das Testen von bis zu 94 Proben in unter 5 Stunden von Probeneingang bis zur Ergebnisausgabe im LIMS. Der GeneXpert® benötigt etwas weniger Zeit, kann allerdings maximal 16 Proben pro Gerät untersuchen. Der GenoType® MTBDR*plus* kann bis zu 48 Proben gleichzeitig untersuchen, benötigt dafür aber mit DNA-Extraktion und hoher manueller Bearbeitungszeit etwa 7 Stunden. Mit seiner hohen Umsatzzahl in kurzer Zeit eignet sich der FluoroType® MTBDR daher vor allem für Groß- und Referenzlabore. Zusätzlich kann der FluoroType® auch bei anderen Erkrankungen wie z.B. einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus oder MRSA als diagnostische Plattform eingesetzt werden. Durch Weiterentwicklungsmöglichkeiten des LATE-PCR basierten Verfahrens könnten in Zukunft auch Resistenzen gegenüber Zweitlinienmedikamenten im Rahmen von MDR-Therapien untersucht werden.

Struktureller Nachteil des FluoroType® MTBDR sind die notwendigen Zusatzgeräte in der Probenvorbereitung (Plattenzentrifuge, Folienversiegler). Der FluoroType® MTBDR benötigt weniger Equipment als der GenoType® MTBDR*plus*, kann jedoch nicht wie der GeneXpert® MTB/RIF quasi alleinstehend genutzt werden. Blutige Proben können in der Regel nicht ausgewertet werden, da die PCR des FluoroType® MTBDR inhibiert wird. Dies trifft jedoch auch auf andere molekulare Verfahren zu. Des Weiteren müssen Kulturoisolate und Direktmaterial getrennt voneinander untersucht werden, da die notwendige PCR-Zykluszahl für Direktmaterial gegenüber Kulturoisolaten höher ist.

4.4. Stärken und Schwächen dieser Arbeit

Diese Arbeit weist einige Stärken und Schwächen auf. Das NRZ Borstel ist eines von zwei nationalen Referenzzentren in Deutschland. Mykobakterielle Untersuchungen sind standardisiert und qualitätskontrolliert. Vergleichsweise hohe Probezahlen konnten in die Arbeit einbezogen werden. Nichtsdestotrotz konnten vor allem für die Fragestellung der Sensitivität im Nachweis von TB bei Lymphknoten nicht ausreichend hohe Fallzahlen generiert werden, um eine Sensitivität mit genügend Genauigkeit zu ermitteln. Um eine möglichst hohe Probenanzahl zu untersuchen wurden Proben über einen Zeitraum von mehr als 6 Monaten gesammelt und tiefgefroren gelagert. In der Literatur wird diskutiert, ob dies einen negativen Effekt auf die Sensitivität im Nachweis von TB und Resistenzen haben könnte (Denkinger et al. 2014; Steingart et al. 2014). Darüber hinaus lassen sich Sensitivitäten für Resistenzen nicht generalisieren, da sie z.T. von epidemiologischen Gegebenheiten der untersuchten Proben bzw. der Verteilung von zirkulierenden Mutationen abhängen.

Nahezu alle Versuche wurden von einem Untersucher durchgeführt. Dieser wurde während der Untersuchungen für die Ergebnisse der Referenzstandards verblindet, sodass eine Voreingenommenheit und unbewusste Beeinflussung der Ergebnisse nicht möglich war.

4.5. Resümee

Molekulare Verfahren ermöglichen in der mykobakteriellen Routinediagnostik eine schnelle Auskunft über das Vorhandensein von MTBC in einer Patientenprobe und ermitteln zusätzlich Resistenzen gegenüber den wichtigsten Erstlinienmedikamenten. Eine akkurate Resistenztestung ermöglicht eine schnelle Behandlung mit adäquaten Therapieregimen. Durch kontinuierliche Weiterentwicklung und breitflächigen Einsatz diagnostischer

Verfahren kann die TB frühzeitig diagnostiziert werden, was wiederum zur erfolgreichen TB-Kontrolle beitragen kann.

In dieser Arbeit wurden für den FluoroType® MTBDR im Nachweis von TB sehr gute Ergebnisse erzielt. Verbesserungspotential ist beim Nachweis von INH-Resistenzen von Direktmaterial gegeben. RMP-Resistenzen wurden mit hoher Sensitivität erkannt. Für den Nachweis von TB aus extrapulmonalem Primärmaterial bedarf es einer größeren Probenanzahl, um eine genauere Aussage treffen zu können.

Insgesamt ist der FluoroType® MTBDR ein sehr einfaches, akkurates Diagnostikum im Nachweis von TB und Resistenzen gegenüber Erstranglinienmedikamenten und könnte dadurch in Zukunft den GenoType® MTBDR*plus*, der ähnliche Parameter untersucht, in der Routinediagnostik ablösen. Durch seine Fähigkeit, gegenüber dem GeneXpert® MTB/RIF auch eine INH-Resistenz zu detektieren könnte der FluoroType® MTBDR eine Lücke in der mykobakteriellen Routinediagnostik schließen. So könnten standardmäßig auch die gegenüber DS-TB mit einem schlechteren Outcome assoziierten INH-Monoresistenzen erkannt werden. Zum standardisierten Einsatz des FluoroType® MTBDR bedarf es allerdings weiterer, unabhängiger Validierungen in anderen epidemiologischen Settings.

5. Zusammenfassung

Tuberkulose (TB) ist trotz effektiver Therapieregime immer noch die neunthäufigste Todesursache weltweit (WHO 2017). Dies liegt unter anderem an dem vermehrten Auftreten von Medikamenten resistenten Formen der TB (Nourzad et al. 2017). Diese werden bisher unzureichend diagnostiziert (WHO 2015a). TB-Erreger sind durch ihren einzigartigen Wandaufbau auf natürliche Weise besonders resistent gegenüber herkömmlichen Antibiotika (Jarlier und Nikaido 1994). Resistenzen gegenüber Antituberkulotika entstehen bei TB-Erregern durch sequentielle Akkumulation von Resistenz-definierenden Mutationen (Miotto et al. 2017). Diese können mit molekularen Verfahren gegenüber dem Referenzstandard Kultur bzw. phänotypischer Resistenztestung (pDST) in verkürzter Zeit und mit geringerem Biosicherheitsaufwand nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde ein neues, auf LATE-PCR basierendes Verfahren auf Sensitivität und Spezifität im Nachweis von MTBC-DNA und INH- und RMP-Resistenzen untersucht. Dazu wurden drei unterschiedliche Ausgangsmaterialien (respiratorisches und extrapulmonales Primärmaterial, Kulturoisolate) mit dem FluoroType® MTBDR untersucht. Zum Vergleich wurden alle Proben ebenfalls mit dem GenoType® MTBDR*plus* untersucht. Als Referenz für den Nachweis der TB galt die Kultur. Als Referenz für die Resistenzanalyse galt die pDST. Ergebnisdiskrepanzen wurden durch Sanger-Sequenzierung untersucht.

Die Sensitivität des FluoroType® MTBDR zum Nachweis von MTBC-DNA aus respiratorischem Primärmaterial war mit 93,8% sehr hoch. Auch RMP-Resistenzen konnten im Vergleich mit ähnlichen Verfahren mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden. Der Nachweis einer INH-Resistenz ist bei Vorliegen von *inhA* und/oder *katG* Mutationen möglich, jedoch war ein hoher Anteil der Proben bezüglich der INH-Resistenz nicht auswertbar. Dies traf vor allem auf Proben mit niedriger Bakterienlast zu. In einer Stichprobe von Lymphknotenmaterial konnte gezeigt werden, dass der FluoroType® MTBDR auch bei paucibacillären Proben in mehr als 50% der Fälle MTBC-DNA nachweisen kann. Abläufe des FluoroType® MTBDR sind darüber hinaus auf individuelle Laborgegebenheiten anpassbar.

Insgesamt ist der FluoroType® MTBDR ein schnelles, robustes und einfaches Verfahren, um TB und Resistenzen gegenüber den Erstlinienmedikamenten INH und RMP nachzuweisen. Durch stetige Verbesserung diagnostischer Algorithmen könnte der FluoroType® MTBDR routinemäßig in der mykobakteriellen Diagnostik eingesetzt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Arastéh K, Baenkler H-W, Bieber C, Brandt R, Chatterjee TT: Lungentuberkulose; in: *Duale Reihe Innere Medizin*, 2.; Thieme, Stuttgart 2009, 380–386
- Banada PP, Sivasubramani SK, Blakemore R, Boehme C, Perkins MD, Fennelly K, Alland D (2010): Containment of Bioaerosol Infection Risk by the Xpert MTB/RIF Assay and Its Applicability to Point-of-Care Settings. *J Clin Microbiol* 48, 3551–3557
- Barnard M, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Bosman M, Coetzee G, Warren RM (2012): The Diagnostic Performance of the GenoType MTBDRplus Version 2 Line Probe Assay Is Equivalent to That of the Xpert MTB/RIF Assay. *J Clin Microbiol* 50, 3712–3716
- Bhalla M, Sidiq Z, Sharma PP, Singhal R, Myneedu VP, Sarin R (2013): Performance of light-emitting diode fluorescence microscope for diagnosis of tuberculosis. *Int J Mycobacteriology* 2, 174–178
- Biadlegne F, Tessema B, Rodloff A, Sack U (2013): Magnitude of Gene Mutations conferring Drug Resistance in *M. tuberculosis* isolates from Lymph Node Aspirates in Ethiopia. *Int J Med Sci* 1589–1594
- Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, Allen J, Tahirli R, Blakemore R, Rustomjee R, et al. (2010): Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. *N Engl J Med* 363, 1005–1015
- Bollela VR, Namburete EI, Feliciano CS, Macheque D, Harrison LH, Caminero JA (2016): Detection of *katG* and *inhA* mutations to guide isoniazid and ethionamide use for drug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis* 20, 1099–1104
- Brennan PJ, Nikaido H (1995): The Envelope of Mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 64, 29–63
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, et al. (2002): A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3684–3689
- Cambau E, Drancourt M (2014): Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. *Clin Microbiol Infect* 20, 196–201
- Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, Rist N, Šmelev NA (1969): Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ* 41, 21–43
- Caulfield AJ, Wengenack NL (2016): Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *J Clin Tuberc Mycobact Dis* 4, 33–43
- Chakravorty S, Simmons AM, Rowneki M, Parmar H, Cao Y, Ryan J, Banada PP, Deshpande S, Shenai S, Gall A, et al. (2017): The New Xpert MTB/RIF Ultra: Improving Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Resistance to Rifampin in an Assay Suitable for Point-of-Care Testing. *mBio* 8

- Chang K, Lu W, Wang J, Zhang K, Jia S, Li F, Deng S, Chen M (2012): Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: A meta-analysis. *J Infect* 64, 580–588
- Chihota VN, Grant AD, Fielding K, Ndibongo B, van Zyl A, Muirhead D, Churchyard GJ (2010): Liquid vs. solid culture for tuberculosis: performance and cost in a resource-constrained setting. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis* 14, 1024–1031
- CLSI: Laboratory detection and identification of mycobacteria; Approved guideline; Band 28; CLSI Dokument M48-A. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute 2008, 9–23
- Crudu V, Stratan E, Romancenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N (2012): First Evaluation of an Improved Assay for Molecular Genetic Detection of Tuberculosis as Well as Rifampin and Isoniazid Resistances. *J Clin Microbiol* 50, 1264–1269
- Daniel TM (2006): The history of tuberculosis. *Respir Med* 100, 1862–1870
- David HL (1970): Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol* 20, 810–814
- Davies PD (2000): Tuberculosis: the global epidemic. *J Indian Med Assoc* 98, 100–102
- Dean AS, Cox H, Zignol M: Epidemiology of Drug-Resistant Tuberculosis; in: *Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control*; Springer, Cham 2017, 209–220
- Denkinger CM, Nicolau I, Ramsay A, Chedore P, Pai M (2013): Are peripheral microscopy centres ready for next generation molecular tuberculosis diagnostics? *Eur Respir J* 42, 544–547
- Denkinger CM, Schumacher SG, Boehme CC, Dendukuri N, Pai M, Steingart KR (2014): Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 44, 435–446
- Doshi R, Falzon D, Thomas BV, Temesgen Z, Sadasivan L, Migliori GB, Raviglione M (2017): Tuberculosis control, and the where and why of artificial intelligence. *ERJ Open Res* 3
- Falzon D, Mirzayev F, Wares F, Baena IG, Zignol M, Linh N, Weyer K, Jaramillo E, Floyd K, Raviglione M (2015): Multidrug-resistant tuberculosis around the world: what progress has been made? *Eur Respir J* 45, 150–160
- Gagneux S (2009): Fitness cost of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 15 Suppl 1, 66–68
- Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, Lalloo U, Zeller K, Andrews J, Friedland G (2006): Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *The Lancet* 368, 1575–1580

- Gegia M, Winters N, Benedetti A, van Soolingen D, Menzies D (2017): Treatment of isoniazid-resistant tuberculosis with first-line drugs: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 17, 223–234
- Gillespie SH (2002): Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 267–274
- Grange JM, Zumla A (2002): The global emergency of tuberculosis: what is the cause? *J R Soc Promot Health* 122, 78–81
- Greinert U, Hillemann D, Lange C, Richter E (2007): Antibiotikaresistente Tuberkulose. *Med Klin* 102, 957–966
- Gygli SM, Borrell S, Trauner A, Gagneux S (2017): Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiol Rev* 41, 354–373
- Heifets LB, Cangelosi GA (1999): Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: a neglected problem at the turn of the century [State of the Art]. *Int J Tuberc Lung Dis* 3, 564–581
- Hoffmann H, Hoffmann-Thiel S, Königsstein B, Moressi-Hauf A, Neher A, Schlags R: *Tuberkulosedagnostik mit modernen Mitteln. 1.*; UNI-MED Verlag AG, Bremen 2015
- Jarlier V, Nikaido H (1994): *Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics.* *FEMS Microbiol Lett* 123, 11–18
- Kayser FH, Böttger EC, Deplazes P, Haller O, Roers A: *Mycobacterium*; in: *Medizinische Mikrobiologie*, 13.; Thieme, Stuttgart 2014, 294–300
- Kent PT (1985): *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory.* U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga
- Koch R (1882): Die Ätiologie der Tuberkulose. *Berl Klin Wochenschr* 15, 428–445
- Kostera J, Leckie G, Tang N, Lampinen J, Szostak M, Abravaya K, Wang H (2016): Analytical and clinical performance characteristics of the Abbott RealTime MTB RIF/INH Resistance, an assay for the detection of rifampicin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary specimens. *Tuberculosis* 101, 137–143
- Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K (2011): The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* 469, 483
- Kumari R, Tripathi R, Pandey AP, Banerjee T, Sinha P, Anupurba S (2016): Rapid Screening of MDR-TB in Cases of Extra Pulmonary Tuberculosis Using Geno Type MTBDRplus. *PLoS ONE* 11
- Loddenkemper R, Hauer B (2010): Drug-Resistant Tuberculosis. *Dtsch Arzteblatt Int* 107, 10–19

- Mailaender C, Reiling N, Engelhardt H, Bossmann S, Ehlers S, Niederweis M (2004): The MspA porin promotes growth and increases antibiotic susceptibility of both *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Read Engl* 150, 853–864
- Matabane MMZ, Ismail F, Strydom KA, Onwuegbuna O, Omar SV, Ismail N (2015): Performance evaluation of three commercial molecular assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical specimens in a high TB-HIV-burden setting. *BMC Infect Dis* 15
- Maurya AK, Umrao J, Singh AK, Kant S, Kushwaha RAS, Dhole TN (2013): Evaluation of GenoType® MTBDRplus assay for rapid detection of drug susceptibility testing of multi-drug resistance tuberculosis in Northern India. *Indian J Pathol Microbiol* 56, 139
- Meaza A, Kebede A, Yaregal Z, Dagne Z, Moga S, Yenew B, Diriba G, Molalign H, Tadesse M, Adisse D, et al. (2017): Evaluation of genotype MTBDRplus VER 2.0 line probe assay for the detection of MDR-TB in smear positive and negative sputum samples. *BMC Infect Dis* 17
- Miotto P, Tessema B, Tagliani E, Chindelevitch L, Starks AM, Emerson C, Hanna D, Kim PS, Liwski R, Zignol M, et al. (2017): A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J* 50
- Mitchison DA (1969): What is drug resistance? *Tubercle* 50, Suppl:44-47
- Mo L, Zhang W, Wang J, Weng XH, Chen S, Shao LY, Pang MY, Chen ZW (2004): Three-Dimensional Model and Molecular Mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (KatG) and Isoniazid-Resistant KatG Mutants. *Microb Drug Resist* 10, 269–279
- Naidoo P, Theron G, Rangaka MX, Chihota VN, Vaughan L, Brey ZO, Pillay Y (2017): The South African Tuberculosis Care Cascade: Estimated Losses and Methodological Challenges. *J Infect Dis* 216, 702–713
- Nathavitharana RR, Cudahy PGT, Schumacher SG, Steingart KR, Pai M, Denkinger CM (2017): Accuracy of line probe assays for the diagnosis of pulmonary and multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 49
- Neelsen F (1883): Ein casuistischer Beitrag zur Lehre von der Tuberkulose. *Cent Für Med Wiss* 497–501
- Nourzad S, Jenkins HE, Milstein M, Mitnick CD (2017): COUNTING THE MISSING CASES: ESTIMATING THE GLOBAL BURDEN OF MULTIDRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS AMONG PREVALENT CASES OF TB. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis* 21, 6–11
- Ormerod LP (2005): Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): epidemiology, prevention and treatment. *Br Med Bull* 73–74, 17–24
- Papaventsis D (2015): Retrospective evaluation of the diagnostic accuracy of FluoroType® MTB assay used for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples in Greece

- Peeling RW, Mabey D (2010): Point-of-care tests for diagnosing infections in the developing world. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 16, 1062–1069
- Procop GW (2016): Laboratory Diagnosis and Susceptibility Testing for Mycobacterium tuberculosis. *Microbiol Spectr* 4
- Rice JE, Reis AH, Rice LM, Carver-Brown RK, Wangh LJ (2012): Fluorescent signatures for variable DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 40, e164
- Ruiz P, Causse M, Vaquero M, Gutierrez JB, Casal M (2017): Evaluation of a new automated Abbott RealTime MTB RIF/INH assay for qualitative detection of rifampicin/isoniazid resistance in pulmonary and extra-pulmonary clinical samples of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Drug Resist* 10, 463–467
- Sanchez JA, Pierce KE, Rice JE, Wangh LJ (2004): Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1933–1938
- Silva J, Appelberg R, Gama F: Antimicrobial peptides as novel anti-tuberculosis therapeutics. *Band 34*; 2016
- Singhal R, Myneedu VP (2015): Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *Int J Mycobacteriology* 4, 1–6
- Small PM, Pai M (2010): Tuberculosis Diagnosis — Time for a Game Change. *N Engl J Med* 363, 1070–1071
- Ssengooba W, Kateete DP, Wajja A, Bugumirwa E, Mboowa G, Namaganda C, Nakayita G, Nassolo M, Mumbowa F, Asiiimwe BB, et al. (2012): An Early Morning Sputum Sample Is Necessary for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis, Even with More Sensitive Techniques: A Prospective Cohort Study among Adolescent TB-Suspects in Uganda. *Tuberc Res Treat* 2012
- Stagg H, Lipman M, McHugh T, Jenkins H (2017): Isoniazid resistant tuberculosis- a cause for concern? *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis* 21, 129–139
- Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, Urbanczik R, Perkins M, Aziz MA, Pai M (2006): Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 6, 570–581
- Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N (2014): Xpert® Mtb/Rif assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 1–166
- Takayama K, Wang L, David HL (1972): Effect of Isoniazid on the In Vivo Mycolic Acid Synthesis, Cell Growth, and Viability of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2, 29–35
- Telenti A, Honoré N, Bernasconi C, March J, Ortega A, Heym B, Takiff HE, Cole ST (1997): Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a blind study at reference laboratory level. *J Clin Microbiol* 35, 719–723

- Tiberi S, Buchanan R, Caminero JA, Centis R, Arbex MA, Salazar M, Potter J, Migliori GB (2017): The challenge of the new tuberculosis drugs. *Presse Médicale* 46, e41–e51
- Tomasichio M, Theron G, Pietersen E, Streicher E, Stanley-Josephs D, van Helden P, Warren R, Dheda K (2016): The diagnostic accuracy of the MTBDRplus and MTBDRsl assays for drug-resistant TB detection when performed on sputum and culture isolates. *Sci Rep* 6
- Trauner A, Borrell S, Reither K, Gagneux S (2014): Evolution of Drug Resistance in Tuberculosis: Recent Progress and Implications for Diagnosis and Therapy. *Drugs* 74, 1063–1072
- Unissa AN, Subbian S, Hanna LE, Selvakumar N (2016): Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol* 45, 474–492
- Unitaid (2015): Unitaid Technology Landscape 4th edition. https://unitaid.eu/assets/Tuberculosis-diagnostics-technology-and-market-landscape-4th-edition-Oct_2015-1.pdf
- Unitaid (2017): Unitaid Technology Landscape 5th edition. <https://unitaid.eu/assets/2017-Unitaid-TB-Diagnostics-Technology-Landscape.pdf>
- Vilchèze C, Jacobs WR (2014): Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol Spectr* 2, MGM2-0014–2013
- Wang K, Tang Z, Yang CJ, Kim Y, Fang X, Li W, Wu Y, Medley CD, Cao Z, Li J, et al. (2009): Molecular Engineering of DNA: Molecular Beacons. *Angew Chem Int Ed* 48, 856–870
- Wilson ML, Stone BL, Hildred MV, Reves RR (1995): Comparison of recovery rates for mycobacteria from BACTEC 12B vials, Middlebrook 7H11-selective 7H11 biplates, and Lowenstein Jensen slants in a public health mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 33, 2516–2518
- Winder FG, Collins P, Rooney SA (1970): Effects of isoniazid on mycolic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and on its cell envelope. *Biochem J* 117, 27P
- Zhang Y, Yew WW (2009): Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [State of the art series. Drug-resistant tuberculosis. Edited by C-Y. Chiang. Number 1 in the series]. *Int J Tuberc Lung Dis* 13, 1320–1330
- Zhang Y, Yew W-W (2015): Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis* 19, 1276–1289
- Ziegler R, Just H-M, Castell S, Diel R, Gastmeier P, Haas W, Hauer B, Loytved G, Mielke M, Moser I, et al. (2012): Infektionsprävention bei Tuberkulose - Empfehlungen des DZK. *Pneumologie* 66, 269–282

Bundesministerium für Arbeit und Soziales (2013): Biostoffverordnung 2013.
https://www.bmas.de/SharedDocs/Downloads/DE/PDF-Publikationen/a227-biostoffverordnung-2013-08.pdf?__blob=publicationFile; Zugriff am 07.02.2018

Global Fund (2018): End-TB-strategy? A historic chance to end tuberculosis.
<https://www.theglobalfund.org/en/blog/2018-03-13-a-historic-chance-to-end-tuberculosis/>;
Zugriff am 28.03.2018

Lessem E (2017). Pipeline Report of TB diagnostics.
<http://www.pipelinerreport.org/sites/default/files/2017-Pipeline-Report-TB-Diagnostics.pdf>;
Zugriff am 12.01.2018

Rönnefarth V (2017). Hain Lifescience: rapid comprehensive diagnosis of MDR-TB.
<http://markets.businessinsider.com/news/stocks/Hain-Lifescience-Rapid-Comprehensive-Diagnosis-of-MDR-TB-1001945592>; Zugriff am 28.11.2017

WHO (2011). Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44593/1/9789241501569_eng.pdf;
Zugriff am 19.01.2018

WHO (2015a) End-TB-strategy.
http://www.who.int/tb/post2015_TBstrategy.pdf?ua=1; Zugriff am 28.11.2017a

WHO (2015b) WHO global tuberculosis report 2015.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf;
Zugriff am 16.01.2018

WHO (2016a): The Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification (TB-LAMP) for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Policy Guidance. (WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee); World Health Organization, Geneva

WHO (2016b). Use of molecular line probe assays.
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246131/1/9789241510561-eng.pdf?ua=1>; Zugriff am 17.10.2017

WHO (2016c) WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis.
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250125/1/9789241549639-eng.pdf?ua=1>; Zugriff am 17.10.2017

WHO (2017). WHO Global tuberculosis report 2017.
http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/; Zugriff am 11.01.2018

7. Appendix

7.1. Ethikvotum



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck - Ratzeburger Allee 160 - 23538 Lübeck

Frau
Dr. med. Kranzer
Forschungszentrum Borstel
Nationales Zentrum für Mykobakterien
Parkallee 18

23845 Borstel

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024

ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 17-368
Datum: 23. Januar 2018

Sitzung der Ethik-Kommission am 04. Januar 2018

Antragsteller: Frau Dr. Kranzer

Titel: Evaluation eines auf LATE-PCR basierenden Diagnostik-Verfahrens in der mykobakteriellen Routinediagnostik

Sehr geehrte Frau Dr. Kranzer,

vielen Dank für Ihr Schreiben vom 16. Januar 2018, in dem Sie den Hinweisen aus unserer Sitzung vom 04. Januar 2018 nachkommen und die gestellten Fragen beantworten.

Die Kommission hat gegen die Durchführung der Studie keine Bedenken.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden.

Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, ist die Kommission umgehend zu benachrichtigen.

Die Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung fordert in § 35 dazu auf, jedes medizinische Forschungsvorhaben mit Menschen zu registrieren. Daher empfiehlt die Kommission grundsätzlich die Studienregistrierung in einem öffentlichen Register (z.B. unter www.drks.de).

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß


Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

7.2. Ergebnistabellen

7.2.1. Respiratorisches Primärmaterial (Sputum)

Tabelle 7-1 Analyseergebnisse von respiratorischem Primärmaterial (Sputum) zum Nachweis von MTBC-DNA und Resistenzen

N	FluoroType® MTBDR				Interpretation		GenoType® MTBDRplus				Interpretation		Mikr.	Kultur	pDST		Sanger-Sequenzierung
	MTBC	rpoB	katG	inhA	RMP	INH	MTBC	rpoB	katG	inhA	RMP	INH			RMP	INH	
277	Neg	-	-	-	-	-	Neg	-	-	-	-	-	Neg	Neg	-	-	
2	Neg	-	-	-	-	-	Neg	-	-	-	-	-	Neg	Pos	S	S	
2	Neg	-	-	-	-	-	Neg	-	-	-	-	-	Neg	Pos	S	R	
1	Pos	WT	WT	WT	S	S	Pos	WT	WT	WT	S	S	Neg	Neg	-	-	
1	Pos	WT	n.a.	n.a.	S	n.a.	Neg	-	-	-	-	-	Neg	Pos	S	S	
1	Pos	WT	WT	WT	S	S	Pos	WT	WT	WT	S	S	Neg	Pos	S	S	
1	Pos	WT	n.a.	WT	S	n.a.	Pos	WT	WT	WT	S	S	Neg	Pos	S	S	
1	Pos	WT	WT	WT	S	S	Pos	n.a.	WT	WT	n.a.	S	Neg	Pos	S	S	rpoB n.a.
1	Pos	WT	WT	WT	S	S	Pos	WT	WT	n.a.	S	n.a.	Neg	Pos	S	S	
1	Pos	WT	n.a.	WT	S	n.a.	Pos	WT	S315T1	WT	S	R	Neg	Pos	S	R	

1	Pos	S531L	WT	C-15T	R	R	Pos	S531L	WT	C-15T	R	R	Neg	Pos	R	R	
1	Pos	H526P	S315T1	WT	R	R	Pos	Δ526-529	S315T1	WT	R	R	Neg	Pos	R	R	
1	Pos	S531W	S315T1	WT	R	R	Pos	Δ530-533	S315T1	WT	R	R	Neg	Pos	R	R	
17	Pos	WT	WT	WT	S	S	Pos	WT	WT	WT	S	S	Pos	Pos	S	S	
5	Pos	S531L	S315T1	WT	R	R	Pos	S531L	S315T1	WT	R	R	Pos	Pos	R	R	
3	Pos	S531L	WT	C-15T	R	R	Pos	S531L	WT	C-15T	R	R	Pos	Pos	R	R	
2	Pos	S531L	WT	WT	R	S	Pos	S531L	WT	WT	R	S	Pos	Pos	R	R	Alt. RM
1	Pos	S531L	WT	WT	R	S	Pos	S531L	WT	WT	R	S	Pos	Pos	R	S	
1	Pos	WT	WT	C-15T	S	R	Pos	WT	WT	C-15T	S	R	Pos	Pos	S	R	
1	Pos	H526D	S315T1	WT	R	R	Pos	H526D	S315T1	WT	R	R	Pos	Pos	R	R	
1	Pos	H526Y	S315T1	WT	R	R	Pos	H526Y	S315T1	WT	R	R	Pos	Pos	R	R	
1	Pos	H526P	n.a.	n.a.	R	n.a.	Pos	S531L	n.a.	WT	R	n.a.	Pos	Pos	R	R	S531L
1	Pos	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Pos	Δ513-519	S315T1	WT	R	R	Pos	Pos	R	R	Seltene Deletion 516
1	Pos	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Pos	WT	S315T1	WT	S	R	Pos	Pos	S	R	
1	Pos	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Pos	D516V	S315T1	WT	R	R	Pos	Pos	R	R	
1	Pos	MUT	S315T1	WT	R	R	Pos	H526D	S315T1	WT	R	R	Pos	Pos	R	R	

1	Pos	MUT	S315T1	WT	R	R	Pos	Δ510-513	S315T1	WT	R	R	Pos	Pos	R	R	Q513K
1	Pos	D516Y	MUT	n.a.	R	R	Pos	Δ513-519	S315T1	MUT	R	R	Pos	Pos	R	R	D516Y, -17G/T
1	Pos	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Pos	Δ513-519	S315T1	MUT	R	R	Pos	Pos	R	R	-17 G/T
1	Pos	S531L	WT	WT	R	S	Pos	S531L	WT	WT	R	S	Pos	Pos	R	R	Alt. RM
1	Pos	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Pos	WT	WT	WT	S	S	Pos	Pos	S	R	Alt. RM
1	Pos	WT	WT	WT	S	S	Pos	WT	WT	WT	S	S	Pos	Pos	R	R	
1	Pos	S531L	WT	WT	R	S	Pos	S531L	WT	WT	R	S	Pos	Pos	R	R	Alt. RM
1	Pos	MUT	n.a.	WT	R	n.a.	Pos	Δ505-509	WT	WT	R	S	Pos	Pos	R	R	Seltene Insertion 509/510
1	Pos	L533P	S315T1	WT	R	R	Pos	S531L	S315T1	WT	R	R	Pos	Pos	S	R	n.a.
1	Pos	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Neg	-	-	-	-	-	Pos	Pos	R	R	
1	Pos	MUT	WT	WT	R	S	Pos	S531L	WT	WT	R	S	Pos	Pos	R	R	Alt. RM
1	Pos	MUT	n.a.	MUT	R	R	Pos	S531L	S315T1	T-8C	S	R	Pos	Pos	R	R	
1	Pos	H526D	n.a.	WT	R	n.a.	Pos	H526D	n.a.	WT	R	n.a.	Pos	Pos	R	R	<i>katG</i> n.a.
1	Pos	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Pos	D516V/ S531L	WT	WT	R	S	Pos	Pos	R	R	Alt.RM

1	Pos	S531L	WT	WT	R	S	Pos	D516V/ S531L	WT	WT	R	S	Pos	Pos	R	R	n.a., alt. RM
1	Pos	MUT	n.a.	WT	R	n.a.	Pos	H526D/ S531L	WT	WT	R	S	Pos	Pos	R	R	H526D+S531L +WT vorhanden
343																	

Mikr. = Mikroskopie; pDST = phänotypische Resistenztestung; MTBC = *Mycobacterium tuberculosis* complex; RMP = Rifampicin; INH = Isoniazid; Neg=negativ;

Pos = positiv; n.a. = nicht auswertbar; WT = Wildtyp; R = resistent; S = sensibel; MUT = nicht näher spezifizierte Mutation; (alt.) RM = (alternative) Resistenzmechanismen;

Δ = Abweichung bei Basenpaar (Fehlen von WT-Bande im GenoType®)

7.2.2. Extrapulmonales Primärmaterial (Lymphknoten)

Tabelle 7-2 Analyseergebnisse von extrapulmonalem Primärmaterial (Lymphknoten) zum Nachweis von MTBC-DNA

	FluoroType® MTBDR				Interpretation Resistenz		GenoType® MTBDRplus				Interpretation Resistenz		Mikr.	Kultur	pDST	
	MTBC	rpoB	katG	inhA	RMP	INH	MTBC	rpoB	katG	inhA	RMP	INH			RMP	INH
33	Neg	-	-	-	-	-	Neg	-	-	-	-	-	Neg	Neg	-	-
1	Neg	-	-	-	-	-	n.a.	-	-	-	-	-	Neg	Neg	-	-
4	Neg	-	-	-	-	-	Neg	-	-	-	-	-	Neg	Pos	S	S
1	Neg	-	-	-	-	-	n.a.	-	-	-	-	-	Neg	Pos	S	S
3	Pos	WT	WT	WT	S	S	Pos	WT	WT	WT	S	S	Pos	Pos	S	S

1	Pos	WT	WT	WT	S	S	Pos	WT	WT	WT	S	S	Neg	Pos	S	S
1	Pos	WT	WT	WT	S	S	n.a.	-	-	-	-	-	Pos	Pos	S	S
1	Pos	WT	n.a.	WT	S	n.a.	n.a.	-	-	-	-	-	Pos	Pos	S	S
45																

Mikr. = Mikroskopie; pDST = phänotypische Resistenztestung; MTBC = *Mycobacterium tuberculosis* complex; RMP = Rifampicin; INH = Isoniazid; Neg = negativ; Pos = positiv; n.a. = nicht auswertbar; WT = Wildtyp; S = sensibel

7.2.3. Kulturelle Isolate

Tabelle 7-3 Analyseergebnisse von kulturellen Isolaten zum Nachweis von Resistenzen gegenüber INH und RMP

	FluoroType® MTBDR			Interpretation		GenoType® MTBDRplus			Interpretation		pDST		Sanger Sequenzierung				Kommentar
	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	RMP	INH	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	RMP	INH	RMP	INH	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>alpC</i>	
85	WT	WT	WT	S	S	WT	WT	WT	S	S	S	S					
6	WT	S315T1	WT	S	R	WT	S315T1	WT	S	R	S	R					
1	WT	WT	C-15T	S	R	WT	WT	C-15T	S	R	S	R					
3	S531L	WT	WT	R	S	S531L	WT	WT	R	S	R	S					
3	S531L	WT	WT	R	S	Δ530-533	WT	WT	R	S	R	S	S531L				
1	H526D	WT	WT	R	S	H526D	WT	WT	R	S	R	S					

1	D516Y	WT	n.a.	R	n.a.	Δ 513-519 S531L	n.a.	C-15T	R	R	R	R	D516Y S531L	WT	C-15T		
1	D516Y	WT	WT	R	S	Δ 513-519	S315T1	-15 to -17	R	R	R	R	D516Y	S315T1	C-17T		
1	WT	S315T1	C-15T	S	R	WT	S315T1	C-15T	S	R	R	R	Seltene Mutation außerhalb von <i>rpoB</i>				
1	S531L	WT	WT	R	S	S531L	WT	WT	R	S	R	R		WT	WT	WT	Alt. RM
1	S531L	WT	WT	R	S	Δ 530-533	WT	WT	R	S	R	R	S531L	WT	WT	C-10T	Seltene Mut.
1	S531L	WT	WT	R	S	S531L	WT	T-8A	R	R	R	R			T-8A		
1	S531L	n.a.	WT	R	n.a.	S531L	n.a.	WT	R	n.a.	R	R		WT	WT	WT	Alt. RM
1	S531L	MUT	WT	R	R	S531L	S315T1	WT	R	R	R	R		S315T1			
38	S531L	S315T1	WT	R	R	S531L	S315T1	WT	R	R	R	R					
1	S531L	S315T1	WT	R	R	Δ 530-533	S315T1	WT	R	R	R	R	S531L				
2	S531L	S315T2	WT	R	R	S531L	S315T2	WT	R	R	R	R					
5	D516V	S315T1	WT	R	R	D516V	S315T1	WT	R	R	R	R					
1	D516V	S315T1	WT	R	R	Δ 513-519	S315T1	WT	R	R	R	R	D516V				
3	H526D	S315T1	WT	R	R	H526D	S315T1	WT	R	R	R	R					

1	H526D	WT	C-15T	R	R	H526D	WT	C-15T	R	R	R	R					
1	H526Y	n.a.	WT	R	n.a.	H526Y	S315T1	WT	R	R	R	R		S315T1			
2	H526Y	S315T1	WT	R	R	H526Y	S315T1	WT	R	R	R	R					
1	H526Y	WT	WT	R	S	H526Y	S315T1	WT	R	R	R	R		S315T1			
1	H526N	S315T1	WT	R	R	Δ 526-529	S315T1	WT	R	R	R	R	H526N				
2	S531L	S315T1	C-15T	R	R	S531L	S315T1	C-15T	R	R	R	R					
1	S531L	S315T1	C-15T	R	R	Δ 530-533	S315T1	C-15T	R	R	R	R	S531L				
1	S531L	S315T1	T-8C	R	R	S531L	S315T1	T-8C	R	R	R	R					
3	H526P	S315T1	C-15T	R	R	Δ 526-529	S315T1	C-15T	R	R	R	R	H526L				
1	L533P	S315T1	T-8C	R	R	Δ 530-533	S315T1	T-8C	R	R	R	R	L533P				
1	H526R	n.a.	WT	R	n.a.	H526D S531L	S315T1	WT	R	R	R	R	H526D S531L	S315T1			
1	L533P	S315T1	WT	R	R	WT	S315T1	WT	S	R	R	R	WT L533P				
3	MUT	S315T1	WT	R	R	Δ 526-529	S315T1	WT	R	R	R	R	H526L				
1	MUT	S315T1	WT	R	R	Δ 530-533	S315T1	WT	R	R	R	R	S531L				
1	MUT	S315T1	WT	R	R	Δ 510-517	S315T1	WT	R	R	R	R	Q513K				

1	MUT	WT	WT	R	S	H526D S531L	WT	WT	R	S	R	R	H526D S531L	WT	WT	WT	Alt.RM
1	MUT	WT	WT	R	S	Δ513-519	S315T1	-15 to -17	R	R	R	R	D516Y	S315T1	C-17T		
180																	

Mikr. = Mikroskopie; pDST = phänotypische Resistenztestung; RMP = Rifampicin; INH = Isoniazid; Neg=negativ; Pos = positiv; n.a. = nicht auswertbar;

WT = Wildtyp; R = resistent; S = sensibel; MUT = nicht näher spezifizierte Mutation; Mut. = Mutation; (alt.) RM = (alternative) Resistenzmechanismen;

Δ = Abweichung bei Basenpaar (Fehlen von WT-Bande im GenoType®)

7.2.4. Vergleich zweier DNA-Extraktionsmethoden

Tabelle 7-4 Vergleich zweier DNA-Extraktionsmethoden mittels FluoroType® MTBDR

	FluoroLyse®				Interpretation Resistenz		Interne Methode				Interpretation Resistenz	
	MTBC	rpoB	katG	inhA	RMP	INH	MTBC	rpoB	katG	inhA	RMP	INH
80	Pos	WT	WT	WT	S	S	Pos	WT	WT	WT	S	S
1	Pos	S531L	WT	WT	R	S	Pos	S531L	WT	WT	R	S
1	Pos	D516Y	WT	WT	R	S	Pos	D516Y	WT	WT	R	S
1	Pos	H526Y	WT	WT	R	S	Pos	H526Y	WT	WT	R	S
1	Pos	WT	S315T1	WT	S	R	Pos	WT	S315T1	WT	S	R

18	Pos	S531L	S315T1	WT	R	R	Pos	S531L	S315T1	WT	R	R
5	Pos	S531L	WT	C-15T	R	R	Pos	S531L	WT	C-15T	R	R
3	Pos	MUT	S315T1	WT	R	R	Pos	MUT	S315T1	WT	R	R
2	Pos	H526Y	S315T1	WT	R	R	Pos	H526Y	S315T1	WT	R	R
1	Pos	L533P	S315T1	T-8C	R	R	Pos	L533P	S315T1	T-8C	R	R
1	Pos	D516V	S315T1	WT	R	R	Pos	D516V	S315T1	WT	R	R
1	Pos	S531L	n.a.	WT	R	n.a.	Pos	S531L	n.a.	WT	R	n.a.
1	Pos	D516Y	WT	WT	R	S	Pos	D516Y	WT	n.a.	R	n.a.
1	Pos	WT	n.a.	WT	S	n.a.	Pos	WT	WT	WT	S	S
2	Pos	MUT	S315T1	WT	R	R	Pos	H526L/ MUT	S315T1	WT	R	R
1	Pos	D516Y	WT	WT	R	S	Pos	D516Y	WT	WT	R	S
1	Pos	H526P	S315T1	WT	R	R	Pos	S531L	S315T1	WT	R	R
1	Pos	H526R	n.a.	WT	R	n.a.	Pos	H526R	WT	WT	R	S
122												

MTBC = *Mycobacterium tuberculosis* complex; RMP = Rifampicin; INH = Isoniazid; Pos = positiv; n.a. = nicht auswertbar;

WT = Wildtyp; R = resistent; S = sensibel; MUT = nicht näher spezifizierte Mutation

8. Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders herzlich beim Laborteam des Nationalen Referenzzentrums für Mykobakterien am Leibniz-Forschungszentrum in Borstel bedanken. Die Zusammenarbeit mit euch hat große Freude gemacht und mich weit über das Fachliche hinaus auch persönlich bereichert. Besonders danken möchte ich Frau Margrid Kernbach, die mich zu Beginn in die Routinediagnostik am NRZ eingearbeitet hat, Frau Petra Vock und Kristine Beuck, die mich bei der Bearbeitung von hochinfektiösen Proben unterstützt haben und im Besonderen Frau Birte Schlüter, die stets ein Ohr für mich hatte und wo sie nur konnte mit Rat und Tat zur Seite stand. Aber auch allen anderen Mitarbeitern des NRZ gilt mein Dank für alle hilfreichen Hinweise und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Doris Hillemann, die mich von Tag Eins an mit ihren versierten und begeisternden Fachkenntnissen, insbesondere in der Molekularbiologie, so oft einen weiteren Schritt voranbringen konnte, wo ich nicht mehr weiterwusste.

Mein besonderer Dank gilt ebenso Herrn Dr. Sönke Andres, der durch seine ruhige Art und sein breit gefächertes Wissen stets ein geschätzter Gesprächs- und Ansprechpartner war.

Ebenso danken möchte ich den Mitarbeitern des FZ-Borstel, insbesondere Frau Susanne Pätzold, Frau Christiane Gerlach und der Bibliothekarin Frau Christiane Engler für Ihre Zeit, Unterstützung und das Organisieren der Borstel Biomedical Research School.

Mein ausgesprochener Dank gilt Herrn Professor Dr. Jan Rupp für die Ermöglichung und zuverlässige Begleitung dieser Arbeit und die hilfreichen Ratschläge, die ich in dieser Zeit bekommen habe.

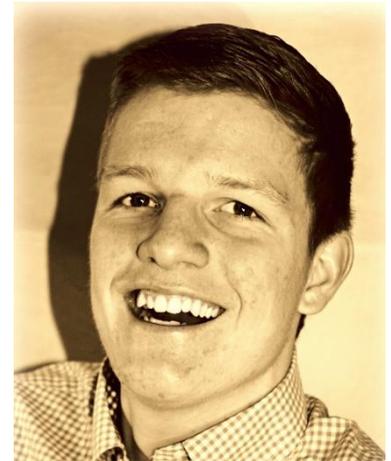
Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mich in dieser Zeit großartig gestützt, zum Teil getragen und mir immer wieder neu aufgeholfen haben. Mein besonderer Dank gilt Frau Melina Meiring, die durch ihre sorgfältige Korrektur zum Gelingen dieser Doktorarbeit maßgeblich beigetragen hat.

Insbesondere möchte ich meiner Freundin, zwischenzeitlich Verlobten und mittlerweile Ehefrau Samira Haasis (geb. Meiring) danken, die in dieser Zeit nie müde geworden ist, mich zu ertragen und zu motivieren.

Zu guter Letzt geht mein größter Dank an Frau Dr. Katharina Kranzer, die mich als Betreuerin unfassbar gut fachlich begleitet hat, mir darüber hinaus viele Lektionen für's Leben gelehrt hat und stets mit großem Engagement mich gefordert und gefördert hat.

9. Lebenslauf Carsten Haasis

E-Mail: Carsten.Haasis94@yahoo.de
Geburtsdatum, Ort: 01.07.1994, Sulingen (D)
Staatsangehörigkeit: deutsch



Schule und Studium

08/2000 – 06/2012 **Freie evangelische Bekenntnisschule Bremen**
Abitur 06/2012 (1,3)

08/2009 – 06/2010 Schüleraustausch in Mason City, Iowa (USA) mit
Besuch der **Mason City High School** (GPA 4.0)

10/2012 – 12/2019 Medizinstudium an der **Christian-Albrechts-**
Universität Kiel
Physikum 09/2014 (1,5)
Hammerexamen 10/2018 (2,0)
Ärztliche Prüfung/M3 11/2019 (1,0)

06/2017 – 01/2020 Doktorarbeit am **Nationalen Referenzzentrum für**
Mykobakterien, Leibniz-Forschungszentrum Borstel

Sprachen Deutsch (Muttersprache)
English (fließend)

Kiel, 09.01.2020

Carsten Haasis

9.1. Publikationsliste

28. März 2018 Hillemann, D, Haasis, C, Andres, S, Behn, T, Kranzer K
„Validation of the FluoroType MTBDR Assay for Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis Complex isolates”, Journal of Clinical Microbiology (JCM)
23. April 2018 Haasis, C, Schlüter, B, Hillemann, D, Kranzer K
„Validation of FluoroType MTBDR assay to detect isoniazid and rifampicin resistance in MTBC isolates”, Paper Poster Präsentation beim “European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases” in Madrid
17. Sept. 2018 Haasis, C, Rupp, J, Andres, S, Schlüter, B, Kernbach, M, Hillemann, D, Kranzer, K, „Validation of the FluoroType® MTBDR assay using respiratory and lymph node samples” Tuberculosis (Elsevier)
24. Okt. 2018 Hillemann, D, Haasis, C, Kranzer, K
„Validation of the FluoroType® MTBDR assay using respiratory samples”, Poster Diskussion bei der “49. Union World Conference on Lung Health” in Den Haag

Erklärung zur Doktorarbeit

Ich versichere, dass ich die vorliegende Doktorarbeit nach bestem Wissen und Gewissen selbstständig erarbeitet und verfasst habe. An den Stellen, an denen ich auf Erkenntnisse anderer Wissenschaftler zurückgegriffen habe, habe ich dies deutlich kenntlich gemacht und auf die Originalquelle verwiesen. Ich habe darüber hinaus keine weiteren personellen, technischen oder sachlichen Hilfsmittel, als die bereits kenntlich gemachten verwendet. Mit der diesbezüglichen Überprüfung durch eine Anti-Plagiatssoftware erkläre ich mich einverstanden.

Carsten Haasis

Kiel, den 09.01.2020