

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Abteilung Molekulare und Experimentelle Mykobakteriologie
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Niemann

**Molekulare Nachweissysteme für Antibiotika-Resistenz vermittelnde
Mutationen bei *Mycobacterium tuberculosis***

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -



vorgelegt von
Juliane Havlicek
aus Gera

Lübeck 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Merker

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2021

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 14.01.2021

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	ii
Abbildungsverzeichnis	iii
1 Zusammenfassung.....	4
1.1 Motivation und Stand der Forschung	4
1.1.1 Tuberkulosetherapie	4
1.1.2 Molekulare Resistenzmechanismen	5
1.1.3 Nachweis einer Antibiotika-Resistenz	8
1.2 Eigene Forschungsergebnisse.....	9
1.2.1 Competitive Reporter Monitored Amplification (CMA)-basierter SNP Assay. 10	
1.2.2 Schmelzkurvenanalyse zur Vorhersage einer MDR-TB und Fluoroquinolon-Resistenz	13
1.2.3 Schmelzkurvenanalyse zur Vorhersage einer Pyrazinamid-Sensitivität.....	16
1.3 Schlussfolgerungen.....	19
1.4 Literaturverzeichnis	24
2 Publikationen	24
3 Danksagung.....	36
4 Selbstständigkeitserklärung	37
5 Lebenslauf.....	38
6 Anhang.....	39

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
ACP	Acyl-Carrier-Protein
BCG	Bacille Calmette-Guérin
bp	Basenpaar
CAS	Zentralasiatischer Stamm (<i>englisch</i> : central asian strain)
CMA	Kompetitive Reporter-überwachte Amplifizierung (<i>englisch</i> : competitive Reporter Monitored Amplification)
Ct	Zyklus, bei dem Schwellenwert überschritten wird (<i>englisch</i> : cycle threshold)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>englisch</i> : deoxyribonucleic acid)
ERDR	Ethambutol-Resistenz bestimmende Region (<i>englisch</i> : ethambutol resistance-determining region)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
LPA	Streifen-Sonden-Test (<i>englisch</i> : line probe assay)
MDR	Multiresistent (<i>englisch</i> : multidrug resistant)
MGIT	Mykobakterielles Wachstum anzeigendes Reaktionsgefäß (<i>englisch</i> : mycobacteria growth indicator tube)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Komplex (<i>englisch</i> : <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex)
NADH	Nicotinamid Adenin Dinukleotid Hydrid
QRDR	Fluoroquinolon-Resistenz bestimmende Region (<i>englisch</i> : quinolone resistance-determining region)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>englisch</i> : polymerase chain reaction)
PZA	Pyrazinamid
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure (<i>englisch</i> : ribonucleic acid)
RRDR	Rifampicin-Resistenz bestimmende Region (<i>englisch</i> : rifampicin resistance-determining region)
SNP	Einzelbasenunterschied (<i>englisch</i> : Single Nucleotide Polymorphism)
TB	Tuberkulose
WGS	Gesamtgenom-Amplifizierung (<i>englisch</i> : whole genome amplification)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>englisch</i> : world health organization)
XDR	Extensiv resistent (<i>englisch</i> : extensively drug resistant)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: m-PIMA™ Analyser und Testkartusche.....	10
Abbildung 2: Schematischer Ablauf einer CMA-Reaktion	11
Abbildung 3: Schematischer Ablauf einer Schmelzkurvenreaktion mit Wildtyp- und Mutationssonden	13
Abbildung 4: Schematischer Ablauf einer Schmelzkurvenreaktion mit ausschließlich Wildtyp- Sonden	17

1 Zusammenfassung

1.1 Motivation und Stand der Forschung

Tuberkulose (TB) ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten weltweit und wird durch Bakterien der *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC)-Stämme ausgelöst (1). Daten der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zur Folge wurden im Jahr 2017 10,0 Millionen Inzidenzfälle registriert. In den Ländern Indien, China, Indonesien, Philippinen, Pakistan, Nigeria, Bangladesch und Südafrika traten zwei Drittel der Neuerkrankungen auf. Im Jahr 2017 wurden durch die WHO 1,3 Millionen Mortalitätsfälle infolge einer TB-Infektion registriert. Obwohl die Zahl der Mortalitätsfälle seit 2000 um 22 % gefallen ist, ist TB eine der zehn häufigsten Todesursachen weltweit (2).

1.1.1 Tuberkulosetherapie

Die Standardtherapie einer sensitiven Tuberkulose erfolgt mit Hilfe der Erstrangantibiotika (*firstline drugs*) Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol und Pyrazinamid über einen Zeitraum von sechs Monaten (3). In der ersten Phase werden über zwei Monate alle vier Antibiotika eingesetzt, während in der zweiten Phase für vier Monate die Antibiotika Rifampicin und Isoniazid zur Anwendung kommen. Aufgrund der effektiven sterilisierenden Wirkung stellt Pyrazinamid das Schlüsselmedikament einer TB-Behandlung dar. Kann dieses Medikament nicht in das Therapieschema aufgenommen werden, muss die Behandlungszeit auf mindestens neun Monate verlängert werden (3).

Sind die Erreger gegenüber Rifampicin und Isoniazid resistent, wird von einer multiresistenten Tuberkulose (*multidrug-resistant tuberculosis* (MDR-TB)) ausgegangen (4). 3,5 % der neu registrierten und 18 % der bereits behandelten TB-Patienten wiesen im Jahr 2017 eine MDR-TB auf (2). Für die Behandlung einer MDR-TB werden Zweitrangantibiotika (*secondline drugs*) angewendet. Zu diesen Medikamenten gehören unter anderem die Fluoroquinolone, wie z.B. Ofloxacin, Ciprofloxacin und Levofloxacin (5). Diese weisen allerdings schwerwiegendere Nebenwirkungen auf. Zusätzlich verlängert sich die Therapiedauer auf bis zu 24 Monate. Da die betroffenen Patienten länger infektiös bleiben, erhöht sich zudem das Transmissionsrisiko (6).

Liegt eine Resistenz sowohl gegenüber Rifampicin und Isoniazid als auch gegen ein Fluoroquinolon und mindestens eines der drei injizierbaren Antibiotika (Capreomycin, Kanamycin und Amikazin) vor, handelt es sich um eine extensiv resistente Tuberkulose (*extensively drug-resistant tuberculosis* (XDR-TB)) (4). Im Jahr 2017 waren 8,5 % der MDR-TB-Fälle eine XDR-TB (2).

Das vermehrte Auftreten von MDR- und XDR-Stämmen ist u.a. assoziiert mit fehlenden diagnostischen Kapazitäten besonders in Regionen der Welt mit den höchsten TB-Inzidenzen. Es wird davon ausgegangen, dass lediglich einer von drei MDR-TB Patienten detektiert wird (7). Zusätzlich werden aufgrund der schwerwiegenden Nebenwirkungen die Medikamente nicht durchgehend eingenommen oder müssen abgesetzt werden, wodurch der weltweite Behandlungserfolg einer MDR-TB bei lediglich 48 % liegt (7).

1.1.2 Molekulare Resistenzmechanismen

Resistenzen gegenüber den verschiedenen Antibiotika werden bei *Mycobacterium tuberculosis* ausschließlich durch Mutationen im Erbgut der Erreger vermittelt. Horizontaler Gentransfer, z.B. durch Plasmide, oder Rekombinationsereignisse müssen bei der Detektion von Antibiotikaresistenzen nicht berücksichtigt werden. In der Regel kann durch eine einzige Mutation (Punktmutation, Deletion oder Insertion) bereits ein resistenter Phänotyp vorhergesagt werden. Betroffen sind definierte Gene, die entweder für das Zielprotein des Antibiotikums kodieren, für die Aktivierung des Medikamentes verantwortlich sind oder für eine erhöhte Transkription des Zielproteins sorgen (8).

Rifampicin wurde 1972 erstmalig eingeführt und weist eine hohe bakterizide Wirkung auf. Es interagiert mit der β -Untereinheit der RNA-Polymerase (codiert durch *rpoB*) und verhindert somit die bakterielle RNA-Synthese. Rifampicin wirkt sowohl gegen Bakterien, die sich in der exponentiellen Phase als auch gegen solche, die sich in der stationären Wachstumsphase befinden (9). Eine Rifampicin-Resistenz wird durch Mutationen im *rpoB*-Gen verursacht. Durch die daraus resultierende strukturelle Veränderung der β -Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase, kann das Antibiotikum nicht mehr effektiv oder gar nicht binden. Bei 97 % der betroffenen MTBC-Stämme liegen Mutationen in einer 81 bp großen Region (*rifampicin resistance-determining region* (RRDR)) vor. Diese umfasst die *rpoB* Basentriplets (Codons) von 507 bis 533 (häufig verwendete *Escherichia coli* Nomenklatur¹). Bisher sind über 50 verschiedene Mutationen bekannt, wobei am häufigsten Mutationen in den Codons 516, 526 und 531 auftreten (9-11). Mutationen im Codon 526 und im Codon 531 vermitteln eine hohe Resistenz gegenüber Rifampicin (12-14). Des Weiteren wurden die Mutationen Leu533Pro, Leu511Pro, Asp516Tyr und His526Leu im Zusammenhang mit einem Therapieversagen bei einem Standardregime von 600 mg/Tag Rifampicin beschrieben (15, 16). Die Detektion der genannten Mutationen ist ein wichtiger Grundstein zum Festlegen

¹ Codon-Bereich 425-452 nach MTB-Nomenklatur

einer geeigneten Therapie. Neben Mutationen in der RRDR können auch Mutationen an der Aminosäureposition 572 im *rpoB*-Gen eine Rifampicin-Resistenz vermitteln (17-19).

Beim zweiten Rückgrat der TB-Behandlung handelt es sich um **Isoniazid**. Isoniazid gelangt als Prodrug in die mykobakterielle Zelle und wird dort durch das Enzym Katalase-Peroxidase (codiert durch *katG*) zu einem instabilen elektrophilen Intermediaten, dem Isonikotinsäure-Radikal, umgewandelt und aktiviert. Dieses lagert sich an das NADH-Molekül an, welches an die für die Mykolsäure essentielle Reduktase, NADH-spezifische Enoyl-Acyl-Carrierprotein (ACP)-Reduktase (codiert durch *inhA*), gebunden ist. Dadurch wird die ACP-Reduktase dauerhaft gehemmt, was zur Blockierung der Mykolsäure-Synthese führt. Die mykobakterielle Zellwandsynthese wird negativ beeinflusst und die Apoptose der betreffenden Zelle wird eingeleitet. Isoniazid ist vor allem gegen wachsende Mykobakterien aktiv. Gegenüber Mykobakterien, die sich in der stationären Wachstumsphase befinden, zeigt dieses Antibiotikum eine geringe Aktivität (9, 20). Eine Isoniazid-Resistenz kann durch Mutationen im *katG*-Gen oder in der *inhA*-Promotorregion bedingt sein. Zwischen 42 und 80 % der Isoniazid-resistenten Stämme tragen Mutationen im Katalase-Peroxidase-Gen (*katG*) (8, 9). Dadurch kommt es zu einem Verlust der Katalase-Peroxidase-Aktivität, sodass eine Aktivierung von Isoniazid nicht mehr möglich ist. Das Antibiotikum bleibt als Prodrug wirkungslos. Bei ca. 10 % der Isoniazid-resistenten Stämme liegen Mutationen im Promotorbereich des Gens für die Enoyl-Acyl-Carrierprotein-Reduktase (*inhA*) vor (9). Durch diese Mutationen wird eine Überexpression der ACP-Reduktase ausgelöst, wodurch das Einwirken des Antibiotikums kompensiert werden kann (10). Studien haben gezeigt, dass eine Resistenz gegenüber Isoniazid nicht zwingend in Kombination mit einer Rifampicin-Resistenz auftreten muss. Des Weiteren tritt eine Isoniazid-Resistenz gehäuft in Ländern mit hohen TB-Inzidenzen auf, weshalb eine separate Isoniazid-Resistenztestung nötig ist (14, 21, 22). Spezifische Mutationen im *katG*-Gen vermitteln eine hohe Isoniazid-Resistenz, wohingegen Mutationen im *inhA*-Promotorbereich, speziell die Mutation -15 C→T, lediglich eine geringe Isoniazid-Resistenz verursachen (23).

Ethambutol inhibiert die mykobakterielle Arabinosyl-Transferase, welche durch das *embCAB*-Operon kodiert wird. Durch die Hemmung der Transferase wird die Polymerisation von Arabinose zu Arabinan unterbunden, sodass die Synthese von Arabinogalactan negativ beeinflusst wird. Bei Arabinogalactan handelt es sich um das Hauptpolysaccharid der mykobakteriellen Zellwand. Folglich wird durch die Behandlung mit Ethambutol die mykobakterielle Zellwandsynthese inhibiert. Ethambutol ist nur bei wachsenden Bakterien

aktiv, bei sich nicht replizierenden Bakterien ist es hingegen wirkungslos (9, 24). Eine Resistenz gegenüber Ethambutol wird durch Mutationen innerhalb der *ethambutol resistance-determining region* (ERDR) vermittelt. In 50 bis 70 % der Fälle treten die Mutationen im Codon 306 auf (24). Das Codon enthält Informationen zur Strukturfunktion des Proteins. Aufgrund der strukturellen Veränderungen kommt es zu einer wesentlichen Einschränkung der Interaktion zwischen Ethambutol und der Arabinosyl-Transferase, woraus eine Resistenz resultiert (9, 24).

Pyrazinamid gelangt ebenso wie Isoniazid als Prodrug in die mykobakterielle Zelle. Dort wird es durch die Pyrazinamidase (codiert durch *pncA*) in seine aktive Form, die Pyrazinsäure, umgewandelt. Die Pyrazinsäure hat eine schädliche Wirkung auf *M. tuberculosis*-Bakterien, da es das Membranpotential destabilisiert und Membrantransportprozesse negativ beeinflusst. Pyrazinamid wirkt bakterizid und sterilisierend auf nicht-replizierende, persistierende *M. tuberculosis*-Bakterien (25-27).

Hauptverantwortlich für eine Resistenz des Tuberkuloseerregers gegen Pyrazinamid sind Mutationen im 516 bp langen *pncA*-Gen. Im Unterschied zu anderen Zielgenen, die mit Resistenzen gegen Antibiotika im Zusammenhang stehen, werden für das *pncA*-Gen keine direkte Bereiche (sogenannte Hotspot-Regionen) beschrieben, in denen Mutationen gebündelt auftreten. Die bisher bekannten Mutationen sind divers und entlang des gesamten Genbereichs sowie innerhalb der Promotorregion verteilt und lassen sich nicht hinsichtlich ihrer biologischen Relevanz priorisieren (28, 29).

Fluoroquinolone binden an die mykobakterielle Gyrase, einem Mitglied der Typ II Topoisomerasen, welche aus den beiden Untereinheiten A (codiert durch *gyrA*) und B (codiert durch *gyrB*) besteht. Die Fluoroquinolone inhibieren das negative Supercoiling der DNA, weshalb die mykobakterielle DNA nicht mehr korrekt repliziert werden kann (9, 30). Eine Resistenz gegenüber Fluoroquinolonen ist in 60 bis 90 % der Fälle mit Mutationen im *gyrA*-Gen assoziiert (31). Ein definierter Bereich (*quinolone resistance-determining region* (QRDR)) erstreckt sich von Codon 88 bis Codon 94. Mutationen in diesem Bereich führen dazu, dass aufgrund einer strukturellen Veränderung der mykobakteriellen Gyrase das Antibiotikum nicht mehr binden kann (10, 11, 31). Die Mutationen Ala90Val, Asp94Asn und Asp94Val sind in der Literatur beschrieben, welche eine hohe Fluoroquinolon-Resistenz vermitteln (32, 33).

Um eine individualisierte Therapie, speziell für MDR- und XDR-TB Patienten gewährleisten zu können, ist eine korrekte Charakterisierung des Tuberkuloseerregers und dessen Resistenzprofils essentiell.

1.1.3 Nachweis einer Antibiotika-Resistenz

Den Goldstandard der Resistenztestung stellen die auf der Kultivierung basierenden Methoden dar. Die aus einer klinischen Probe extrahierten Mykobakterien werden in Löwenstein-Jensen- oder in Middlebrook-Medium kultiviert, welches mit dem zu testenden Antibiotikum versetzt ist. Abhängig von der minimalen Hemmkonzentration kann mykobakterielles Wachstum makroskopisch festgestellt werden. Da *M. tuberculosis*-Bakterien eine Generationszeit zwischen zwölf und 18 Stunden besitzen, sind Kulturergebnisse meist erst nach drei bis acht Wochen zu erwarten (34-36). Am weitesten verbreitet hat sich das kommerzielle Testsystem BACTEC MGIT 960. Die Grundlage stellt eine fluoreszierende Substanz dar, welche am Boden des Reaktionsgefäßes in Silikon eingebettet und zur Öffnung des Gefäßes hin mit Middlebrook-Medium bedeckt ist. Zu Beginn des Tests wird die Fluoreszenzemission durch den hohen Sauerstoffgehalt im Medium unterbunden. Wachsen Mykobakterien entweder ohne oder trotz eines zugegebenen Antibiotikums, wird der Sauerstoff im Medium verbraucht, was in einer geringeren Unterdrückung der Fluoreszenzemission resultiert. Somit kann ein Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit vom mykobakteriellen Wachstum detektiert werden (37). Die auf der Kultivierung basierenden Methoden erlauben allerdings keine frühzeitige Therapieentscheidung und benötigen eine komplexe Laborinfrastruktur (34). Des Weiteren wird eine Pyrazinamid-Resistenztestung nicht routinemäßig durchgeführt, was auf die benötigten aziden Bedingungen (pH 5,5 bis 6,0) zurückzuführen ist (7). Durch die vorherrschenden Bedingungen wird mykobakterielles Wachstum inhibiert, was zu einer geringen Reproduzierbarkeit und kontroversen Testergebnissen führt (38-40).

Aufgrund der langen Testdauer treten immer mehr molekulare Testsysteme in den Fokus. Zum Nachweis von resistenzvermittelnden Mutationen wurden bereits zahlreiche molekulare Testverfahren entwickelt, wie z.B. die Allele-spezifische PCR, die Allele-spezifische Ligation oder der Nachweis mit Hilfe von TaqMan-Sonden (41-43). Alle Techniken vereinen eine sensitive und verlässliche Mutationsdetektion. Allerdings werden dafür eine komplexe Laborinfrastruktur und sehr gut ausgebildetes Personal benötigt (44).

Aus diesem Grund setzten sich die sogenannten *line probe* Assays (LPAs) immer weiter durch. Für die Testung einer Resistenz gegenüber Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol und

Fluoroquinolonen existieren kommerzielle LPAs der Firma Hain Lifescience (GenoType MTBDRplus Assay (v1.0 und v2.0) und GenoType MTBDRsl Assay (v2.0)). Die Grundlage dieser Tests bildet die DNA-Streifentechnologie. Nach Isolation der mykobakteriellen DNA aus den zu untersuchenden klinischen Proben erfolgt eine Multiplex-Amplifikation mit biotinylierten Primern. Anschließend werden die PCR-Produkte chemisch denaturiert und an membrangebundene Sonden hybridisiert. Nach einem stringenten Waschschrift wird eine an Streptavidin gekoppelte Phosphatase zugesetzt, welche ein zugegebenes Substrat umsetzt. Liegt ein Wildtyp bzw. eine Mutante im getesteten Genbereich vor, fehlt bzw. bildet sich eine Farbbande auf der Nitrozellulosemembran aus (45, 46). Für die Pyrazinamid-Resistenztestung wurde ebenfalls ein DNA-Streifentest entwickelt. Allerdings werden im Vergleich zu den zuvor genannten Tests lediglich Wildtyp-Sonden verwendet, um beim Nicht-Vorhandensein einer Bande den Wildtyp im *pncA*-Gen und dem dazugehörigen Promotorbereich auszuschließen (47). Trotz der vielen Vorteile besteht bei den LPAs das Risiko einer Amplikonkontamination aufgrund des offenen Testdesigns (48).

Im Jahr 2010 kam der erste Sputendirekttest (Xpert MTB/Rif Assay) der Firma Cepheid auf den Markt, mit welchem ein Nachweis von *M. tuberculosis* und zusätzlich eine Resistenzbestimmung des Antibiotikums Rifampicin möglich ist. Der Test basiert auf der Real-Time PCR-Technologie. Zur Detektion einer Rifampicin-Resistenz werden fünf, sich überlappende Wildtyp-Sonden eingesetzt, welche die RRDR umspannen. Kommt es zu einem Versatz des Ct-Wertes einer Sonde, liegt an entsprechender Stelle eine Mutation vor, die auf eine Rifampicin-Resistenz hinweist. Bei dem Xpert MTB/Rif-Assay sind alle erforderlichen Reagenzien in einer Einweg-Plastikkartusche vorhanden. Lediglich die Zugabe des liquifizierenden Puffers zum Sputum erfolgt manuell. Nach Eingabe der Testkartusche in das Gerät liegen Ergebnisse in weniger als zwei Stunden vor (49, 50).

Bislang gibt es kein Testsystem, welches eine einfache, schnelle und parallele Resistenztestung gegenüber mehreren Antibiotika vereint. Jedoch ist ein schneller Direkttest zur Bestimmung des molekularen Resistenzprofils der Tuberkuloseerreger erforderlich, um den Patienten eine adäquate Therapie zu ermöglichen und somit die globale Tuberkuloseepidemie einzudämmen.

1.2 Eigene Forschungsergebnisse

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den methodischen Grundstein für einen schnellen, sensitiven und verlässlichen Test zu legen, welcher in einer ressourcenlimitierten Umgebung eingesetzt werden kann. Dafür ist eine einfache Handhabung ohne die Notwendigkeit einer

komplexen Laborinfrastruktur nötig. Als Arbeitsplattform dient der m-PIMA™ Analyser, welcher ursprünglich für den m-PIMA™ HIV-1/2 Detect entwickelt wurde (Abbildung 1). Die Plattform ist mit einem Labor in einer Kartusche zu vergleichen. Alle notwendigen Komponenten zur Amplifikation, zur Hybridisierung und zur Detektion liegen in verschiedenen Kammern der Einmalkartusche vor. Nachdem die Probe appliziert wurde, wird die Kartusche ins Gerät gegeben und die automatische Testdurchführung startet.

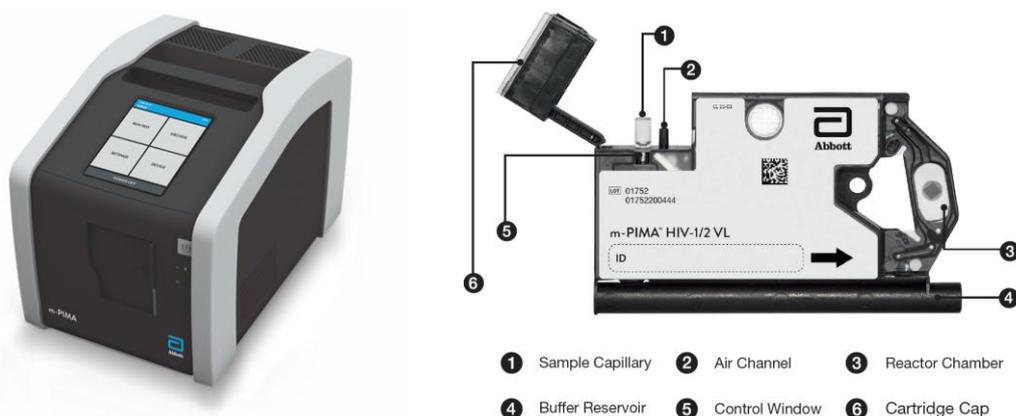


Abbildung 1: m-PIMA™ Analyser und Testkartusche (51)

Zur Evaluation der verschiedenen Prototypenentwicklungen wurde eine Plasmidbank mit den verschiedenen Wildtyp- und Mutationssequenzen angelegt. Mittels TOPO TA-Klonierung wurden die Sequenzen aus klinischen Patientenproben in *Escherichia coli*-Zellen eingebracht, die Plasmide isoliert, quantifiziert und abschließend die Sequenz mittels Sanger-Sequenzierung bestimmt. Insgesamt wurden 210 Plasmide mit verschiedenen Sequenzen erzeugt. Für den *rpoB*-Genbereich standen 26 Plasmide, für den *katG*-Genbereich sechs Plasmide, für den *inhA*-Promotorbereich vier Plasmide, für den *embB*-Genbereich sechs Plasmide, für den *gyrA*-Genbereich elf Plasmide und für den *pncA*-Genbereich 157 Plasmide zur Verfügung.

1.2.1 Competitive Reporter Monitored Amplification (CMA)-basierter SNP Assay

Um resistenzvermittelnde Mutationen bei *M. tuberculosis* nachzuweisen, wurde in einem ersten Ansatz das bereits etablierte Competitive Reporter Monitored Amplification (CMA)-Verfahren modifiziert. Dazu wurden immobilisierte Sonden und fluoreszenzmarkierte Reporter mit den entsprechenden Wildtyp- und Mutationssequenzen verwendet. CMA beruht auf einer kompetitiven Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten Reportern auf ein entsprechendes Sondenarray. Die Reporter binden spezifisch an die immobilisierten komplementären Sonden. Ein durch eine Real Time-PCR erzeugtes Amplikon konkurriert mit den immobilisierten Sonden um die Bindung der Reportermoleküle. Dabei wird die Bindung

in Lösung der Bindung an der Festphase bevorzugt. Die Änderung der Signalintensität jeder Sonde wird durch bildgebende Verfahren gemessen, welche das Mikroarray während des Amplifikationsprozesses mehrfach aufnehmen. Eine firmeneigene Software bestimmt den Zyklus-Schwellwert und weist somit die Anwesenheit des entsprechenden Analyten nach (52).

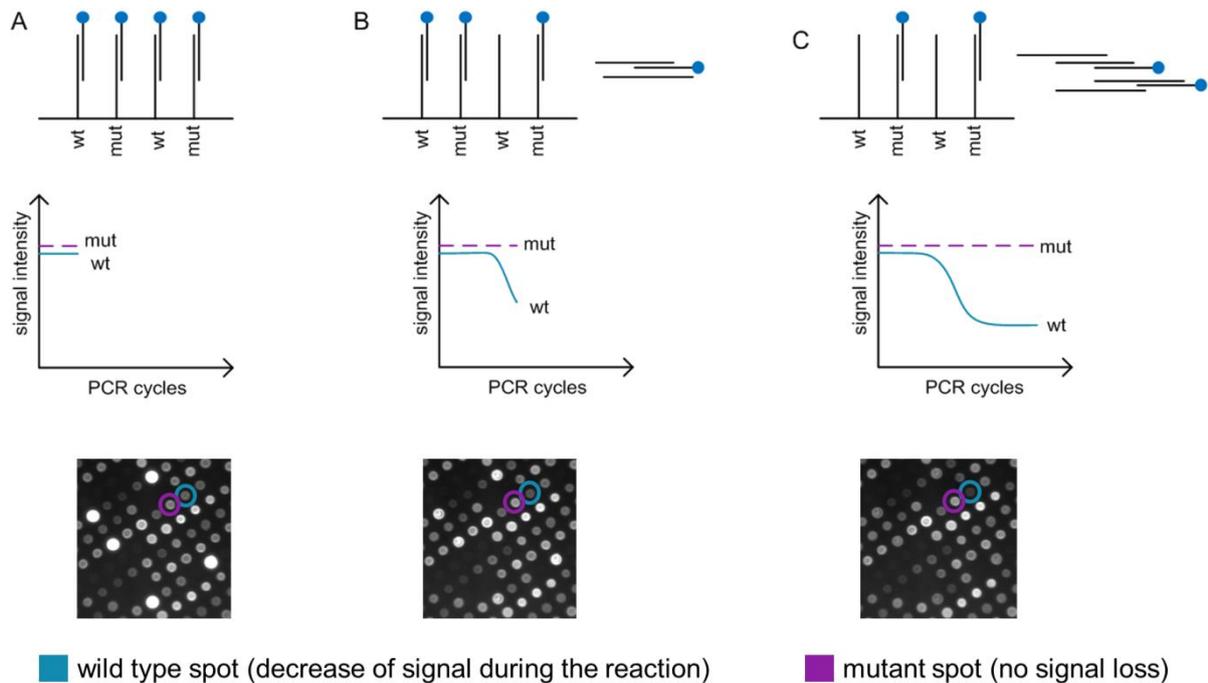


Abbildung 2: Schematischer Ablauf einer CMA-Reaktion

Zu Reaktionsbeginn des CMA-basierten SNP Assays lagen die Reporter mit sowohl der Wildtyp- als auch mit der Mutationssequenz gebunden an die komplementären Sonden auf dem Array vor (A). Bei Vorhandensein von z.B. Wildtyp-DNA wird diese durch die PCR amplifiziert. Das Wildtyp-Amplikon konkurriert mit den immobilisierten Wildtyp-Sonden um die Bindung der komplementären Wildtyp-Reporter. Es erfolgte eine Reporterbindung an die vervielfältigte DNA, sodass es zur Fluoreszenzsignalabnahme an den Wildtyp-Sonden kam. Je mehr Wildtyp-DNA amplifiziert wurde, desto höher war die Signalabnahme (B). Am Ende der PCR zeigte das Signal der Wildtyp-Sonde einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Das Signal der Mutationssonden blieb hingegen unverändert (C). Um den relativen Fluoreszenzwert jeder Sonde zu erhalten, wurde das Verhältnis aus dem Endsignal am Ende der Amplifikation und dem höchsten Signal während der Amplifikation gebildet. Der untersuchte Genotyp wurde bestimmt, indem das Verhältnis der relativen Fluoreszenzwerte eines zusammengehörigen Paares einer Wildtyp- und einer Mutationssonde berechnet wurde. Dieser sogenannte Diskriminierungsfaktor repräsentiert bei einem Wert größer eins eine Mutation und bei einem Wert kleiner eins den Wildtyp.

Mit Hilfe einer Multiplex-Reaktion kann der CMA-basierte SNP Assay resistenzvermittelnde Mutationen gegenüber Rifampicin, Isoniazid und Ethambutol nachweisen. Dafür wurden insgesamt 27 verschiedene Wildtyp- und Mutationssonden in dreifacher Redundanz auf einem Mikroarray aufgebracht. Mit dem CMA-basierten SNP Assay konnten neun verschiedene

Rifampicin-resistenzvermittelnde Mutationen nachgewiesen werden, welche sich alle in der RRDR des *rpoB*-Gens befinden. Zum Nachweis einer Isoniazid-Resistenz wurden vier Mutationen innerhalb des *katG*-Gens und zwei Mutationen innerhalb des *inhA*-Promotorbereiches mittels entsprechender Sonden auf dem Array abgebildet. Insgesamt konnten fünf verschiedene Ethambutol-resistenzvermittelnde Mutationen mit Hilfe des CMA-basierten SNP Assay detektiert werden, welche sich im ERDR des *embB*-Gens befinden (Anlage 1).

Kommerziell erworbene, genomische Wildtyp-DNA des Referenzstammes H37Rv und neun Plasmide mit verschiedenen Mutationen in den Genbereichen *rpoB*, *katG*, *embB* und im *inhA*-Promotorbereich konnten eindeutig als solche mittels CMA-basierten SNP-Assay eindeutig detektiert werden ((53), Tabelle S5). Um die Testung einer multiresistenten Tuberkulose zu simulieren, wurden mehrere Plasmide in einem Experiment untersucht. Alle Mutationen in den vier getesteten Kombinationen konnten eindeutig durch den entwickelten Test nachgewiesen werden ((53), Tabelle S6). Der CMA-basierte SNP Assay wurde zusätzlich auf seine Fähigkeit hin untersucht, verschiedenste Mutationen in klinischen Isolaten zu detektieren. Dazu wurden DNA-Isolate verschiedenster MTBC-Stämme untersucht. Basierend auf ihrem molekularen Resistenzprofil wurden die Isolate in drei Gruppen eingeteilt: monoresistente Isolate und Isolate mit zwei bzw. mit drei resistenzvermittelnden Mutationen. Für die erste Gruppe wurde beispielhaft das Isolat 1429/02 (*katG* Ser315Thr, A(G/C)(C/A)) untersucht. Zur zweiten Gruppe gehörten die Isolate 368/01 (*rpoB* Ser531Leu, T(C/T)G + *katG* Ser315Thr, A(G/C)C) und 4724/03 (*rpoB* His526Arg, C(A/G)C + *katG* Ser315Thr, A(G/C)C). Für die dritte Gruppe wurden repräsentativ die Isolate 1049/02 (*rpoB* Ser531Leu, T(C/T)G + *katG* Ser315Thr, A(G/C)C + *embB* Met306Ile, AT(G/A)), 2822/06 (*rpoB* His526Asp, (C/G)AC + *inhA* -15 (-15C→T) + *embB* Met306Val, (A/G)TG)) und 9975/05 (*rpoB* Ser531Leu, T(C/T)G + *katG* Ser315Thr, A(G/C)C + *embB* Met306Val, (A/G)TG)) untersucht. Für alle Isolate konnte der entsprechende Genotyp mit Hilfe des entwickelten Prototypentests korrekt nachgewiesen werden ((53), Abbildung 3).

Die Sensitivität des CMA-basierten SNP Assays wurde mit Hilfe kommerziell erworbener, genomischer Wildtyp-DNA des Referenzstammes H37Rv bestimmt. Alle Zielgene *rpoB*, *katG*, *embB* und die Promotorregion von *inhA* wurden in einer Multiplex-Reaktion amplifiziert und konnten bis zu einer Konzentration von 417 Genkopien/ml detektiert werden ((53), Abbildung 2). Um die Assayperformance in einer simulierten Nichtlabor-Umgebung zu charakterisieren, wurde inaktiviertes Kulturmaterial von TB-Patientenisolaten mit dem CMA-basierten SNP Assay analysiert. Mit lediglich einem Mikroliter der Zellextrakte war es

möglich, alle Mutationen in den Genbereichen *rpoB*, *katG*, *embB* und im *inhA*-Promotorbereich nachzuweisen. Als Kontrolle wurden ebenfalls die aufgereinigten DNA-Isolate untersucht ((53), Abbildung 3).

Der entwickelte CMA-basierte SNP Assay ist in der Lage, neben Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs), die einen Genbereich betreffen, auch SNPs zu detektieren, wenn zwei oder drei Genbereiche betroffen sind. Die Verwendbarkeit von inaktiviertem Kulturmaterial in der Testkartusche und einer Testdauer von einer Stunde sind Vorteile des Tests, um diesen in einer ressourcenlimitierten Umgebung einzusetzen. Eine resistente Tuberkulose kann durch eine Vielzahl von Mutationen begründet sein. Um so viele Mutationen wie möglich abzudecken, werden ebenso viele verschiedene immobilisierte Sonden und Reporter benötigt. Um die Komplexität des entwickelten Systems dennoch so gering wie möglich zu halten, wurde alternativ der Schmelzkurvenassay etabliert. Hierbei erfolgt die Detektion indirekt mittels fluoreszenzmarkierter Primer, fluoreszenzmarkierte Reporter sind nicht erforderlich.

1.2.2 Schmelzkurvenanalyse zur Vorhersage einer MDR-TB und Fluoroquinolon-Resistenz

Die Schmelzkurvenanalyse beruht auf der Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten Amplikons an immobilisierte Sonden auf einem Mikroarray. Die Methode wurde beispielhaft für den Nachweis einer Rifampicin-, einer Isoniazid- und einer Fluoroquinolon-Resistenz etabliert. Die Resistenzdetektion erfolgt anhand der unterschiedlichen Schmelzprofile der Amplikons an Wildtyp- bzw. Mutationssonden.

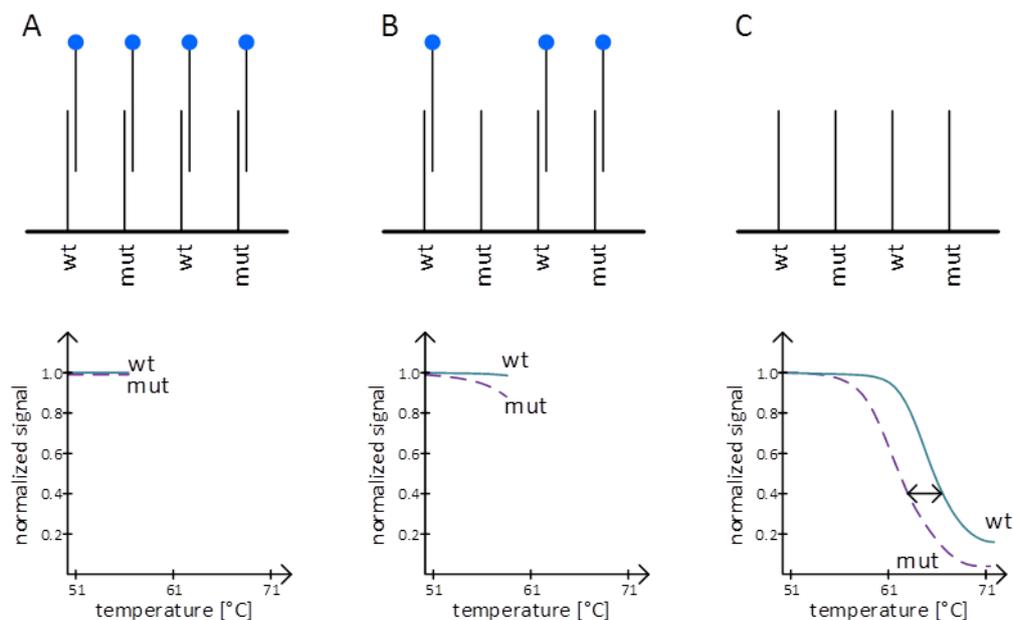


Abbildung 3: Schematischer Ablauf einer Schmelzkurvenreaktion mit Wildtyp- und Mutationssonden

In einem ersten Schritt erfolgte eine Multiplex-PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern zur Amplifikation der definierten Zielgene (*rpoB* RRDR, *rpoB* Codon 572, *katG* Codon 315, *gyrA* QRDR und *inhA*-Promotorregion). Nach einem Denaturierungsschritt konnten die entstandenen Einzelstränge aufgrund einer Hybridisierungstemperatur von 30°C an die immobilisierten Wildtyp- bzw. Mutationssonden in dreifacher Redundanz (d.h. auf drei Spots) auf dem Mikroarray binden (A). Anschließend wurde die Temperatur schrittweise von 51°C auf 71°C erhöht. Zuerst lösten sich die unspezifischen Amplikon-Sonden-Bindungen, wodurch das Signal der nicht-komplementären Sonden abnahm und das Signal der komplementären Sonden unverändert blieb (B). Mit weiter ansteigender Temperatur wurden auch die komplementären Amplikon-Sonden-Bindungen aufgelöst. Bei der finalen Temperatur von 71°C waren alle Bindungen aufgelöst und das Signal hat an allen Sonden abgenommen (C). Bei jedem Temperaturschritt wurde ein Bild des Mikroarrays aufgenommen. Aus der Subtraktion des nicht-spezifischen Hintergrunds vom absoluten Fluoreszenzwert wurde das Rohsignal eines jeden Spots erhalten. Um ein kontinuierliches Signal zu erzeugen, erfolgte eine Interpolation. Überstieg das Signal einen Wert von 0,05; 0,1 oder 0,2 (abhängig von der betrachteten Sonde), wurde dieses normalisiert und als „detektiert“ deklariert. Für jede Sonde wurde der Temperaturwert bei einem Signalwert von 0,4 bestimmt. Die Berechnung des Diskriminierungsfaktors erfolgte, indem das Verhältnis der Signalwerte einer zusammengehörigen Wild- und Mutationssonde gebildet wurde. Ein Diskriminierungsfaktor kleiner eins repräsentierte den Wildtyp, ein Diskriminierungsfaktor größer eins eine Mutation.

Der entwickelte Schmelzkurvenassay verwendet 61 immobilisierte Sonden, welche den Wildtyp als auch verschiedenste Mutationen repräsentieren. Insgesamt können 43 unterschiedliche Mutationen nachgewiesen werden, welche eine Resistenz gegenüber Rifampicin, Isoniazid oder gegenüber den Fluoroquinolonen vermitteln (Anlage 2).

Um die Funktionalität des entwickelten Schmelzkurvenassays zu verifizieren, wurden 30 verschiedene MTBC-Isolate untersucht. Die analysierten Isolate trugen 18 Mutationen in der RRDR, eine Mutation im *rpoB*-Codon 572, fünf verschiedene Mutationen im *katG*-Codon, neun Mutationen in der QRDR und zwei Mutationen in der *inhA*-Promotorregion. Bei der Untersuchung eines Wildtyp-Genotyps wurde an allen Mutationssonden ein Diskriminierungsfaktor kleiner eins festgestellt. Wurde allerdings ein Genotyp mit einer Mutation analysiert, zeigte sich an der entsprechenden Mutationssonde ein Diskriminierungsfaktor größer eins ((54), Tabelle 1). Um die Sensitivität des entwickelten Schmelzkurvenassays zu bestimmen, wurde kommerziell erhältliche Wildtyp-DNA des Referenzstammes H37Rv in einem Konzentrationsbereich von 50 bis 600 Genkopien/ml untersucht. Mit ansteigender DNA-Konzentration wurde eine ansteigende Detektionsrate festgestellt. Das Schmelzkurvenassay wies eine Nachweisgrenze von 240 Genkopien/ml auf, bei welcher 95 % der Proben detektiert werden konnten ((54), Abbildung 2). Auf dem Mikroarray war neben verschiedenen Wildtyp- und Mutationssonden auch eine Sonde zum spezifischen Nachweis von MTBC-Stämmen integriert. Um die Spezifität des entwickelten Schmelzkurvenassays zu

bestimmen, wurde verschiedene nicht-tuberkulöse Mykobakterien, wie zum Beispiel *Mycobacterium intracellulare*, *M. malmoense*, *M. asiaticum*, *M. fortuitum* oder *M. marinum* getestet. Dabei konnten keine unspezifischen Reaktionen beobachtet werden. Ein anderer MTBC-Stamm *M. bovis* BCG hingegen erzeugte vergleichbare Signale zu *M. tuberculosis* ((54), Abbildung 3). Zusätzlich wurde Kulturmaterial von verschiedenen MTBC-Stämmen im entwickelten Schmelzkurvenassay untersucht. Es konnten alle Mutationen detektiert werden. Es wurde kein Unterschied zwischen Kulturmaterial und aufgereinigter DNA festgestellt ((54), Tabelle S2). Somit besitzt der Test das Potential in einer ressourcenlimitierten Laborumgebung eingesetzt zu werden.

Die Performance des entwickelten Schmelzkurventests wurde in einer Hoch-Inzidenzumgebung mit Hilfe von 265 verschiedenen MTBC-Stämmen aus Swasiland untersucht, welche zuvor mittels Sanger-Sequenzierung analysiert wurden (55). Swasiland ist eines der Länder mit der weltweit größten HIV- und TB-Last (7). Von den untersuchten Isolaten wiesen 144 Isolate einen Wildtyp-Genotyp innerhalb der RRDR und des Codons 572 auf, welche alle korrekt identifiziert werden konnten. Die anderen 121 Isolate trugen verschiedenste Mutationen innerhalb des *rpoB*-Gens, von denen 99,2 % (120/121) richtig nachgewiesen werden konnten. Ein Isolat trug eine *rpoB*-Deletion (Codon 513 und 514) und wurde irrtümlich als Mutation Ser513Leu klassifiziert. Isoniazid-Resistenz vermittelnde Mutationen im *katG*-Gen und im *inhA*-Promotorbereich wurden in 99,2 % (122/123) der Fälle korrekt identifiziert. Die Mutation Met275Ile konnte nicht detektiert werden, da diese außerhalb des Detektionsbereiches des entwickelten Schmelzkurvenassay lag. Eine Assoziation zwischen dieser seltenen Mutation und einem resistenten Phänotyp konnte bisher nicht nachgewiesen werden (56, 57).

Eine Fluoroquinolon-Resistenz ist hauptsächlich mit Mutationen im *gyrA*-Gen assoziiert, alle untersuchten Mutationen konnten korrekt nachgewiesen werden. Die Mutation *gyrA* Ser95Thr konnte ebenso durch eine entsprechende Sonde auf dem Mikroarray in allen Isolaten richtig identifiziert werden. Bei diesem SNP handelt es sich um eine phylogenetische Mutation für den Wildtyp H37Rv-Stamm, welche nicht mit einer Fluoroquinolon-Resistenz assoziiert ist (58). Zusammenfassend war der entwickelte Schmelzkurvenassay in der Lage, in 99,5 % (963/968) der Fälle die korrekte Wildtyp- bzw. Mutationssequenz nachzuweisen.

Der entwickelte Schmelzkurvenassay in einer Prototypen-Kartusche ist geeignet, um eine Resistenz gegenüber Rifampicin, Isoniazid und den Fluoroquinolonen zu detektieren. Nach Eingabe des Reaktionsmixes in die Kartusche erfolgt eine Analyse innerhalb von 90 Minuten. Das Assay besitzt eine Nachweisgrenze von 240 Genkopien/ml und kann sowohl mit

aufgereinigter DNA als auch mit Kulturmateriale durchgeführt werden. Das System weist eine vergleichbare Performance mit getrockneten Reagenzien auf ((54), Abbildung S1), sodass der Test auch in ressourcenlimitierten Umgebungen zum schnellen Resistenznachweis bei einer Tuberkuloseinfektion eingesetzt werden kann.

1.2.3 Schmelzkurvenanalyse zur Vorhersage einer Pyrazinamid-Sensitivität

Bei den beiden zuvor vorgestellten Verfahren werden Wildtyp- und Mutationssonden verwendet, um eine Antibiotikaresistenz nachzuweisen. Allerdings müssen dafür definierte Hotspot-Regionen bekannt sein. Aufgrund der divers auf dem gesamten Gen verteilten Mutationen ist diese Herangehensweise zum Nachweis einer Pyrazinamid-Resistenz bzw. Pyrazinamid-Sensitivität nicht möglich. Der entwickelte Schmelzkurvenassay wurde derart abgeändert, indem lediglich Wildtyp-Sonden zur Anwendung kommen, welche das *pncA*-Gen umspannen. Beim Vorliegen einer Mutation tritt ein Sondenversatz auf, welcher mit Hilfe eines neu implementierten Algorithmus detektiert werden kann.

Der entwickelte Schmelzkurvenassay umfasst 51 sich überlappende Wildtyp-Sonden in dreifacher Redundanz, welche einen Großteil des *pncA*-Gens und dessen Promotorbereiches umfassen ((59), Abbildung 1). Zusätzlich gibt es auf dem Mikroarray drei Mutationssonden zur Detektion von phylogenetischen Mutationen. Die Mutation Ala46Ala ist spezifisch für die Spezies *M. canettii* und kann als phylogenetischer Marker zur Unterscheidung verschiedener MTBC-Stämme verwendet werden (60-63). *M. bovis*-Stämme, welche auch Mitglieder des MTBCs sind, können durch die Mutation His57Asp identifiziert werden, welche zusätzlich zu einer Pyrazinamid-Resistenz führt (26, 64). Die dritte Mutation Ser65Ser ist ein Marker für die *M. tuberculosis*-Abstammungslinie Delhi/CAS und ist nicht mit einer Pyrazinamid-Resistenz assoziiert (65, 66). Eine weitere Sonde wurde zum Nachweis der stillen Mutation Ser74Ser auf dem Mikroarray integriert, um falsch-positive Testergebnisse auszuschließen. Aufgrund einer Länge von 561 bp plus Promotorregion wurde die Amplifikation des *pncA*-Gens auf drei Teilbereiche aufgeteilt: *pncA* A1 Nukleotid -28 bis Codon 32, *pncA* A2 Codon 46 bis Codon 77 und *pncA* A3 Codon 116 bis Codon 168.

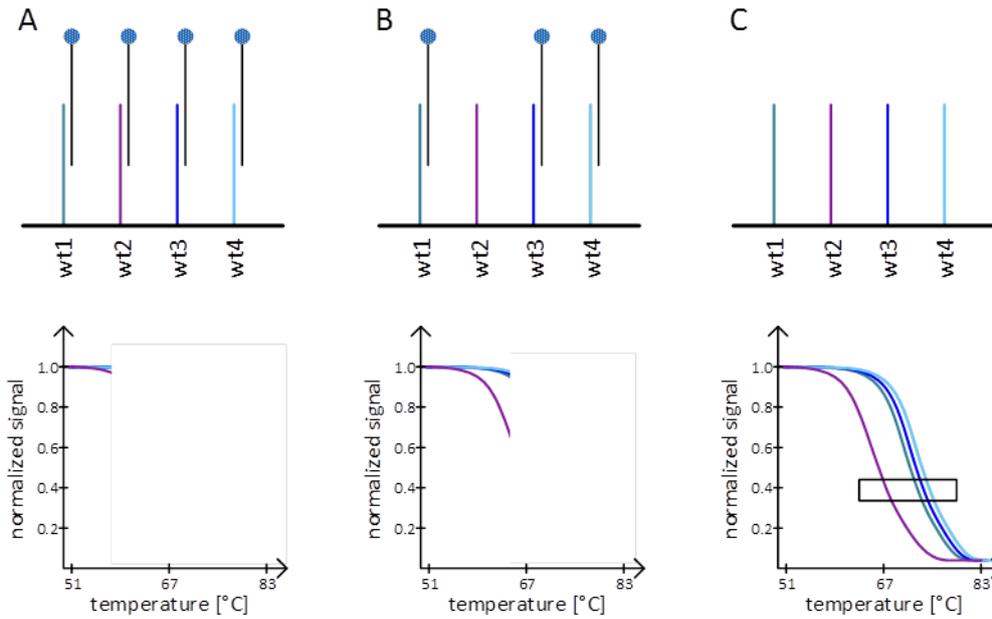


Abbildung 4: Schematischer Ablauf einer Schmelzkurvenreaktion mit ausschließlich Wildtyp-Sonden

In einem ersten Schritt wurden die drei Genabschnitte *pncA* A1, *pncA* A2 und *pncA* A3 mittels fluoreszenzmarkierter Primer amplifiziert. Nach einem Denaturierungsschritt konnten die fluoreszenzmarkierten Einzelstränge bei einer Temperatur von 31°C an die immobilisierten Wildtyp-Sonden auf dem Mikroarray binden (A). Anschließend wurde die Temperatur schrittweise von 51°C auf 83°C erhöht. Zuerst wurden alle Amplikon-Sonden-Bindungen bei ansteigender Temperatur aufgelöst, die eine Mutation im analysierten *pncA*-Genbereich zeigen (B). Bei weiterer Temperaturerhöhung wurden schließlich auch die Amplikon-Sonden-Bindungen aufgelöst, welche den Wildtyp repräsentieren (C). Bei jedem Temperaturschritt wurde ein Bild des Mikroarrays aufgenommen, welche anschließend mit der firmeneigenen Software ausgewertet wurden. Um das Rohsignal eines jeden Spots zu bestimmen, wurde der Hintergrundwert von den jeweiligen Helligkeitswerten abgezogen. Ein kontinuierliches Signal wurde mittels Interpolation gewonnen. Überstieg das Rohsignal einen Fluorezwert von 0,01, wurde das Signal normalisiert. Die 51 überlappenden Wildtyp-Sonden wurden aufgrund ihres Schmelzverhaltens in sechs Auswertegruppen eingeteilt ((59), Tabelle S2). Die Detektion einer Mutation bzw. eines Nicht-Wildtyps basiert auf einem Versatz der betroffenen Sonden im Vergleich zu den anderen Sonden einer Auswertegruppe. Bei einem Signallevel von 0,04 wurde der Versatz mittels Ausreißertest überprüft. Für den Ausreißertest wurde der einseitige Tietjen-Moore Test angewendet. Dieser ist geeignet, mehrere Ausreißer in einem univarianten Datensatz zu detektieren, welcher einer Normalverteilung folgt (67). Wurde durch den Tietjen-Moore Test ein Ausreißer innerhalb einer Auswertegruppe nachgewiesen, lag eine Mutation innerhalb der untersuchten DNA-Sequenz vor.

Um die Nachweisgrenze des entwickelten Schmelzkurventests zur Vorhersage einer Pyrazinamid-Sensitivität zu bestimmen, wurde genomische DNA des *M. tuberculosis*-Referenzstammes H37Rv in einem Konzentrationsbereich von 1000 bis 5000 Genkopien/ml verwendet. Die Nachweisgrenze wurde auf 3750 Genkopien/ml bestimmt, bei welcher 95 % der Proben als positiv detektiert wurden ((59), Abbildung 3). Die Performance des

entwickelten Schmelzkurventests wurde mit Hilfe von 36 verschiedenen *M. tuberculosis*-Isolaten und vier Plasmiden mit unterschiedlichen *pncA*-Mutationen untersucht. Sieben Proben trugen Mutationen, welche im Amplifikationsbereich *pncA* A1 liegen. Für den Amplifikationsbereich *pncA* A2 wurden 15 Proben und für den Amplifikationsbereich *pncA* A3 18 verschiedene Proben untersucht ((59), Tabelle S1). Wurde ein Wildtyp-Genotyp untersucht, zeigten alle Sonden einer Auswertegruppe das gleiche Schmelzverhalten. Kein Sondenverlauf zeigte einen Versatz im Vergleich zu den anderen Sonden innerhalb einer Auswertegruppe, weshalb kein Ausreißer nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu konnten alle untersuchten Mutationen aufgrund von mindestens einem Ausreißer detektiert werden. Die Mutation Ile31Ser konnte allerdings nur manuell bestätigt werden, da der durch die Mutation verursachte Versatz für die automatisierte Auswertung nicht ausreichend eindeutig war. Begründet wurde dies dadurch, dass sich die Mutation am Ende des Amplifikationsbereiches *pncA* A1 befand, was in zukünftigen Anpassungen des Schmelzkurventests berücksichtigt werden muss.

Mit Hilfe der zuvor genannten Kollektion verschiedener MTBC-Stämme aus Swasiland (Kapitel 1.2.2) konnte eine klinische Bewertung des entwickelten Schmelzkurventests erfolgen. In 153 der untersuchten Isolate konnte keine Mutation nachgewiesen werden, weshalb dadurch auf das Vorliegen eines *pncA*-Wildtyps geschlossen wurde. Dies wurde mittels Sanger-Sequenzierung verifiziert (55). Unter den 118 Isolaten mit 21 verschiedenen *pncA*-Mutationen konnten 98 (83,05 %) als Nicht-Wildtyp identifiziert werden ((59), Tabelle 1). In den anderen 20 Fällen trugen die Isolate Mutationen, welche sich außerhalb der Detektionsbereiche des entwickelten Schmelzkurventests befanden. Im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung konnte eine Sensitivität von 83,05 % und eine Spezifität von 100 % erreicht werden. Um die Performance des entwickelten Schmelzkurventests ebenfalls für MTBC-Stämme aus anderen geografischen Regionen abzuschätzen, wurde eine 'in silico'-Analyse für 1000 Proben aus Samara, Russland, mit den zugänglichen Sequenzierungsdaten durchgeführt (68). Für die russische Kohorte konnte der entwickelte Schmelzkurventest eine Sensitivität von 74,4 % erreichen, was erneut durch den eingegrenzten Detektionsbereiches des Tests zu begründen ist.

Die Assayperformance wurde zusätzlich in einer simulierten Nichtlabor-Umgebung charakterisiert, indem inaktiviertes Kulturmaterial von sechs verschiedenen MTBC-Stämmen untersucht wurde. Die Isolate repräsentierten sowohl den Wildtyp-Genotyp als auch verschiedene Mutationen (His51Asp, Del125-129, Asp136Ala, Leu151Ser und Arg154Gly). Das inaktivierte Kulturmaterial wurde im Vergleich zu aufgereinigter genomischer DNA

untersucht. Dabei konnte kein Unterschied bezüglich der Assayperformance festgestellt werden ((59), Tabelle S4).

Der entwickelte Schmelzkurventest ist in der Lage, einen Nicht-Wildtyp in definierten Bereichen des *pncA*-Gens und dessen Promotorregion zu detektieren. Der Nachweis ist bis zu einer Konzentration von 3750 Genkopien/ml innerhalb von 2,5 Stunden möglich. Durch eine Verbesserung der Detektionsbereiche kann der entwickelte Schmelzkurventest als zuverlässiger und schneller Test zum Nachweis einer Pyrazinamid-Sensitivität in ressourcenlimitierten Umgebungen eingesetzt werden.

1.3 Schlussfolgerungen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten verschiedene Ansätze für den Nachweis von resistenzvermittelnden Mutationen bei *M. tuberculosis* etabliert werden:

- Die entwickelten Testmethoden weisen eine maximale Testdauer von 2,5 Stunden auf. Durch die kurze Testdauer kann die benötigte Therapie sofort eingeleitet werden. Das Risiko einer weiteren Verbreitung kann erheblich minimiert werden.
- Durch das angewendete Kartuschendesign und die Kompatibilität zum m-PIMA™ Analyser ist eine einfache Handhabbarkeit gegeben. Werden Prototypenkartuschen mit Trockenreagenzien verwendet, ist ausschließlich die Probenapplikation als manueller Arbeitsschritt erforderlich. Alle weiteren Testschritte und die Auswertung laufen automatisiert ab. Der m-PIMA™ Analyser kann mit einem internen Akku betrieben werden, wodurch auch ein Test in den entlegensten Regionen der Welt möglich ist.
- Die entwickelten Testverfahren zeigen mit anderen Testmethoden vergleichbare sensitive und verlässliche Ergebnisse.
- Begründet durch das verwendete Mikroarray ist eine parallele Resistenztestung von verschiedenen Antibiotika möglich. Des Weiteren können die entwickelten Tests durch Austausch der immobilisierten Sonden leicht auf andere Genbereiche oder Antibiotika angepasst werden.

Das Ziel der WHO lautet, die globale TB-Epidemie bis 2030 zu stoppen (2). Dafür ist allerdings eine adäquate Behandlung der betroffenen Patienten erforderlich, was eine Überprüfung des Resistenzprofils des entsprechenden Erregers bedingt. Die im Rahmen der Dissertation entwickelten Testverfahren stellen einer Verbesserung der derzeitigen etablierten Resistenztestung dar, da sowohl der CMA-basierte SNP Assay als auch die Schmelzkurven-

assays eine einfache, schnelle und parallele Resistenztestung gegenüber mehreren Antibiotika vereinen.

Testdauer

Seit mehr als 50 Jahren werden von der WHO auf der Kultivierung basierende Methoden zum Resistenznachweis empfohlen (69). Aufgrund einer Generationszeit des Tuberkuloseerregers von zwölf bis 18 Stunden sind Kulturergebnisse meist erst nach drei bis acht Wochen zu erwarten. Dies verzögert die Resistenzdetektion und führt zu inadäquaten Behandlungen und zur Verbreitung von Antibiotika-resistenten Stämmen (34). Die im Rahmen der Dissertation entwickelten Methoden weisen eine maximale Testdauer von 2,5 Stunden auf.

Komplexität der Testsysteme

Kommerziell verfügbare auf der Kultivierung basierende Testsysteme wie der BACTEC MGIT 960 von Becton, Dickinson and Company zur Detektion einer Rifampicin-, Isoniazid-, Ethambutol- oder Fluoroquinolon-Resistenz erfordern ein Biosicherheitslabor der Stufe 3 und spezialisierte Laborkräfte (34, 70, 71). In TB-Referenzlaboratorien werden nun weit verbreitet molekulare Methoden eingesetzt (8). Bei den molekularen Methoden wird grundsätzlich zwischen PCR-basierten Inhouse-Methoden, den DNA-Streifentests und den kartuschenbasierten Tests unterschieden. Die PCR-basierten Methoden (z.B. Allele-spezifische PCR oder Allel-spezifische Ligation) sind sehr arbeits- und zeitaufwendig, da die Amplifikation und Detektion in zwei Schritten unter Verwendung von unterschiedlichen Methoden und Geräten durchgeführt wird (41, 42). Um unter anderem das benötigte Laborequipment zu verringern, wurden LPAs entwickelt, welche auf der DNA-Streifentechnologie basieren. Kommerziell verfügbare Testsysteme, wie der GenoType MTBDRplus Assay (v1.0 und v2.0) und der GenoType MTBDRsl Assay (v2.0) detektieren resistenzvermittelnde Mutationen für Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol, Fluoroquinolone und injizierbare Antibiotika (45, 46). Allerdings ist der Durchführungsaufwand im Vergleich zu kartuschenbasierten Testmethoden hoch (48). Des Weiteren birgt das offene Plattformdesign das Risiko für eine potentielle Amplikonkontamination. Meist werden für LPAs eine nested PCR durchgeführt, was wiederum ein hohes Risiko für falsch-positive Ergebnisse darstellt (72, 73).

Sowohl der hier etablierte CMA-basierte SNP-Assay als auch die entwickelten Schmelzkurvenassays (Kapitel 1.2.1-1.2.3) basieren auf der Verwendung von geschlossenen Prototypkartuschen, welche kompatibel mit dem m-PIMATM Analyser sind. Somit ist keine weitere komplexe Laborinfrastruktur zur Durchführung der Resistenztestung erforderlich.

Zusätzlich wird durch das geschlossene Kartuschendesign das Risiko einer Amplikonkontamination minimiert.

Automatisierbarkeit

Zur Durchführung der LPAs sind einige manuelle Arbeitsschritte erforderlich. Des Weiteren treten Probleme bei der Interpretation der Tests aufgrund der hohen Färbevarianz der verschiedenen Banden auf (74). Bei dem kommerziell erhältlichen Xpert MTB/Rif Assay handelt es sich um das erste Point-of-Care System, welches eine sensitive und spezifische Detektion einer Rifampicin-Resistenz unter dem direkten Nutzen von Sputumproben ermöglicht. Nach der Sputum-Vorbereitung laufen alle anschließenden Schritte wie PCR-Amplifikation und Interpretation der Ergebnisse voll automatisiert ab (49, 50). Beim CMA-basierten SNP Assay und den entwickelten Schmelzkurvenassays handelt es sich um Testmethoden, welche kompatibel mit dem m-PIMATM Analyser sind. Bei Verwendung von Prototypenkartuschen mit integrierten Trockenreagenzien laufen nach der Probenapplikation alle weiteren Schritte voll automatisiert ab, sodass keine weiteren manuellen Arbeitsschritte erforderlich sind. Die Auswertung erfolgt ebenso automatisiert, wodurch eine Varianz in den Analyseergebnissen ausgeschlossen ist.

Sensitivität und Spezifität

Entscheidend für das Testergebnis ist die Qualität des analysierten Templates (75). Sowohl mit aufgereinigter genomischer DNA als auch mit inaktiviertem Kulturmaterial konnten mit den im Rahmen der Dissertation entwickelten Testverfahren vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Des Weiteren war die ermittelte Nachweisgrenze von bis zu 417 Genkopien/ml MTBC-DNA beim CMA-basierten SNP-Assay vergleichbar mit anderen PCR-basierten Methoden wie die Verwendung von molecular beacons und Taq Man-Sonden (76-79). Zusätzlich konnten beispielsweise mit dem CMA-basierten SNP Assay alle Genotypen der analysierten Isolate korrekt identifiziert werden, was auf eine vergleichbar hohe Spezifität zu anderen PCR-basierten in-house Methoden verschiedener Laboratorien hindeutet.

Parallele Resistenztestung

Der kommerziell erhältliche Point-of-Care Test von Cepheid ist auf den Nachweis einer Rifampicin-Resistenz beschränkt (49). Andere molekulare Testsysteme, welche für die parallele Resistenzdetektion geeignet sind, benötigen auf der anderen Seite mehrere manuelle Schritte und ein spezielles Equipment (80-82).

Die im Rahmen der Dissertation entwickelten Testmethoden basieren auf einer Prototypenkartusche, welche unter anderem einen Mikroarray beinhaltet. Auf diesem sind immobilisierte

Sonden aufgebracht, welche spezifisch für die nachzuweisenden Antibiotika-Resistenzen sind. Eine Anpassung des entsprechenden Tests auf andere Antibiotika erfolgt über den Ersatz bzw. die Implementierung weiterer Sonden auf dem Mikroarray. Trotz dieser Flexibilität zeigen molekulare Testmethoden Limitationen hinsichtlich seltener und teilweise nicht bekannter Mutationen. Beispielsweise kann ein TB-Erreger durch eine seltene Mutation im *rpsA*-Gen eine Pyrazinamid-Resistenz aufweisen, wohingegen das *pncA*-Gen die Wildtyp-Sequenz zeigt. Das definierte Set von klinischen und epidemiologisch relevanten Mutationen muss sorgfältig ausgewählt werden, welches zusätzlich die geografisch unterschiedlichen Inzidenzen berücksichtigt. Beispielsweise haben MDR/XDR-Stämme in den geografisch benachbarten Regionen KwaZulu-Natal in Südafrika und Swasiland verschiedene Mutationsprofile (83, 84).

Besonderheiten beim Nachweis einer Pyrazinamid-Resistenz/Sensitivität

Zum Nachweis einer Pyrazinamid-Resistenz gibt es ein kommerziell verfügbares Kulturbasiertes Verfahren, den Testkit BACTEC MGIT 960 PZA (27). Allerdings wurden für dieses Testsystem bereits zahlreiche Nachteile beschrieben. Aufgrund der Alkalisierung des Mediums durch ein großes erforderliches Inoculum oder das Vorhandensein von BSA kann es zu falsch-resistenten Ergebnissen kommen (85, 86). In den meisten Fällen muss die Sekundärkultur eingesetzt werden, was wiederum zu einer langen Durchführungsdauer führt (87). Ein direktes Animpfen der PZA MGIT Tubes mit Sputum ist anfällig für invalide Ergebnisse aufgrund möglicher Kontaminationen, ein ineffizientes Wachstum und/oder zu kleine Inoculums (87, 88).

Molekulare Testmethoden zum Nachweis einer Pyrazinamid-Resistenz konnten bisher nicht etabliert werden, da keine Hotspot-Regionen bekannt sind und die Mutationen divers über das komplette Gen verteilt sind. DNA-Sequenzierungsmethoden wie WGS (whole genome sequencing) oder Amplikon-Sequenzierung könnten diese Limitation übergehen (89, 90). Allerdings sind die Sequenzierungsmethoden sehr teuer, technisch anspruchsvoll und nicht für den Einsatz am Point-of-Care geeignet (74). Aus diesem Grund wurde ein Schmelzkurvenassay zum Nachweis einer Pyrazinamid-Sensitivität entwickelt. Beim Vorliegen eines *pncA*-Wildtyps kann auf eine Pyrazinamid-Sensitivität geschlossen werden. Dieses Vorgehen trägt das Risiko für falsch-resistente Ergebnisse, wenn eine Mutation innerhalb des *pncA*-Gens vorliegt, der Stamm hingegen Pyrazinamid sensitiv ist. Hingegen erlaubt diese Herangehensweise Medizinern einen begründeten Einschluss von Pyrazinamid in eine frühe MDR-TB-Behandlung. In der Swasiland-Kollektion trugen lediglich zwei Isolate (1,7 %) eine *pncA*-Mutation, welche phänotypisch sensitiv getestet wurden. Auf der anderen Seite gab es

lediglich ein Isolat (0,9 %), welches phänotypisch resistent getestet wurde, im *pncA*-Gen lag hingegen keine Mutation vor. Dies kann durch einen anderen Resistenzmechanismus begründet sein. In Osteuropa gibt es unter den MDR-TB-Patienten besonders hohe Pyrazinamid-Resistenzraten (> 50 %), was eine solide und konservative Vorhersage einer Pyrazinamid-Sensitivität sehr wertvoll macht und den Grundstein für eine frühe individualisierte Therapie legt (91, 92). Der entwickelte Schmelzkurvenassay könnte mit weiteren Verbesserungen insbesondere des abgedeckten Genbereiches als schneller Rule-in Test zum Nachweis einer Pyrazinamid-Sensitivität eingesetzt werden.

Direkte Anwendbarkeit von Sputum-Proben

Eine Einschränkung der entwickelten Testverfahren liegt in der direkten Anwendbarkeit von Sputum-Proben. Diese wurde bisher nicht untersucht, weshalb diesbezüglich keine Aussage möglich ist. Allerdings konnte mit dem CMA-basierten SNP-Assay und der Schmelzkurvenassays gezeigt werden, dass die Verfahren robust gegenüber der Verwendung von hitzeinaktiviertem Kulturmaterial sind. Somit sind die Tests geeignet, in ressourcenlimitierten Laborumgebungen eingesetzt zu werden.

Mit allen entwickelten Testansätzen wurden die Grundsteine für molekulare Nachweistests gelegt, um schnell und zuverlässig resistenzvermittelnde Mutationen für verschiedene Antibiotika nachzuweisen. Mit Hilfe solcher Methoden können in Zukunft multiresistente und extensiv resistente Tuberkulosen detektiert werden, wodurch den Patienten eine adäquate Therapie verabreicht werden und somit die weltweite Tuberkuloseepidemie eingedämmt werden kann.

1.4 Literaturverzeichnis

1. WHO. 2017. Global tuberculosis report 2017.
2. WHO. 2018. Global tuberculosis report 2018.
3. Caminero JA, Matteelli A, Lange C. 2012. Treatment of TB.154-166.
4. Bastos ML, Hussain H, Weyer K, Garcia-Garcia L, Leimane V, Leung CC, Narita M, Pena JM, Ponce-de-Leon A, Seung KJ, Shean K, Sifuentes-Osornio J, Van der Walt M, Van der Werf TS, Yew WW, Menzies D. 2014. Treatment outcomes of patients with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis according to drug susceptibility testing to first- and second-line drugs: an individual patient data meta-analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 59:1364-74.
5. Von Groll A, Martin A, Jureen P, Hoffner S, Vandamme P, Portaels F, Palomino JC, da Silva PA. 2009. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in *gyrA* and *gyrB*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53:4498-500.
6. Drobniowski FAW, S.M. 1998. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*--a molecular story. *Journal of Medical Microbiology* 47:189-96.
7. WHO. 2016. Global tuberculosis report 2016.
8. Somoskovi AP, L.M.; Salfinger, M. 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respiratory Research* 2:164-8.
9. Rattan AK, A., Ahmad, N. 1998. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerging infectious diseases* 4:195-209.
10. Musser JM. 1995. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clinical microbiology reviews* 8:496-514.
11. Lorenzo D, Mousa SA. 2011. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic testing. *Acta tropica* 119:5-10.
12. Williams DLS, L.; Collins, L.; Miller, L.P.; Heifets, L.B.; Gangadharam, P.R.; Gillis, T.P. 1998. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42:1853-7.

13. Yang BK, H.; Ohno, H.; Ogawa, K.; Fukuda, M.; Hirakata, Y.; Maesaki, S.; Tomono, K.; Tashiro, T.; Kohno, S. 1998. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and rpoB mutations of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 42:621-8.
14. Kumar P, Balooni V, Sharma BK, Kapil V, Sachdeva KS, Singh S. 2014. High degree of multi-drug resistance and hetero-resistance in pulmonary TB patients from Punjab state of India. *Tuberculosis* 94:73-80.
15. Horne DJ, Pinto LM, Arentz M, Lin SY, Desmond E, Flores LL, Steingart KR, Minion J. 2013. Diagnostic accuracy and reproducibility of WHO-endorsed phenotypic drug susceptibility testing methods for first-line and second-line antituberculosis drugs. *Journal of Clinical Microbiology* 51:393-401.
16. Van Deun A, Aung KJ, Bola V, Lebeke R, Hossain MA, de Rijk WB, Rigouts L, Gumusboga A, Torrea G, de Jong BC. 2013. Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: challenging the gold standard. *Journal of Clinical Microbiology* 51:2633-40.
17. Bobadilla-del-Valle MP-d-L, A; Arenas-Huertero, C.; Vargas-Alarcon, G.; Kato-Maeda, M.; Small, P.M.; Couary, P.; Ruiz-Palacios, G.M.; Sifuentes-Osornio, J. 2001. rpoB Gene mutations in rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis identified by polymerase chain reaction single-stranded conformational polymorphism. *Emerging infectious diseases* 7:1010-1013.
18. Madania AH, M.; Zarzour, H.; Ghoury, I.; Hebbo, B. 2012. Characterization of mutations causing rifampicin and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis in Syria. *Polish journal of microbiology* 61:23-32.
19. Ahmad S, Mokaddas E, Al-Mutairi N, Eldeen HS, Mohammadi S. 2016. Discordance across Phenotypic and Molecular Methods for Drug Susceptibility Testing of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates in a Low TB Incidence Country. *PloS one* 11:e0153563.
20. Slayden RAB, C.E. 3rd. 2000. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis. *Microbes and Infection* 2:659-69.
21. Kurbatova EV, Cavanaugh JS, Shah NS, Wright A, Kim H, Metchock B, Van Deun A, Barrera L, Boulahbal F, Richter E, Martin-Casabona N, Arias F, Zemanova I, Drobniewski F, Santos Silva A, Coulter C, Lumb R, Cegielski JP. 2012. Rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis: susceptibility to isoniazid and other anti-

- tuberculosis drugs. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 16:355-7.
22. Mukinda FK, Theron D, van der Spuy GD, Jacobson KR, Roscher M, Streicher EM, Musekiwa A, Coetzee GJ, Victor TC, Marais BJ, Nachega JB, Warren RM, Schaaf HS. 2012. Rise in rifampicin-monoresistant tuberculosis in Western Cape, South Africa. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 16:196-202.
 23. Niehaus AJ, Mlisana K, Gandhi NR, Mathema B, Brust JC. 2015. High Prevalence of inhA Promoter Mutations among Patients with Drug-Resistant Tuberculosis in KwaZulu-Natal, South Africa. *PloS one* 10:e0135003.
 24. Starks AM, Gumusboga A, Plikaytis BB, Shinnick TM, Posey JE. 2009. Mutations at embB codon 306 are an important molecular indicator of ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53:1061-6.
 25. Pierre-Audigier C, Surcouf C, Cadet-Daniel V, Namouchi A, Heng S, Murray A, Guillard B, Gicquel B. 2012. Fluoroquinolone and pyrazinamide resistance in multidrug-resistant tuberculosis. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 16:221-3, i-ii.
 26. Scorpio AZ, Y. 1996. Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Medicine* 2:662-7.
 27. Whitfield MGW, R.M.; Streicher, E.M.; Sampson, S.L.; Sirgel, F.A.; van Helden, P.D.; Mercante, A.; Willby, M.; Hughes, K.; Birkness, K.; Morlock, G.; van Rie, A.; Posey, J.E. 2015. *Mycobacterium tuberculosis* pncA Polymorphisms That Do Not Confer Pyrazinamide Resistance at a Breakpoint Concentration of 100 Micrograms per Milliliter in MGIT. *Journal of Clinical Microbiology* 53:3633-5.
 28. Miotto P, Cabibbe AM, Feuerriegel S, Casali N, Drobniowski F, Rodionova Y, Bakonyte D, Stakenas P, Pimkina E, Augustynowicz-Kopec E, Degano M, Ambrosi A, Hoffner S, Mansjo M, Werngren J, Rusch-Gerdes S, Niemann S, Cirillo DM. 2014. *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamide resistance determinants: a multicenter study. *mBio* 5:e01819-14.

29. Palomino JC, Martin A. 2014. Drug Resistance Mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. *Antibiotics* 3:317-40.
30. Sulochana SN, S.; Paramasivan, C.N.; Suganthi, C.; Narayanan, P.R. 2007. Analysis of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from India. *Journal of Chemotherapy* 19:166-71.
31. Avalos E, Catanzaro D, Catanzaro A, Ganiats T, Brodine S, Alcaraz J, Rodwell T. 2015. Frequency and geographic distribution of gyrA and gyrB mutations associated with fluoroquinolone resistance in clinical Mycobacterium tuberculosis isolates: a systematic review. *PloS one* 10:e0120470.
32. Goble MI, M.D.; Madsen, L.A.; Waite, D.; Ackerson, L.; Horsburgh, C.R. Jr. 1993. Treatment of 171 Patients with Pulmonary Tuberculosis Resistant to Isoniazid and Rifampin. *The New England Journal of Medicine* 328:527-532.
33. Telzak EES, K.; Alpert, P.; Mannheimer, S.; Medard, F.; El-Sadr, W.; Blum, S.; Gagliardi, A.; Salomon, N.; Turett, G. 1995. Multidrug-Resistant Tuberculosis in Patients without HIV Infection. *The New England Journal of Medicine* 333:907-912.
34. Banu SR, M.; Khan, S.R.; Ferdous, S.S.; Ahmed, S.; Gratz, J.; Stroup, S.; Pholwat, S.; Heysell, S.K.; Houpt, E.R. 2014. Discordance across Several Methods for Drug Susceptibility Testing of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates in a Single Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 52:156-163.
35. Pankhurst LJ, del Ojo Elias C, Votintseva AA, Walker TM, Cole K, Davies J, Fermont JM, Gascoyne-Binzi DM, Kohl TA, Kong C, Lemaitre N, Niemann S, Paul J, Rogers TR, Roycroft E, Smith EG, Supply P, Tang P, Wilcox MH, Wordsworth S, Wyllie D, Xu L, Crook DW. 2016. Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study. *The Lancet Respiratory Medicine* 4:49-58.
36. Smith I. 2003. Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews* 16:463-496.
37. Tortoli EC, P.; Piersimoni, C.; Simonetti, T.; Gesu, G.; Nista, D. 1999. Use of BACTEC MGIT 960 for Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens: Multicenter Study. *Journal of Clinical Microbiology* 37:3578-3582.
38. Cui Z, Wang J, Lu J, Huang X, Zheng R, Hu Z. 2013. Evaluation of methods for testing the susceptibility of clinical Mycobacterium tuberculosis isolates to pyrazinamide. *Journal of Clinical Microbiology* 51:1374-80.

39. Morlock GPC, J.T.; Butler, W.R.; Brim, S.E.; Sikes, D.; Mazurek, G.H.; Woodley, C.L.; Cooksey, R.C. 2000. Phenotypic Characterization of *pncA* Mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44:2291-2295.
40. Zimic ML, S.; Gilman, R.H.; Gutierrez, A.; Fuentes, P.; Cotrina, M.; Kirwan, D.; Sheen, P. 2012. A new approach for pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbial Drug Resistance* 18:372-5.
41. Newton CRG, A.; Heptinstall, L.E.; Powell, S.J.; Summers, C.; Kalsheker, N.; Smith, J.C.; Markham, A.F. 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic acids research* 17:2503-16.
42. Chen XL, K.J.; Kwok, P.Y. 1998. A homogeneous, ligase-mediated DNA diagnostic test. *Genome research* 8:549-56.
43. Lee LGC, C.R.; Bloch, W. 1993. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic acids research* 21:3761-66.
44. Wu S, Liang P, Yu H, Xu X, Liu Y, Lou X, Xiao Y. 2014. Amplified single base-pair mismatch detection via aggregation of exonuclease-sheared gold nanoparticles. *Analytical chemistry* 86:3461-7.
45. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. 2007. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 45:2635-40.
46. Tagliani E, Cabibbe AM, Miotto P, Borroni E, Toro JC, Mansjo M, Hoffner S, Hillemann D, Zalutskaya A, Skrahina A, Cirillo DM. 2015. Diagnostic Performance of the New Version (v2.0) of GenoType MTBDRsl Assay for Detection of Resistance to Fluoroquinolones and Second-Line Injectable Drugs: a Multicenter Study. *Journal of Clinical Microbiology* 53:2961-9.
47. Driesen M, Kondo Y, de Jong BC, Torrea G, Asnong S, Desmaretz C, Mostofa KSM, Tahseen S, Whitfield MG, Cirillo DM, Miotto P, Cabibbe AM, Rigouts L. 2018. Evaluation of a novel line probe assay to detect resistance to pyrazinamide, a key drug used for tuberculosis treatment. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 24:60-64.
48. Kim SJ. 2005. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *The European respiratory journal* 25:564-9.

49. Blakemore R, Story E, Helb D, Kop J, Banada P, Owens MR, Chakravorty S, Jones M, Alland D. 2010. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *Journal of Clinical Microbiology* 48:2495-501.
50. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, Allen J, Tahirli R, Blakemore R, Rustomjee R, Milovic A, Jones M, O'Brien SM, Persing DH, Ruesch-Gerdes S, Gotuzzo E, Rodrigues C, Alland D, Perkins MD. 2010. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *The New England Journal of Medicine* 363:1005-15.
51. Abbott. [Online: <https://www.alere.com/en/home/product-details/alere-q-hiv-12-detect.html>], accessed.
52. Ullrich T, Ermantraut E, Schulz T, Steinmetzer K. 2012. Competitive reporter monitored amplification (CMA)--quantification of molecular targets by real time monitoring of competitive reporter hybridization. *PloS one* 7:e35438.
53. Havlicek J, Rivera-Milla E, Slickers P, Andres S, Feuerriegel S, Niemann S, Merker M, Labugger I. 2017. An application of competitive reporter monitored amplification (CMA) for rapid detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs). *PloS one* 12:e0183561.
54. Havlicek JD, B.; Slickers, P.; Andres, S.; Beckert, P.; Feuerriegel, S.; Niemann, S.; Merker, M.; Labugger, I. 2018. Rapid Microarray-Based Detection of Rifampin, Isoniazid, and Fluoroquinolone Resistance in Mycobacterium tuberculosis by Use of a Single Cartridge. *Journal of Clinical Microbiology* 56:e01249-17.
55. Sanchez-Padilla E, Dlamini T, Ascorra A, Rusch-Gerdes S, Tefera ZD, Calain P, de la Tour R, Jochims F, Richter E, Bonnet M. 2012. High prevalence of multidrug-resistant tuberculosis, Swaziland, 2009-2010. *Emerging infectious diseases* 18:29-37.
56. Heep M, Brandstatter B, Rieger U, Lehn N, Richter E, Rusch-Gerdes S, Niemann S. 2001. Frequency of rpoB mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 39:107-10.
57. Lavender C, Globan M, Sievers A, Billman-Jacobe H, Fyfe J. 2005. Molecular characterization of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates collected in Australia. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49:4068-74.

58. Feuerriegel S, Koser CU, Niemann S. 2014. Phylogenetic polymorphisms in antibiotic resistance genes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 69:1205-10.
59. Havlicek JD, B.; Slickers, P.; Andres, S.; Beckert, P.; Feuerriegel, S.; Niemann, S.; Merker, M.; Labugger, I. 2019. Rapid microarray-based assay for detection of pyrazinamide resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 94:147-154.
60. Goh KS, Legrand E, Sola C, Rastogi N. 2001. Rapid differentiation of "*Mycobacterium canettii*" from other *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms by PCR-restriction analysis of the *hsp65* gene. *Journal of Clinical Microbiology* 39:3705-8.
61. Pfyffer GEA, R.; van Embden, J.D.; van Soolingen, D. 1998. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerging infectious diseases* 4:631-4.
62. Somoskovi A, Dormandy J, Parsons LM, Kaswa M, Goh KS, Rastogi N, Salfinger M. 2007. Sequencing of the *pncA* gene in members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex has important diagnostic applications: Identification of a species-specific *pncA* mutation in "*Mycobacterium canettii*" and the reliable and rapid predictor of pyrazinamide resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 45:595-9.
63. van Soolingen DH, T.; de Haas, P.E.; Hermans, P.W.; Koedam, M.A.; Teppema, K.S.; Brennan, P.J.; Besra, G.S., Portaels, F., Top, J.; Schouls, L.M.; van Embden, J.D. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Canetti*: characterization of an exceptional isolate from Africa. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 47:1236-45.
64. Scorpio AC, D.; Whipple, D.; Cave, D.; Bates, J.; Zhang, Y. 1997. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. *Journal of Clinical Microbiology* 35:106-10.
65. Jureen P, Werngren J, Toro JC, Hoffner S. 2008. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52:1852-4.
66. Stavrum R, Myneedu VP, Arora VK, Ahmed N, Grewal HM. 2009. In-depth molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* from New Delhi--

- predominance of drug resistant isolates of the 'modern' (TbD1) type. PloS one 4:e4540.
67. Tietjen GL, Moore RH. 1972. Some Grubbs-Type Statistics for the Detection of Several Outliers. *Technometrics* 14:583-597.
 68. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, Corander J, Bryant J, Parkhill J, Nejentsev S, Horstmann RD, Brown T, Drobniowski F. 2014. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nature genetics* 46:279-86.
 69. WHO. 2015. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis, 5th ed.
 70. Piersimoni C, Olivieri A, Benacchio L, Scarparo C. 2006. Current perspectives on drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex: the automated nonradiometric systems. *Journal of Clinical Microbiology* 44:20-8.
 71. Rondon L, Piuri M, Jacobs WR, Jr., de Waard J, Hatfull GF, Takiff HE. 2011. Evaluation of fluoromycobacteriophages for detecting drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 49:1838-42.
 72. Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Sekiguchi JI, Kato S, Mori T, Kirikae T. 2010. Pyrazinamide resistance in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Japan. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16:1164-8.
 73. Sekiguchi J, Nakamura T, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae F, Kobayashi I, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Morita K, Suetake T, Yoshida H, Kato S, Mori T, Kirikae T. 2007. Development and evaluation of a line probe assay for rapid identification of pncA mutations in pyrazinamide-resistant mycobacterium tuberculosis strains. *Journal of Clinical Microbiology* 45:2802-7.
 74. Willby MJ, Wijkander M, Havumaki J, Johnson K, Werngren J, Hoffner S, Denkinge CM, Posey JE. 2018. Detection of Mycobacterium tuberculosis pncA Mutations by the Nipro Genoscholar PZA-TB II Assay Compared to Conventional Sequencing. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62.
 75. Myakishev MVK, Y.; Hu, S.; Hamer, D.H. 2001. High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers. *Genome research* 11:163-9.
 76. Kumar P, Nath K, Rath B, Sen MK, Vishalakshi P, Chauhan DS, Katoch VM, Singh S, Tyagi S, Sreenivas V, Prasad HK. 2009. Visual format for detection of

- Mycobacterium tuberculosis and M. bovis in clinical samples using molecular beacons. *The Journal of molecular diagnostics* : JMD 11:430-8.
77. Hadjinicolaou AV, Demetriou VL, Emmanuel MA, Kakoyiannis CK, Kostrikis LG. 2009. Molecular beacon-based real-time PCR detection of primary isolates of Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis in environmental and clinical samples. *BMC microbiology* 9:97.
78. Khalvati Fahlyani B, Behzad-Behbahani A, Taghavi SA, Farhadi A, Salehi S, Adibzadeh S, Aboualizadeh F, Alavi P, Nikouyan N, Okhovat MA, Ranjbaran R, Rafiei Dehbidi GR, Shakibzadeh A. 2015. Development of an In-House TaqMan Real Time RT-PCR Assay to Quantify Hepatitis C Virus RNA in Serum and Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatitis monthly* 15:e28895.
79. Fernandes-Monteiro AG, Trindade GF, Yamamura AM, Moreira OC, de Paula VS, Duarte AC, Britto C, Lima SM. 2015. New approaches for the standardization and validation of a real-time qPCR assay using TaqMan probes for quantification of yellow fever virus on clinical samples with high quality parameters. *Human vaccines & immunotherapeutics* 11:1865-71.
80. Pholwat SL, J.; Stroup, S.; Gratz, J.; Banu, S.; Rahman, S.M.M.; Ferdous, S.S.; Foongladda, S.; Boonlert, D.; Ogarkov, O.; Zhdanova, S.; Kibiki, G.; Heysell, G.; Houpta, E. 2015. Integrated Microfluidic Card with TaqMan Probes and High-Resolution Melt Analysis To Detect Tuberculosis Drug Resistance Mutations across 10 Genes. *mBio* 6:e02273-14.
81. Lee SH, Choi HB, Yu SY, Chang UJ, Kim CK, Kim HJ. 2015. Detection of first-line anti-tuberculosis drug resistance mutations by allele-specific primer extension on a microsphere-based platform. *Annals of laboratory medicine* 35:487-93.
82. Roh SS, Smith LE, Lee JS, Via LE, Barry CE, 3rd, Alland D, Chakravorty S. 2015. Comparative Evaluation of Sloppy Molecular Beacon and Dual-Labeled Probe Melting Temperature Assays to Identify Mutations in Mycobacterium tuberculosis Resulting in Rifampin, Fluoroquinolone and Aminoglycoside Resistance. *PloS one* 10:e0126257.
83. Sanchez-Padilla EM, M.; Beckert, P.; Jochims, F.; Dlamini, T.; Kahn, P.; Bonnet, M.; Niemann, S. 2015. Detection of drug-resistant tuberculosis by Xpert MTB/RIF in Swaziland. *The New England Journal of Medicine* 372:1181-2.

84. Cohen KA, Abeel T, Manson McGuire A, Desjardins CA, Munsamy V, Shea TP, Walker BJ, Bantubani N, Almeida DV, Alvarado L, Chapman SB, Mvelase NR, Duffy EY, Fitzgerald MG, Govender P, Gujja S, Hamilton S, Howarth C, Larimer JD, Maharaj K, Pearson MD, Priest ME, Zeng Q, Padayatchi N, Grosset J, Young SK, Wortman J, Mlisana KP, O'Donnell MR, Birren BW, Bishai WR, Pym AS, Earl AM. 2015. Evolution of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis over Four Decades: Whole Genome Sequencing and Dating Analysis of Mycobacterium tuberculosis Isolates from KwaZulu-Natal. *PLoS medicine* 12:e1001880.
85. Heifets L. 2002. Susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. *Journal of Medical Microbiology* 51:11-2.
86. Zhang YP, S.; Sun, Z. 2002. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. *Journal of Medical Microbiology* 51:42-9.
87. Siddiqi SA, A.; Asif, S.; Behera, D.; Javaid, M.; Jani, J.; Jyoti, A.; Mahatre, R.; Mahto, D.; Richter, E.; Rodrigues, C.; Visalakshi, P.; Rüsç-Gerdes, S. 2011. Direct Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis for Rapid Detection of Multidrug Resistance Using the Bactec MGIT 960 System: a Multicenter Study. *Journal of Clinical Microbiology* 50:435-440.
88. Libonati JPS, C.E.; Davis, J.R.; Siddiqi, S.H. 1988. Direct antimicrobial drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis by the radiometric method. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 10:41-8.
89. Park J, Jang W, Kim M, Kim Y, Shin SY, Park K, Kim MS, Shin S. 2018. Molecular drug resistance profiles of Mycobacterium tuberculosis from sputum specimens using ion semiconductor sequencing. *Journal of microbiological methods* 145:1-6.
90. Walker TM, Merker M, Kohl TA, Crook DW, Niemann S, Peto TE. 2017. Whole genome sequencing for M/XDR tuberculosis surveillance and for resistance testing. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 23:161-166.
91. Balabanova YF, L.; Ignatyeva, O.; Riekstina, V.; Danilovits, M.; Jaama, K.; Davidaviciene, E.; Radiulyte, B.; Popa, C.M.; Nikolayevskyy, V.; Drobniowski, F. 2017. Multidrug-resistant TB in Eastern region of the EU: is the shorter regimen an exception or a rule? *Thorax* 72:850-852.

92. Lange CD, R.; Fréchet-Jachym, M.; Guenther, G.; Guglielmetti, L.; Olaru, I.D.; Oliveira, O.; Rumetshofer, R.; Veziris, N.; van Leth, F.; European MDR-TB database collaboration. 2016. Limited Benefit of the New Shorter Multidrug-Resistant Tuberculosis Regimen in Europe. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 194:1029-1031.

2 Publikationen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sind folgende Publikationen erschienen:

- Havlicek J, Rivera-Milla E, Slickers P, Andres S, Feuerriegel S, Niemann S, Merker M, Labugger I. 2017. An application of competitive reporter monitored amplification (CMA) for rapid detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs). PLoS ONE. 12(8):e0183561. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183561>
- Havlicek J, Dachsel B, Slickers P, Andres S, Beckert P, Feuerriegel S, Niemann S, Merker M, Labugger I. 2018. Rapid Microarray-Based Detection of Rifampicin, Isoniazid, and Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by Use of a Single Cartridge. J Clin Microbiol. 56:e01249-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01249-17>
- Havlicek J, Dachsel B, Slickers P, Andres S, Beckert P, Feuerriegel S, Niemann S, Merker M, Labugger I. 2018. Rapid microarray-based assay for detection of pyrazinamide resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Diagn Microbiol Infect Dis. pii: S0732-8893(18)30811-3. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.12.011

3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Ines Labugger und Prof Dr. Stefan Niemann für die Möglichkeit, an diesem interessanten Thema zu arbeiten. Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Olaf Such und Thomas Ullrich für die Unterstützung seitens meines Arbeitgebers, der Alere Technologies GmbH. Dr. Thanh Tu Hellmich-Duong danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Matthias Merker möchte ich mich bedanken, dass er die Betreuung meiner Arbeit übernommen hat und durch seine vielen hilfreichen Ratschläge zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Alere Technologies GmbH für die schöne Zeit und das angenehme Arbeitsklima. Für die vielfältige Unterstützung bei den praktischen Arbeiten möchte ich mich besonders bei Beatrice Dachsel, Annette Wagenhaus, Katja Herzog, Christina Lenhart und Sandra Henk bedanken. Kerstin Scheubert und Cornelius Middelhoff möchte ich für die Unterstützung bei der Anpassung der Auswertesoftware und bei der statistischen Datenanalyse danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Mann Matthias und meinem Sohn Oskar bedanken. Durch das große Verständnis und moralische Unterstützung konnte ich immer wieder Kraft für neuen Tatendrang schöpfen.

4 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Ferner versichere ich, dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Gera, den

Juliane Havlicek

5 Lebenslauf

Juliane Havlicek



Persönliche Daten

geboren am 28.07.1989 in Gera, Thüringen

Ausbildung und beruflicher Werdegang

- | | |
|-------------------|--|
| 04/2014 bis heute | Alere Technologies GmbH, Jena
<i>Abteilung:</i> Forschung & Entwicklung <ul style="list-style-type: none">• Molekulare Testentwicklung<ul style="list-style-type: none">○ zum Nachweis von Antibiotikaresistenzen bei einer Tuberkuloseinfektion○ zur Bestimmung der Virenlast bei einer HIV-Infektion |
| 10/2011 – 03/2014 | Ernst-Abbe-Fachhochschule, Jena
<i>Studiengang:</i> Pharma-Biotechnologie
<i>Abschluss:</i> Master of Science |
| 11/2011 – 12/2012 | Hans-Knöll-Institut, Jena
<i>Abteilung:</i> Zell- und Molekularbiologie <ul style="list-style-type: none">• Qualitätskontrolle PET/CT-Gerät• Zellkultur |
| 10/2008 – 09/2011 | Staatl. Studienakademie Sachsen, Riesa
<i>Studiengang:</i> Labor- und Verfahrenstechnik
<i>Abschluss:</i> Diplom-Ingenieur (BA)
<i>Praxispartner:</i> quo data GmbH, Dresden
TraitGenetics GmbH, Gatersleben <ul style="list-style-type: none">• Entwicklung und Analyse von Mikrosatelliten-Markern• DNA-Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese |
| 08/2000 – 07/2008 | Georg-Samuel-Dörffel-Gymnasium, Weida
<i>Abschluss:</i> Allgemeine Hochschulreife |

6 Anhang

Anlage 1: Nachweisbare Mutationen mit dem CMA-Assay

Antibiotikum	Gen	Position	Mutation
Rifampicin	<i>rpoB</i>	516	Asp516Val, G(A/T)C
			Asp516Tyr, (G/T)AC
		526	His526Tyr, (C/T)AC
			His526Asp, (C/G)AC
			His526Arg, C(A/G)C
			His526Asn, (C/A)AC
		531	Ser531Leu, T(C/T)G
	Ser531Trp, T(C/G)G		
		533	Leu533Pro, C(T/C)G
Isoniazid	<i>katG</i>	315	Ser315Thr, A(G/C)C
			Ser315Thr, A(G/C)(C/A)
			Ser315Asn, A(G/A)C
			Ser315Ile, A(G/T)C
		<i>inhA</i>	-8
		-15	-15C→T
Ethambutol	<i>embB</i>	306	Met306Ile, AT(G/A)
			Met306Ile, AT(G/T)
			Met306Ile, AT(G/C)
			Met306Leu, (A/C)TG
			Met306Val, (A/G)TG

Anlage 2: Nachweisbare Mutationen mit dem Schmelzkurvenassay

Antibiotikum	Gen	Position	Mutation		
Rifampicin	<i>rpoB</i>	511	Leu511Pro, C(T/C)G		
		513	Ser513Leu, C(A/T)A Ser513Lys, (C/A)AA Ser513Pro, C(A/C)A		
		516	Asp516Phe, (G/T)(A/T)C Asp516Val, G(A/T)C Asp516Tyr, (G/T)AC		
		518	Asn518Ser, A(A/G)C		
		522	Ser522Gln, (T/C)(C/A)G Ser522Leu, T(C/T)G Ser522Trp, T(C/G)G		
		526	His526Asp, (C/G)AC His526Arg, C(A/G)C His526Asn, (C/A)AC His526Leu, C(A/T)C His526Tyr, (C/T)AC His526Cys, (C/T)(A/G)C His526Gln, CA(C/A) His526Pro, C(A/C)C His526Ser, (C/A)(A/G)C		
		531	Ser531Leu, T(C/T)G Ser531Trp, T(C/G)G		
		533	Leu533Pro, C(T/C)G		
		572	Ile572Phe, (A/T)TC		
		Isoniazid	<i>katG</i>	315	Ser315Asn, A(G/A)C Ser315Ile, A(G/T)C Ser315Gly, (A/G)GC Ser315Thr A(G/C)C Ser315Thr, A(G/C)(C/A)
					<i>inhA</i>
				-8	-8T→A -8T→C
				-15	-15C→T
		Fluoroquinolone	<i>gyrA</i>	88	Gly88Cys, (G/T)GC
				89	Asp89Asn, (G/A)AC
				90	Ala90Val, G(C/T)G
91	Ser91Pro, (T/C)CG				
94	Asp94Ala, G(A/C)C Asp94Asn, (G/A)AC Asp94Gly, G(A/G)C Asp94His, (G/C)AC Asp94Tyr, (G/T)AC Asp94Val, G(A/T)C				
95	Ser95Thr, A(G/C)C				