

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Bereich klinische Infektiologie
Lehrstuhl für International Health / Infectious Diseases
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christoph Lange

**Nachweis von transrenaler mykobakterieller DNA zur Diagnose der
pulmonalen Tuberkulose und zum Therapiemonitoring**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von
Emilia Häußinger
aus München

Lübeck 2021

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Jan Heyckendorf
2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Christoph Dodt

Tag der mündlichen Prüfung 10.01.2023

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10.01.2023

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

A. Einleitung	1
1. Epidemiologie der Tuberkulose	1
1.1. Weltweit	1
1.2. Tuberkulose in Deutschland	3
2. Infektion mit <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
2.1. Biologie von <i>M. tuberculosis</i>	4
2.2. Transmission	4
2.3. Pathogenese	5
3. Klinik	6
4. Diagnostik der aktiven Tuberkulose	7
4.1. Mikroskopie	7
4.2. Kultur	8
4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	8
5. Entwicklung neuer PCR-Verfahren zur Tuberkulose	10
5.1. Stellenwert	10
5.2. Klinische Anwendung	11
6. Heutiger PCR-Standard (Xpert Ultra, LPAs)	12
7. Neuere Entwicklungen, Prototypen	13
8. Urin als Medium zur Tuberkulose Diagnostik:	14
8.1. Urinbasierte Verfahren außer PCR	14
8.2. Urinbasierte PCR-Verfahren	15
9. Vorstellung eines neuen PCR-Verfahrens zur Detektion von MTB-trDNA im Urin und Evaluation bezüglich des Einsatzes als Primärdiagnostik und zum Therapiemonitoring	16
 B. Material und Methoden	 18
1. Patientenkollektiv	18
1.1. Einschlusskriterien	18
1.2. Ausschlusskriterien	18
2. Klinische Untersuchungsmethoden - Ralph Score	18
3. Probensammlung und –bearbeitung	19
3.1. Urin	19
3.2. Blut	19

3.3.	Sputum	19
4.	Laborverfahren	19
4.1.	Referenzmethode – sputumbasierte Mikrobiologie	19
4.1.1.	Kultur	20
4.1.2.	Mikroskopie	20
4.2.	Index-Testverfahren	20
4.2.1.	Isolierung der DNA aus Urin und Plasma	20
4.2.2.	Amplifikation und Detektion isolierter DNA aus Urin- und Plasmaproben	21
4.2.3.	Sequenzierung des gesamten Genoms (Whole-genome-Sequencing, WGS) und Datenanalyse	21
5.	Definition und Bestimmung des Grenzwerts (cut-off)	21
5.1.	Cut off des Indextestverfahrens	21
5.2.	Cut off des Referenzverfahrens	22
6.	Statistische Methoden	22
7.	Ethik-Kommission	23
C.	Ergebnisse	24
1.	Patientenkollektiv	24
1.1.	Teilnehmeranzahl und –verteilung auf Subgruppen	24
1.2.	Klinisch deskriptive Daten der Patienten	25
2.	Testergebnisse	26
2.1.	trDNA-Werte bei therapienaiven Tuberkulosepatienten und Vergleich Mit den Referenznachweismethoden (MGIT-, LJ-Kultur und AFB- Mikroskopie)	26
2.1.1.	Verfügbarkeit des Probenmaterials	27
2.1.2.	Ausgangswerte aller Methoden im Vergleich (Sensitivität)	27
2.1.3.	Korrelation trDNA-Ausgangswerte und SFS-Mikroskopie	28
2.2.	trDNA-Werte im Therapieverlauf (Monitoring)	29
2.2.1.	trDNA-Höchstwerte, Erreichen des Grenzwerts	29
2.2.2.	Vergleich der trDNA-Werte mit den Sputumreferenzmethoden	31
2.2.2.1.	Vergleich hinsichtlich der maximalen Anzahl nachgewiesener Tuberkulosepatienten und der Zeitdauer bis zum Erreichen der jeweils maximalen Anzahl	32

2.2.2.2.	Vergleich hinsichtlich der Konversionszeit und -rate	33
2.2.3.	Vergleich trDNA-Werte mit dem radiologischen Befund	34
2.2.4.	Vergleich trDNA-Werte und renale Funktion, Entzündungs- und Urinparameter	36
2.2.5.	trDNA-Werte und demographische Patientendaten	36
2.3.	trDNA-Nachweis im Plasma im Therapieverlauf – Vergleich mit Urin und Kultur	36
2.4.	trDNA-Verlauf unter Therapieumstellung bei resistenten Tuberkulosestämmen	37
E.	Diskussion	41
E.	Zusammenfassung	58
F.	Literaturverzeichnis	59
G.	Anhang	70
a.	Tabellenverzeichnis	70
b.	Abbildungsverzeichnis	71
c.	Abkürzungsverzeichnis	73
d.	Erklärung zur Zustimmung der Ethikkommission	76
H.	Danksagung	77
I.	Lebenslauf	78

A. Einleitung

1. Epidemiologie der Tuberkulose

1.1. Weltweit

Tuberkulose (TB) war bis 2019 die häufigste zum Tod führende Infektionskrankheit und stand an 13. Stelle der häufigsten Todesursachen weltweit (1). Seit 2020 ist Tuberkulose durch die bestehende COVID-19 Pandemie nun die zweithäufigste zum Tod führende Infektionskrankheit nach COVID-19 (2).

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erkrankten im Jahr 2020 9,9 Millionen Menschen neu an einer Tuberkulose. Dies entspricht einer Inzidenz von 127/100.000 Einwohnern. Somit lag verglichen mit 2019 eine leichte Senkung der Inzidenz um 1,9% vor, was den seit 2000 bestehenden Trend einer geringen jährlichen Senkung der Inzidenz fortsetzt. Andererseits steigt das Bevölkerungswachstum jedoch weiterhin kontinuierlich an (3) und eine noch raschere Senkung der Inzidenz ist somit dringend notwendig um die von der WHO gesetzten Meilensteine zur Beendigung der Tuberkuloseepidemien bis 2030 zu erreichen (1).

Tuberkulose kann unabhängig von Alter und Geschlecht auftreten, wobei in 2020 dabei 56% Männer, 33% Frauen und 11% Kinder betrafen. Bei 8% der mit Tuberkulose infizierten Bevölkerung weltweit besteht außerdem zusätzlich eine Infektion mit HIV. 1,3 Millionen Menschen verstarben im Jahr 2020 an einer Tuberkulose, weitere 251.000 Menschen mit zusätzlicher HIV-Infektion. Dies ist seit dem Jahr 2000 erstmalig ein Anstieg im Vergleich zum Vorjahr (von 1,2 Millionen Todesfälle an Tuberkulose in 2019 und einer Höchstzahl von 1,7 Millionen in 2000) und zeigt somit ein Ende des seitdem bestehenden Abwärtstrends der Tuberkulose-Todesfallzahl bei HIV-negativen als auch -positiven Individuen an.

Nach dem Bericht der WHO ereignen sich zwei Drittel der globalen Tuberkulosefälle in nur acht Ländern: Indien, China, Indonesien, Philippinen, Pakistan, Nigeria, Bangladesch und Südafrika (1). **Abbildung 1** zeigt die Tendenz der globalen Tuberkulose-Inzidenz weltweit seit dem Jahr 2000.

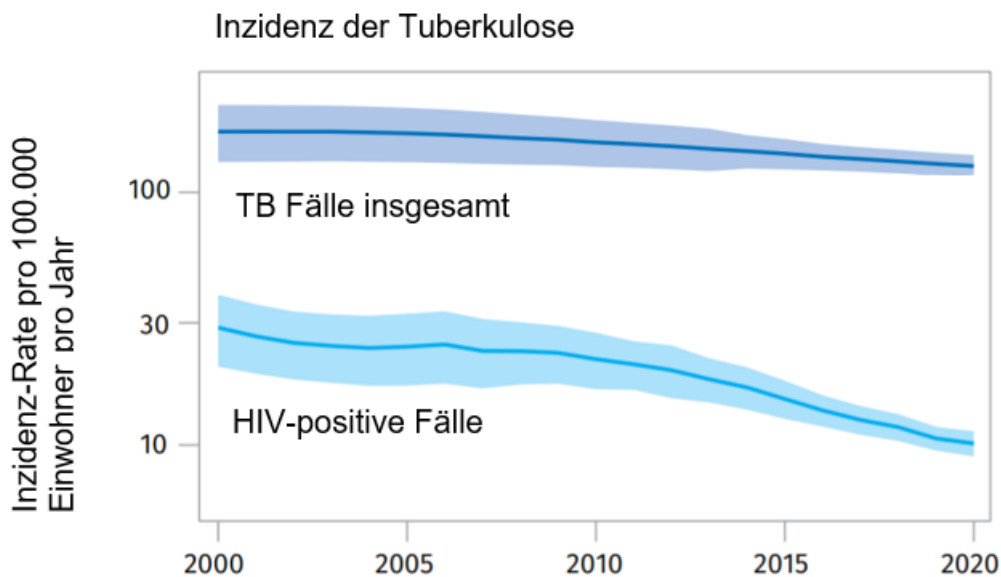


Abbildung 1: Weltweite Trends der geschätzten Tuberkulose Inzidenzrate, 2000-2020 (Quelle: World Health Organisation. Global Tuberculosis Report 2021) (1).

Zum Erreichen der von der WHO gesetzten Meilensteine zur Fallreduktion der Inzidenz als auch Mortalität durch die Tuberkulose wäre ein Rückgang der Todesfälle an TB um 35% und eine Reduktion der Inzidenz um 20 % im Vergleich zu den Werten aus 2015 nötig gewesen. Diese Meilensteine wurden nicht erreicht, auch wenn es ein paar regionale Erfolge gab. Weltweit gesehen betrug die Senkung der Todesfälle zwischen 2015 bis 2020 nur 9,2% und somit nur ein Viertel der gesetzten Ziele. Der bis 2019 erreichte Fortschritt (eine Senkung der Mortalität um 14% zwischen 2015 und 2019 und zwischen 2000 bis 2019 sogar um 41%) wurde durch die erhöhte Todesfallzahl an Tuberkulose von 2019 bis 2020 drastisch gebremst, welche vermutlich der Unterbrechung von diagnostischen als auch therapeutischen Möglichkeiten aufgrund der COVID-19 Pandemie geschuldet ist. Die offensichtlichste Auswirkung der COVID-19 Pandemie auf die Epidemiologie der Tuberkulose ist außerdem die weltweit große Abnahme gemeldeter neu diagnostizierter TB Fälle. Dies fiel von 7,1 Millionen in 2019 auf 5,8 Millionen in 2020, also um 18% zurück auf das Niveau von 2012 und ist weit entfernt von den geschätzten 10 Millionen Menschen, die sich in 2020 mit einer TB infizierten. 16 Länder sind für 93% dieser Abnahme verantwortlich, wobei Indien, Indonesien und die Philippinen am stärksten betroffen sind.

Geminderter Zugang zu diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten einer TB führte zu einer Erhöhung der Todesfälle durch TB, was uns diesbezüglich auf das Niveau von 2017 zurücksetzt. Auch die Senkung der Inzidenz welche in vergangenen Jahren erreicht wurde, wurde gebremst und kam dabei beinahe zum Halt. Die bestehende Datenlage weist außerdem darauf hin, dass diese Einflüsse die Vorhersagen für 2022 vermutlich weiter anhaltend verschlechtern(1).

1.2. Tuberkulose in Deutschland

In der Europäischen Union und anderen „westlichen“ Ländern stehen die niedrige Prävalenz und Inzidenz der Erkrankung in deutlichem Gegensatz zu der Situation in Entwicklungsländern (4). Repräsentativ hierfür seien im Folgenden die Zahlen für Deutschland genannt:

Im Jahr 2019 wurden insgesamt 4.791 Tuberkulosefälle registriert, dies entspricht einer Inzidenz von 5,8 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Nach einer deutlichen Zunahme im Jahr 2015 waren die Zahlen erstmals 2017 wieder rückläufig und stagnierten 2018. Im Jahr 2019 ist eine deutliche Abnahme zu beobachten, die Inzidenz ist gegenüber dem Vorjahr um 12,8 % gesunken (5). Dabei betreffen etwa knapp drei Viertel aller Erkrankungen Patienten, die im Ausland geboren waren (5–7). Die Zahl der jährlichen Todesfälle betrug 2019 129 und entspricht einer Mortalität von 0,2 erkrankungsbedingten Todesfällen pro 100.000 Einwohner. Die Letalität lag bei 2,8 % und war damit geringfügig höher als im Vorjahr (2018: 2,6 %, 139 Todesfälle) – obwohl die absoluten Fallzahlen 2019 niedriger waren (5).

Im Jahr 2020 ist die Inzidenz der Neuerkrankungen an Tuberkulose in Deutschland auch weiter deutlich gesunken. So wurden in diesem Jahr 4.127 Fälle an das Robert Koch Institut (RKI) gemeldet, das sind 14,2% weniger als im Vorjahr (8). Die Hauptgründe für den Rückgang werden in der 2020 sind vermutlich weniger einer zunehmenden Unterdiagnostik und Untererfassung geschuldet als vielmehr der deutlich geringeren (Arbeits-) Migration aus Hochprävalenzländern und möglicherweise den nun allgemein besser umgesetzten Empfehlungen zur Infektionsprävention vermutet. Eine zeitliche Verzögerung bei der aktiven Fallfindung wie auch der TB-Diagnostik unter Pandemiebedingungen sind außerdem denkbar (8).

2. Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis*

2.1. Biologie von *M. tuberculosis*

Tuberkulose wird durch Bakterien des *Mycobacterium tuberculosis* Komplexes (MTBK) hervorgerufen. Dieser umfasst neben *M. tuberculosis* auch *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. microti* und *M. pinnipedii* (9) sowie der Impfstamm *M. bovis* BCG (10). Es handelt sich bei Mykobakterien um säurefeste, aerobe, unbewegliche, nicht sporenbildende stäbchenförmige Bakterien aus der Familie der Mycobacteriaceae. Die Zellwände der Erreger sind mit wachsartigen Mykolsäuren ummantelt, welche ihnen eine hohe Resistenz gegen Umwelteinflüsse verleiht (11). Das Bakterium teilt sich ca. alle 16-20 Minuten und weist somit eine im Vergleich mit anderen Bakterien sehr langsame Zellteilung auf (12).

Andere Mykobakterien werden unter dem Sammelbegriff Nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM) (früher auch als mycobacteria other than tuberculosis (MOTT), „atypische Mykobakterien“ oder „Umweltmykobakterien“ bezeichnet) zusammengefasst. Sie umfassen mehr als 150 einzelne Spezies, wobei die meisten Mykobakterien-Arten verschiedenste Umweltbereiche besiedeln (z.B. Erde, Oberflächen- und Trinkwasser) und auch in Lebensmitteln zu finden sind. NTM sind im Allgemeinen wenig pathogen (13,14).

2.2. Transmission

Die Übertragung der Bakterien erfolgt in etwa 90% der Fälle durch Tröpfchen beim Ausstoß Erreger-haltiger Aerosole beim Husten eines Patienten mit einer offenen Lungentuberkulose (15). Die Größe der Aerosole kann dabei einen Durchmesser kleiner 5 µm haben (16).

Ob sich eine Person dabei mit Tuberkulosebakterien infiziert ist von mehreren Faktoren abhängig, unter anderem von (17):

- Häufigkeit, Dauer und Enge des Kontakts mit einer an infektiöser Tuberkulose erkrankten Person
- Menge und Virulenz der inhalierten Erreger
- Empfänglichkeit für eine Infektion der exponierten Person

Prädisponierende Faktoren sind z.B. eine Immunschwäche (z.B. AIDS), oder eine Silikose (18).

2.3. Pathogenese

Die Inkubationszeit zwischen der Exposition und einer messbaren Immunantwort auf den Erreger beträgt ca. 6 bis 8 Wochen (10). Das Erkrankungsrisiko ist in den ersten beiden Jahren nach Infektion am größten (19). Das höchste Risiko zu erkranken haben Kleinkinder und immunsupprimierte Personen (20).

Bei stattgehabter Übertragung werden die Tuberkulosebakterien in den Alveolen von Makrophagen aufgenommen und können für gewöhnlich in ihnen überleben. Es kommt zu einer latenten Infektion mit *M. tuberculosis* (LTBI), die klinisch inapparent verläuft, sich auf Wochen, Monate oder viele Jahre erstrecken kann und in ca. 90% der Fälle nicht reaktiviert (21). So ist vermutlich ca. ein Viertel der Weltbevölkerung latent mit *M. tuberculosis* infiziert (1). Während dieser Phase lässt sich die Infektion nur indirekt, das heißt anhand der Immunreaktion des Patienten (bzw. durch den Nachweis sensibilisierter, spezifischer Immunzellen) nachweisen (22).

Vermehren sich die Tuberkulosebakterien direkt am Eindringort und lösen dort eine Immunantwort aus, entsteht ein so genannter Primäraffekt. Dieser ist histologisch gekennzeichnet durch ein Granulom aus Epitheloidzellen und Langerhans-Riesenzellen mit zentraler Verkäsung (auch verkäsendes Granulom genannt) (23). Auf dem lymphogenen Infektionsweg greift er auf regionale Lymphknoten über, was man als Primärkomplex bezeichnet. Meist ist dieser selbst limitierend, oft bleiben dabei vernarbende und verkalkte Strukturen zurück, die röntgenologisch nachweisbar bleiben (24). Die Bakterien können dabei auch aerogen, lymphogen oder hämatogen in andere Lungenfelder oder Organe streuen und gegebenenfalls dort eine „post-primäre“ Tuberkulose auslösen. Unter postprimärer Tuberkulose (auch chronische Tuberkulose) versteht man jegliche Form der Tuberkulose, die nach einer stattgefundenen Primärinfektion auftritt. Meist liegt dem Ausbruch eine Reinfektion zugrunde (25). Histologische Merkmale hierbei sind beispielsweise apikale pulmonale Herde, Simon-Spitzenherde, Assmann-Frühinfiltrate oder das Rasmussen-Aneurysma (26).

Sowohl der Primäraffekt als auch postprimäre Läsionen münden in der Regel wieder in eine symptomfreie LTBI. In ca. 5-10% kommt es zu einem späteren Zeitpunkt zu einer endogenen Reaktivierung dieser Herde und dadurch zu einer sekundären Tuberkulose. Es entwickelt sich das Krankheitsbild einer symptomatischen, „aktiven“ Tuberkulose (Exazerbation), die wiederum in über 90% der Fälle die Lunge betrifft (27). Risikofaktoren dafür sind Umstände, die zu einer zellulären Immunsuppression führen. Dazu gehören insbesondere Krankheiten und Situationen wie (9)

- eine Ko-infektion mit HIV,
- ein schlecht behandelter Diabetes mellitus,
- eine chronische, hämodialysepflichtige Niereninsuffizienz oder
- iatrogene Immunsuppressionen mit Medikamenten, wie z.B. Ciclosporin A oder Tacrolimus nach Organ- oder Knochenmarktransplantationen oder TNF-Antagonisten zur antirheumatischen, dermato- oder gastroenterologischen Therapie (unter anderem eingesetzt zur Therapie chronischer Krankheitsbilder wie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED), rheumatoider Arthritis, Psoriasis und andere).

Bei Ausbleiben einer antituberkulösen Therapie kommt es dann im Verlauf zu einer hohen Wahrscheinlichkeit des Nachweises von Tuberkelbakterien im Sputum, einer sogenannten offenen, infektiösen Tuberkulose. Dabei kommt es zu einer zunehmenden Zerstörung und Kavernisierung weiterer Lungenanteile (28).

3. Klinik

Die Tuberkulose ist ein komplexes Krankheitsbild mit vielfältigen klinischen Erscheinungsformen. Sie ist nicht durch eine spezifische Klinik gekennzeichnet, die klinische Diagnose ist dadurch erschwert (29). Die primäre Tuberkulose, die sich meist asymptomatisch oder als „grippaler Infekte“ präsentiert, wird daher meist nicht erkannt. Der Verlauf ist in der Regel schleichend, Symptome wie Müdigkeit, Fieber, Schwäche, Leistungseinbruch, Appetitlosigkeit und Gewichtsabnahme sind häufig und begründen den früheren Namen „Schwindsucht“. Nachtschweiß tritt seltener auf, ist aber in Kombination mit Husten und Gewichtsverlust als starker Hinweis zu werten. Hinzu kommt, dass deutlichere Beschwerden wie Dyspnoe und

Hämoptysen üblicherweise erst in Spätstadien mit fortgeschrittener Lungenzerstörung und –Vernarbung auftreten. Auch die körperliche Untersuchung, insbesondere die Auskultation der Lunge, zeigt in der Regel keine Auffälligkeiten. Erst in späten Erkrankungsphasen werden körperlicher Verfall, Kachexie und Schwäche sichtbar (30,31).

Der häufigste Ort der Erstmanifestation einer Tuberkulose ist die Lunge (32). In 20% der Tuberkulosefälle handelt es sich jedoch um einen extrapulmonalen Befall bei dem nahezu jedes Organ betroffen sein kann (33). Beispiele für extrapulmonale Manifestationsorte sind die Nebenniere, das zentrale Nervensystem (insbesondere die Meningen), Knochen/Gelenke/Knorpel, Niere, Perikard, Bauchraum bzw. Verdauungstrakt, Urogenitaltrakt, Pleura, Lymphknoten und Haut. Der Befall weiterer Organe (u.a. Weichteile, Larynx, Tonsillen, Innenohr, Auge) stellt eine absolute Rarität dar. Die Symptome sind hierbei lokalisationsbestimmt und ebenfalls sehr variabel bzw. unspezifisch. Die Lokisationshäufigkeit variiert dabei je nach Herkunft der Patienten (34).

4. Diagnostik der aktiven Tuberkulose

Bei einem Verdacht auf Lungentuberkulose sollten mindestens zwei bis drei morgendliche Sputumproben für die mykobakterielle Diagnostik gewonnen werden. Wird kein Sputum produziert, sollten die Sekrete bronchoskopisch gewonnen werden. Bei Verdacht auf eine extrapulmonale Tuberkulose sollte aus dem betroffenen Organgebiet so viel Material wie möglich entnommen und histologisch untersucht werden (35). Zum Nachweis einer aktiven Tuberkulose gibt es aktuell die im folgenden erläuterten Verfahren.

4.1. Mikroskopie

Die Mikroskopie ist aktuell das schnellste und preiswerteste Verfahren der Tuberkulosedagnostik. Zytologie- und histologisches Material kann unverzüglich mittels Ziehl-Neelsen-Färbung oder Auramin-Färbung untersucht und bei guter Logistik innerhalb von zwei Stunden befundet werden. LED-Fluoreszenzmikroskopische Verfahren können die Sensitivität dieser Methode zudem deutlich steigern (36). Aufgrund der limitierten Nachweisgrenze (5000 Erreger/ml) lassen

sich zwar nur in der Hälfte der Fälle säurefeste Stäbchen (SFS) nachweisen. Sie sind aber immer ein hartes Indiz für eine aktive Tuberkulose (27). Die Mikroskopie erlaubt auch anhand der Keimzahl zwischen stark (positiven) und schwach (negativen) infektiösen Tuberkulosepatienten zu unterscheiden und stellt deshalb eine der wichtigsten Erstlinien-Diagnostika dar (37). Der initiale Therapieerfolg einer Lungentuberkulose wird mikroskopisch überwacht. Nach spätestens sechs bis acht Wochen sollte das Sputum mikroskopisch frei von säurefesten Stäbchen sein. Trotz allem liegt die Sensitivität des mikroskopischen Nachweises bei nur 50-60% (38).

4.2. Kultur

Der Goldstandard ist nach wie vor der kulturelle Nachweis des Erregers – er bietet die bestmögliche Sensitivität und Spezifität (39). Auch diese Methode basiert auf Sputum als Untersuchungsmaterial. Mittels Fest- und Flüssigmedien kulturell angezüchtete Tuberkulosebakterien beweisen dabei eine aktive Tuberkulose. Darüber hinaus können die Erreger hinsichtlich der Resistenzen oder ihres Genomtyps weiter analysiert werden. Wegen des langsamen Wachstums müssen Kulturen aber mindestens sechs Wochen (bei Flüssigmedien) bzw. acht Wochen lang (bei Festmedien) beobachtet werden, bevor sie als negativ gewertet werden (17).

Ein Problem dabei stellt auch die geringe Sensibilität bei Kindern unter 5 Jahren dar (da diese oft nur eine geringe Bakterienmenge ausscheiden, die unter der Nachweisgrenze liegen kann), hierbei beträgt die Sensitivität nämlich nur 5% (40,41).

Falsch negative Ergebnisse können außerdem auch durch „geschlossene“ Formen der Tuberkulose verursacht sein, bei denen das Infektionsgeschehen noch keinen Anschluss an das Bronchialsystem gefunden hat (9).

4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zusätzlich zur mikroskopischen und kulturellen Diagnostik werden zum Direktnachweis von Tuberkulosebakterien zunehmend Nukleinsäureamplifikationstests (NAT, z.B. PCR) eingesetzt (42).

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch *polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode, um die DNA in vitro zu vervielfältigen. Dabei werden ca. 20-50 Zyklen in einem Thermocycler durchgeführt. Die Zyklen bestehen aus 3 Schritten: Schritt 1: Denaturierung: durch Erhitzen der doppelsträngigen DNA auf 94-96 °C werden die Stränge durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen getrennt. Dieser Schritt wird im ersten Zyklus oft etwas länger durchgeführt (Initialisierung). Anschließend wird schnell auf ca. 65°C abgekühlt, um die Rückbildung der Doppelhelix zu verhindern. Schritt 2: Primerhybridisierung: die Temperatur wird ca. 20 Sekunden lang auf einem Wert gehalten, der eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA erlaubt und der von Länge und Sequenz der Primer bestimmt wird. Meist liegt dieser Wert zwischen 55 und 65 °C. (Bei zu niedriger Temperatur kann es unter Umständen zu unspezifischen Bindungen der Primer an die DNA, sog. „Geisterbanden“, kommen. Wird die Temperatur zu hoch gewählt können die Primer gegebenenfalls nicht richtig anlagern und es kommt zu gar keiner oder nur insuffizienter Produktbildung). Schritt 3: Elongation: die DNA-Polymerase füllt vom 3'-Ende des angelagerten Primers nun die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf, der Primer bildet dabei den Anfang des neuen Einzelstrangs. Die Temperatur in diesem Schritt ist abhängig von der jeweils verwendeten DNA-Polymerase (meist 68-72°C). Je 500 Basenpaare werden ca. 30 Sekunden benötigt. Anschließend sind die PCR-Produkte unter Raumtemperatur einige Tage stabil.

Es werden dabei mehrere Zyklen benötigt, da erstens das PCR Produkt als Doppelstrang erstmals im dritten Zyklus in der richtigen Länge vorliegt und zweitens sich die gewünschten Produkte in den folgenden Zyklen exponentiell vermehren (43). **Abbildung 2** bildet das Prinzip der PCR schematisch ab.

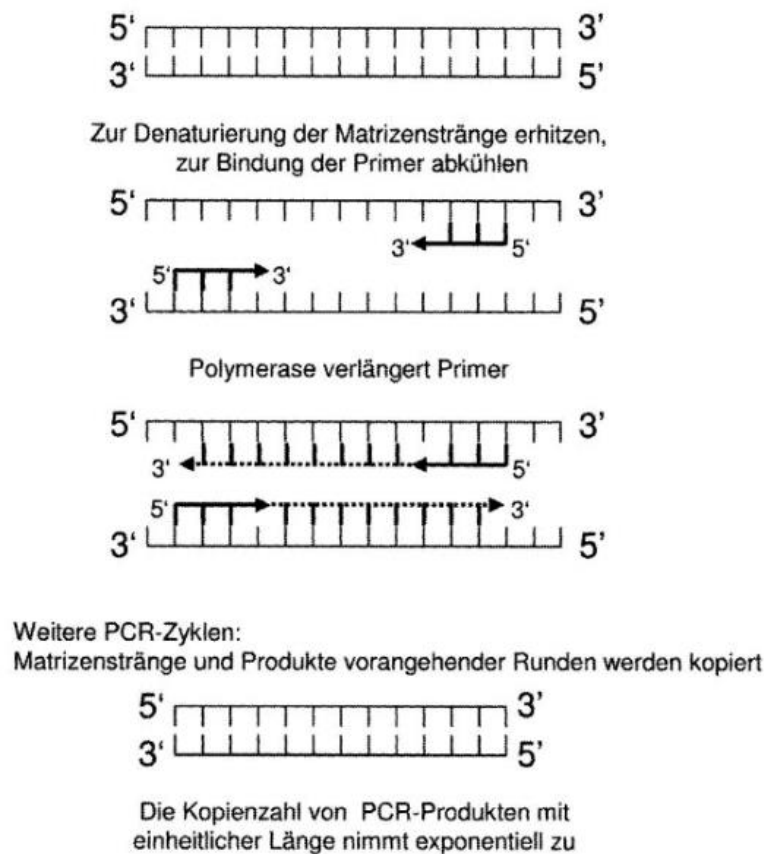


Abbildung 2: Prinzip der PCR. Während jedes PCR-Zyklus werden drei Schritte durchlaufen, nämlich 1. die Denaturierung von DNA-Doppelsträngen, 2. die Anlagerung der Primer und 3, die Synthese von Kopien der Matrizen durch Verlängerung der Primer (44).

5. Entwicklung neuer PCR-Verfahren zur Tuberkulose

Aktuell gibt es immer mehr Untersuchungen bezüglich neuer PCR-Nachweismethoden die in unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien zum Einsatz kommen, beispielsweise im Plasma oder im Urin.

5.1. Stellenwert

NATs können wie die Mikroskopie am Tag des Laboreingangs abgeschlossen werden, sind aber deutlich sensitiver und spezifischer als sie – in über der Hälfte der mikroskopisch negativen Sputumproben tuberkulöser Patienten lassen sich molekularbiologisch Tuberkulosebakterien nachweisen. So verbesserte der Einsatz dieser Tests die diagnostische Leistung für pulmonale Tuberkulose in jüngster Zeit

deutlich (Verdoppelung der Sensitivität der Sofortdiagnostik in Ergänzung zur Mikroskopie), die Sensitivität der NATs genügt aber nicht zum Ausschluss einer Tuberkulose (je nach Probenmaterial liegt sie bei 70% aus respiratorischem Sekret und bis 80% bei Ergüssen) (45,46).

Zusätzlich ermöglicht die PCR die zügige Differenzierung zwischen *M. tuberculosis* und nichttuberkulösen Mykobakterien und dem Nachweis von Resistenzmutationen (daher immer indiziert bei Verdacht auf MDR) (27).

5.2. Klinische Anwendung

Im differentialdiagnostischen Einsatz bedeutet ein positives PCR-Ergebnis mit hoher Wahrscheinlichkeit, dass eine Tuberkulose vorliegt. Bleiben trotz Nachweis säurefester Stäbchen Zweifel an der Diagnose einer TB, wird also mittels NAT zwischen nicht-tuberkulösen Mykobakterien und Tuberkulosebakterien differenziert.

Indikationen für NAT liegen unter anderem vor bei medizinisch dringlichen Fällen wie z.B. schwer kranken oder immunsupprimierten Patienten, bei sozial dringlichen Fällen wie z.B. Eltern kleiner Kinder, bei mikroskopisch negativem oder unklarem Untersuchungsmaterial und dringendem Verdacht auf eine Tuberkulose sowie bei invasiv gewonnenem Untersuchungsgut (BAL, Punktate, Gewebe o.ä.) (9).

Eine PCR kann jedoch auch falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse vorweisen (47). Ein falsch positives Ergebnis tritt auf, wenn PCR-Produkte erzeugt werden, welche nicht der gewünschten und zu vervielfältigenden DNA-Sequenz entsprechen. Ursachen hierfür kann unter anderem eine Kontamination sein, beispielsweise durch DNA-Material von Personen, die an der Analyse oder Herstellung der für den Test nötigen Komponenten mitgewirkt haben, das in die Probe gelangt ist. Eine andere mögliche Fehlerquelle für ein falsch positives Ergebnis ist beispielsweise eine zu niedrige Vorlagenspezifität der Polymerasen, also Bindung der Polymerasen an unerwünschte DNA-Vorlagen oder fehlgebundene Primer und die darauffolgende Erzeugung unerwünschter PCR-Produkte. Auch eine niedrige Substratspezifität aufgrund existierender ähnlicher DNA-Sequenzen kann zu falsch positiven Ergebnissen führen (48).

Falsch negative Ergebnisse der PCR ergeben sich, wenn hingegen keine vervielfältigte DNA nachgewiesen wird, obwohl die nachzuweisende Sequenz im Probenmaterial vorhanden war. Ursachen hierfür können sein:

- Substratverweigerung: Polymerasen können gelegentlich „schwierige Substrate“ verweigern, dies betrifft beispielsweise vermehrt DNA mit einem hohen GC-Anteil oder DNA mit Sekundärstrukturen.
- Inhibitoren: verschiedene Substanzen können thermostabile DNA-Polymerasen in der PCR stören, z.B. Virostatika, Hämoglobin, Heparin, Polysaccharide, Myoglobin, Proteasen u. v. a.
- Mögliche Fehlerquellen für ein falsch negatives Ergebnis sind auch eine falsche Aufbereitung des Probenmaterials, z.B. falsche Temperatureinstellung oder Einsetzen nicht kompatibler Polymerasen in der Durchführung der Tests (49,50).

6. Heutiger PCR-Standard (Xpert Ultra, LPAs)

Es gibt diverse kommerzielle real-time PCR-Kits wie beispielsweise den GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, USA). Hierbei handelt es sich um eine quantitative Echtzeit-PCR (Real-Time-PCR, rt-PCR) in einem geschlossenen Kassettensystem, welche MTB detektieren und zusätzlich Mutationen im *rpoB*-Gen (Rifampicin-Resistenz) innerhalb von zwei Stunden außerhalb von spezialisierten Laboratorien nachweisen kann (51). Da das Nachweisverfahren jedoch insbesondere in paucibacillären, Mikroskopie-negativen und HIV-positiven Patientenkollektiv nur unzureichend sensitiv ist wurde das Nachfolgermodell Xpert Ultra entwickelt, welches 2017 von der WHO zur breiten Anwendung in der Detektion von Tuberkulose und Resistenzen offiziell empfohlen wurde. Xpert Ultra nutzt im Vergleich zum bisherigen verwendeten Xpert MTP/RIF die selbe GeneXpert Plattform, verwendet jedoch im Gegensatz dazu zwei verschiedene Genotypisierungen (IS6110 und IS 1081) sowie eine größere DNA Reaktionskammer. Außerdem werden verbesserte Fluidelemente, Enzyme und thermalen Zyklen eingesetzt (52). Bei der Anwendung auf eine pulmonale Tuberkulose ergab sich somit im Durchschnitt eine verbesserte Sensitivität von 88% vs. 83% des Nachweises von *M. tuberculosis* bei Patienten, welche ein positives Ergebnis in der Kultur aufwiesen. Die Zunahme der Sensitivität geht jedoch auf Kosten einer etwas geringeren Spezifität von 96% (vs. 98% mittels

Gene Xpert). In der Detektion von Rifampicin-Resistenzen erzielten beide Tests ein ähnliches Ergebnis (53). Auch eine 2019 durchgeführte Meta-Analyse zeigte durch den Vergleich von 16 teilnehmenden Studien, ein im Durchschnitt besseres Abschneiden des Xpert Ultra, wobei eine Subanalyse eine besonders gute Performance von Xpert Ultra in „Low-TB Burden“ Ländern aufwies (54).

Desweiteren gibt es auch neuere PCR-Verfahren, die zusätzlich vorhandene Resistenzen der Tuberkulosebakterien gegen ein oder mehrere antituberkulöse Medikamente nachweisen, wie beispielsweise der Xpert MTB/XDR. Dieser kann das Vorliegen von Resistenzen gegenüber 6 verschiedener Medikamente nachweisen, dazu gehören Isoniazid, Fluorchinolone, 2nd-line Antibiotika (Amikacin, Kanamycin, Capreomycin) und Ethionamid (ETH), wobei das Ergebnis bereits in weniger als 90 Minuten vorliegt (55). Diese Verfahren werden aktuell in weiteren Studien wie beispielsweise dem Xpert MTB/XDR Clinical Evaluation Trial evaluiert.

Daneben gibt es den Begriff sogenannter *in-house* PCR's. Für letztere werden für ein Labor spezifische Parameter bestimmt und verwendet, beispielsweise bestimmte Primer oder Polymerasen welche bisher nicht extern validiert wurden (42).

Des Weiteren werden sogenannte *line probe assays* (LPAs) auf den Nachweis von Tuberkulose erprobt. Diese basieren ebenfalls auf der Anwendung von PCR-Verfahren um eine Tuberkulose zu diagnostizieren und zusätzlich auf Resistenzen nicht nur von Rifampicin, sondern auch von Isoniazid zu überprüfen. Das Verfahren wurde dabei bisher nur an Mikroskopie-positiven Sputumproben durchgeführt, um multiresistente Tuberkulosepatienten (MDR-TB) schnell, einfach und sicher zu identifizieren (56).

7. Neuere Entwicklungen, Prototypen

Die Zunahme von immer mehr Resistenzen der Mykobakterien gegenüber der bisher eingesetzten antituberkulösen Medikamente stellt die Bekämpfung der Tuberkulose weltweit immer wieder vor neue Herausforderungen und erfordert eine noch schnellere Entwicklung neuer und besserer Werkzeuge zur Diagnostik. Da die oben genannten Methoden des heutigen PCR-Standards (Xpert Ultra, LPAs) leider nur eine begrenzte Zahl möglicher Resistenzmuster nachweisen können wurde ein

neues Verfahren namens Deeplex® Myc-TB (Genoscreen) entwickelt. Dabei handelt es sich um einen Assay, welcher 18 spezifische Genomregionen nachweisen kann, welche für eine bestimmte Resistenz kodieren (rpoB, katG, fabG1, ahpC, inhA, pncA, embB, gidB, rpsL, gyrA, gyrB, ethA, eis, rrs, tlyA, rplC, rrl, rv0678). Außerdem kann es die Subspezies bestimmen und ermöglicht eine Genotypisierung aus MTB-Isolaten. Durch diese Vorteile gegenüber den anderen PCR-Verfahren, und durch ebenfalls rasche Vorlage der Untersuchungsergebnisse ist Deeplex® Myc-TB ein vielversprechendes Verfahren, welches unter Umständen die bisherigen PCR-Verfahren langfristig ablösen könnte (57).

8. Urin als Medium zur Tuberkulose Diagnostik:

8.1. Urinbasierte Verfahren außer PCR

In aktuellen Studien kommt Urin mehr und mehr als einfach erhältliches Medium zur Diagnostik einer Tuberkulose zum Einsatz. Dabei gibt es auch Ansätze, die nicht die PCR als Nachweismethode nutzen. Ein Beispiel hierfür sind neuere Testverfahren, die auf dem Nachweis vermehrter Ausscheidung des Glykolipids Lipoarabinomannan (LAM) in Urin beruhen (58–61). LAM ist ein hitzeresistentes Glykolipid der äußeren Zellwand des Tuberkulose-Bakteriums welches ebenfalls über die Nieren gefiltert wird und bisher der einzige von der WHO gebilligte Biomarker für *M. tuberculosis*, den man im Urin nachweisen kann (59). Als Nachweismethode wird hierbei ein ELISA-Verfahren angewendet und somit deutlich kostengünstiger als der Nachweis mittels PCR (viermal so teuer) (62). Meist eignet sich die Anwendung dieser Tests jedoch nur für HIV-Infizierte, bei denen sich die Tuberkulosebakterien aufgrund der bestehenden Abwehrschwäche stark vermehren. Bei nicht mit HIV-infizierten Patienten und einer geringeren Bakterienlast fällt der Test daher in der Regel negativ aus (63, 64). Es gibt jedoch aktuelle Studien zur Entwicklung solcher LAM-Nachweismethoden, die LAM bereits in einem Bereich von wenigen Pikogramm pro Milliliter nachweisen können. In einer ersten klinischen Anwendung an 48 HIV-negativen Patienten konnte eine Sensitivität von 96% und eine Spezifität von 81% erzielt werden. Die LAM-Konzentrationen im Urin korrelieren dabei positiv mit dem Schweregrad der Erkrankung bzw. mit der mikroskopisch nachweisbaren Zellzahl und quantifiziert somit auch die TB-Last (65). LAM kann dabei auch in anderen Medium wie Serum,

Sputum, Liquor und Pleuraergüssen nachgewiesen werden, jedoch ist LAM auch in anderen Fungi oder Bakterien enthalten und kann mit Actinobakterien der normalen oralen Flora und *Candida albicans* kreuzreagieren (66).

Zur Verbesserung der Sensitivität des bisher einzigen kommerziell erhältlichen Point-of-Care Tests Alere Determine TB LAM AG (Alere LAM) wurde ein neuer POCT, der Fujifilm SILVAMP TB LAM (FujiLAM), entwickelt. Dieser zeigt im Vergleich eine bessere Sensitivität unter Beibehaltung einer ähnlich hohen Spezifität unter hospitalisierten, HIV-positiven Patienten (67). Auch beim Nachweis von nicht-pulmonaler Tuberkulose zeigte sich ebenfalls eine im Durchschnitt 30-prozentige Verbesserung der Sensitivität bei gleichbleibend guter Spezifität (68). In einer aktuellen Meta-Analyse, deren Datensammlung von 2012 bis 2017 durchgeführt wurde und 1.595 hospitalisierte und nicht-hospitalisierte Patienten mit einer gleichzeitig vorliegenden Tuberkulose- und HIV-Infektion in 5 prospektiven Kohortenstudien in Südafrika, Vietnam und Ghana umfasst, wurde eine signifikant höhere Sensitivität von 70,7% des SILVAMP-LAM Tests im Vergleich zu 34,9% des LF-LAM (Alere) bestätigt, wobei die Sensitivität desto höher ausfiel, je niedriger die CD4-Zellzahl war. Die Spezifität fiel im Vergleich leicht niedriger (90,9% bei SILVAMP-LAM vs. 95,3% bei LF-LAM), wobei diese bei steigender CD4-Zellzahl ebenfalls anstieg.

Weitere Studien zur Evaluation bezüglich der Praktikabilität des in der Handhabung leicht komplexeren Einsatzes von SILVAMP-LAM und bezüglich der Auswirkung auf die tatsächliche Mortalität von Patienten mit TB und HIV wären zudem nötig (69).

8.2. Urinbasierte PCR-Verfahren

In einer Meta-Analyse über PCR-Verfahren im Urin für den Nachweis von Tuberkulose wurden 8 Studien mit insgesamt 1212 Patienten aus 7 Ländern analysiert und zusammengefasst, wobei Kinder nicht im Patientenkollektiv enthalten waren (eingeschlossenes Alter: 28-48 Jahre). Dabei ergab sich insgesamt eine hohe Spezifität (94%), aber nur mäßige Sensitivität (55%). Die Performance zeigte sich dabei im Mittel etwas besser in HIV-positiven Patienten (59%) und in Patienten deren Mikroskopie-Ergebnis ebenfalls positiv ausfiel (53% vs. 46%). Die Spezifität war immer hoch, auch unabhängig vom Ergebnis der Kultur. Eine Studie erhielt LTBI-Infektionen als Kontrollen, wobei sich die Spezifität hielt, da die PCR nur aktive

Formen der Tuberkulose detektiert. Die mäßige Sensitivität entspricht anderen Studienergebnissen der LAM-Tests, die PCR ist jedoch – unabhängig davon ob eine Ko-Infektion mit HIV besteht oder nicht – besser bzw. hat eine höhere diagnostische Genauigkeit. Ein weiterer Vorteil der PCR-Verfahren ist die zusätzlich mögliche Resistenztestung.

Zusammenfassend haben insbesondere folgende Variablen einen starken Einfluss auf die Sensitivität bzw. Spezifität: Temperatur, Schnelligkeit der Zentrifugation, angewendetes Gene target (*IS 6110* vs. *rpoB*) sowie der Urin-Überstand (verworfen vs. Behalten).

Die Annahme, dass der Morgenurin mehr DNA enthält hat sich als nicht statistisch signifikant erwiesen. Die Sensitivität ließ sich durch Zentrifugation und Einfrieren des Probenmaterials vor der DNA-Extraktion verbessern. Bezüglich des Xperts sind außerdem weitere Studien notwendig, da ggf. die Verwendung von *IS 6110* sensitiver ist. Außerdem ist die Sensitivität des Xperts bei Anwendung von Kindern deutlich geringer (51-81%) (70).

9. Vorstellung eines neuen PCR-Verfahrens zur Detektion von MTB-trDNA im Urin und Evaluation bezüglich des Einsatzes als Primärdiagnostik und zum Therapiemonitoring

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine neue Labormethode zu evaluieren, die auf dem quantitativen und qualitativen Nachweis von mykobakterieller trDNA im Urin beruht. Sie basiert auf einer einfachen Verfügbarkeit des Substrats und ist damit ein möglicher Baustein für eine grundlegende Optimierung des klinischen Managements der verschiedenen Formen von Tuberkulose. Die Entwicklung und Ausführung des Assays wurde in enger Zusammenarbeit mit der Firma Alere umgesetzt. Die Firma hält ein Patent auf den Assay, sodass bestimmte Details nicht bekannt sind oder veröffentlicht werden können oder einer Vertraulichkeitsvereinbarung unterliegen.

Folgende Fragestellungen sollten dabei untersucht werden:

- Ist eine Diagnostik der pulmonalen Tuberkulose durch das vorgestellte PCR-Verfahren im Urin möglich und welche Wertigkeit hat die Methode im klinischen Einsatz?
- Eignet sich sequentielle PCR-Untersuchung im Urin zum Monitoring bzw. zur raschen Evaluation des Therapieansprechens bei Patienten unter Therapie?
- Kann der Test als Indikator des Krankheitsausmaßes und des klinischen Verlaufs eingesetzt werden?
- Gibt es Untergruppen von Patienten oder Formen der Tuberkulose für die der Test potentiell einen besonderen Nutzen erwarten lässt bzw. deren klinische Diagnose erleichtert oder ermöglicht?

B. Material und Methoden

1. Patientenkollektiv

Patienten mit dem klinischen Verdacht auf das Vorliegen einer pulmonalen Tuberkulose wurden zwischen Januar 2012 und März 2013 an der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel, einem Fachkrankenhaus für Lungenerkrankungen, Infektionen und Allergien prospektiv konsekutiv rekrutiert.

1.1. Einschlusskriterien

Potentielle Studienteilnehmer wurden anhand des klinischen Verdachts mit den Symptomen Fieber, Husten, Nachtschweiß und/oder Gewichtsverlust und einem Röntgen-Thorax/CT-Thorax Bild passend zur Verdachtsdiagnose einer Lungentuberkulose identifiziert. Die abschließende Diagnose einer Tuberkulose bedurfte eines kulturellen Nachweises von *M. tuberculosis* aus dem Sputum. Hierbei war es unbedeutend ob säurefeste Stäbchen mikroskopisch im Sputum nachweisbar waren, oder nicht. Die Patienten mit initialem Verdacht auf eine pulmonale Tuberkulose bei denen die Verdachtsdiagnose nicht bestätigt wurde, wurden in der Kontrollgruppe zusammengefasst.

1.2. Ausschlusskriterien

Gründe für einen Ausschluss aus der Studie waren eine bereits früher stattgehabte Tuberkulose oder extrapulmonale Manifestationsformen der Tuberkulose.

2. Klinische Untersuchungsmethoden - Ralph Score

Im Rahmen der klinischen Untersuchungen wurden bei allen Patienten Röntgenaufnahmen des Thorax angefertigt. Zur Quantifizierung des röntgenologisch sichtbaren Befalls wurde der Ralph Score bestimmt (71). Hierfür wurde das Vorhandensein von Kavernen mit 40 Punkten bewertet und für die prozentuale Ausbreitung der Infiltration ein Wert von 0 bis 100 Punkten (dem Prozentwert der Fläche der Infiltrate im Röntgenbild entsprechend) vergeben. Dies ergibt einen möglichen Maximalwert von 140 Punkten. Die Punktebewertung wurde unabhängig von drei Fachärzten durchgeführt und der Mittelwert errechnet. Dazu wurden alle drei unabhängig voneinander bestimmten Punktwerte addiert und anschließend durch drei dividiert.

3. Probensammlung und –bearbeitung

3.1. Urin

Bis Woche vier wurde der Morgenurin der Studienteilnehmer zweimal wöchentlich gesammelt, dann wöchentlich bis zur Entlassung aus der Klinik. Hierfür wurden 50 ml Mittelstrahlurin in einen mit EDTA beschichteten Becher (endgültige Konzentration 25 mM) gefüllt, um eine Denaturierung der DNA zu verhindern. Die Urinproben wurden innerhalb von vier Stunden nach Abnahme bearbeitet. An jeder Einzelprobe wurde zudem ein Urinstreifentest 10 Combur-Test® (Roche Diagnostics GmbH, Grenzach-Whylen, Germany) durchgeführt. Mit dem Urinstreifentest wurden folgende Parameter gemessen: spezifisches Gewicht, pH, Leukozyten, Nitrit, Protein, Glukose, Urobilinogen, Bilirubin und Erythrozyten.

3.2. Blut

Über den gesamten Zeitraum der Verlaufsbeobachtung wurden zusätzlich wöchentlich venöse EDTA-Blutproben entnommen und das C-Reaktive Protein (CRP), Harnstoff-N und Kreatinin im Serum bestimmt. Darüber hinaus wurde von ausgewählten Patienten Plasma mittels zehnminütiger Zentrifugation bei 2.000 xg gewonnen und bei -80° Celsius (°C) aufbewahrt bis die DNA daraus isoliert wurde.

3.3. Sputum

Von allen Patienten wurden wöchentlich morgendliche Sputumproben für den mikroskopischen Nachweis säurefester Stäbchen und die kulturelle Anzucht von *M. tuberculosis* gesammelt.

4. Laborverfahren

4.1. Referenzmethode – sputumbasierte Mikrobiologie

Aus dem wöchentlich gewonnenen Sputum wurden zum einen Kulturen angelegt, zum anderen wurden die Sputumproben mikroskopisch auf den Nachweis säurefester Stäbchen untersucht. Sowohl die kulturellen als auch die mikroskopischen Laboruntersuchungen wurden im Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Mykobakterien des Forschungszentrums Borstel durchgeführt. Für die

Studie wurden die Ergebnisse der Kultur als diagnostischer Goldstandard als Referenzmethode gewählt.

4.1.1. Kultur

Zur Bebrütung der Kulturen wurden einerseits das BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System (Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) (72) und andererseits das Festnährmedium Loewenstein-Jensen (LJ) genutzt (73,74). Dem Standard entsprechend wurden zum positiven Nachweis einer Tuberkulose mindestens drei Sputumproben an drei unterschiedlichen Tagen angelegt und mindestens für acht Wochen bebrütet.

4.1.2. Mikroskopie

Für die Sputummikroskopie wurden die Proben mittels Kinyoun-Lösung (histologische Färbung für Mikroorganismen mit säurefester Zellwand) angefärbt. Anschließend wurden die Proben mikroskopisch beurteilt und die Anzahl der vorhandenen Mykobakterien ausgezählt bzw. quantifiziert (36).

4.2. Index-Testverfahren

4.2.1. Isolierung der DNA aus Urin und Plasma

Zur Isolierung der DNA-Kurzfragmente (≤ 75 bp) aus dem Urin wurden zu 4 ml der Urinprobe je 6 ml Lyse-/Binde-Puffer und 1 ml Bindematrix hinzugefügt, vorsichtig vermischt und in eine kleine Filtersäule der Porengröße 10 μ m gegeben. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 80 mM Kaliumacetat, 8,3 mM Tris-HCl (pH 7,5), 40 μ M EDTA und 70% Ethanol um eventuell übriggebliebene Inhibitoren aus dem Urin und Puffer zu eliminieren. Die DNA wurde dann in ein Endvolumen von 50 μ l RNase- und DNase-freiem Wasser eluiert. Anschließend wurden die Proben bei -80°Celsius bis zur Analyse aufbewahrt.

Bei den Plasmaproben wurde jeweils die in 1 ml Plasma enthaltene DNA mittels QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Hilden, Germany) nach Gebrauchsanweisung des Herstellers isoliert.

4.2.2. Amplifikation und Detektion isolierter DNA aus Urin- und Plasmaproben

Eine *M. tuberculosis*-spezifische Sequenz wurde durch die Amplifikation einer 38bp großen spezifischen Genomregion, *IS6110*, mittels DNA-Fingerprint detektiert. Es erfolgte die Durchführung einer real-time PCR wobei 300 nM eines Oligonukleotidprimers, ein QuantiTect SYBR-Green PCR-Kit (Qiagen, Hilden, Germany) sowie 20 µl der eluierten DNA aus Urin oder Plasma angewendet wurden. Dieses Gemisch bestehend aus einem Endvolumen von 100 µl wurde abschließend mit einer HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) bearbeitet. Die Proben wurden in doppelten real-time PCR-Durchgängen analysiert.

4.2.3. Sequenzierung des gesamten Genoms (Whole-genome-Sequencing, WGS) und Datenanalyse

Für die Anfertigung der „whole genome sequencing library“ wurde das ligationsbasierte „library preparation“-Protokoll des NEBNext Ultra Kits (New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland) durchgeführt. Die entstandenen Libraries wurden mit dem MiSeq Instrument (Illumina, San Diego, USA) in doppelte End 2 x 301 bp Durchgänge (Version 3 Chemie) sequenziert. Es wurden keine weiteren Proben in den Durchgang mit einbezogen und die Durchführung erfolgte direkt nach dem Hauptwaschvorgang um eine mögliche Kontaminierung zu verhindern.

Die entstehenden Lesungen für jede Library und nicht zugeschriebene Lesungen von dem MiSeq Durchgang wurden gegen das H37Rv Referenzgenom (NC_000962.3) mit der Abbildungssoftware BWA kartiert/abgebildet, Duplikate wurden mittels SAMtools entfernt, und beide rezentriert und rekaliert mittels GATK toolkit durchgeführt. Die entstandenen bam files wurden mit dem Qualimap Programm ausgewertet.

5. Definition und Bestimmung des Grenzwerts (cut-off)

5.1. Cut off des Indextestverfahrens

Der beschriebene Test wurde ab einem cut-off Wert von 0,5 cpu/ml als positiv gewertet. Dieser cut-off Wert wurde von uns in Zusammenschau der Befunde bzw. aus der Analyse der erstellten Datensätze festgelegt und war nicht vordefiniert.

5.2. Cut off des Referenzverfahrens

Das Ergebnis der Kultur wurde als negativ gewertet, wenn drei Sputumkulturen von drei aufeinander folgenden Tagen kein Wachstum zeigten. Als positiv galt das Ergebnis sobald mindestens eine der Kulturen ein mykobakterielles Wachstum innerhalb von 8 Wochen zeigte. Diese Definitionen sind prädefiniert und entsprechen dem Goldstandard. In diesem Rahmen wurde die „*time to culture positivity*“ (TTP) definiert als Zeitdauer zwischen dem Ansetzen der Kultur und dem Zeitpunkt eines positiven Ergebnisses in Tagen.

Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung wurden als positiv gewertet, sobald der mikroskopische Nachweis mindestens eines Mykobakteriums gelang. Auch diese Definition ist vordefiniert und lag bereits vor Studienbeginn vor (9).

6. Statistische Methoden

Die Datenauswertung und -analyse erfolgte mit der Statistica v11 Software (StatSoft Inc., Hamburg, Germany).

Um den Zusammenhang zwischen zwei Variablen messen bzw. beurteilen zu können wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient, auch Rang-Korrelationskoeffizient genannt, genutzt. Die Korrelation wird hierbei im Unterschied zum klassischen Pearson-Korrelationskoeffizienten nicht zwischen den Datenpunkten selbst, sondern zwischen ihren Rängen berechnet.

Der Mann-Whitney-U-Test für ungepaarte Stichproben wurde angewendet, um zwischen Gruppen oder diagnostischen Methoden zu vergleichen. Er wird auch Wilcoxon Rangsummen-Test für unabhängige Stichproben genannt und testet, ob die zentralen Tendenzen zweier unabhängiger Stichproben verschieden sind. Er wird verwendet, wenn die Voraussetzungen für einen t-Test für unabhängige Stichproben nicht erfüllt sind.

Deskriptive Statistiken der quantitativen Werte basieren auf Median und Interquartilsabständen (IQR). Unterschiede wurden statistisch ausgewertet unter einem Konfidenzlevel von 95%.

Die Übereinstimmung zwischen den Beurteilern wurde mit dem Kappa-Test quantifiziert. Mit Kappa wird der Grad der Übereinstimmung der nominalen oder

ordinalen Bewertungen durch mehrere Prüfer bei Bewertung derselben Stichproben gemessen (75).

Das 95% Konfidenzintervall wurde nach der Methode von Newcombe errechnet (76).

7. Ethik-Kommission

Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Universität Lübeck beraten und positiv bewertet (Lübeck, 11-247). Alle teilnehmenden Patienten willigten ein, an der Studie teilzunehmen und unterschrieben eine Einverständniserklärung.

C. Ergebnisse

1. Patientenkollektiv

1.1. Teilnehmeranzahl und –verteilung auf Subgruppen

Zwischen Januar 2012 und März 2013 wurden 59 Patienten mit dem klinischen Verdacht des Vorliegens einer pulmonalen Tuberkulose an der Medizinischen Klinik Borstel untersucht. 25 Patienten (42,4%) wurden von der Studie ausgeschlossen, da sie die Einschlusskriterien nicht erfüllten. Somit konnten 34 Patienten in die Studie eingeschlossen werden (57,6%).

Von diesen Patienten dienten nach klinischem und mikrobiologischem Ausschluss einer Tuberkulose 8 Patienten als Kontrollgruppe (23,5%). Innerhalb dieser Gruppe gab es 3 Patienten bei denen nicht-tuberkulöse Mykobakterien isoliert wurden, die als *M. xenopi*, *M. fortuitum* und *M. malmoense* identifiziert werden konnten. Bei den übrigen 26 Patienten (76,5%) wurde die Diagnose der Tuberkulose durch einen positiven kulturellen Nachweis von *M. tuberculosis* bestätigt. 4 Patienten hiervon (15,4%) zeigten dabei eine oder mehrere Resistenzen der gegen *M. tuberculosis* eingesetzten Medikamente und wurden daher als eigene Subgruppe untersucht. Somit blieben 22 Patienten (84,6%) mit einer nachgewiesenen sensiblen pulmonalen Tuberkulose. 18 (81,8%) dieser Patienten wiesen zusätzlich ein positives Ergebnis in der Mikroskopie auf (mikroskopisch-positive Patienten), 4 (18,2%) ein negatives Mikroskopie-Ergebnis (mikroskopisch-negative Patienten).

Bei 11 (50,0%) der insgesamt 22 Tuberkulosepatienten startete die erste Probensammlung erst kurz nach Therapiebeginn („begonnen mit Therapie“). Die anderen 11 (50,0%) hatten bei Beginn der Probensammlung noch nicht mit der Therapie begonnen („therapienaiv“). Die Übersicht hierzu ist in **Abbildung 3** als Flussdiagramm dargestellt.

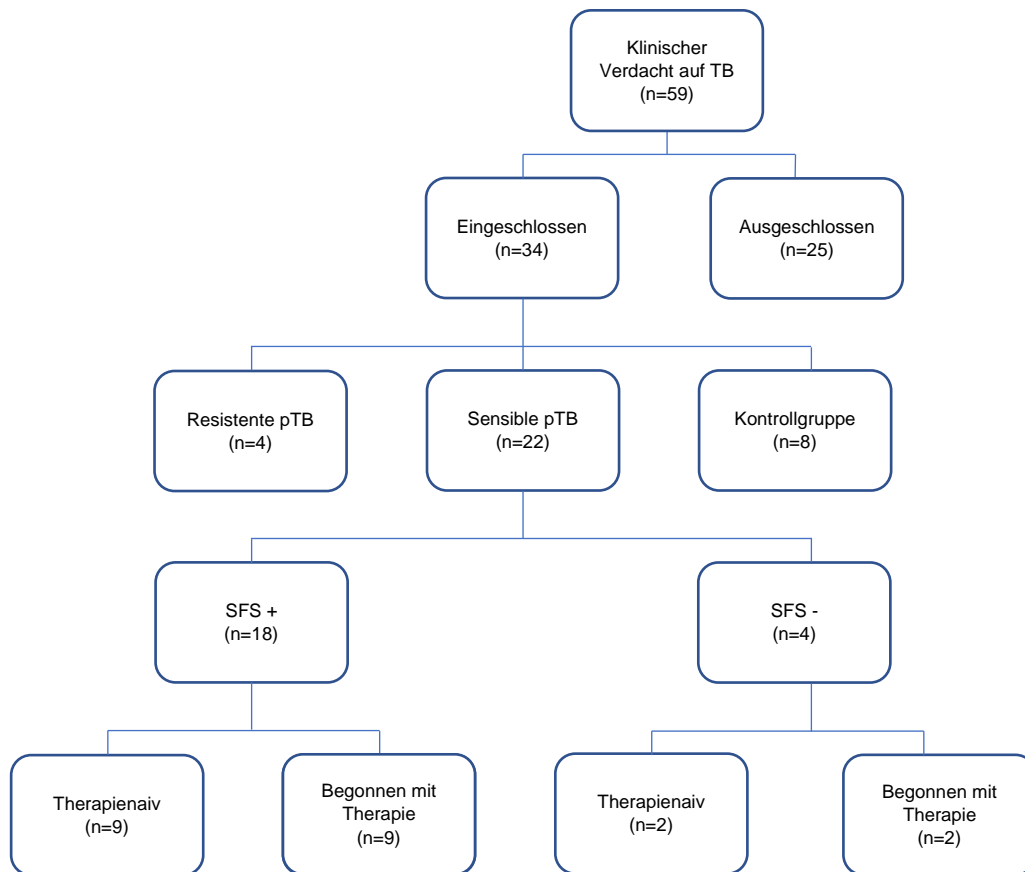


Abbildung 3: Anzahl von Patienten in jeder Kategorie.

Die Patienten wurden unter Therapie verlaufsbeobachtet, die mittlere Beobachtungszeit betrug dabei 50 Tage (IQR 29-80).

1.2. Klinisch deskriptive Daten der Patienten

Die demographischen Daten der Patienten zeigt **Tabelle 1**. Das mediane Patientenalter der 34 in die Studie eingeschlossenen Patienten betrug 50 Jahre. Dabei reichten die Altersangaben von 32 bis 68 Jahre (IQR 32-68). 6 der Patienten waren weiblich (17,7%), 28 männlich (82,3%). Der „*body mass index*“ (BMI) der Studienteilnehmer betrug im Mittel 21,7 kg/m² (Interqualitätsbanden IQR 18,1-25,3). 18 Patienten waren Raucher (52,9%), kein Patient war zusätzlich HIV-positiv. 2 Patienten aus der Kontrollgruppe hatten in der Vorgeschichte eine ausgeheilte Tuberkulose, die mehr als sechs Monate zurücklag. Außerdem gab es in der Kontrollgruppe 3 Patienten mit einer pulmonalen Infektion durch NTMs sowie 2

Patienten mit einer Lymphknoten-Tuberkulose. Bei einem Patienten konnte die finale Diagnose nicht erhoben werden.

Tabelle 1: Charakteristika der an der Studie teilnehmenden Patienten

Parameter	<u>Kulturbestätigte Tuberkulose (n=22)</u>		<u>andere Diagnose (n=8)</u>
	Therapienaiv (n=11)	Begonnen mit Therapie (n=11)	
Alter (median / IQR)	49 / 46-63	56 / 32-44	54 / 36-68
Weiblich (n)	2	2	1
Männlich (n)	9	9	7
Body mass index (median / IQR)	19,6 / 18,1-22,3	20,1 / 18,8-22,4	23,3 / 20,8-25,3
Tuberkulose vor >6 Monaten (n)	0	0	2
Derzeit Raucher (n)	7	6	5
HIV-positiv (n)	0	0	0

2. Testergebnisse

Insgesamt wurden in der Studie 322 Morgenurinproben, 221 venöse Blutproben und 261 Sputumproben genommen und ausgewertet.

2.1. trDNA-Werte bei therapienaiven Tuberkulosepatienten und Vergleich mit den Referenznachweismethoden (MGIT-, LJ-Kultur und AFB-Mikroskopie)

Um die Wertigkeit der trDNA-Aussage zu evaluieren, wurden zunächst die trDNA-Ausgangswerte aller verfügbaren Patienten bestimmt und für die Studie herangezogen, die nicht mit Tuberkuloseheilmitteln vorbehandelt waren (therapienaive Patienten, d.h. Erhalt der Urinprobe vor Tag 1 des Therapiebeginns) und deren Diagnose „Tuberkulose“ (allerdings zeitlich deutlich verzögert und daher erst später verfügbar) durch das Vorliegen positiver Kulturen „absolut“ gesichert war (Goldstandard). Dies traf auf 11 Patienten zu.

Anschließend wurden die trDNA-Werte dieser Patienten mit den Messergebnissen der Sputumreferenzmethoden verglichen. Diese Referenznachweismethoden sind wie oben beschrieben der MGIT-Kulturnachweis und der SFS-Mikroskopienachweis. Die Messwerte der DNA-Fragmente aus den Urinproben

wurden hierzu den jeweiligen Ergebnissen der Sputumproben desselben Tages zugeordnet.

Dabei wurde in 2.1.1. verglichen, in wie weit die Probenmaterialien für Urin und Sputum verfügbar waren. In 2.1.2. wurde ausgewertet, wie viele Patienten jeweils als richtig positiv detektiert wurden und ermittelten somit die Sensitivität der jeweiligen Untersuchungsmethode. In 2.1.3. wurde anschließend untersucht, ob eine Korrelation zwischen den trDNA-Ausgangswerten im Urin und den Mikroskopieergebnissen des Sputums besteht.

2.1.1. Verfügbarkeit des Probenmaterials

Während die Morgenurinproben von allen Patienten verfügbar waren (n=11), waren nur 10 Patienten in der Lage Sputum für die Analyse zu produzieren. Die Anzahl der Patienten, bei denen mindestens eine Probe abgegeben und ausgewertet werden konnte, lag somit für den trDNA-Nachweis aus Urin bei 100%, für die MGIT-Kultur sowie die Sputum-Mikroskopie bei 91% (n=10 von 11), (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Diagnostische Wertigkeit der Sputumreferenzmethoden und des trDNA Assays zum Tuberkulosenachweis bei therapienaiven Patienten vor Therapiebeginn (n=11)

	MGIT-Kultur	LJ-Kultur	Sputum-Mikroskopie	trDNA
Anzahl der Patienten, die mind. 1 Probe abgaben	10	7	10	11
Anzahl der Patienten mit mind. 1 verarbeiteten Probe	10	7	10	11
Anzahl der Patienten mit mind. 1 positiver Probe	10	7	6	7
Sensitivität des Assays in der Diagnose definiert als % Patienten, die in einer oder mehreren Proben vor Therapiebeginn positiv getestet wurden.	91*	64	60	64

* 1 Patient lieferte kein Probenmaterial ab, daher keine 100% erreicht.

2.1.2. Ausgangswerte aller Methoden im Vergleich (Sensitivität)

In allen Fällen, in denen Sputum verfügbar war (n=10 für MGIT) detektierten die MGIT-Kulturen jeweils alle Tuberkulosepatienten als positiv, was einer Sensitivität von 100% entspricht (Goldstandard). In der SFS-Mikroskopie wurden 6 von 10 verfügbaren Proben als positiv gewertet, die Sensitivität beträgt hier also 60%. Der

trDNA-Assay detektierte 7 von 11 Proben positiv, er hat somit eine Sensitivität von 64%. Formell handelt es sich dabei um Prozentwerte, aufgrund der sehr kleinen Fallzahlen sind Angaben zur Sensitivität und Spezifität jedoch nur eingeschränkt verwertbar. Diese Ergebnisse sind ebenfalls in **Tabelle 2** dargestellt.

2.1.3. Korrelation trDNA-Ausgangswerte und SFS-Mikroskopie

Die Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen dem trDNA-Assay und der SFS-Mikroskopie war gering (Kappa -0,25; N=10). Das heißt, bei den therapienaiven Patienten wurde in viel weniger Fällen als erwartet mit beiden Methoden dasselbe diagnostische Ergebnis ermittelt, und zwar in nur 4 Fällen. Bei diesen 4 übereinstimmenden Ergebnissen handelt es sich um drei SFS mikroskopisch-positive und einen SFS mikroskopisch-negativen Fall. Die trDNA-Fragmente waren hingegen in drei weiteren SFS mikroskopisch-positiven Fällen gar nicht nachweisbar (ebenfalls falsch negativ), aber in drei SFS mikroskopisch-negativen Fällen positiv (richtig positiv). Insgesamt erzielte der trDNA-Assay also 6 richtig positive (=60%) und 4 falsch negative Ergebnisse (=40%). Auch die SFS-Mikroskopie ergab, wie der trDNA-Assay, insgesamt 6 richtig positive und 4 falsch negative Ergebnisse von 10. Beide Methoden erzielten daher die gleiche Detektionsrate und somit eine Sensitivität von 60%.

Wurden aber beide Methoden gemeinsam zur Bewertung herangezogen, konnte die Diagnoserate „Tuberkulose“ auf eine Sensitivität von 90% (9/10 vergleichbar) bzw. 91% (10/11 bezogen auf alle Patienten dieses Kollektivs, jedoch nicht vergleichbar) erhöht werden.

Den detaillierten Vergleich der Ergebnisse von trDNA-Assay und Sputum-Mikroskopie (SFS) zeigt **Tabelle 3**.

Tabelle 3: Diagnostische Übereinstimmung von DNA und SFS-Mikroskopie bei therapienaiven Patienten ($n=11$)

	<i>n</i>	%	Bewertung der Tuberkulosediagnose durch den trDNA-Assay
SFS+ / DNA+	3/10	30	richtig positiv
SFS- / DNA-	1/10	10	falsch negativ
SFS+ / DNA-	3/10	30	falsch negativ
SFS- / DNA+	3/10	30	richtig positiv
SFS+ u./od. DNA+	9/10	90	richtig positiv durch jeweils ein Verfahren

2.2. trDNA-Werte im Therapieverlauf (Monitoring)

Im Folgenden untersuchten wir die Veränderungen der trDNA-Werte im Verlauf der Therapie. Hierzu wurden alle kulturell bestätigten Tuberkulosepatienten, unabhängig davon, wann die erste Probensammlung erfolgt war untersucht (also 22 Patienten, bestehend aus 11 therapienaiven Patienten und 11 Patienten, die bereits mit der Therapie begonnen hatten). Die Schwankungen der trDNA-Messwerte dieser 22 Patienten mit Medikamenten-sensibler Tuberkulose wurden über eine mediane Beobachtungszeit von 50 Tagen (IQR 29-80) analysiert.

2.2.1. trDNA-Höchstwerte, Erreichen des Grenzwerts

Da die trDNA-Werte (erwartungsgemäß) im Therapieverlauf tendenziell fielen (Shapiro-Wilks' Test $p < 0,02$), wurde der wöchentliche Medianwert der trDNA-Werte herangezogen, um die Muster der Veränderungen über die Zeit zu beschreiben.

Die wöchentlichen medianen trDNA-Werte lagen anfangs in der Gruppe der Patienten mit bereits begonnener Behandlung ($n=11$) bei 0,51 log cp/ml und stiegen auf einen intermediären Höchstwert von 0,83 log cp/ml in Woche 5 der Therapie an. In der Subgruppe der elf therapienaiven Patienten ($n=11$) reichten die trDNA Ausgangswerte von 0 bis 1,6 log cp/ml (Median 0,81 log cp/ml) und stiegen innerhalb der ersten Woche auf maximale Werte von 1,4 log cp/ml (Median) an. Dies ist graphisch in **Abbildung 5** dargestellt.

Nach diesem Höchstwert nahmen die trDNA-Konzentrationen über die Zeit kontinuierlich ab und fielen bis zur Woche 11 unter den Schwellenwert von 0,5 log cp/ml (**Abbildung 4**).

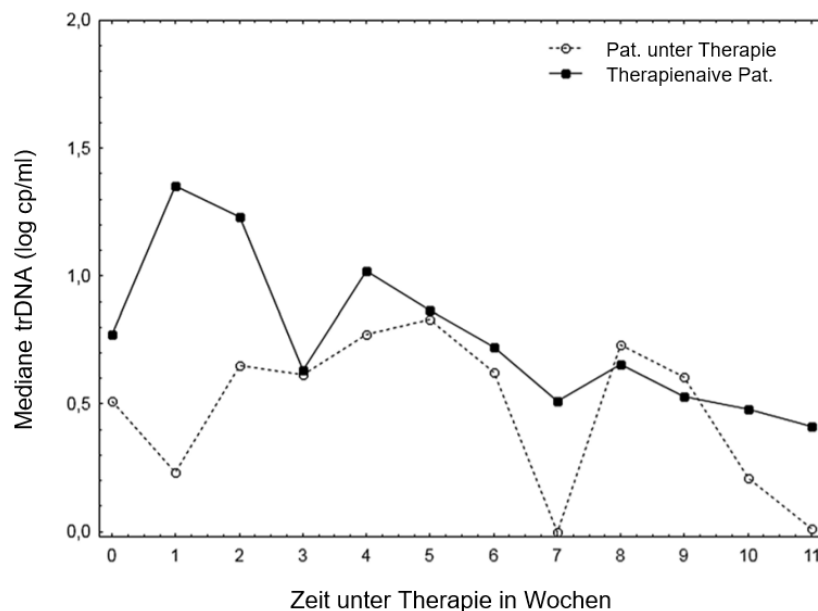


Abbildung 4: Zeitverlauf der wöchentlichen Schwankung der trDNA Werte unter Therapie. Die medianen trDNA Werte (log cp/ml) der Medikamentensensitiven Patienten wurden kategorisiert in therapienaive Patienten (schwarze Punkte; n=11) und Patienten, die bereits mit der Therapie begonnen hatten (leere Punkte; n=11). Die Zeit unter Therapie ist in Wochen ausgedrückt. Für jede Woche wurde der Medianwert ermittelt.

Bei den therapienaiven Patienten mit initial undetektierbarer trDNA (4/11) wurde diese unter der antituberkulösen Therapie nachweisbar (Median 4 Tage nach Therapiebeginn; Intervall: 1-26). Trotzdem korrelierten die maximalen trDNA-Werte nicht mit dem Prozentsatz der mittels SFS-Mikroskopie detektierten positiven Ergebnisse (Kruskal-Wallis-Test $p > 0,2$).

Abbildung 5 zeigt den Prozentsatz Tuberkulosenegativer und -positiver Ergebnisse der MGIT-Kulturen nach Therapiebeginn.

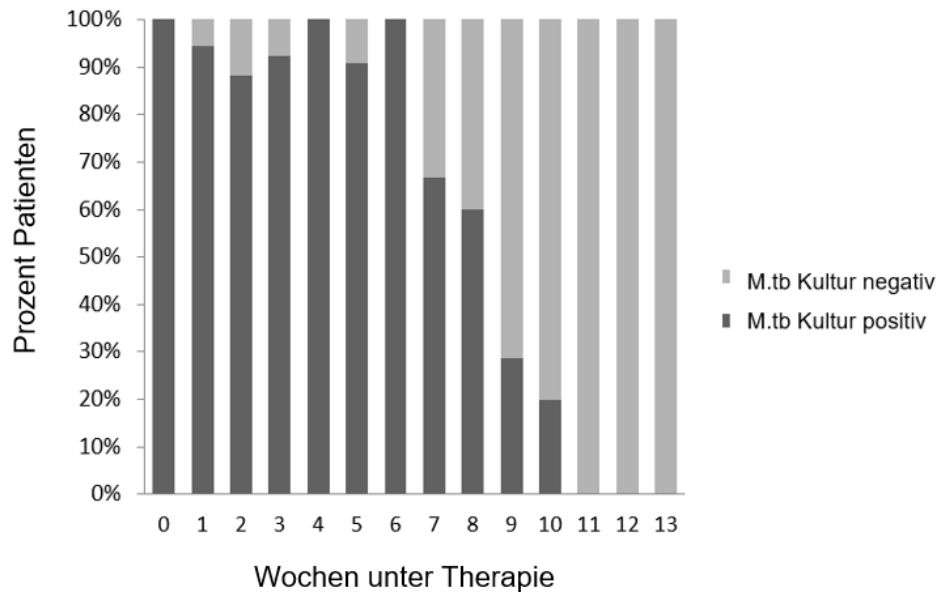


Abbildung 5: Prozentsatz Tuberkulosenegativer und -positiver Ergebnisse der Flüssigkulturen nach Therapiebeginn (M.tb = *Mycobacterium tuberculosis*).

Insgesamt konnten von den 22 Patienten mit kulturell positiver und therapiesensitiver Tuberkulose innerhalb von 4 Wochen Beobachtungszeit 21 auch mittels trDNA identifiziert werden (96%). Der einzige Patient, der während des gesamten Beobachtungsverlaufs trDNA-negativ blieb, war derjenige mit nicht-detektierbaren SFS in der Sputummikroskopie und pauszibazilliärer Infektion.

2.2.2. Vergleich der trDNA-Werte mit den Sputumreferenzmethoden

Im Folgenden wurden die 4 Methoden (MGIT-Kulturnachweis, LJ-Kulturnachweis, mikroskopischer Nachweis und trDNA-Fragmentnachweis) zunächst in Bezug auf die Zeitdauer miteinander verglichen in der die maximale Anzahl nachgewiesener Tuberkulosepatienten in der jeweiligen Methode erreicht wurde. Anschließend erfolgte der Vergleich der jeweiligen Konversionszeit. Für diese Punkte wurden die Messergebnisse aller 22 tuberkulosebestätigten Patienten berücksichtigt.

2.2.2.1. Vergleich hinsichtlich der maximalen Anzahl nachgewiesener Tuberkulosepatienten und der Zeitdauer bis zum Erreichen der jeweils maximalen Anzahl

Die MGIT-Kultur erreichte ihre maximale Detektionsrate (Sensitivität) von 100% innerhalb von 60 Tagen ab Hospitalisierung, zu diesem Zeitpunkt waren also 22 von 22 Patienten als positiv detektiert. Die LJ-Kultur erreichte eine maximale Detektionsrate von 86% (19 von 22 Patienten) innerhalb von 51 Tagen. Die trDNA-Nachweismethode erreichte ihr Maximum an 21 von 22 detektierten Patienten innerhalb von 27 Tagen und erzielte somit eine Sensitivität von 95%, gefolgt von der SFS-Mikroskopie mit einer Sensitivität von 82% (18 von 22 Patienten) innerhalb von sechs Tagen. Somit erhöhte sich die Sensitivität des trDNA-Assays im Verlauf der Therapie von anfänglich 60% auf 95%. Zusätzlich lag das Ergebnis des trDNA-Assays deutlich früher vor als das Ergebnis der herkömmlichen Sputumkulturproben.

Innerhalb der 6. Woche nach Hospitalisierung konnten bereits zum Zeitpunkt der Probensammlung 18 von 22 Tuberkulosepatienten (82%) mittels SFS-Mikroskopie und 15 von 22 Patienten (68%) durch den trDNA-Assay detektiert werden. Die Ergebnisse der Kultur hingegen waren wegen des langsamen Wachstums der Tuberkulosebakterien zu diesem Zeitpunkt noch nicht verfügbar. Die Übersicht dazu verdeutlicht Tabelle 4.

Tabelle 4: Diagnostische Wertigkeit der Sputumreferenzmethoden und des trDNA-Assays für die Detektion von Tuberkulosepatienten nach Therapiebeginn ($n=22$)

	MGIT-Kultur	LJ-Kultur	Mikroskopie	trDNA
Zeit bis zur max. Tuberkulosedetektionsrate (in Tagen)	60	51	6	27
Anzahl detektierter Patienten ($n/22$)	22/22	19/22	18/22	21/22
Sensitivität (%)	100	86	82	95
Anzahl diagnostizierter Tuberkulosefälle innerhalb der ersten Woche ab Hospitalisation (n)	0	0	18/22	15/22

Insgesamt konnten wir keine Korrelation zwischen den erreichten Maximalwerten der trDNA im Verlauf der Therapie und der TTP (time to positivity) der MGIT- und LJ- Kulturen bzw. der SFS-Mikroskopie erkennen. Während die TTP der LJ-Kulturen wie erwartet in inversem Zusammenhang mit den maximalen trDNA-Messwerten stand (das heißt, je höher die Maximalwerte der trDNA-Messergebnisse, desto kürzer die Zeit bis zum Erreichen eines positiven Ergebnisses in der LJ-Kultur), korrelierte die TTP der MGIT-Kulturen damit nicht. Der Mikroskopie-Nachweis korrelierte dagegen positiv mit der maximalen trDNA (das heißt, je höher die maximal erreichten trDNA-Messwerte, desto mehr SFS waren mikroskopisch nachweisbar).

2.2.2.2. Vergleich hinsichtlich der Konversionszeit und -rate

Im Folgenden wurden die 4 Methoden hinsichtlich der Zeit bis zum Erreichen der Konversion und der Konversionsrate verglichen. Diese ist standardgemäß definiert als Übergang von positiven zu drei aufeinanderfolgenden negativen Messergebnissen. Die Konversionszeit bemisst die entsprechende Zeitdauer bis zum Erreichen der Konversion. Hierzu wurden die Messergebnisse aller 22 Tuberkulosepatienten herangezogen.

Nach Erreichen der maximalen Detektionsrate der Tuberkulosebakterien fiel ihre Nachweisbarkeit während des Therapieverlaufs graduell ab. Die Konversion wurde nur bei 11 (von 22) Patienten bestimmt, bei denen eine Verlaufsbeobachtung von über 50 Tagen gegeben war. Am Ende der Verlaufsbeobachtung erreichte die trDNA eine Konversionsrate (ein negatives Messergebnis) von 82% (9/11) in Woche 12. Die zwei weiterhin positiv getesteten trDNA-Werte waren hierbei auch in der Kultur weiterhin positiv.

Die Konversionsrate auf Basis der MGIT- und LJ-Kultur betrug jeweils 64% (7/11) in Woche 11 bzw. 8, die Konversionsrate der SFS-Mikroskopie betrug ebenfalls 64% (7/11) in Woche 9 (**Tabelle 5**).

Tabelle 5: Konversionszeit und –rate der Sputumreferenzmethoden und des trDNA-Assays

	MGIT-Kultur	LJ-Kultur	Mikroskopie	trDNA
Anzahl der Patienten mit erreichter Konversion	7/11	7/11	7/11	9/11
Konversionsrate (%)	64	64	64	82
Konversionszeit (<i>in Wochen</i>)	11	8	9	12

2.2.3. Vergleich trDNA-Werte mit dem radiologischen Befund

Es wurde dann der Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des radiologischen Befunds bei Therapiebeginn und den maximalen trDNA-Messergebnissen untersucht. Außerdem analysierten wir den Zusammenhang des Ralph Scores mit der TTP von MGIT- und LJ-Kulturen.

Interessanterweise korrelierten die maximalen trDNA-Werte positiv mit dem Ralph Score (das heißt je höher der Ralph Score desto höher der maximale trDNA-Ausscheidungswert im Urin) ($p < 0,04$; $r^2 = 0,18$, **Abbildung 6 A**). Dies spricht dafür, dass der Verlauf der DNA-Eliminierung das Ausmaß der pulmonalen Erkrankung widerspiegelt.

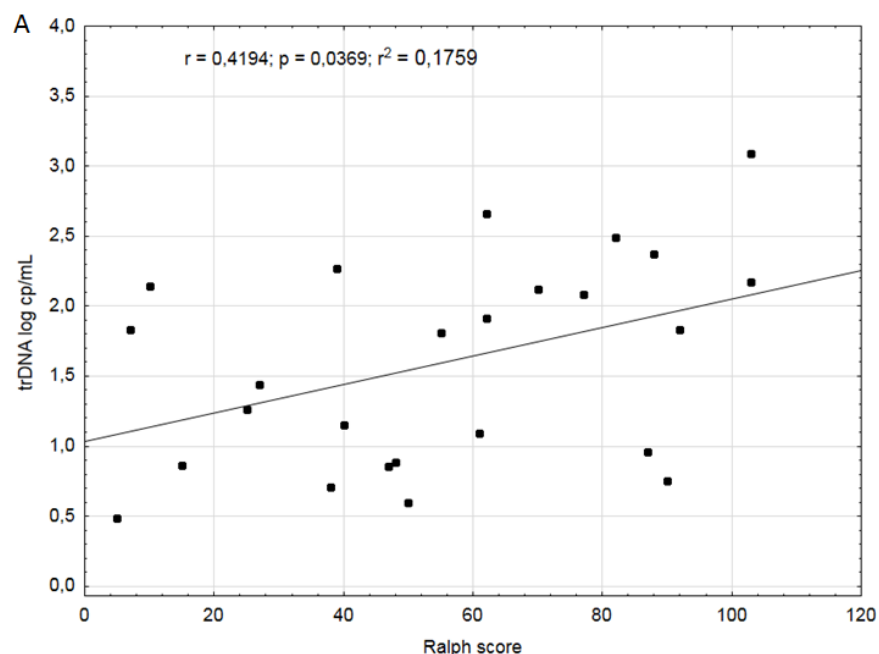


Abbildung 6 A: Maximale trDNA-Ausscheidung im Urin im Verhältnis zum Ralph Score.

In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurde auch festgestellt, dass die TTP der MGIT- und LJ-Kulturen invers mit dem Ralph Score zusammenhing (das bedeutet, je höher der Ralph Score, desto kürzer die Zeitdauer zwischen dem Ansetzen der Kultur und dem Zeitpunkt eines positiven Ergebnisses in Tagen). Dies ist graphisch in den **Abbildungen 6 B und 6 C** dargestellt.

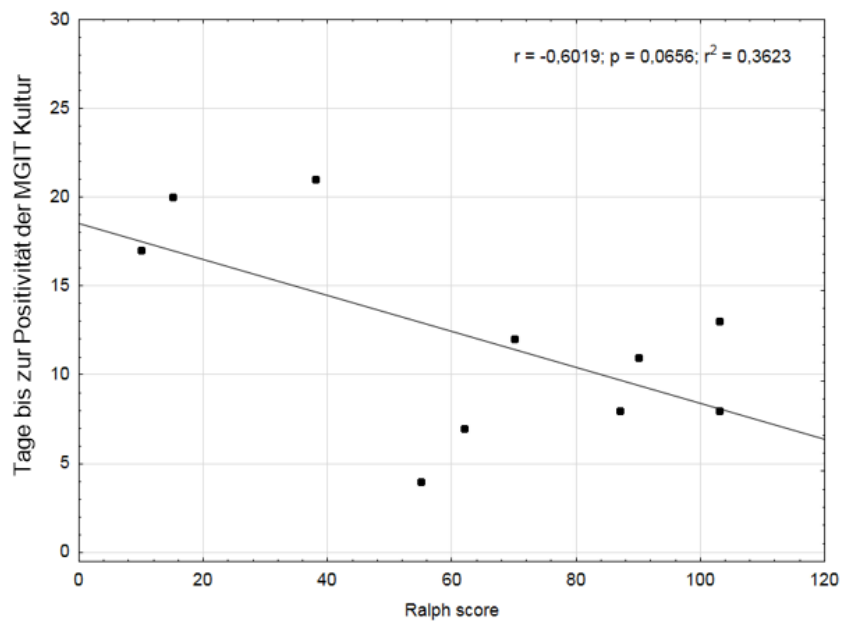


Abbildung 6 B: Ralph Score und TTP von MGIT- Kulturen.

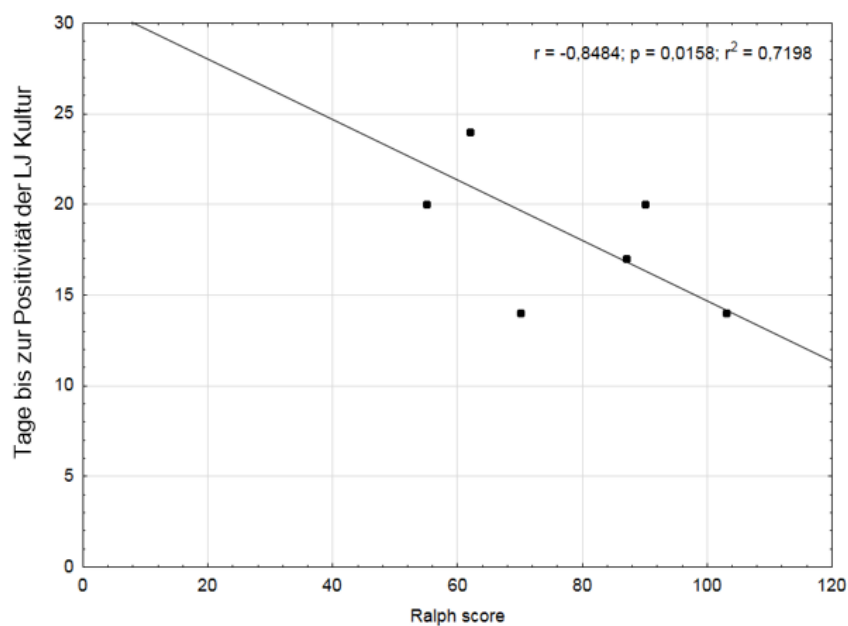


Abbildung 6 C: Ralph Score und TTP von LJ- Kulturen.

2.2.4. Vergleich trDNA-Werte und renale Funktion, Entzündungs- und Urinparameter

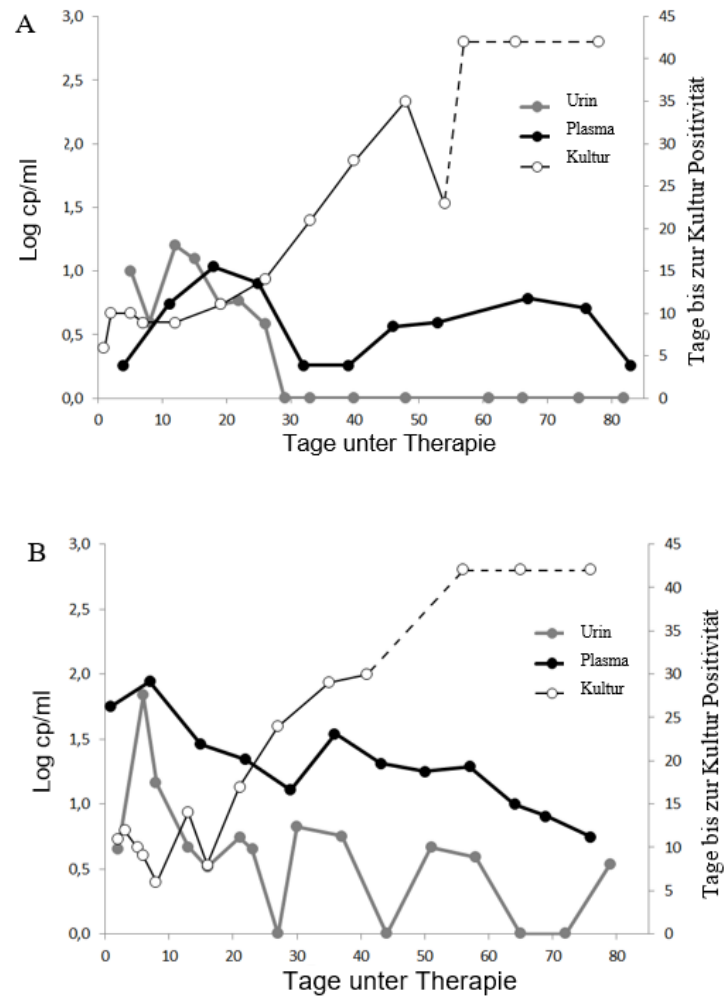
Die maximalen trDNA-Werte aus dem Urin korrelierten nicht signifikant mit dem laborchemisch im Serum nachgewiesenen Kreatinin, Serum-Harnstoff oder CRP-Spiegel. Der trDNA-Assay wird somit offensichtlich nicht von Parametern der renalen Funktion oder dem generellen Entzündungsstatus beeinflusst. Darüber hinaus ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen verschiedenen gemessenen Urinparametern (Spezifisches Gewicht, pH, Leukozyten, Nitrat, Protein, Glukose, Urobilinogen, Bilirubin und Erythrozyten – gemessen mittels Urinstreifentest) und den trDNA-Maximalwerten.

2.2.5. trDNA-Werte und demographische Patientendaten

Neben den oben bereits beschriebenen Parametern wurden die demographischen Daten der Patienten wie Geschlecht, Alter, Raucherstatus und BMI untersucht. Sie zeigten keinen Zusammenhang mit den maximalen trDNA-Werten.

2.3. trDNA-Nachweis im Plasma im Therapieverlauf – Vergleich mit Urin und Kultur

Um zu untersuchen, ob die *M. tuberculosis*-DNA vom Infektionsort durch die Blutbahn in den Urogenitaltrakt transportiert wird, wurden in einer Subgruppe aus zwei Patienten (19, 22) die trDNA-Werte im Plasma bestimmt und mit den Verläufen der trDNA im Urin und den Sputumergebnissen der MGIT-Kultur verglichen. Interessanterweise konnte die trDNA im Plasma noch nachgewiesen werden, nachdem die MGIT-Kultur bereits seit mehr als 30 Tagen negativ geworden war (also die Kultur-Konversion erreicht hatte) (**Abbildungen 7 A und 7 B**).



Abbildungen 7 A und B: Zeitverlauf der trDNA-Messwerte in Plasma und Urin und der entsprechenden Daten der MGIT-Kulturen von Patient 19 (A) und 22 (B). Die gestrichelte Linie zeigt einen negativen MGIT-Kulturstatus an.

2.4. trDNA-Verlauf unter Therapieumstellung bei resistenten Tuberkulosestämmen

In 4 Fällen der initial insgesamt 26 Patienten mit nachgewiesener Tuberkulose-Infektion lagen Antibiotikaresistenzen von *M. tuberculosis* vor. Bei ihnen kam es im Verlauf teilweise zu einer mehrfachen Umstellung des Therapieregimes. Im Einzelnen handelt es sich dabei um folgende Resistenzen: Patient 19: resistent gegenüber Isoniazid (INH) und Protionamid (PTH); Patient 21: resistent gegenüber Rifampicin (RIF), Rifamycin (RM), INH, PTH, Streptomycin (SM); Patient 23:

resistent gegenüber INH, PTH, SM und Patient 36: resistent gegenüber SM (Medikamenten-Inhaltsstoffe siehe unter Abkürzungsverzeichnis).

Hierbei ließen sich folgende Beobachtungen erschließen:

Patient 19: erhielt eine antituberkulöse Standard-Therapie von Tag 1 bis Tag 22 (Therapie-Regimen 1 bestehend aus: RIF 600 mg, INH 300 mg, Ethambutol (EMB) 1500 mg und Pyrazinamid (PZA) 2000 mg). Danach wurde INH durch Moxifloxacin (MFX) ersetzt (Therapie-Regimen 2: RIF 600 mg, MFX 400 mg, EMB 1500 mg, PZA 2000 mg). Ab Tag 75 wurde die Gabe von PZA beendet (Therapie-Regimen 3: RIF 600 mg, MFX 400 mg, EMB 1500 mg). Das Maximum der trDNA-Ausscheidung im Urin wurde bereits an Tag 12, also noch vor Umstellung des ersten Therapieregimes erreicht. Nach Umstellung der Therapie zeigte sich keine erneute messbare Erhöhung der trDNA-Werte. Dies ist in **Abbildung 8** dargestellt, wobei die roten Linien jeweils den Zeitpunkt der Änderung des Therapieregimes anzeigen.

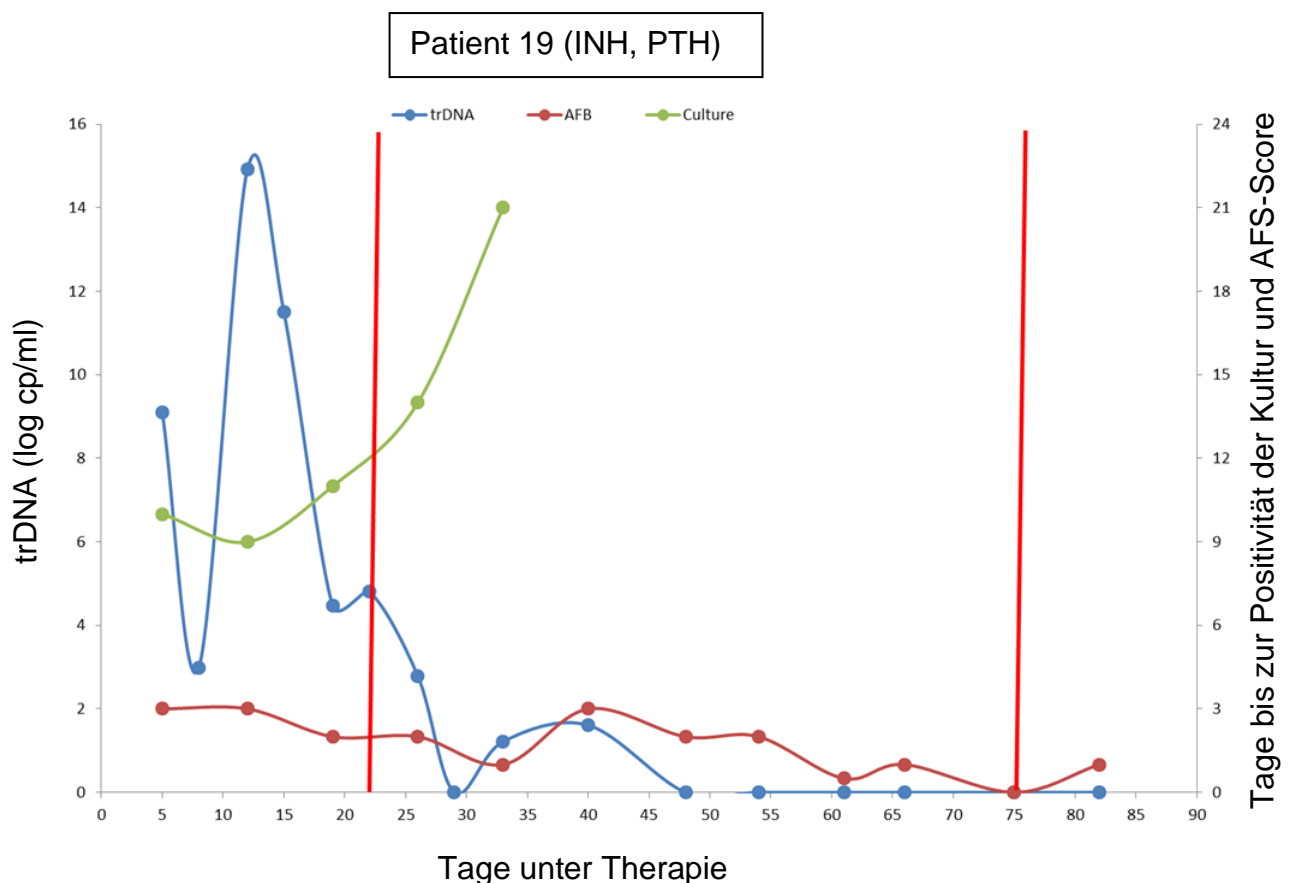


Abbildung 8: Kurvenverlauf der Messergebnisse der verschiedenen Laborverfahren bei Patient 19 mit Resistenz gegenüber Isoniazid und Prothionamid.

Patient 21: erhielt ebenfalls eine Standard-Therapie gegen die Tuberkulose bis Tag 21. Dann wurde das Therapie-Regime insgesamt dreimal verändert: an Tag 21, an Tag 44 und erneut an Tag 62. Dabei bestand das zweite Therapie-Regimen ab Tag 21 aus EMB (1600 mg), PZA (1500 mg), MFX (400mg), PAS (4000mg) Capreomycin (CM, 1000 mg) und Terizidon (TZD, 750 mg). Zwischen Tag 44 und Tag 62 wurde PAS pausiert (Therapie-Regimen 3). Zwischen Tag 62 und Tag 97 erhielt der Patient ein 4. Therapie-Regimen, bestehend aus EMB (1600 mg), PZA (1500 mg), MFX (400 mg), PAS (3 x 4000 mg), CM (1000 mg) und TZD (750 mg). Es zeigte sich nach Nachweis niedriger basaler trDNA-Werte eine Erhöhung im Verlauf mit einem trDNA-Maximum an Tag 69. Die Messergebnisse sind im Kurvenverlauf von **Abbildung 9** veranschaulicht dargestellt, die Zeitpunkte der Änderung im Therapiekonzept werden dabei durch die roten Linien markiert.

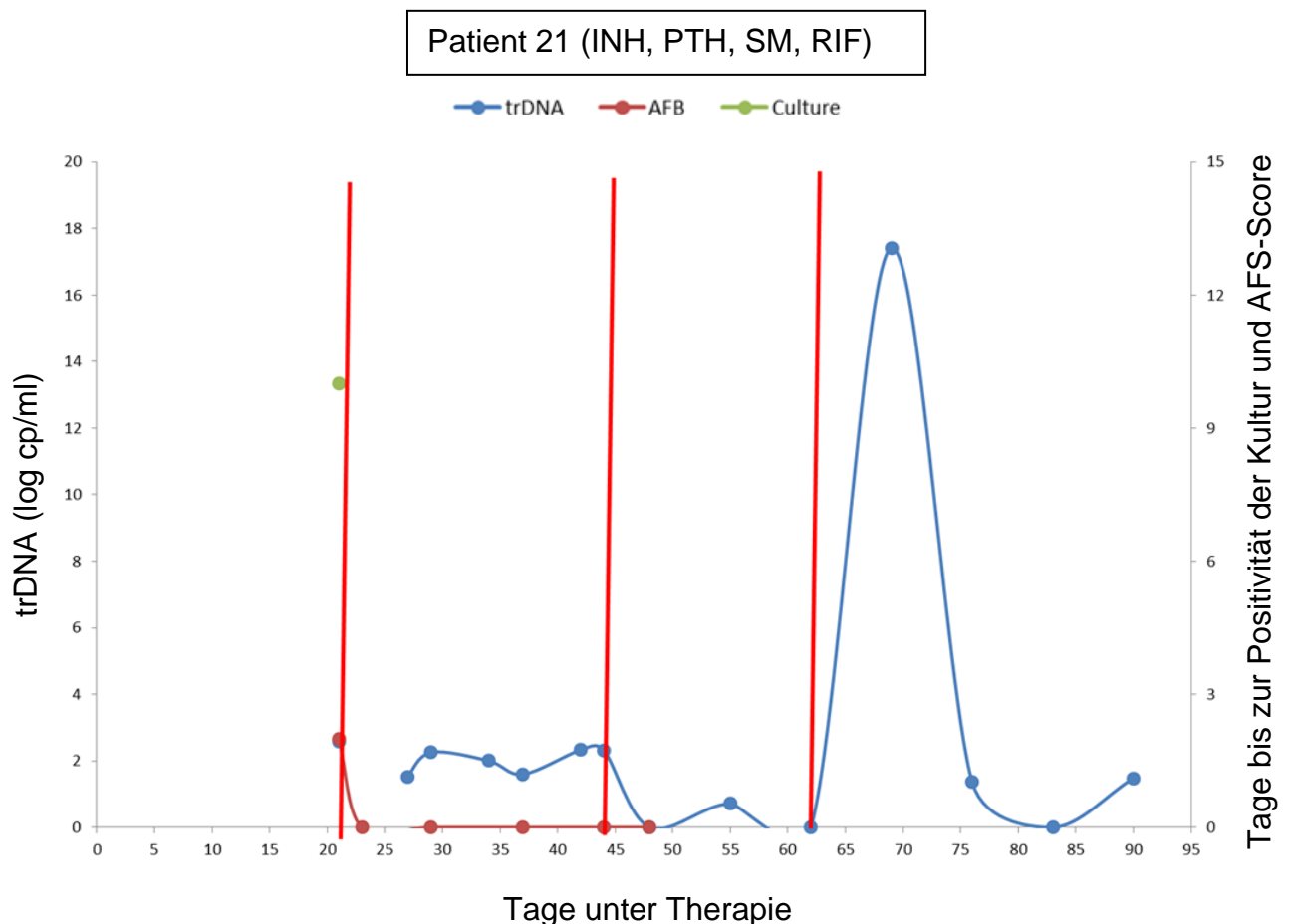


Abbildung 9: Kurvenverlauf der Messergebnisse der verschiedenen Laborverfahren bei Patient 21 mit Resistenz gegenüber Rifampicin, Isoniazid, Prothionamid und Streptomycin.

Patient 23: erhielt ebenfalls eine Standard-Therapie bis Tag 21 (Therapie-Regimen 1: RIF 600 mg, INH 300 mg, EMB 1200 mg, PZA 1500 mg), dann wurde Isoniazid durch Moxifloxacin ersetzt (Therapie-Regimen 2: RIF 600 mg, EMB 1200 mg, PZA 1500 mg, MFX 400 mg). An Tag 45 wurde die Therapie erneut umgestellt: die Gabe von Rifampicin wurde beendet, die Dosis von Pyrazinamid erhöht sowie zusätzlich Capreomycin und Terizidon gegeben (Therapie-Regimen 3: EMB 1200 mg, PZA 2000 mg, MFX 400 mg, CM 1000 mg, TZD 750 mg). Daraufhin zeigte sich ein trDNA-Maximum an Tag 59. Dieser Kurvenverlauf ist graphisch in **Abbildung 10** dargestellt, wobei die roten Balken graphisch den Zeitpunkt der Änderung im Therapie-Regimen anzeigen.

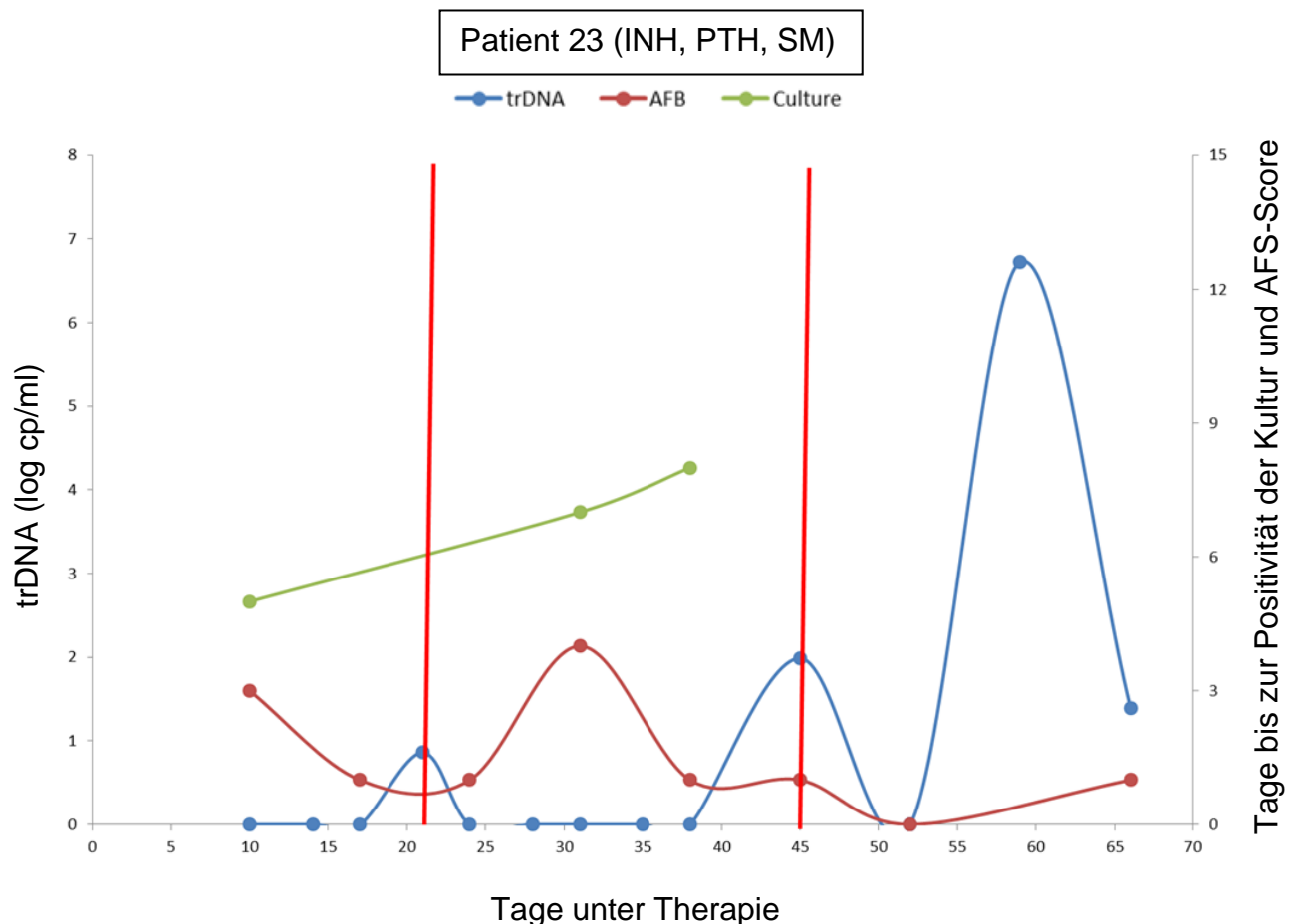


Abbildung 10: Kurvenverlauf der Messergebnisse der verschiedenen Laborverfahren bei Patient 23 mit Resistenz gegenüber Isoniazid, Prothionamid und Streptomycin.

E. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Labormethode evaluiert, die auf dem quantitativen und qualitativen Nachweis von mykobakterieller trDNA in humanen Urinproben beruht.

Dabei wurde gezeigt, dass die Methode zwar gegenüber dem diagnostischen Goldstandard *M. tuberculosis* Kultur sehr spezifisch ist, aber nur eine Sensitivität von <70 % erreicht werden kann. Der sequentielle Nachweis von *M. tuberculosis* DNA-Fragmenten im Urin von Tuberkulose-Patienten unter Therapie eignet sich prinzipiell zum Therapiemonitoring. Es können bei einem Teil der Patienten auch noch dann DNA-Fragmente im Urin nachgewiesen werden, wenn keine SFS mehr im Sputum detektierbar sind. Unter erfolgreicher Therapie werden DNA-Fragmente im Urin irgendwann nicht mehr nachweisbar. Die Konzentration von DNA-Fragmenten im Urin korreliert nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung.

Das hier beschriebene PCR-Verfahren zur spezifischen Detektion von DNA-Kurzfragmenten (38 bp) von *M. tuberculosis* im Urin von Tuberkulosepatienten wurde in der vorliegenden Arbeit genau evaluiert. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu den Sputum-basierten Referenzmethoden eine Sensitivität von nur <70%.

Auch im Kontext zu den von den WHO-Richtlinien zusammengefassten NAT-Verfahrensklassen (aufgeteilt in Klassen bezüglich ihrer Technologie, Komplexität der Durchführung und Zielstrukturen), welche von der WHO als unterstützenswert im Einsatz zur TB-Diagnostik gewertet werden, fällt unser Test bezüglich der Sensitivität leider ebenfalls vergleichsweise schlecht aus (77). Insbesondere werden dabei Xpert, XpertUltra und Truenat MTB verglichen mit dem mikroskopischen Nachweis der säurefesten Stäbchen als ebenbürtig eingeschätzt bzw. könnten diesen sogar ersetzen. Außerdem werden diese bereits im Einsatz bei Kindern und extrapulmonaler zur Diagnostik empfohlen, wobei die Sensitivität dabei stark vom genutzten Untersuchungsmaterial abhängt (78).

Falsch positive Testergebnisse wurden nicht gefunden. Dennoch wird dieser Test den bisherigen Goldstandard des kulturellen Nachweises von *M. tuberculosis* mit einer Sensitivität von 100% (bei MGIT-Kulturen) nicht ersetzen können.

Erfreulicherweise konnte jedoch durch den Einsatz des trDNA-Nachweisverfahrens in Kombination mit der Sputummikroskopie, die für sich ebenfalls eine diagnostische Sensitivität von ca. 60% aufweist, bei therapienaiven TB Patienten eine Sensitivität von ca. 90% erreicht werden. Dies könnte insbesondere bei Patienten, bei denen keine SFS mikroskopisch im Sputum festgestellt werden können, bei denen dennoch mit hoher klinischer Wahrscheinlichkeit eine pulmonale Tuberkulose vermutet wird, von großem klinischen Nutzen sein. Hier könnte die Verdachtsdiagnose einer Tuberkulose zeitnah anhand von Urinproben bestätigt werden, wobei insbesondere die Schnelligkeit des Vorliegens des Testergebnisses von Vorteil wäre: Während der kulturelle Nachweis im Sputum im Durchschnitt ca. 4-6 Wochen braucht um ein positives Ergebnis anzuzeigen, würde man das Ergebnis des Urinverfahrens in Kombination mit der Mikroskopie noch am selben Tag erhalten. Dies könnte ein deutlicher Vorteil sein, insbesondere um die Indikation des Einsatzes antituberkulöser Medikamente bereits vor Therapiebeginn zu evaluieren.

Zum kulturellen Nachweis einer Tuberkulose kann aufgrund der Vielzahl möglicher Lokalisationen unterschiedliches Probenmaterial verwendet werden: von respiratorischen Materialien (Sputum, Bronchialsekret, BAL) und Magennüchternsekret, über Biopsiematerialien (z.B. von Lymphknoten) bis hin zu Flüssigpunktionen (z.B. Pleurapunktat, Liquor) (79). Nachteil hierbei ist der teilweise hohe Arbeitsaufwand der Probengewinnung, bei der u.a. medizinische Interventionen (wie Bronchoskopie, u.a. Pleura- oder Liquorpunktion oder endoskopische Biopsie-Entnahmen) durch entsprechendes Fachpersonal nötig sind.

Der mikroskopische Erregernachweis erfordert zudem eine hohe Bakterienkonzentration sowie geschultes Laborpersonal. Vor allem die Verfügbarkeit von Sputum variiert aber stark von Patient zu Patient (80), insbesondere bei Kindern ist die Gewinnung meist problematisch oder gar nicht möglich (81,82).

Urin als Untersuchungsmaterial ist im Vergleich deutlich einfacher, schneller und, da weniger aufwendig, sicherer bzw. interventionslos zu erhalten. Entsprechend

konnten auch in vorliegender Studie mehr Urin,- als Sputumproben gesammelt und analysiert werden, was die grundsätzliche Überlegung unterstützt, dass Urin als leicht verfügbares Material für einen Grundlagentest vorteilhafter ist als Sputum. Es gibt zudem bereits andere auf Urin basierende „point of care tests“ (POCT), die für den Nachweis von *M. tuberculosis* und anderer Infektionskrankheiten (z.B. Legionellen-Pneumonie oder Pneumokokken-Pneumonie) zur Verfügung stehen (59,67,83).

In einer Subgruppe von zwei Patienten wurde das neue Testverfahren nicht nur an Urinproben, sondern auch an verfügbaren Plasmaproben durchgeführt. In beiden Fällen gelang der Nachweis von trDNA im Urin und im Plasma. Dies unterstützt unsere Theorie, dass die DNA von *M. tuberculosis* bei infizierten Patienten vom Infektionsort durch die Blutbahn in den Urogenitaltrakt transportiert, von der Niere gefiltert und über den Urin ausgeschieden wird. Interessanterweise konnte die trDNA im Plasma bei beiden Patienten auch noch nachgewiesen werden, nachdem die Ergebnisse der MGIT-Kultur seit mehr als 30 Tagen negativ ausgefallen waren. Möglicherweise ist diese Beobachtung ein Indiz dafür, dass zu diesem Zeitpunkt weiterhin Bakterien oder Bakterienfragmente im Blutkreislauf transportiert werden, die jedoch bereits abgetötet wurden und daher in der Kultur kein Wachstum mehr zeigen konnten. Der Nachweis im Plasma gelang zudem auch noch als die trDNA-Werte im Urin bereits negativ ausfielen, also über den Konversionszeitpunkt hinaus. Dies kann möglicherweise als Hinweis darauf gewertet werden, dass ein natürlicher Abbau der DNA von *M. tuberculosis* im Urin stattfindet, oder dass die Bakterien-DNA durch die Nierenfiltration mechanisch denaturiert wird.

In einer Studie wurde ebenfalls die Möglichkeit des Nachweises mykobakterieller DNA im Plasma untersucht, wobei mittels quantitativer PCR (qPCR) gezeigt werden konnte, dass die DNA im Plasma auch bei fehlender Mykobakteriämie nachweisbar war (84). Während die real-time PCR im Plasma positiv ausfiel, blieben die Blutkulturen negativ. Dies lässt vermuten, dass der Ursprung der nachgewiesenen MTB-DNA nicht von im Blut zirkulierenden Bakterien stammt, sondern lässt auf die Präsenz zellfreier MTB-DNA im Plasma von Patienten mit Tuberkulose schließen, ähnlich wie unsere Beobachtungen. Eingeschlossen wurden in dieser Studie jedoch nur Patienten mit bereits positivem mikroskopischen Nachweis der

Tuberkulosebakterien (84). Zur besseren Vergleichbarkeit wären daher weiterführende Studien interessant, unter anderem Studien, welche TB-negative Kontrollgruppen bzw. Patienten mit bestätigter Infektion, aber negativem Mikroskopienachweis einschließen.

In einer weiteren Studie von J. Yang et al. wurde gezeigt, dass im Vergleich zur real time-PCR die Anwendung einer droplet digital PCR (ddPCR) zum Nachweis von mykobakterieller DNA im Plasma, welche die absolute Quantität der Ziel-DNA misst, indem die Nukleinsäuren in separate Wasser-in-Öl Mikro-Tröpfchen aufgeteilt werden, welche einzeln beurteilt werden, eine deutliche Verbesserung der Sensitivität erreicht. Das Verfahren der ddPCR ist zum einen weniger anfällig gegenüber PCR-Inhibitoren wie Phenol, Ethanol oder EDTA (u.a.) und besitzt zudem Fähigkeit deutlich niedrigere Spiegel mykobakterieller DNA zu detektieren. Weiterer Vorteil der Anwendung von PCR-Verfahren im Plasma ist, dass dabei Patienten mit pulmonaler als auch extrapulmonaler Tuberkulose identifiziert werden können (85).

Ähnlich wie in der in dieser Arbeit verwendeten PCR weisen die Daten anderer Studien also darauf hin, dass die Anwendung von PCR-Verfahren zum Nachweis mykobakterieller DNA auch im Plasma ein vielversprechendes Instrument für die künftige Diagnostik der Tuberkulose und im Therapie-Monitoring spielen könnte, wobei es weiterführende Studien in diesem Bereich bedarf (84,85).

Parallel zur Datensammlung der trDNA-Messwerte wurden zeitgleich auch laborchemische Untersuchungen verschiedener Laborparameter im Serum und mittels Urinstreifen-Analysen („U-stix“) durchgeführt und ausgewertet. Die statistische Auswertung zeigte, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen den im Testverfahren detektierten maximalen trDNA-Werten im Urin und den im Plasma nachgewiesenen Nierenparametern Kreatinin und Serum-Harnstoff oder den im Urin untersuchten spezifischen Urinparametern bestand. Dies unterstützt die These, dass die renale Ausscheidung der *M. tuberculosis*-DNA weitgehend unabhängig von der Nierenfunktion erfolgt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Testverfahrens möglicherweise auch auf Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion angewendet werden könnte. Hierzu müssten Untersuchungen an Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion erfolgen. Außerdem zeigte sich

keine signifikante Korrelation zwischen den maximalen trDNA-Werten und dem Serumspiegel des C-reaktiven Proteins, welches als Entzündungsmarker fungiert, was dafür sprechen könnte, dass der Test auch vom jeweiligen Entzündungsstatus des Patienten nicht beeinflusst wird. Darüberhinaus wurden die maximalen trDNA-Werte mit verschiedenen demographischen Charakteristika der an der Studie teilnehmenden Patienten verglichen. Dabei wurden Parameter wie Geschlecht, Alter, Body-Maß-Index (BMI) oder Raucherstatus auf eine mögliche Korrelation mit den trDNA-Werten untersucht. Auch hier ergab sich kein signifikanter Zusammenhang mit der Höhe der maximalen trDNA-Werte.

Die trDNA-Messwerte wurden im Urin in regelmäßigen Abständen über einen Beobachtungszeitraum von im Median 50 Tagen gemessen. Dabei zeigte sich im Verlauf ein spezifisches Muster unter Therapie: zunächst fand sich ein initialer Anstieg der detektierten trDNA-Werte, der unter Fortführung der Therapie nach dem Erreichen eines Maximalwerts anschließend kontinuierlich bis zum Erreichen des Cut-Offs abfiel.

Der initiale Anstieg der detektierten trDNA nach Therapiebeginn wird als spezifische Antwort auf ein erfolgreiches Therapieansprechen gewertet. Ist die Therapie effektiv, kommt es dabei zu einer vermehrten Abtötung von *M. tuberculosis*, die vermehrt über den Urin ausgeschieden werden. Die steigenden trDNA-Werte spiegeln also die Wirkung der antituberkulösen Medikamente wider. Somit wäre mit vorgestelltem Testverfahren bei aktiver pulmonaler Tuberkulose eine rasche, zeitnahe Evaluation des Therapieansprechens möglich, was insbesondere bei der Therapie resistenter Tuberkulosestämmen von großer Bedeutung sein könnte.

Bei einigen Patienten wurde beobachtet, dass die trDNA nicht nachweisbar war (n=4/11) im Verlauf aber unter Therapie detektiert wurde. Somit ergab sich bei therapienaiven Patienten im Verlauf unter Therapie eine erhöhte Sensitivität von initial 64% auf 96% und in Kombination mit dem mikroskopischen Nachweis von Mykobakterien in der Mikroskopie auf insgesamt 100%. Im Durchschnitt gelang dabei der Nachweis innerhalb der ersten Woche (bzw. im Median bereits an Tag 4 nach Therapiebeginn), aber spätestens innerhalb von 27 Tagen. Das Ergebnis der Kultur erreichte seine maximale Anzahl positiv detektierter Patienten von 100%

dagegen erst innerhalb von 60 Tagen, liegt also beim trDNA-Test wesentlich früher vor. Besonders vorteilhaft ist, dass der Nachweis von trDNA nach unseren Beobachtungen meist bereits in der ersten Woche gelang, wohingegen von der Kultur zu diesem Zeitpunkt noch kein Ergebnis vorlag.

Da die trDNA im Verlauf einer effektiven Therapie rasch positiv wird könnte das Testverfahren also auch als Bestätigungstest der Verdachtsdiagnose Tuberkulose eingesetzt werden. Somit könnte man die Indikation einer antituberkulösen Therapie bei Mikroskopie-negativen Tuberkulosepatienten aber hohem klinischen Verdacht auf eine Erkrankung erhärten, auch wenn vor Therapiebeginn keine trDNA nachwiesen worden war. Der Nachweis von trDNA war im Therapieverlauf bei allen Patienten mit bestätigter pulmonaler Tuberkulose mindestens einmal positiv.

Nach Erreichen des Maximalwerts zeigte sich dann, wie bereits erwähnt, ein kontinuierlicher Abfall der detektierten trDNA-Werte. Dabei erreichten 82% der Testwerte eine endgültige Konversion in Woche 12. Dieser Verlauf deutet auf eine progressive Elimination der Bakterien hin.

Im Vergleich zum trDNA-Test betrug die Konversionsrate der MGIT-Kultur 64% in Woche 11 und die der Sputum-Mikroskopie 64% in Woche 9. Der Zeitpunkt der Konversion der trDNA-Werte tritt also im Vergleich durchschnittlich erst später ein und es wird eine höhere Konversionsrate als bei den sputumbasierten Referenzmethoden erreicht. Der längere Nachweis der trDNA im Urin könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich um die Ausscheidung abgetöteter Bakterien handelt, die länger über den Urin ausgeschieden werden als sie im Sputum vorhanden sind.

Die trDNA-Maximalwerte wurden in der Gruppe der therapienaiven Patienten in Woche 1 und in der Gruppe der Patienten mit bereits begonnener Therapie in Woche 5 erreicht. Wir untersuchten dabei die erreichten Maximalwerte auf einen Zusammenhang mit den quantitativen Ergebnissen des Ralph Scores und fanden dabei eine positive Korrelation. Das heißt, je höher der Ralph Score, der ein quantitatives Maß für die Schwere der Erkrankung darstellt, desto höher waren die

erreichten Maximalwerte der trDNA im Urin. Dies spricht dafür, dass die Höhe der trDNA-Maximalwerte bzw. der Verlauf der DNA-Eliminierung über den Urin das Ausmaß der pulmonalen Erkrankung widerspiegelt.

Bestätigend kommt hinzu, dass sich auch eine positive Korrelation mit der Menge an SFS in der Sputum-Mikroskopie darstellte. Das heißt, je mehr Mykobakterien im Sputum mikroskopisch nachweisbar waren, desto höher fiel der erreichte Maximalwert der trDNA aus und desto ausgeprägter war der infiltrative Befund.

Bei der Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs der trDNA-Maximalwerte und der *Time to Positivity* der Sputumkultur ergaben sich widersprüchliche Aussagen: Während zum einen keine signifikante Korrelation mit der TTP der MGIT-Kultur nachgewiesen werden konnte, zeigte sich zum anderen erwartungsgemäß eine positive inverse Korrelation mit der TTP der LJ-Kultur. Letzteres bedeutet bestätigend: je höher der maximal erreichte trDNA-Wert ausfiel, desto kürzer war die Zeit bis zum positiven Nachweis eines kulturellen Wachstums der LJ-Kultur. Auch das unterstützt die Hypothese, dass der trDNA-Maximalwert das Krankheitsausmaß widerspiegelt, während die fehlende Korrelation der trDNA-Maximalwerte mit der TTP der MGIT-Kultur keinen weiteren Beweis hierfür liefert.

In einer Subgruppe von vier Patienten handelte es sich um eine Erkrankung mit resistenten Tuberkulosestämmen (sogenannte MDR- oder XDR-Tuberkulose). Bei zwei von diesen 4 Patienten (Patienten 12 und 23) trat ein Anstieg der trDNA auf, nachdem das Therapieregime ein zweites bzw. drittes Mal umgestellt worden war. Dies legt die Vermutung nahe, dass nach der medikamentösen Umstellung das neu eingetretene Therapieansprechen im Kurvenverlauf abzulesen ist. Dies hätte möglicherweise einen Effekt auf die medizinische Praxis, da sich hieraus in einem zukünftigen klinischen Einsatz ein relevanter Nutzen des Testverfahrens zur schnellen Evaluation des Therapieansprechens bei multiresistenter Tuberkulose ableiten ließe. Der trDNA-Nachweis könnte sich somit als Instrument in der antituberkulösen Therapie resistenter Stämme erweisen, da innerhalb von zwei Wochen anhand des trDNA-Kurvenverlaufs die Effektivität der medikamentösen Bakterizidität abzuleiten wäre. Somit könnte bei Therapieversagen eine zeitnahe

Umstellung auf ein erweitertes Regime erfolgen, wertvolle Zeit gewonnen werden und das Risiko für die Entstehung neuer Resistenzen minimiert werden.

Bei den anderen beiden Patienten (Patient 19 und Patient 34), bei deren Untersuchungen der trDNA-Höchstwert noch vor Umstellung des Therapieregimes gemessen wurde und bei denen es nach Therapieumstellung zu keinem erneuten Anstieg der trDNA-Werte kam, lag bei einem eine Resistenz gegen Streptomycin, also einem second-line Medikament der antituberkulösen Therapie, vor und bei dem anderen Patient eine Resistenz gegen Isoniazid. Dies könnte möglicherweise den Effekt der jeweils andern 3 verabreichten Medikamente (konkret handelt es sich dabei um RIF, EMB und PZA) widerspiegeln, gegen die sich das Bakterium sensible zeigte und die daher wohl ausreichend gewirkt haben müssen.

Wie bereits oben erwähnt gibt es möglicherweise besondere Patientengruppen, bei denen der Nachweis von trDNA im Urin für die Diagnose einer pulmonalen Tuberkulose von besonders großem Nutzen sein könnte. Hierzu zählen unter anderem Kinder, da bei ihnen der Urin leicht verfügbar ist und andererseits Sputum als Probenmaterial nur schwer gewonnen werden kann (81,82). Zu den Patientengruppen für die der trDNA-Nachweis von besonderem Nutzen ist, zählen aber auch Fälle mit extrapulmonaler Tuberkulose, da hier keine Mykobakterien im Sputum vorhanden sind. Somit könnte bei diesen Patienten gegebenenfalls auf aufwendige Interventionen zur Materialgewinnung verzichtet werden, da der Nachweis auch bei dieser Patientensubgruppe über den Urin möglich wäre. Um dies zu beweisen müssten allerdings weiterführende Studien mit einem entsprechenden Patientenkollektiv folgen. Auch bei Vorliegen einer paucibacillären Infektion könnte der Einsatz des trDNA-Verfahrens von besonderem Nutzen sein. Paucibacilläre Infektionen sind meist nicht durch die sputumbasierte Mikroskopie nachweisbar, da nicht genug Bakterien für den mikroskopischen Nachweis vorhanden sind (53). Somit entfällt bei dieser Gruppe ein wichtiges Instrument der Diagnostik. Da der Nachweis der trDNA aber unabhängig von der absoluten Bakterienlast zu funktionieren scheint (keine signifikante Korrelation zwischen trDNA und Mikroskopie-Ergebnis bei therapienaiven Patienten) könnte der trDNA-Test in diesen Fällen die Mikroskopie ggf. als gleichwertig ersetzen.

Zunächst ist festzuhalten, dass die Mehrzahl der veröffentlichten Daten zum Einsatz bereits existierender trDNA-Verfahren Patienten betrifft, die zusätzlich zur Tuberkuloseerkrankung HIV-positiv waren, was die Vergleichbarkeit bisheriger Studienergebnisse mit unserem Patientenkollektiv beeinträchtigen könnte (86).

In der 2015 erschienenen Metaanalyse wurden aus 8 Studien mit insgesamt 1212 Teilnehmern die Studienergebnisse bereits existierender PCR-Verfahren im Urin zur Detektion von *M. tuberculosis* - DNA zusammengefasst (70). Dabei handelte es sich um Daten, die zwischen 1993 und 2013 erhoben worden sind. Von den 1212 Studienteilnehmern waren 605 Patienten an aktiver pulmonaler Tuberkulose erkrankt. Die übrigen 607 Teilnehmer waren entweder gesund oder Kultur-negativ.

In Zusammenschau der Befunde zeigte sich eine durchschnittliche Sensitivität der getesteten PCR-Verfahren von 55% und eine Spezifität von 94%. Im Vergleich dazu ist die Performance unseres Testverfahrens mit einer Sensitivität von 64% und einer Spezifität von 100% also deutlich besser.

In der Auswertung der Meta-Analyse zeichnete sich ab, dass eine jeweils verbesserte Sensitivität insbesondere auf drei Parameter zurückgeführt werden konnte: 1) die Verwendung einer Aufbewahrungstemperatur von unter -70°C (Sensitivität von 71% vs. 35% bei einer Aufbewahrungstemperatur von >.70°C), 2) eine langsamere Zentrifugation von <5.000 rpm (Sensitivität von 61% vs. 17%) und 3) die Zielsequenz *IS6110* (Sensitivität von 70% vs. 33% bei Verwendung der Zielsequenz *rpoB*) (70).

Auch die Spezifität schien durch drei Parameter positiv beeinflusst worden zu sein: 1) eine schnellere Zentrifugation von >5.000 rpm (diese erzielte eine Spezifität von 99% vs. 93% bei einer Zentrifugation von <5.000 rpm), 2) das Verwerfen des Urinüberstands (Spezifität von 98% vs. 92%) sowie 3) die Verwendung der Zielsequenz *rpoB* (Spezifität von 99% vs. 94%) (70).

Im Vergleich hierzu verwendeten wir in unserem trDNA-Assay eine Aufbewahrungstemperatur von -80°C und ebenfalls die Zielsequenz *IS6110*, was

verglichen mit den Daten aus der Metaanalyse für eine besonders hohe Sensitivität sorgen sollte.

Variable Parameter, die den Test nicht beeinflussten oder die zu heterogen waren um ihren Einfluss miteinander vergleichen bzw. analysieren zu können waren unter anderem: die verwendete Urinmenge, die Urinfraktion (Anfangs-, Mittel- oder Endstrahlurin), die Aufbewahrungszeit sowie Zusätze wie beispielsweise EDTA oder die Qualität der DNA-Extraktion. Insgesamt scheint es zielführend zu sein, den spezifischen Einfluss dieser Parameter zu eruieren (bzw. ggf. positiv zu verändern) um die international mitgeteilte und auch in der eigenen Studie gefundene bisher mäßige Sensitivität der trDNA-Diagnostik zu verbessern. Für diese Überlegungen spricht auch das vergleichsweise gute Abschneiden der Sensitivität in unserer Studie in der eine niedrigere Aufbewahrungstemperatur von -80°C und die Zielstruktur *IS6110* verwendet wurden.

Auch in den Subgruppen der im Rahmen der Meta-Analyse untersuchten Patienten zeigten sich Unterschiede in Bezug auf die Sensitivität und Spezifität der trDNA-Diagnostik. Diese sind in **Tabelle 6** unseren Studienergebnissen übersichtlich gegenübergestellt.

Tabelle 6: Sensitivität und Spezifität der trDNA-Diagnostik. Vergleich der Ergebnisse internationaler Studien mit den eigenen Ergebnissen

	Sensitivität international	Sensitivität eigene Studie	Spezifität international	Spezifität eigene Studie
Random effect model*	47%	keine Daten	89%	keine Daten
Health control data **	67%	64%	99%	100%
Durchschnitt allgemein	55%	64%	94%	100%
Mikroskopie negativ	46%	75%	98%	100%
Mikroskopie positiv	53%	50%	96%	100%
HIV-positiv	59%	keine Daten	98%	keine Daten

* (also: Sputum Kultur + und -)

** (also: Sputum Kultur + und gesundes Kollektiv ohne vorliegender Sputumprobe)

Insgesamt war die diagnostische Wertigkeit der Tests also etwas besser bei HIV-positiven Patienten und bei Patienten mit einem positiven Mikroskopie-Nachweis (87–90). Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass der Test umso sensitiver ist, je höher die Bakterienlast bzw. je schwerer das Erkrankungsausmaß sind.

Die Spezifität war in allen Studien hoch, egal ob der kulturelle Nachweis negativ ausfiel oder ob es sich um gesunde Kontrollen handelte bei denen keine Sputumprobe vorlag (Gesunde können kaum Sputum produzieren (91)). In einer der Studien waren außerdem in die Kontrollgruppe Patienten mit einer latenten Tuberkuloseinfektion einbezogen worden (92). Auch dabei zeigte sich erwartungsgemäß eine hohe Spezifität, das PCR-Verfahren im Urin detektiert also wie gewünscht nur Patienten mit aktiver pulmonaler Tuberkulose.

Die einfache und sichere Gewinnung von Urin ist für einen POCT von großem Vorteil. Außerdem zeichnet sich Urin im Gegensatz zu Sputum für das betroffene Gesundheitspersonal durch ein deutlich niedrigeres Infektionsrisiko während der Probengewinnung aus. Das PCR-Verfahren aus Urin kann daher als POCT in jedem Haushalt und in jeder Gemeinde angewendet werden.

In den bisherigen Studien bestätigt sich auch die Vermutung, dass die DNA von *M. tuberculosis* durch die Niere gefiltert und über den Urin ausgeschieden wird. Die Annahme, dass Morgenurin mehr *M. tuberculosis* DNA enthält als der tageszeitlich später entnommene Urin war nicht zu verifizieren.

Anzumerken ist, dass in den bisher veröffentlichten Studien ausschließlich Erwachsene über 16 Jahre (genauer: in einer Altersspanne von 28-48 Jahren) und keine Kinder getestet wurden. Doch gerade für diese könnte der PCR-Nachweis von *M. tuberculosis* im Urin von besonders großem Nutzen sein, da diese oft zu keiner Sputumproduktion fähig sind und es sich bei Kindern und Jugendlichen oft um paucibacilläre Erkrankungen handelt.

Aufgrund publizierter Studien gilt die Annahme, dass sich das Hinzufügen von EDTA unabhängig von der Aufbewahrungstemperatur positiv auf die Genauigkeit

des PCR-Tests auswirkt (93,94). Um dies zu bestätigen sind jedoch weiterführende Studien nötig. Eine erhöhte Sensitivität der PCR-Verfahren durch Urinkonzentrierung mittels Zentrifugation und Einfrieren der Probe vor DNA-Extraktion zeigte sich beispielsweise für PCR-Verfahrensnachweise von Schistosomiasis (95). Ob diese Beobachtung auch auf den PCR-Nachweis von aktiver pulmonaler Tuberkulose zu übertragen ist müsste ebenfalls in weiteren Studien untersucht werden.

Seit 2013 kommt es nach Empfehlung der WHO zu einem weit verbreiteten Einsatz des GeneXpert (Xpert, Cepheid, USA) in Ländern mit hoher Tuberkuloseprävalenz (sogenannter „high-burden TB countries“) (96,97). Da der Xpert auf dem Nachweis des *rpoB*-Gens beruht und nicht die Zielstruktur *IS 6110* verwendet und vor allem bei Kindern eine niedrige Sensitivität von nur 51-81% aufweist (98) wurde der Xpert MTB/RIF Ultra entwickelt, welcher nun seit 2017 nach Empfehlung der WHO im Einsatz ist. Dieser neue Assay berücksichtigt die zwei verschiedenen Zielstrukturen *IS 6110* und *IS 1081*, verwendet eine verbesserte Assay-Zusammensetzung und ist mit einer größeren Reaktionskammer ausgestattet. Der Xpert MTB/RIF Ultra Assay zeigt laut einer Meta-Analyse von 2020 in 16 darin eingeschlossenen Studien eine alles in allem bessere Sensitivität in der Diagnostik als der Xpert MTB/RIF (88,1% vs. 72,5%), jedoch auf Kosten einer etwas niedrigeren Spezifität im Vergleich (96,2% vs. 98,9%). Dabei ist jedoch anzumerken, dass die Leistungsfähigkeit in Abhängigkeit von den jeweils untersuchten Settings (u.a. HIV-Koinfektion, mikroskopisch gelungener Nachweis der Mykobakterien, Alter u.v.m.) und je nach verwendeten Untersuchungsmaterialien (Urin, Plasma, Liquor, Pleuraflüssigkeit u.a.) stark variierte (46).

Im Vergleich mit den ELISA-Nachweisverfahren von LAM im Urin zeigt sich auch bei LAM eine höhere Sensitivität in der Subgruppe der HIV-positiven Patienten (insbesondere wenn die Zellzahl der CD4-positiven Zellen unter 200 Zellen/ μ l liegt (99)). Der PCR-Nachweis ist jedoch unabhängig von einer Ko-Infektion in jedem Fall besser in der Genauigkeit (LAM Sensitivität 28-66%, Spezifität: 66-98 %). Der neu entwickelte Urin-basierte Fuji-LAM-Assay zeigt im Vergleich hierzu jedoch eine bessere Sensitivität von durchschnittlich 70,4%. In einer Subgruppe von HIV-

positiven Patienten mit einer CD4-Zellzahl von $<100/\mu\text{l}$ wurde dabei die bestmögliche Sensitivität von 81% erzielt. Die Spezifität blieb dabei vergleichbar mit der des Vorgänger Modells AlereLAM mit durchschnittlich 90,8% (59). Die WHO empfiehlt insgesamt stark den Einsatz dieser Verfahren zur Erstdiagnose einer TB bei HIV-positiven Patienten. Nachteil ist jedoch, dass diese Verfahren bisher keine Resistenztestung durchführen können und bisher auch nicht zum Monitoring eingesetzt wurden (100).

Ein weiterer zusätzlicher Nutzen der PCR-Verfahren ist zudem die Möglichkeit einer gleichzeitigen Resistenztestung im Gegensatz zur Nachweismethode von LAM, bei der keine Differenzierung zwischen einer medikamentenresistenten und medikamentensensiblen Tuberkulose möglich ist (69). Ein Nachteil hingegen ist, dass die PCR-Verfahren deutlich teurer sind als die Nachweisverfahren von LAM. Weitere Analysen zeigen zudem, wie man durch die Kombination der LAM-Nachweisverfahren mit PCR-Verfahren nach bestimmten Algorithmen ebenfalls deutlich Kosten sparen kann, als durch den alleinigen Einsatz der PCR-Methoden (101–103).

Wahrscheinlich größter Kritikpunkt an der vorliegenden Studie ist die insgesamt geringe Anzahl teilnehmender Patienten. Um die wertvollen Hinweise und Schlussfolgerungen aus speziellen Fragestellungen für den künftigen Einsatz der trDNA statistisch zu erhärten, wäre es daher wünschenswert weiterführende Studien mit größeren Patientenzahlen durchzuführen. So können beispielsweise noch keine belastbaren Aussagen über die Bedeutung des trDNA-Assays bei multiresistenten Tuberkuloseerregern getroffen werden. Bei dem in unserem Patientenkollektiv erfassten Subkollektiv zeichnete sich zwar eine Tendenz ab, welche die Vermutung nahelegt, dass eine signifikante Aussagekraft bezüglich der Evaluation des Therapieansprechens besteht. Auch in diesem Fall handelt es sich jedoch um nur vier Patienten mit MDR- oder XDR-Resistenzmustern, so dass weiterführende Studien mit einer entsprechend höheren Fallzahl dringend notwendig sind, wobei eine weiterführende Studie unserer Gruppe zu diesem Thema bereits Hinweise dafür erbringt, dass es bei Infektionen mit multiresistenter Tuberkulose kein spezifisches Muster des trDNA-Spiegel-Verlaufs während des

Follow Ups gibt (104). Auch konnte keine Korrelation zwischen den trDNA-Spiegeln und dem Rückgang der bakteriellen Last im Sputum nachgewiesen werden. Obwohl die trDNA innerhalb der ersten 2 Wochen nach Therapiebeginn nachgewiesen werden konnte zeigte sich im Vergleich zur TTP und dem mikroskopischen Nachweis keine Verbesserung der Charakterisierung der frühen bakteriziden Wirkung der im Therapie-Regimen angewendeten Medikamenten. Auch die zusätzliche Anwendung von trDNA mit TTP und Mikroskopie verbesserte die Aussagekraft der Messungen bezüglich der Medikamentenaktivität ebenfalls nicht. Dennoch dient diese weiterführende Studie als *proof of principle*, dass trDNA Messungen insbesondere bei extrapulmonaler TB und bei Kindern, also in Situationen in denen keine Sputumproben zur Verfügung stehen, ein hilfreiches Werkzeug in der Diagnostik der TB sein könnten (104). Es wären allerdings dennoch weitere Studien interessant, welche einen möglichen Nutzen des Nachweises von trDNA im Urin im Monitoring von Therapieumstellungen im Falle multiresistenter TB untersuchen.

Als weiterer Kritikpunkt vorliegender Studiendurchführung ist anzuführen, dass die Probensammlung teilweise nur lückenhaft vorliegt. Zum Teil wurde mit der Sammlung von Probenmaterial erst nach Therapiebeginn begonnen oder sie wurde nicht über den gesamten Beobachtungszeitraum von mindestens 50 Tagen durchgeführt. Ein Teil der spezifischen Fragestellungen konnte daher nicht auf das gesamte Patientenkollektiv angewendet werden, sondern nur auf kleinere Subgruppen von 4 bis 11 Patienten bei denen die für die Beantwortung der Fragestellung erforderliche Probensammlung vollständig vorlag. Auch hier wären der Vollständigkeit halber weiterführende Studien mit einer konsequenteren bzw. regelmäßigen Probensammlung wünschenswert.

Der Assay könnte außerdem bei Patienten unterschiedlicher ethnischer Herkunft oder bei Patienten mit Koinfektionen (z.B. HIV) unterschiedliche Bedeutungen haben, da die trDNA-Ausscheidung durch diese Faktoren möglicherweise biologisch beeinflusst wird. Diese demographischen Daten wurden in unserer Studie nicht ausgewertet, bzw. waren bei unserem Patientenkollektiv teilweise nicht gegeben (z.B. waren alle Patienten HIV-negativ).

Frühzeitige, effiziente und kostengünstige Methoden für den Diagnosenachweis der Tuberkulose werden dringend gebraucht, um einem effektiven Management von Tuberkulosepatienten gerecht zu werden und damit die Übertragung und somit Ausweitung der infektiösen Erkrankung zu unterbrechen. Dies gilt vor allem für Gebiete und Länder, in denen die finanziellen und sozialen Ressourcen besonders limitiert bzw. derzeit noch nicht gegeben sind (105). Außerdem wäre es wünschenswert weitere Studien durchzuführen, welche die PCR-Methode angewandt im Plasma weiter untersuchen und auswerten, da gezeigt werden konnte, dass die trDNA im Plasma länger detektierbar bleibt und nicht wie ggf. im Urin denaturiert.

Im Rahmen der Erstdiagnostik der aktiven Tuberkulose könnte der vorgestellte trDNA-Assay aufgrund des leicht zugänglichen Probenmaterials Urin ein attraktiver diagnostischer Marker für Patienten mit paucibacillärer Erkrankung oder extrapulmonaler Tuberkulose sein. Außerdem könnte er ein vielversprechendes Diagnostikum für Kinder darstellen, die kaum Sputum produzieren können (106). Unter genannten Umständen wäre eine Sensitivität von 64% immer noch besser als die Aussagekraft der sputumbasierten Methoden wie der mikroskopischer Nachweis der Tuberkulosebakterien oder Kulturbefruchtung (106).

Auch im Therapieverlauf könnte der trDNA-Assay als bestätigende Diagnostik während einer „Therapie auf Verdacht“ eingesetzt werden: besteht trotz mikroskopisch negativer und noch ausstehender kultureller Ergebnisse weiterhin ein dringender Verdacht auf Tuberkulose, wird unter klinischen Umständen meist bereits prophylaktisch mit einer medikamentösen antituberkulösen Therapie begonnen. Da der trDNA-Assay eine Sensitivität von 95% nach Therapiebeginn und sein Nachweismaximum bereits nach 27 Tagen (statt 60 Tagen bei der Sputumkultur) erreicht, könnte mit dieser Differentialindikation gegebenenfalls eine weitere unnötige Einnahme von nebenwirkungsreichen antituberkulösen Medikamenten vermieden werden. Die potentiellen klinischen Indikationen für den trDNA-Assay sind in **Tabelle 7** zusammenfassend aufgeführt.

Tabelle 7: Potentielle Indikationen für den trDNA-Test bei klinischem Verdacht auf Lungentuberkulose

Sputumbefund	trDNA indiziert	Einsatz bei:
Mikroskopisch negativ	wenn trotzdem klinischer Verdacht	Paucibacillärer Tuberkulose Extrapulmonaler Tuberkulose
Sputum nicht vorhanden (oder nicht repräsentativ)	immer	Kindertuberkulose (kein Sputum?) Mangelnder Kooperation (Demenz, Sprachschwierigkeiten etc.) Fehlendem Hustenstoß (Koma, Intensivpatienten etc.)
Mikroskopisch positiv	bei Verdacht auf falsch positiven Befund	nichttuberkulöser Mykobakteriose, unsicherer Befundbewertung im Labor

Über den Einsatz zur Diagnosestellung hinaus könnte der trDNA-Assay einen interessanten Marker für ein individuelles Monitoring antituberkulöser Therapien darstellen, da er im Falle einer medikamentensensiblen Tuberkulose schnell auf ein neu begonnenes Therapie-Regime reagiert (107,108). Interessant wäre es in diesem Zusammenhang, in weiteren Studien zu untersuchen, ob sich die Vermutung bestätigt, dass es auch sichtbare Veränderungen in der trDNA-Ausscheidungskurve gibt, wenn die bestehende Therapie aufgrund von fehlendem Ansprechen umgestellt wird. Dies könnte insbesondere bei multiplen Resistenzmustern dazu dienen, die Wirksamkeit umgestellter Therapie-Regime frühzeitig zu beurteilen. Auch hierzu wären weitere Studien mit größeren Zahlen von MDR-/XDR- Patienten wünschenswert.

Allerdings ist insgesamt auch zu bedenken, dass die hohe Stabilität von DNA dazu führen könnte, dass die Quantität viabler Erreger überschätzt werden könnte, wodurch ggf. Therapien unnötig lang weitergeführt werden oder zusätzliche Medikamentenklassen eingesetzt werden, welche zu keinem Mehrnutzen führen (53).

Von Interesse wäre auch, ob im Verlauf der trDNA-Kurve Pausen oder Abbrüche der Therapie erkannt werden können. Die hierzu nötige Untersuchung wäre allerdings aus ethischer Sicht nicht vertretbar und könnte nur im Einzelfall, z.B. bei

non-Compliance oder bei Therapieabbrüchen aufgrund zu hoher Nebenwirkungen durch die Medikamente beobachtet werden. Sollte sich die Hypothese bestätigen, dass sich Therapiepausen in der Urinkinetik widerspiegeln, könnte dies zum Nachweis einer mangelnden Patienten-Compliance eingesetzt werden und eine direkte Kontrolle der Medikamenteneinnahme (DOTS – *direct observed therapy*) entbehrlich machen. Die potentiellen Indikationen für den trDNA-Assay hinsichtlich des Therapieverlaufs sind in **Tabelle 8** dargestellt.

Tabelle 8: Potentielle Indikationen für den trDNA-Test unter antituberkulöser Therapie

Sputumbefund	trDNA indiziert	Aussagekraft
Mikroskopisch negativ	wenn weiterhin klinischer Verdacht	Bestätigung der Diagnose Tuberkulose, wenn der trDNA-Test im Verlauf positiv wird (vor Sputumkulturergebnissen vorhanden)
Mikroskopisch positiv	bei fehlendem Therapieansprechen	Ausschluss von Resistenzen oder Therapie-Abbrüchen, NTMs

E. Zusammenfassung

Einleitung: Trotz neuester Fortschritte im Bereich der Molekulardiagnostik bleiben die Identifikation von Patienten mit mikroskopisch negativer Tuberkulose sowie das Monitoring des Therapieerfolges eine Herausforderung im Kampf gegen die Tuberkulose.

Methodik: In vorliegender Arbeit wird ein verbessertes molekulares Verfahren zur Detektion von *Mycobacterium tuberculosis*-DNA in Urin mittels PCR (trDNA-Test) vorgestellt und hinsichtlich seines klinischen Nutzens und seiner Wertigkeit zur Diagnosestellung und zum Therapiemonitoring der Tuberkulose evaluiert.

Ergebnisse: Der trDNA-Test konnte eine Tuberkulose mit einer Sensitivität von 64% und einer Spezifität von 100% im Urin diagnostizieren. Durch den kombinierten Einsatz von Sputum-Mikrobiologie (genauer: dem mikroskopischen Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis*) und trDNA-Methode erhöhte sich die Sensitivität auf 91%. Nach Therapiebeginn nahm die trDNA-Konzentration über die Zeit signifikant ab bis zu einem nicht detektierbarem Wert in Woche 12 bei 9 von 11 Patienten (82%). Bei Therapie-naiven Patienten zeigten sich niedrige Basis-Werte der trDNA, welche innerhalb einer Woche auf ihren Maximalwert anstiegen. Die Maximalwerte der trDNA korrelierten positiv mit einem radiologischen Score als auch mit dem mikroskopischen Smear-Grad. Korrespondierende Proben zeigten auch eine inverse Korrelation zwischen der „time to positivity“ (TTP) der Festkultur und den maximalen trDNA-Werten. Der Test ist außerdem unabhängig von der Nierenfunktion oder dem Entzündungszustand des Patienten.

Schlussfolgerungen: Der Verlauf der trDNA-Ausscheidung im Urin weist auf eine bakterizide Wirkung der antituberkulösen Medikation durch den Beginn einer effektiven Therapie hin. Dieses zeitnahe Feedback könnte wertvoll in der Evaluation neuer Medikamente sein, insbesondere bei vorhandenen Resistenzen. Zudem kann der Test für ein individualisiertes Tuberkulosetherapie-Monitoring in Betracht gezogen werden. Der trDNA-Maximalwert korreliert dabei mit dem Ausmaß der pulmonalen Erkrankung zu. Urin als leicht zugängliches Probenmaterial verspricht außerdem großen Nutzen in Fällen, in denen kein Sputum gewonnen werden kann, insbesondere für die Diagnostik bei Kindern und Patienten mit extrapulmonaler Tuberkulose (109-112). Als POCT-Test besteht außerdem der Vorteil einer patientennahen Versorgung, die weitgehend Untersucher-unabhängig, einfach und sicher reproduzierbar und wenig fehleranfällig ist (113).

F. Literaturverzeichnis

1. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Coronavirus (COVID-19) dashboard [website]. Geneva: World Health Organization. [zitiert 3. Dezember 2021]. Verfügbar unter: <https://covid19.who.int/>.
3. United Nations – Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019): World Population Prospects: The 2019 Revision.
4. Hauer B, Fiebig L, Brodhun B, Rexroth U, Haas W. Aktuelle Epidemiologie der Tuberkulose weltweit, in Europa und in Deutschland. Pneumol. 1. Februar 2014;11(1):10–20.
5. Brodhun B, Altmann D, Hauer B, Haas W. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2019 [Internet]. Robert Koch-Institut; 2020 Sep [zitiert 3. Dezember 2021]. Verfügbar unter: <https://edoc.rki.de/handle/176904/6987>
6. Robert Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin: Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. Robert Koch-Institut, Berlin; 2020(11):3-30.
7. Othmer JT, Schönfeld N, Häcker B, Otto-Knapp R, Bauer TT. Migration und Tuberkulose. Pneumologie. 30. August 2018;72(09):644–59.
8. Bauer T, Häcker B, Otto-Knapp R, Trost C. Welttuberkulosekongress 2021: Infektionskontrolle gestern und heute – 125 Jahre Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose (DZK. 18. März 2021 [zitiert 3. Dezember 2021]; Verfügbar unter: <https://edoc.rki.de/handle/176904/7919>
9. Hoffmann H, Hofmann-Thiel S, Königsstein B, Morresi-Hauf A, Neher A, Schlag R. Tuberkulosedagnostik mit modernen Mitteln. 1. Aufl. Bremen: UNI-MED Verlag AG; 2015. 91 S.
10. Robert Koch-Institut. RKI-Ratgeber: Tuberkulose. Robert Koch-Institut, Berlin; 2013.
11. Fuehner T, Stoll M, Bange FC, Welte T, Pletz MW. Klinik der Lungentuberkulose. Pneumol. 1. Mai 2007;4(3):151–62.
12. Köhler W, Eggers H J, Fleischer B et.al. Medizinische Mikrobiologie. 8. Aufl. München/Jena: Urban & Fischer Verlag; 2001. 944 S.

13. Ringshausen FC, Rademacher J. Lungenerkrankung durch nichttuberkulöse Mykobakterien. Internist. 1. Februar 2016;57(2):142–52.
14. Johnson M, Odell J. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. J Thorac Dis. 1. März 2014;6:210–20.
15. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Herausgeber. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier; 2010. 2 S.
16. Fennelly K, Jones-Lopez E. Quantity and Quality of Inhaled Dose Predicts Immunopathology in Tuberculosis. Front Immunol. 29. Juni 2015;6:313.
17. Diel R, Loytved G, Nienhaus A, Castell S, Detjen A, Geerdes-Fenge H, u. a. Neue Empfehlungen für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose. Pneumologie. Juni 2011;65(06):359–78.
18. Ziegler R, Just H-M, Castell S, Diel R, Gastmeier P, Haas W, u. a. Infektionsprävention bei Tuberkulose - Empfehlungen des DZK. Pneumologie. Mai 2012;66(05):269–82.
19. Pareek M, Greenaway C, Noori T, Munoz J, Zenner D. The impact of migration on tuberculosis epidemiology and control in high-income countries: a review. BMC Med. 23. März 2016;14(1):48.
20. Lönnroth K, Migliori GB, Abubakar I, D'Ambrosio L, de Vries G, Diel R, u. a. Towards tuberculosis elimination: an action framework for low-incidence countries. Eur Respir J. April 2015;45(4):928–52.
21. Mack U, Migliori GB, Sester M, Rieder HL, Ehlers S, Goletti D, u. a. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis? A TBNET consensus statement. Eur Respir J. 1. Mai 2009;33(5):956–73.
22. Esmail H, Barry C, Young D, Wilkinson R. The ongoing challenge of latent tuberculosis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 19. Juni 2014;369:20130437.
23. Herzmann C, Dallenga T, Kalinke U. Pulmonale Immunität bei Tuberkulose. Pneumologie. Juli 2018;72(07):493–502.
24. Braun J, Müller-Wieland D. Basislehrbuch Innere Medizin: kompakt-greifbar-verständlich. 6. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag; 2018. 426–433 S.
25. Hunter RL. The Pathogenesis of Tuberculosis: The Early Infiltrate of Post-primary (Adult Pulmonary) Tuberculosis: A Distinct Disease Entity. Front Immunol. 2018;9:2108.

26. Thomas C, Büttner R, Hagedorn M, Moll R, Ramaswamy A, Rüschoff J. Histopathologie kompakt: Kursbuch der Allgemeinen und Speziellen Histopathologie. 1. Aufl. Stuttgart: Schattauer GmbH; 2003. 200 S.
27. Flick H, Wurzinger G. Lungentuberkulose. Pneumol. 1. Juli 2013;10(4):275–94.
28. Sia IG, Wieland ML. Current Concepts in the Management of Tuberculosis. Mayo Clin Proc. April 2011;86(4):348–61.
29. Kalsdorf B, Strassburg A, Greinert U, Lotz J, Lange C. Klinik und Diagnose der Tuberkulose. Pneumologie. Mai 2008;62(5):284–94.
30. Desalu O, Adeoti A, Fadeyi A, Salami K, Fawibe A, Oyedepo O. Awareness of the Warning Signs, Risk Factors, and Treatment for Tuberculosis among Urban Nigerians. Tuberc Res Treat. 1. Januar 2013;2013:369717.
31. Campbell IA, Bah-Sow O. Pulmonary tuberculosis: diagnosis and treatment. BMJ. 20. Mai 2006;332(7551):1194–7.
32. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, u. a. Tuberculosis. Nat Rev Dis Primer. 27. Oktober 2016;2(1):16076.
33. Vollmer E, Goldmann T. Pathologie und Diagnose der Lungentuberkulose sowie nichttuberkulöser Mykobakterien. Pneumol. 1. September 2011;8:301–5.
34. Siemon G. Extrapulmonale Tuberkulosen. Pneumol. 1. Mai 2007;4(3):163–74.
35. Rüschoff-Gerdes S, Hillemann D. Moderne mykobakteriologische Labordiagnostik. Pneumologie. September 2008;62(09):533–40.
36. Desikan P. Sputum smear microscopy in tuberculosis: Is it still relevant? Indian J Med Res. 1. März 2013;137:442–4.
37. Matthys H, Seeger W. Klinische Pneumologie. Springer Verlag; 2013. 770 S.
38. Perkins MD, Cunningham J. Facing the crisis: improving the diagnosis of tuberculosis in the HIV era. J Infect Dis. 15. August 2007;196 Suppl 1:S15-27.
39. Richter E, Beer J, Diel R. MIQ 05: Tuberkulose Mykobakteriose. In: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. 2. Aufl. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2010. 86 S.

40. Ramos S, Gaio R, Ferreira F, Leal JP, Martins S, Santos JV, u. a. Tuberculosis in children from diagnosis to decision to treat. *Rev Port Pneumol*. Dezember 2017;23(6):317–22.
41. Brent AJ, Mugo D, Musyimi R, Mutiso A, Morpeth SC, Levin M, u. a. Bacteriological diagnosis of childhood TB: a prospective observational study. *Sci Rep*. 18. September 2017;7(1):11808.
42. Wei Z, Zhang X, Wei C, Yao L, Li Y, Zhang X, u. a. Diagnostic accuracy of in-house real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 8. August 2019;19(1):701.
43. Polymerase-Kettenreaktion. In: Wikipedia [Internet]. 2021 [zitiert 4. Dezember 2021]. Verfügbar unter: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Polymerase-Kettenreaktion&oldid=217006112>
44. Krause G, Scherer G, Müller M, Weiß T. Grundlagen der Polymerasekettenreaktion (PCR) [Biomonitoring Methods in German language, 2004]. In: The MAK-Collection for Occupational Health and Safety [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2012 [zitiert 4. Dezember 2021]. S. 321–55. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/3527600418.bipcrbasicd0016>
45. Luetkemeyer AF, Firnhaber C, Kendall MA, Wu X, Mazurek GH, Benator DA, u. a. Evaluation of Xpert MTB/RIF Versus AFB Smear and Culture to Identify Pulmonary Tuberculosis in Patients With Suspected Tuberculosis From Low and Higher Prevalence Settings. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1. Mai 2016;62(9):1081–8.
46. DiNardo AR, Lange C, Mandalakas AM. Editorial Commentary: 1, 2, 3 (Years) ... and You're Out: The End of a 123-year Historic Era. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1. Mai 2016;62(9):1089–91.
47. Burkardt HJ. Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin Chem Lab Med*. Februar 2000;38(2):87–91.
48. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis*. Juni 2004;4(6):337–48.
49. Bacich DJ, Sobek KM, Cummings JL, Atwood AA, O'Keefe DS. False negative results from using common PCR reagents. *BMC Res Notes*. 27. Oktober 2011;4(1):457.

50. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* November 2012;113(5):1014–26.
51. Hillemann D, Richter E, Andres S, Rüscher-Gerdes S. Fortschritte in der bakteriologischen und molekularen Diagnostik der Tuberkulose. *Pneumol.* 1. Februar 2014;11.
52. World Health Organization. WHO meeting report of a technical expert consultation: non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF ultra compared to Xpert MTB/RIF [Internet]. World Health Organization; 2017 [zitiert 4. Dezember 2021]. Report No.: WHO/HTM/TB/2017.04. Verfügbar unter: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254792>
53. Dorman SE, Schumacher SG, Alland D, Nabeta P, Armstrong DT, King B, u. a. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis.* Januar 2018;18(1):76–84.
54. Zhang M, Xue M, He J-Q. Diagnostic accuracy of the new Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculosis disease: A preliminary systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* Januar 2020;90:35–45.
55. Cepheid | Cepheid | TB Drug-Resistance Testing | Xpert MTB-XDR [Internet]. [zitiert 4. Dezember 2021]. Verfügbar unter: <https://www.cepheid.com/en/tests/Critical-Infectious-Diseases/Xpert-MTB-XDR>
56. Desikan P, Panwalkar N, Mirza SB, Chaturvedi A, Ansari K, Varathe R, u. a. Line probe assay for detection of Mycobacterium tuberculosis complex: An experience from Central India. *Indian J Med Res.* Januar 2017;145(1):70–3.
57. Feuerriegel S, Kohl TA, Utpatel C, Andres S, Maurer FP, Heyckendorf J, u. a. Rapid genomic first- and second-line drug resistance prediction from clinical Mycobacterium tuberculosis specimens using Deeplex-MycTB. *Eur Respir J.* Januar 2021;57(1):2001796.
58. Hamasur B, Bruchfeld J, Haile M, Pawlowski A, Bjorvatn B, Källénus G, u. a. Rapid diagnosis of tuberculosis by detection of mycobacterial lipoarabinomannan in urine. *J Microbiol Methods.* Mai 2001;45(1):41–52.
59. Bulterys MA, Wagner B, Redard-Jacot M, Suresh A, Pollock NR, Moreau E, u. a. Point-Of-Care Urine LAM Tests for Tuberculosis Diagnosis: A Status Update. *J Clin Med.* 31. Dezember 2019;9(1):E111.

60. Benjamin A, Cavalcante SC, Jamal LF, Arakaki-Sanchez D, de Lima JN, Pilotto JH, u. a. Accuracy of Determine TB-LAM Ag to detect TB in HIV infected patients associated with diagnostic methods used in Brazilian public health units. *PloS One*. 2019;14(9):e0221038.
61. Huerga H, Rucker SCM, Bastard M, Dimba A, Kamba C, Amoros I, u. a. Should Urine-LAM Tests Be Used in TB Symptomatic HIV-Positive Patients When No CD4 Count Is Available? A Prospective Observational Cohort Study From Malawi. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 1. Januar 2020;83(1):24–30.
62. Anochie PI, Onyeneke EC, Ogu AC, Onyeozirila AC, Aluru S, Onyejebu N, u. a. Recent advances in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. *Germs*. 1. September 2012;2(3):110–20.
63. Suwanpimolkul G, Kawkitinarong K, Manosuthi W, Sophonphan J, Gatechompol S, Ohata PJ, u. a. Utility of urine lipoarabinomannan (LAM) in diagnosing tuberculosis and predicting mortality with and without HIV: prospective TB cohort from the Thailand Big City TB Research Network. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. Juni 2017;59:96–102.
64. Shah M, Hanrahan C, Wang ZY, Dendukuri N, Lawn SD, Denkinge CM, u. a. Lateral flow urine lipoarabinomannan assay for detecting active tuberculosis in HIV-positive adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 10. Mai 2016;(5):CD011420.
65. Paris L, Magni R, Zaidi F, Araujo R, Saini N, Harpole M, u. a. Urine lipoarabinomannan glycan in HIV-negative patients with pulmonary tuberculosis correlates with disease severity. *Sci Transl Med*. 13. Dezember 2017;9(420):eaal2807.
66. Kroidl I, Clowes P, Mwakyelu J, Maboko L, Kiangi A, Rachow A, u. a. Reasons for false-positive lipoarabinomannan ELISA results in a Tanzanian population. *Scand J Infect Dis*. Februar 2014;46(2):144–8.
67. Broger T, Sossen B, du Toit E, Kerkhoff AD, Schutz C, Ivanova Reipold E, u. a. Novel lipoarabinomannan point-of-care tuberculosis test for people with HIV: a diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis*. August 2019;19(8):852–61.
68. Kerkhoff AD, Sossen B, Schutz C, Reipold EI, Trollip A, Moreau E, u. a. Diagnostic sensitivity of SILVAMP TB-LAM (FujiLAM) point-of-care urine assay for extra-pulmonary tuberculosis in people living with HIV. *Eur Respir J*. 6. Februar 2020;55(2):1901259.
69. Broger T, Nicol MP, Székely R, Bjerrum S, Sossen B, Schutz C, u. a. Diagnostic accuracy of a novel tuberculosis point-of-care urine lipoarabinomannan assay

- for people living with HIV: A meta-analysis of individual in- and outpatient data. *PLoS Med.* 1. Mai 2020;17(5):e1003113.
70. Marangu D, Devine B, John-Stewart G. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests in urine for pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis.* November 2015;19(11):1339–47.
 71. Ralph AP, Ardian M, Wiguna A, Maguire GP, Becker NG, Drogumuller G, u. a. A simple, valid, numerical score for grading chest x-ray severity in adult smear-positive pulmonary tuberculosis. *Thorax.* Oktober 2010;65(10):863–9.
 72. Somoskövi A, Ködmön C, Lantos A, Bártfai Z, Tamási L, Füzy J, u. a. Comparison of recoveries of mycobacterium tuberculosis using the automated BACTEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system, and Löwenstein-Jensen medium. *J Clin Microbiol.* Juni 2000;38(6):2395–7.
 73. Diacon AH, Maritz JS, Venter A, van Helden PD, Andries K, McNeeley DF, u. a. Time to detection of the growth of Mycobacterium tuberculosis in MGIT 960 for determining the early bactericidal activity of antituberculosis agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* Dezember 2010;29(12):1561–5.
 74. Chien HP, Yu MC, Wu MH, Lin TP, Luh KT. Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis.* September 2000;4(9):866–70.
 75. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Medica.* 2012;22(3):276–82.
 76. Newcombe RG. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Stat Med.* 30. April 1998;17(8):857–72.
 77. Update on the use of nucleic acid amplification tests to detect TB and drug-resistant TB: rapid communication. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 78. Molecular assays intended as initial tests for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB and rifampicin resistance in adults and children: rapid communication. Policy update. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 79. Rüscher-Gerdes S, Richter E. Mikrobiologie und Labordiagnostik bei Tuberkulose. *Pneumol.* 1. Juli 2006;3(4):273–6.

80. Karinja MN, Esterhuizen TM, Friedrich SO, Diacon AH. Sputum Volume Predicts Sputum Mycobacterial Load during the First 2 Weeks of Antituberculosis Treatment. *J Clin Microbiol.* April 2015;53(4):1087–91.
81. Thomas TA. Tuberculosis in children. *Pediatr Clin North Am.* August 2017;64(4):893–909.
82. Babafemi EO, Cherian BP, Ouma B, Mogoko G. Paediatric tuberculosis diagnosis using Mycobacterium tuberculosis real-time polymerase chain reaction assay: protocol for systematic review and meta-analysis. *Syst Rev.* 30. August 2019;8(1):225.
83. García-Basteiro AL, DiNardo A, Saavedra B, Silva DR, Palmero D, Gegia M, u. a. Point of care diagnostics for tuberculosis. *Pulmonology.* 1. März 2018;24(2):73–85.
84. Click ES, Murithi W, Ouma GS, McCarthy K, Willby M, Musau S, u. a. Detection of Apparent Cell-free M. tuberculosis DNA from Plasma. *Sci Rep.* 12. Januar 2018;8(1):645.
85. Yang J, Han X, Liu A, Bai X, Xu C, Bao F, u. a. Use of Digital Droplet PCR to Detect Mycobacterium tuberculosis DNA in Whole Blood-Derived DNA Samples from Patients with Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:369.
86. Green C, Huggett JF, Talbot E, Mwaba P, Reither K, Zumla AI. Rapid diagnosis of tuberculosis through the detection of mycobacterial DNA in urine by nucleic acid amplification methods. *Lancet Infect Dis.* August 2009;9(8):505–11.
87. Minion J, Leung E, Talbot E, Dheda K, Pai M, Menzies D. Diagnosing tuberculosis with urine lipoarabinomannan: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* Dezember 2011;38(6):1398–405.
88. Flores LL, Steingart KR, Dendukuri N, Schiller I, Minion J, Pai M, u. a. Systematic Review and Meta-Analysis of Antigen Detection Tests for the Diagnosis of Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* Oktober 2011;18(10):1616–27.
89. Drain PK, Losina E, Coleman SM, Giddy J, Ross D, Katz JN, u. a. Diagnostic accuracy of a point-of-care urine test for tuberculosis screening among newly-diagnosed HIV-infected adults: a prospective, clinic-based study. *BMC Infect Dis.* 26. Februar 2014;14:110.
90. Peter JG, Theron G, van Zyl-Smit R, Haripersad A, Mottay L, Kraus S, u. a. Diagnostic accuracy of a urine lipoarabinomannan strip-test for TB detection in

- HIV-infected hospitalised patients. *Eur Respir J*. November 2012;40(5):1211–20.
91. Richardson M. The physiology of mucus and sputum production in the respiratory system. *Nurs Times*. 10. Juni 2003;99(23):63–4.
 92. Aceti A, Zanetti S, Mura MS, Sechi LA, Turrini F, Saba F, u. a. Identification of HIV patients with active pulmonary tuberculosis using urine based polymerase chain reaction assay. *Thorax*. Februar 1999;54(2):145–6.
 93. Vorsters A, Micalessi I, Bilcke J, Ieven M, Bogers J, Van Damme P. Detection of human papillomavirus DNA in urine. A review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. Mai 2012;31(5):627–40.
 94. Milde A, Haas-Rochholz H, Kaatsch HJ. Improved DNA typing of human urine by adding EDTA. *Int J Legal Med*. 1999;112(3):209–10.
 95. Kenguele HM, Adegnikaa AA, Nkoma A-M, Ateba-Ngoa U, Mbong M, Zinsou J, u. a. Impact of short-time urine freezing on the sensitivity of an established *Schistosoma* real-time PCR assay. *Am J Trop Med Hyg*. Juni 2014;90(6):1153–5.
 96. Peter JG, Theron G, Muchinga TE, Govender U, Dheda K. The diagnostic accuracy of urine-based Xpert MTB/RIF in HIV-infected hospitalized patients who are smear-negative or sputum scarce. *PloS One*. 2012;7(7):e39966.
 97. Shenai S, Amisano D, Ronacher K, Kriel M, Banada PP, Song T, u. a. Exploring alternative biomaterials for diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV-negative patients by use of the GeneXpert MTB/RIF assay. *J Clin Microbiol*. Dezember 2013;51(12):4161–6.
 98. Detjen AK, DiNardo AR, Leyden J, Steingart KR, Menzies D, Schiller I, u. a. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med*. Juni 2015;3(6):451–61.
 99. Peter J, Green C, Hoelscher M, Mwaba P, Zumla A, Dheda K. Urine for the diagnosis of tuberculosis: current approaches, clinical applicability, and new developments. *Curr Opin Pulm Med*. Mai 2010;16(3):262–70.
 100. Lateral flow urine lipoarabinomannan assay (LF-LAM) for the diagnosis of active tuberculosis in people living with HIV. Policy update 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 101. Zwerling A. Costs of tuberculosis screening among inpatients with HIV. *Lancet Glob Health*. Februar 2019;7(2):e163–4.

102. Boyles TH, Griesel R, Stewart A, Mendelson M, Maartens G. Incremental yield and cost of urine Determine TB-LAM and sputum induction in seriously ill adults with HIV. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. Oktober 2018;75:67–73.
103. Shah M, Dowdy D, Joloba M, Ssengooba W, Manabe YC, Ellner J, u. a. Cost-effectiveness of novel algorithms for rapid diagnosis of tuberculosis in HIV-infected individuals in Uganda. *AIDS Lond Engl*. 28. November 2013;27(18):2883–92.
104. Heyckendorf J, Labugger I, van der Merwe L, Garcia-Basteiro AL, Diacon AH, Lange C. Serial measurements of transrenal mycobacterial DNA as indicators of the early bactericidal activity (EBA) of antituberculosis drugs. *Tuberc Edinb Scotl*. Januar 2017;102:31–3.
105. Kidenya BR, Kabangila R, Peck RN, Mshana SE, Webster LE, Koenig SP, u. a. Early and efficient detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. *PloS One*. 2013;8(2):e57527.
106. Hommel G, von Miquel M. Die vergessene Krankheit - Tuberkulose gestern und heute. 1. Aufl. Bochum: Laupenmühlen; 2010. 80 S.
107. Heyckendorf J, Olaru ID, Ruhwald M, Lange C. Getting personal perspectives on individualized treatment duration in multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 15. August 2014;190(4):374–83.
108. Olaru ID, von Groote-Bidlingmaier F, Heyckendorf J, Yew WW, Lange C, Chang KC. Novel drugs against tuberculosis: a clinician's perspective. *Eur Respir J*. April 2015;45(4):1119–31.
109. Olaru ID, Heyckendorf J, Grossmann S, Lange C. Time to Culture Positivity and Sputum Smear Microscopy during Tuberculosis Therapy. *PLoS ONE*. 29. August 2014;9(8):e106075.
110. Lawn SD, Kerkhoff AD, Vogt M, Wood R. Diagnostic accuracy of a low-cost, urine antigen, point-of-care screening assay for HIV-associated pulmonary tuberculosis before antiretroviral therapy: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*. März 2012;12(3):201–9.
111. Torrea G, Van de Perre P, Ouedraogo M, Zougba A, Sawadogo A, Dingtounda B, u. a. PCR-based detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in urine of HIV-infected and uninfected pulmonary and extrapulmonary tuberculosis patients in Burkina Faso. *J Med Microbiol*. Januar 2005;54(Pt 1):39–44.

112. Kroidl I, Clowes P, Reither K, Mtafya B, Rojas-Ponce G, Ntinginya EN, u. a. Performance of urine lipoarabinomannan assays for paediatric tuberculosis in Tanzania. *Eur Respir J.* September 2015;46(3):761–70.
113. Dheda K, Davids V, Lenders L, Roberts T, Meldau R, Ling D, u. a. Clinical utility of a commercial LAM-ELISA assay for TB diagnosis in HIV-infected patients using urine and sputum samples. *PloS One.* 24. März 2010;5(3):e9848.

G. Anhang

a. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika der an der Studie teilnehmenden Patienten

Tabelle 2: Diagnostische Wertigkeit der Sputumreferenzmethoden und des trDNA Assays zum Tuberkulosenachweis bei therapienaiven Patienten vor Therapiebeginn ($n=11$)

Tabelle 3: Diagnostische Übereinstimmung von DNA und SFS-Mikroskopie bei therapienaiven Patienten ($n=11$)

Tabelle 4: Diagnostische Wertigkeit der Sputumreferenzmethoden und des trDNA-Assays für die Detektion von Tuberkulosepatienten nach Therapiebeginn ($n=22$)

Tabelle 5: Konversionszeit und –rate der Sputumreferenzmethoden und des trDNA-Assays

Tabelle 6: Sensitivität und Spezifität der trDNA-Diagnostik. Vergleich der Ergebnisse internationaler Studien mit den eigenen Ergebnissen

Tabelle 7: Potentielle Indikationen für den trDNA-Test bei klinischem Verdacht auf Lungentuberkulose

Tabelle 8: Potentielle Indikationen für den trDNA-Test unter antituberkulöser Therapie

b. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweite Trends der geschätzten Tuberkulose Inzidenzrate, 2000-2020 (Quelle: World Health Organisation. Global Tuberculosis Report 2021) (1).

Abbildung 2: Prinzip der PCR. Während jedes PCR-Zyklus werden drei Schritte durchlaufen, nämlich 1. die Denaturierung von DNA-Doppelsträngen, 2. die Anlagerung der Primer und 3, die Synthese von Kopien der Matrizen durch Verlängerung der Primer (44).

Abbildung 3: Anzahl von Patienten in jeder Kategorie.

Abbildung 4: Zeitverlauf der wöchentlichen Schwankung der trDNA Werte unter Therapie. Die medianen trDNA Werte (log cp/ml) der Medikamentensensitiven Patienten wurden kategorisiert in therapienaive Patienten (schwarze Punkte; n=11) und Patienten, die bereits mit der Therapie begonnen hatten (leere Punkte; n=11). Die Zeit unter Therapie ist in Wochen ausgedrückt. Für jede Woche wurde der Medianwert ermittelt.

Abbildung 5: Prozentsatz Tuberkulosenegativer und -positiver Ergebnisse der Flüssigkulturen nach Therapiebeginn (M.tb = *Mycobacterium tuberculosis*).

Abbildung 6 A: Maximale trDNA-Ausscheidung im Urin im Verhältnis zum Ralph Score.

Abbildung 6 B: Ralph Score und TTP von MGIT- Kulturen.

Abbildung 6 C: Ralph Score und TTP von LJ- Kulturen.

Abbildungen 7 A und B: Zeitverlauf der trDNA-Messwerte in Plasma und Urin und der entsprechenden Daten der MGIT-Kulturen von Patient 19 (A) und 22 (B). Die gestrichelte Linie zeigt einen negativen MGIT-Kulturstatus an.

Abbildung 8: Kurvenverlauf der Messergebnisse der verschiedenen Laborverfahren bei Patient 19 mit Resistenz gegenüber Isoniazid und Prothionamid.

Abbildung 9: Kurvenverlauf der Messergebnisse der verschiedenen Laborverfahren bei Patient 21 mit Resistenz gegenüber Rifampicin, Isoniazid, Prothionamid und Streptomycin.

Abbildung 10: Kurvenverlauf der Messergebnisse der verschiedenen Laborverfahren bei Patient 23 mit Resistenz gegenüber Isoniazid, Prothionamid und Streptomycin.

c. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFB	<i>engl.</i> : acid fast bacillus
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BMI	<i>engl.</i> : body mass index
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C°	Grad Celsius
ca.	circa
CM	Capreomycin
cp/ml	copies pro Milliliter
cpu	<i>engl.</i> : copies per unit
CRP	C-reaktives Protein
d.h.	das heißt
DNA	<i>engl.</i> : desoxyribonucleic acid
DOTS	<i>engl.</i> : direct observed therapy
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>engl.</i> : enzyme-linked immunosorbent assay
EMB	Ethambutol
ETH	Ethionamid
ggf.	gegebenenfalls
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IGRA	Interferon- γ Release Assay
INH	Isoniazid
IQR	Interqualitätsbanden
kg	Kilogramm
LAM	Lipoarabinomannan
LJ	Löwenstein-Jensen
LTBI	Latente Tuberkuloseinfektion
m ²	Quadratmeter
MDR	<i>engl.</i> : multidrug-resistance

MXF	Moxifloxacin
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOTTs	<i>engl.</i> : mycobacteria other than tuberculosis
MTB	Mycobacterium tuberculosis
MTBK	Mycobacterium tuberculosis Komplex
NAT	Nukleinsäureamplifikationstest
NJ	New Jersey
nM	nanomolar
NRZ	Nationales Referenzzentrum
NTM	nichttuberkulöse Mykobakterien
o.ä.	oder ähnliches
PAS	P-aminosalicylsäure
PCR	<i>engl.</i> : polymerase chain reaction
pH	potentia hydrogenii
POCT	<i>engl.</i> : point of care test
pTB	pulmonale Tuberkulose
PTH	Prothionamid
PZA	Pyrazinamid
RIF	Rifampizin
RKI	Robert Koch-Institut
RM	Rifamycin
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>engl.</i> : revolutions per minute
rtPCR	<i>engl.</i> : real time polymerase chain reaction
SFS	Säurefeste Stäbchen
SM	Streptomycin
s.o.	siehe oben
TB	Tuberkulose
TBC	Tuberkulose
THT	Tuberkulin Hauttest
TMP/SMZ	Cotrimoxazol
trDNA	transrenale Desoxyribonukleinsäure

Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
TTP	<i>engl.</i> : time to positivity
TZD	Terizidon
u.a.	unter anderem
USA	<i>engl.</i> : United States of Amerika
vs.	versus
WHO	<i>engl.</i> : World Health Organisation
XDR	<i>engl.</i> : extensively drug-resistant
xg	Maßeinheit der Zentrifugalkraft
z.B.	zum Beispiel
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

d. Erklärung zur Zustimmung der Ethikkommission



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck - Ratzeburger Allee 160 - 23538 Lübeck

Herrn
Prof. Dr. Chr. Lange
Forschungszentrum Borstel
Medizinische Klinik
Parkallee 1-40

23845 Borstel

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. F. Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 500 4639
Fax: +49 451 500 3026
janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 11-247
Datum: 02. Juli 2012

Probensammlung zur Evaluierung von Methoden zur Nukleinsäuren-Detektion von M. tuberculosis

Hier: Änderungen – Ihr Schreiben vom 28. Juni 2012

Sehr geehrter Herr Prof. Lange,

die von Ihnen benannten Änderungen

- zusätzliches Ausschlusskriterium im Kapitel 3.1.2, Patient ist bereits länger als drei Tage auf Tuberkulose-therapie
- zusätzlicher Satz im Kapitel 3.2 bezüglich der weiteren venösen Blutentnahme
- Blutentnahmen neu definiert.

habe ich zur Kenntnis genommen. Es bedarf keiner weiteren Begutachtung durch die Kommission.

Bitte beachten Sie folgenden Hinweis:

In die Patienteninformation sollte nun ein Satz zu den Risiken einer venösen Blutentnahme (Nervenverletzung) aufgenommen werden.

Mit freundlichen Grüßen und den besten Wünschen für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich
Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

H. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christoph Lange für die Möglichkeit mit dieser Arbeit zu beginnen und für den langen Atem mich dabei über all die Jahre zu begleiten und für seinen Glauben daran, dass ich diese Arbeit fertig stellen kann. Ohne ihn wäre mir auf halber Strecke sicherlich die Puste ausgegangen. Ich danke PD Dr. Jan Heyckendorf, meinem Doktorvater, für die raschen Korrekturen und exzellente Unterstützung die er mir brachte und für seine wachsamen Augen, die alles genau unter die Lupe nahmen, insbesondere zum Ende hin und mich so durchs Ziel begleitet hat. Danke!

Ich danke Ines Labugger und Eric Rivera Milla für ihre Zeit und Unterstützung, für die zahlreiche Treffen und Einblicke sowohl in die Firma Alere als auch in die wunderschöne Stadt Jena, die sie mir gewährt haben.

Ich danke zu guter Letzt auch meiner Familie dafür, dass sie für mich da sind und immer ein großes Herz und Ohr für mich haben. Insbesondere danke ich meinen Eltern Karl und Adelheid Häußinger, ohne deren nicht ermüdenden Ratschlägen, Nachfragen und Motivation diese Arbeit wahrscheinlich nie zu Ende gebracht worden wäre. Meiner Mutter danke ich dabei vor allem für die Fürsorglichkeit und gutem Zureden meinem Vater für die Liebe zur Medizin, insbesondere der Pneumologie, die ich von klein an miterleben durfte und die ich durch ihn geerbt habe. Ihm möchte ich diese Arbeit widmen.

I. Lebenslauf

Name	Emilia Häußinger
Adresse:	Siegenburger Str. 37, 81373 München
Geburtsdatum, -ort	17. Juli 1988, Gräfelfing
Staatsangehörigkeit	deutsch
Kontakt	Tel.: +49 (0)176/62396056 E-Mail: emilia.haeussinger@gmail.com

Berufstätigkeit und akademischer Werdegang

seit 01/2017	München Klinik Schwabing, München Weiterbildungsassistentin in der Inneren Medizin
04/2009 – 06/2016	Universität zu Lübeck Studiengang Medizin (Abschlussnote 2,33)
09/2013 – 03/2014	Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, ESP Erasmus Aufenthalt im Studiengang Medizin im WS 2013/14
09/2008 – 04/2009	Universität Wien Studiengang Internationale Entwicklungen

Schulausbildung

09/1998 – 05/2007	Kurt-Huber-Gymnasium Gräfelfing Abitur, LK Englisch und Kunst
01/2005 – 06/2005	Santa Barbara High School, Kalifornien, USA Auslandshalbjahr im ersten Halbjahr der 11. Klasse
09/1994 – 05/1998	Grundschule Gräfelfing

Besondere Kenntnisse und sonstiges Engagement

08/2012 – 10/2012	<i>DKFZ</i> Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg 3-monatiger Aufenthalt zur Tuberkulose-Forschung
01/2008 – 06/2008	Holy Trinity Medical Care Center, Accra, Ghana 6-monatiger Aufenthalt zur Freiwilligenarbeit
Fremdsprachen:	Englisch (sehr gut in Wort und Schrift) Spanisch (sehr gut in Wort und Schrift) Französisch (gut in Wort und Schrift) Latein (großes Latinum, 2004)
Hobbies / Interessen	Musik (Gitarre, Klavier) Kunst (Zeichnen) Sport (Wassersport, Wintersport)