

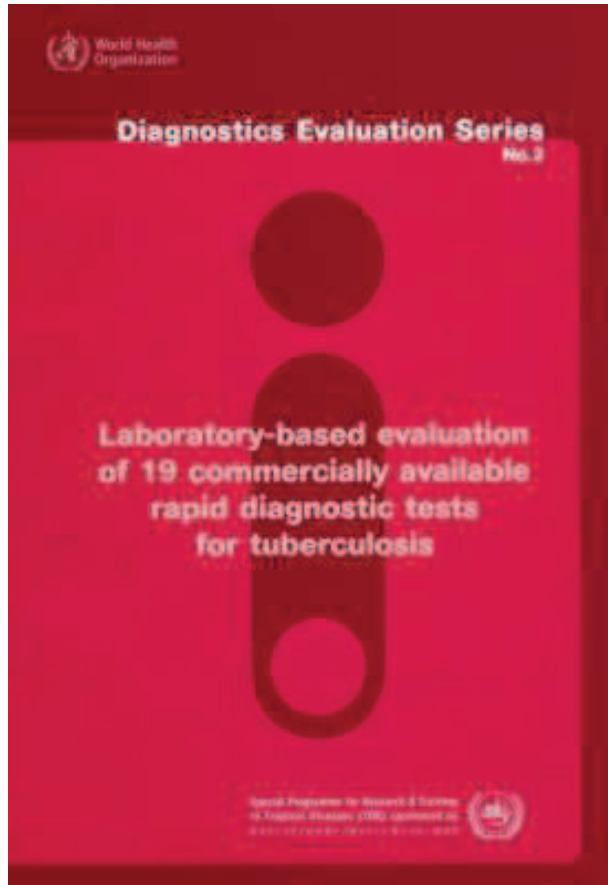
Aktuelles aus der TB-Diagnostik

Elvira Richter
Forschungszentrum Borstel
Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien

Rostock, 24.10.2013

Diagnostik

Serologische Nachweisverfahren



TDR/WHO publication, 2008

Evaluierung von 19 TB-Schnell-Tests

Summary:

None of the tests performed well enough to replace microscopy

(sensitivity 1% - 60%)

(specificity mostly < 80%)

Diagnostik der Infektion

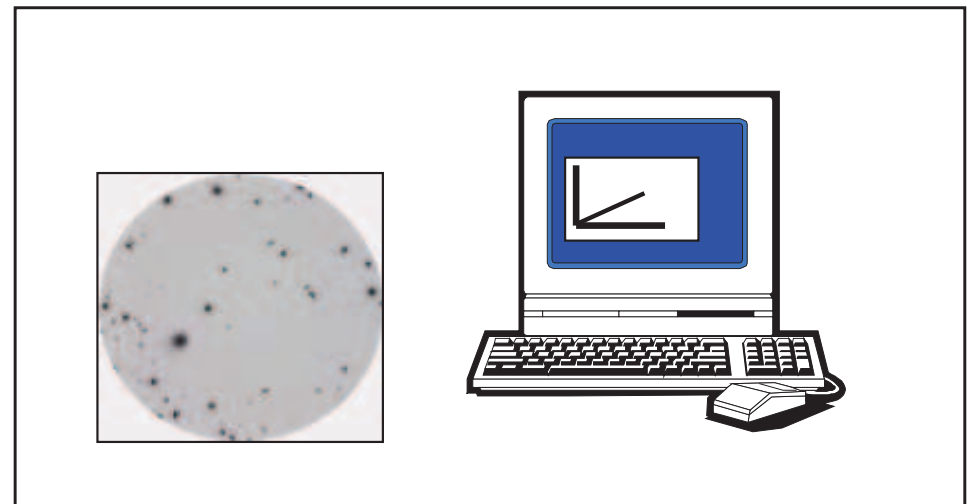
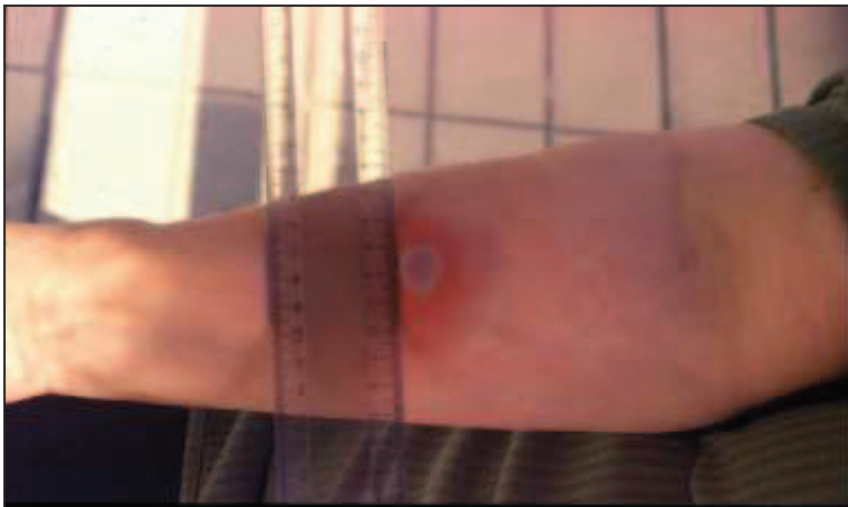
z.B. nach Kontakt mit TB-Patienten

Mendel-Mantoux Test

Interferon- γ -Tests

→ T SPOT™ –TB Test

→ QuantiFERON® TB Gold in-Tube



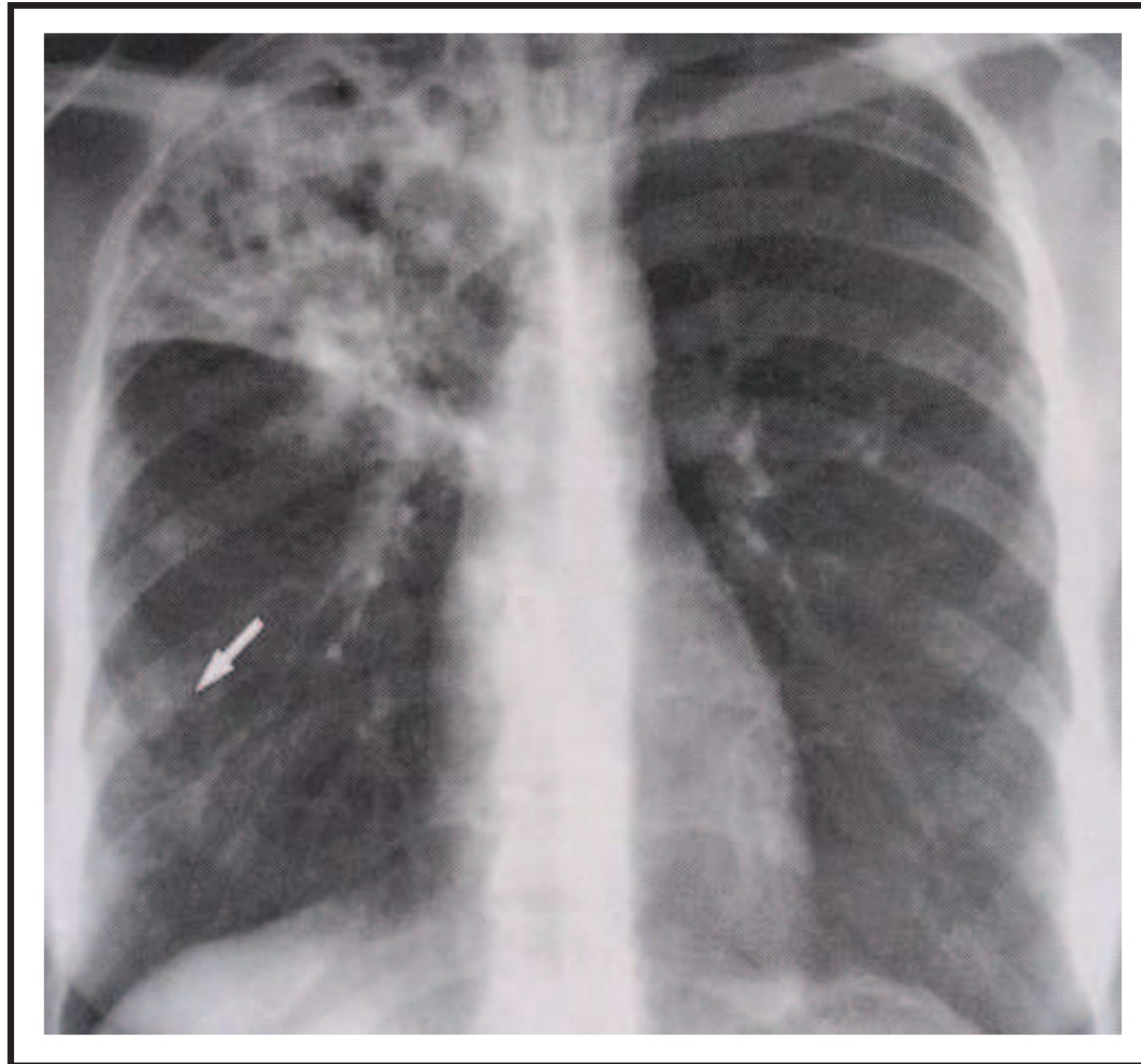
Interferon- γ -Tests

Einsatz

- **Umgebungsuntersuchung**
- **vor der Therapie mit TNF α -Inhibitoren**
- **Arbeitsmedizinische Vorsorge**

Mikrobiologische Diagnostik

Tuberkulose - vorwiegend pulmonale Lokalisation



(Rom + Garay (ed.): Tuberculosis; 2004)

Extrapulmonale Tuberkulose



(Rom + Garay (ed.): Tuberculosis; 2004)



(Dr. Greinert, Forschungszentrum Borstel)

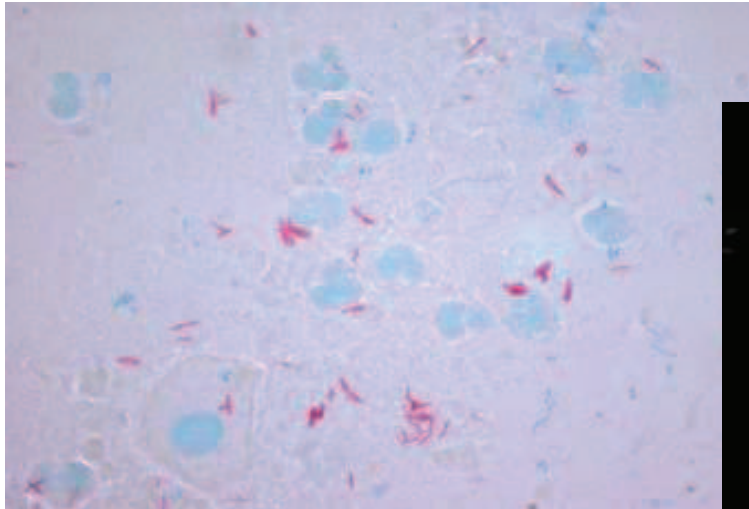
Untersuchungsmaterial

Sputum, Stuhl usw.	ohne Zusätze
Magensaft	in Phosphatpuffer
Urin	Morgenurin (30 - 50ml)
Gewebe / Abstriche	in ca. 1 ml phys. Kochsalzlösung
Blut	5 ml Citrat- oder Heparinblut
Knochenmark	in Citrat- oder Heparinröhrchen

Mikroskopie

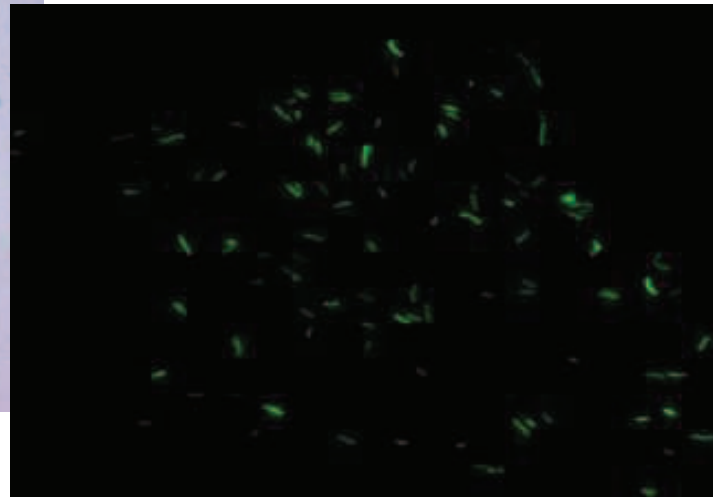
Licht-Mikroskopie:

Ziehl Neelsen-Färbung



Fluoreszenz-Mikroskopie / LEDs

- Auramin
- Auramin-Rhodamin
- Acridin orange



Geringe Sensitivität

Keine Unterscheidung zwischen

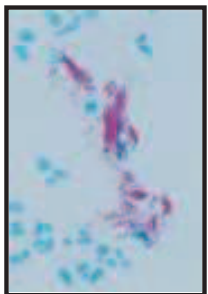
→ TB und nicht-tuberkulösen Mykobakterien

→ lebenden und toten Mykobakterien

Zeitbedarf

Vermehrungszeit:

- *E. coli* ~ 20 min
- *M. tuberculosis* ~ 20 h



negatives
Kultur-
ergebnis

24 h

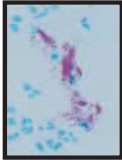
1 Woche

8 Wochen

Schneller TB-Nachweis

Molekularbiologische Techniken zum schnellen Nachweis von TB im Untersuchungsmaterial (PCR)

- AMTD, Gen-Probe Inc
- BD ProbeTec™ ET, BD Diagnostics
- COBAS® TaqMan®, Roche Diagnostics
- artus M. tuberculosis PCR, Qiagen
- GenoType® Mycobacteria Direct, HAIN Lifescience
- RealArt M. tuberculosis TM, Abbott Laboratories

	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
Mikrosk. positiv	100	100
Mikrosk. negativ	60 - 90	95 - 100

- ⇒ Ergebnisse innerhalb weniger Stunden
- ⇒ Labor mit spezieller Ausstattung
- ⇒ z.T. aufwendige Arbeitsschritte

GeneXpert System:Xpert® MTB/RIF Assay



+



15 Min.



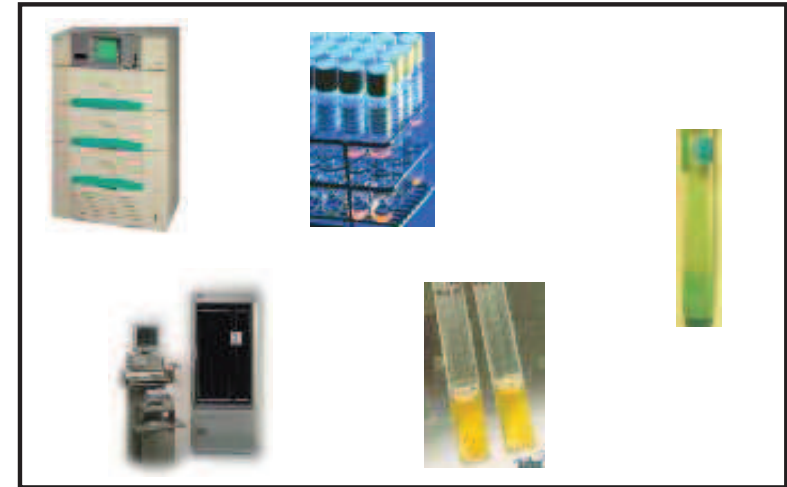
2 Std.

**incl. Resistenzbestimmung
für RMP**

Kultureller Nachweis

Flüssige und feste Kulturmedien

⇒ **„Goldstandard“**



Zum Nachweis von nicht-tuberkulösen Mykobakterien:

zusätzl. Kulturmedien

zusätzl. Inkubation bei anderer Temperatur

Kultureller Nachweis

Der kulturelle Nachweis ist weiterhin nötig,

- um Kulturen für Resistenzbestimmung, genaue Differenzierung, ggf. Fingerprintuntersuchungen zu erhalten**
- zum TB-Nachweis bei falsch negativer TB-PCR**
- zur Therapiekontrolle**

- zum Nachweis von nicht-tuberkulösen Mykobakterien**

Anzahl Mykobakterien-Spezies

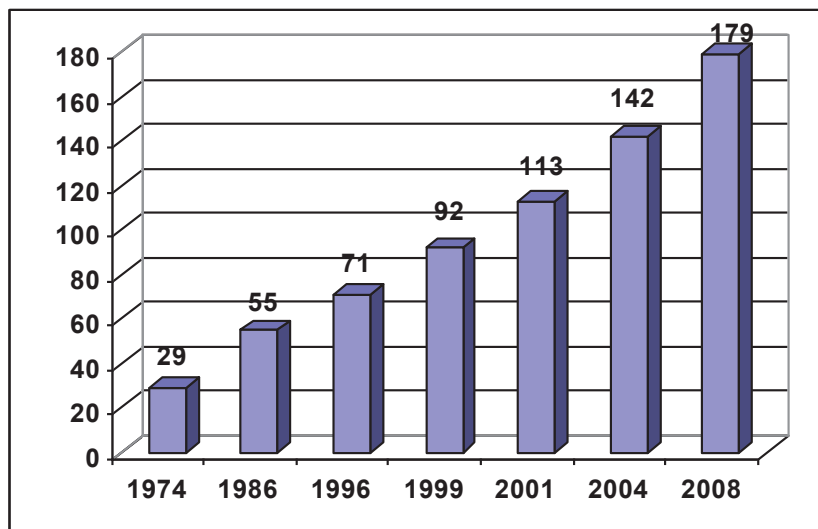
1974: 29 Spezies

2011: 147 valide beschriebene Spezies

www.bacterio.cict.fr

Sequenzeinträge für 190 „Spezies“

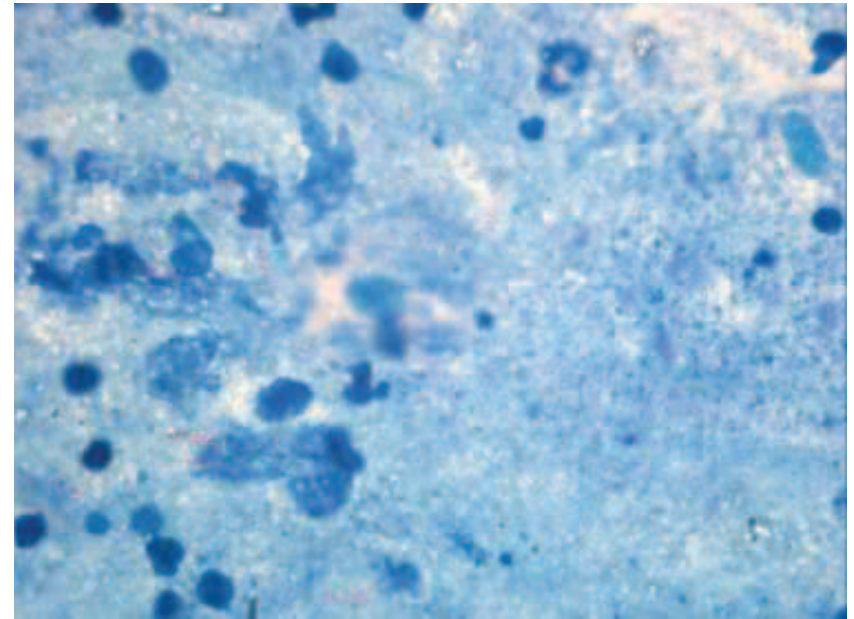
www.ncbi.nlm.nih.gov



Radiologischer Lungenbefund



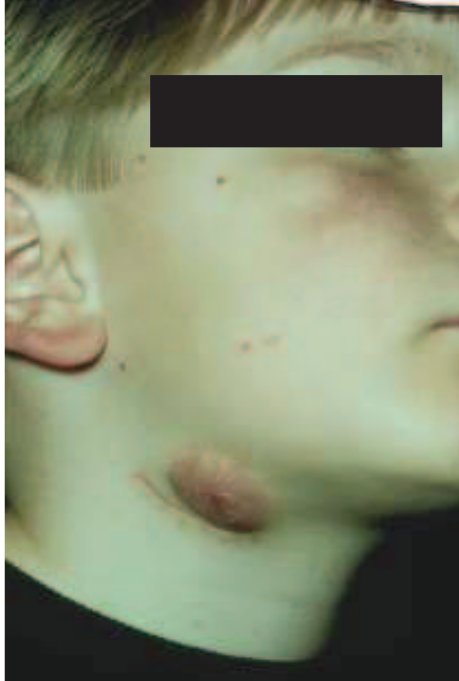
aus: Griffith et al.; ATS/IDSA Statement; AJRCCM, 2007: 367-416.
Figure E6. Chest radiograph: 42 year old man, smoker, with
M. kansasii disease associated with bilateral upper lobe
reticulonodular densities.



Kulturbefund:

Mycobacterium kansasii

NTM - Infektionen bei Kindern



M. avium

M. bohemicum

M. haemophilum

M. interjectum

M. kansasii

M. lentiflavum

M. malmoense

M. scrofulaceum

typische Konstellation:

- **Mendel Mantoux-Hauttest positiv**
- **IGRA negativ**

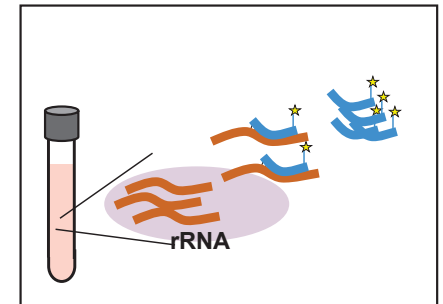
Nicht-tuberkulöse Mykobakterien

- Nicht von Mensch zu Mensch übertragbar
 - Nicht meldepflichtig nach IfSG
- ➔ Keine Zahlen zu Inzidenz und Prävalenz

Identifizierung von Mykobakterien

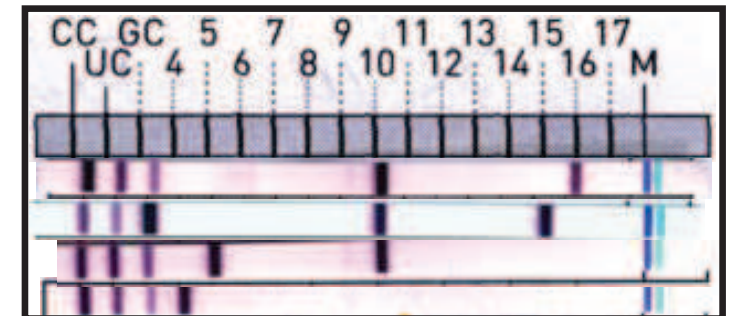
Gensonden:

nur für TB-Bakterien, *M. avium*-Komplex, *M. kansasii*, *M. goodii*
ca. 2 Stunden Bearbeitungszeit



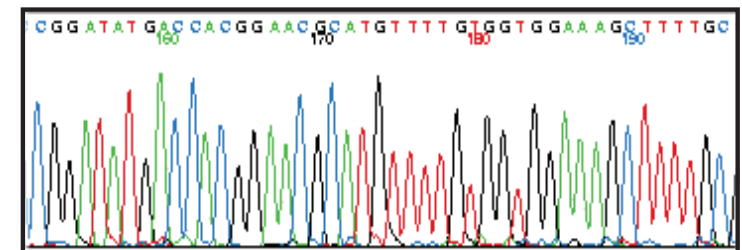
DNA-,Line Probe Assays‘

PCR-Amplifikation und anschließende Hybridisierung
ca. 6 Stunden Bearbeitungszeit
2 Testsysteme: 16 bzw. 36 Spezies;
seltene und unbekannte Arten werden nicht erkannt,
nahe verwandte Arten werden nicht unterschieden



Sequenzanalyse

alle Spezies
1 bis 2 Tage Bearbeitungszeit
Datenbankanalyse ist komplex



***Mycobacterium tuberculosis*-Komplex**

M. tuberculosis

M. africanum

M. bovis

M. bovis* ssp. *bovis

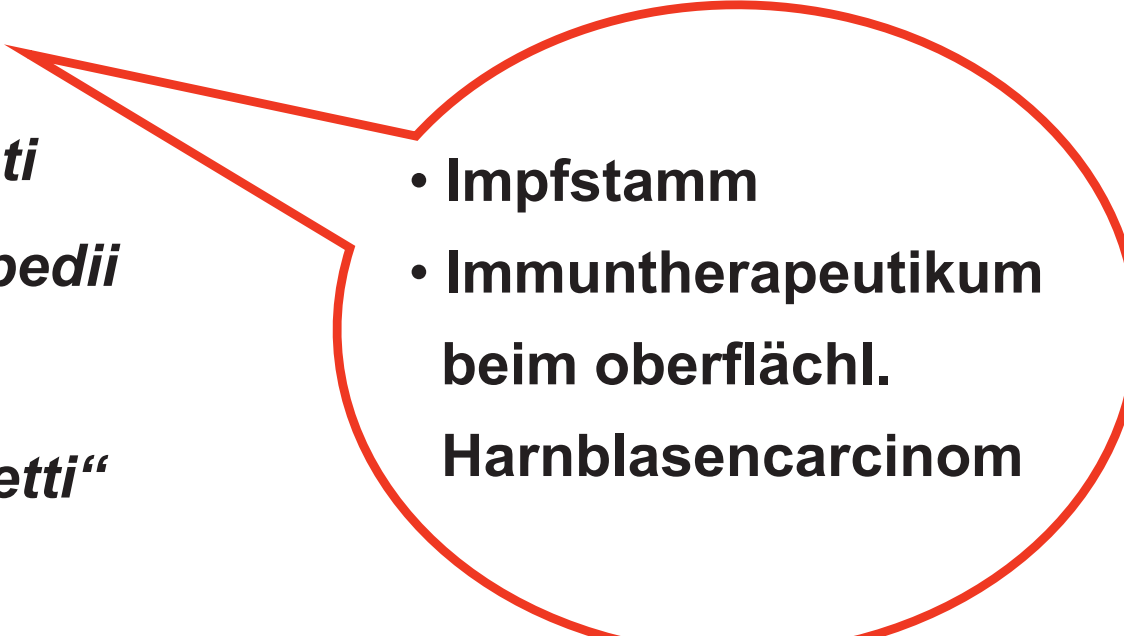
M. bovis* ssp. *caprae

BCG

M. microti

M. pinnipedii

„*M. canetti*“

- 
- Impfstamm
 - Immuntherapeutikum
beim oberflächl.
Harnblasencarcinom

**Resistenzen -
aktuelle Situation
und Bestimmung**

Definitionen

MDR = Multi Drug Resistance

Resistenz gegenüber mindestens Isoniazid (INH) und Rifampicin (RMP)

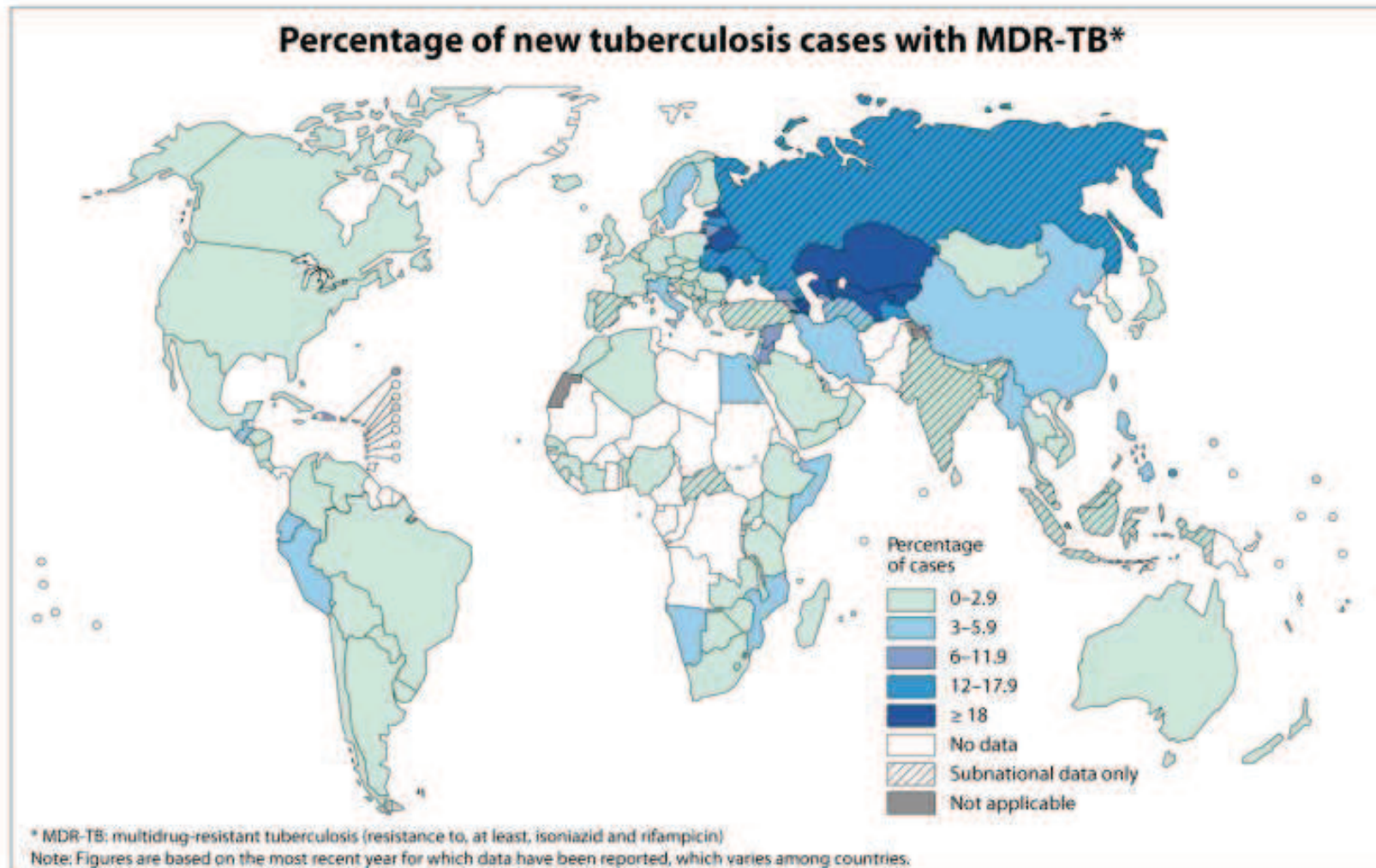
XDR = Extensively Drug Resistance

MDR + Resistenz gegen ein Fluoroquinolon und Amikacin oder Kanamycin oder Capreomycin

TDR = Totally Drug Resistant

Resistenz gegen alle getesteten Antibiotika

Anteil MDR-TB bei Neuerkrankten 2011

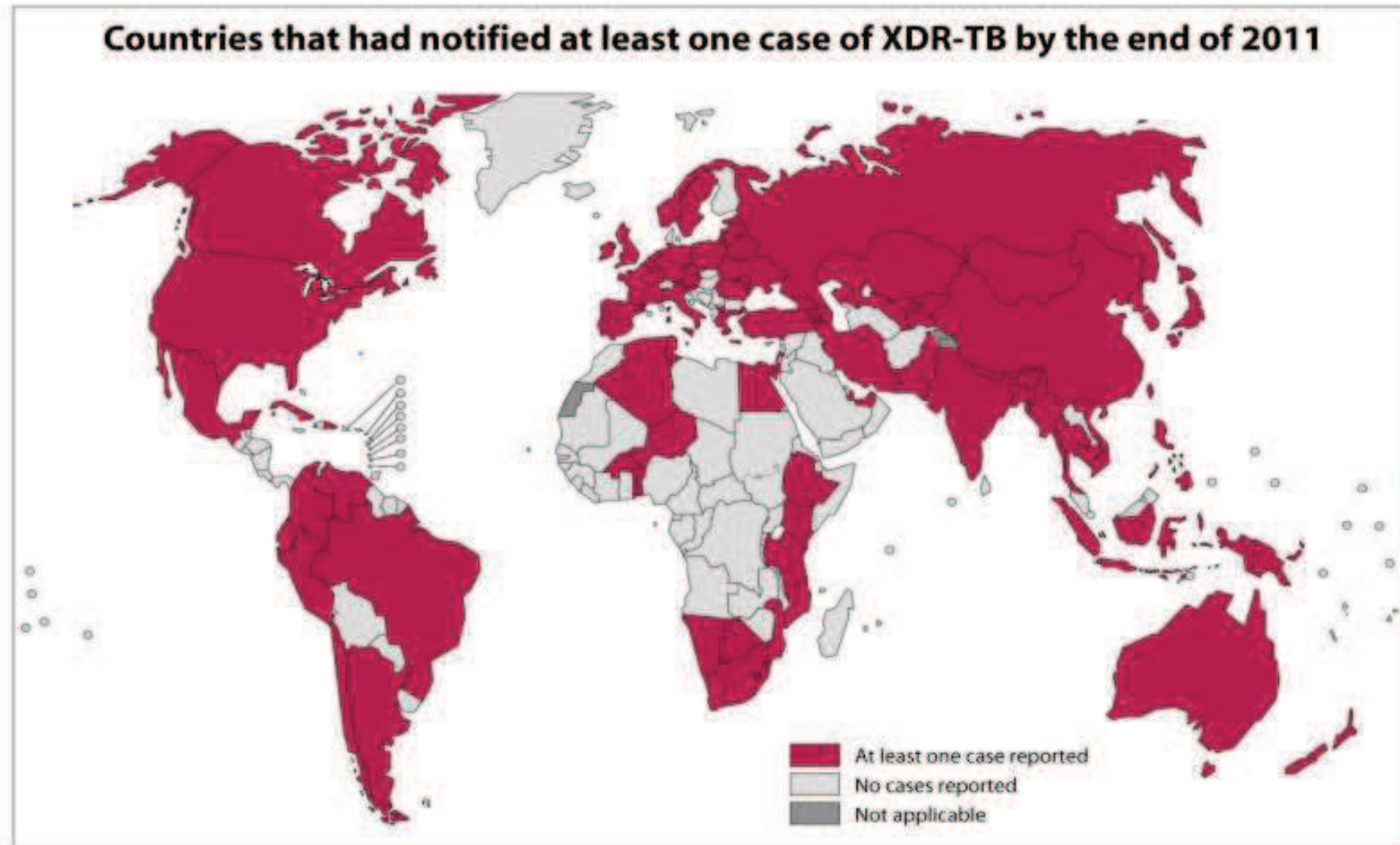


The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Source: *Global Tuberculosis Report 2012*. WHO, 2012.



Länder mit XDR-Tuberkulose

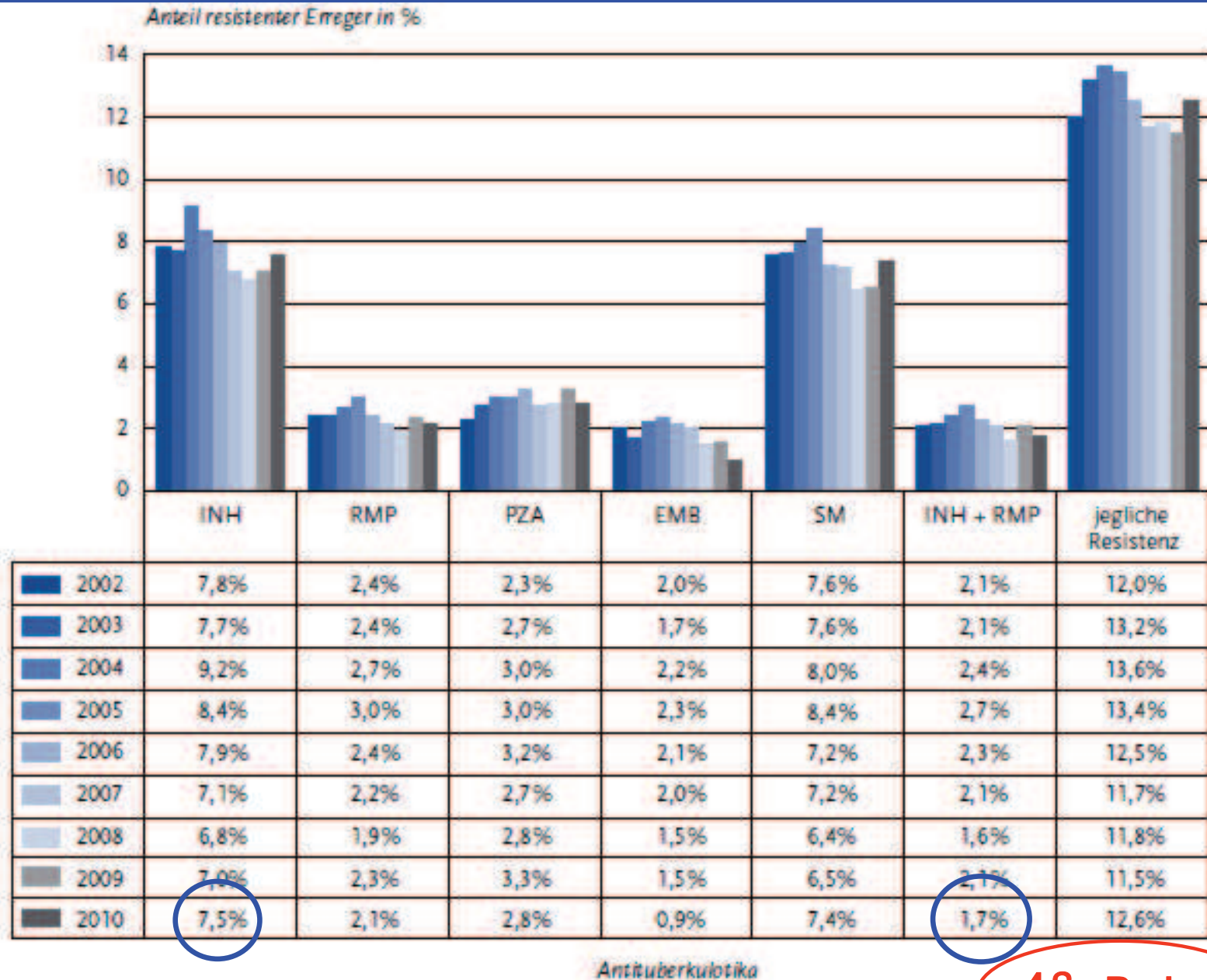


The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Source: *Global Tuberculosis Report 2012*, WHO, 2012.



Resistente Tuberkulose – Deutschland 2010



Quelle: Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2010; Robert Koch-Institut, 2012

48 Pat.

Empfindlichkeitsprüfung

Festmedien

Löwenstein-Jensen
(Middlebrook)



3 - 4 Wochen

Alle First line- und viele
Second line-Medikamente

Flüssigmedien

BACTEC 460 TB
MGIT



7 - 10 Tage

Alle First line- und fast alle,
auch die neueren, Second line-
Medikamente (z.B. Linezolid);
nicht Terizidon/Cycloserin

Molekularbiologische Methoden

InnoLipa
GenoType MTBDRplus/sl
,home made'-Techniken
GeneXpert: Direktmaterial



Stunden bis 1 - 2 Tage

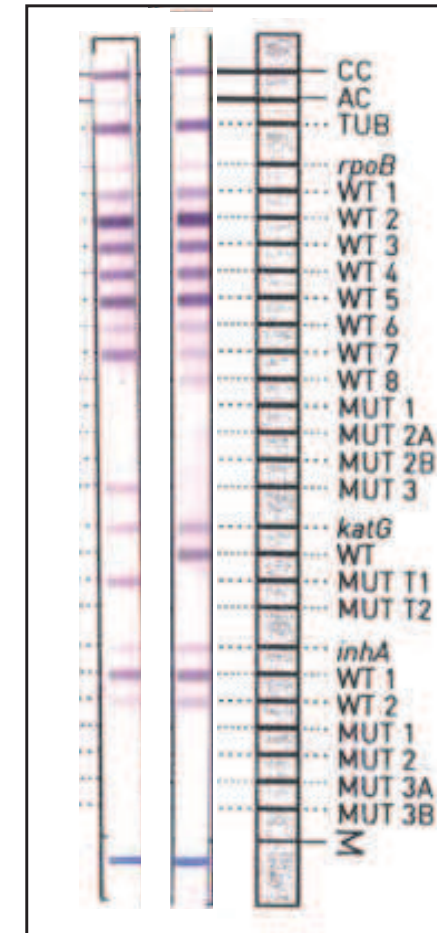
Kommerziell für INH, RMP sowie
EMB, Oflox., Ami-/Capreomycin
erhältlich.

Hohe Spezifität,
geringere Sensitivität.

Molekularbiologischer Nachweis

Streifenhybridisierungstests:

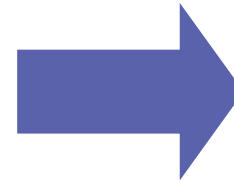
	Sensitivität	Spezifität
RMP	98.1%	98.7%
INH	84.3%	99.5%
OFL	90.2 %	100 %
AM	83.3 %	100 %
CM	86.8 %	99.1 %
EMB	59.0 %	100 %



Phänotypische Resistenzbestimmung



BACTEC MGIT 960



First line-AB:

SM, INH, RMP

EMB, PZA

und

Second line-AB

(außer Cycloserin)

Wichtig: Für jeden TB-Stamm muss
eine Resistenzbestimmung vorliegen.
Bei ausbleibendem Therapieerfolg:
nach 2 Monaten wiederholen.



Forschungszentrum Borstel

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit