

# MiQ

# 5 1998

---

## Tuberkulose Mykobakteriose

---

R. Kuchler, G. E. Pfyffer, S. Rüsck-Gerdes, J. Beer, A. Roth, H. Mauch

---

Unter Mitarbeit von T. Schaberg (für die Deutsche Gesellschaft für Pneumologie), K. Feldmann, Ph. Kirschner, E.C. Böttger, L. Naumann, H. Stetzelberg, M. Fischer (in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Mykobakterien)



Stuttgart Jena Lübeck Ulm

## Vorwort

Die Mykobakterien, insbesondere die Infektionen mit Tuberkulosebakterien und *M. avium* haben in den letzten Jahren weltweit und grenzüberschreitend zugenommen und damit nicht nur die therapeutischen, sondern auch die diagnostischen Probleme, die in dem hier vorliegenden Mikrobiologisch-Infektiologischen Qualitätsstandard (MIQ) besprochen werden. Ausgangspunkt ist immer das infektiologische Geschehen, welches bei der Tuberkulose inzwischen bedrohliche Ausmaße angenommen hat: In nahezu jeder Sekunde infiziert sich ein Mensch mit dem Tuberkuloseerreger. Weltweit erkranken jährlich schätzungsweise 7 bis 8 Millionen Menschen. In diesem Jahr sterben mehr Menschen an einer Tuberkulose als je zuvor in einem Jahr in der Geschichte der Menschheit – 2 bis 3 Millionen. HIV- und Tuberkuloseinfektionen sind eine tödliche Kombination und haben die Bedrohung überproportional ansteigen lassen. Nach Schätzung der WHO werden bis zum Jahre 2020 eine Milliarde neue Infektionen, 200 Millionen Neuerkrankungen und 70 Millionen hieraus resultierende Todesfälle erwartet. Die im Vergleich zu anderen Ländern niedrige, wenn auch verzögert sinkende Inzidenz an neu gemeldeten Tuberkulosen in westeuropäischen Ländern darf nicht darüber hinwegtäuschen, daß bei uns eine Zeitbombe tickt: Die Tuberkuloseerkrankungen bei unseren unmittelbaren Nachbarn, insbesondere in einigen osteuropäischen Ländern, sind dramatisch angestiegen. Wir müssen uns bei der heutigen, immer stärker zunehmenden Internationalisierung aller Bereiche und des Reiseverkehrs viel konsequenter darauf einstellen, daß die Tuberkulose, insbesondere mit hochresistenten Erregern eine zunehmende Bedrohung ist und auch in den westeuropäischen und nordamerikanischen Ländern mit niedriger Inzidenz weitere Erkrankungen verursacht.

Da die Tuberkulose eine Erkrankung ist, die nicht sofort erkannt wird, weil sie mit „schleichenden“ Symptomen beginnt, ist die mikrobiologische Diagnostik, zumindest im Anfangsstadium, schwierig. Um so wichtiger ist es, das gesamte diagnostische Repertoire einzusetzen, wenn klinisch an die Möglichkeit einer Tuberkulose gedacht wird, damit sie schnell erkannt, geheilt und damit die Übertragungskette unterbrochen wird. Zum Glück verfügen wir im Gegensatz zu vielen anderen Ländern noch über genügend Mittel, um alle neu entdeckten, z. T. revolutionären Techniken wie die Nukleinsäureamplifikation (NAT) einsetzen zu können. Dies hat aber zur Folge, daß große Unsicherheit besteht, welchen Stellenwert noch die „alten“, konventionellen Techniken wie Mikroskopie, Kultur und Empfindlichkeitsprüfung besitzen, weiterhin ob oder wie lange wir uns angesichts der sinkenden finanziel-

len Möglichkeiten diese neuen Technologien noch leisten können. Diese MIQ-Tuberkulose/Mykobakteriose versucht hierzu Stellung zu beziehen und die diagnostischen Indikationen unter Berücksichtigung wirtschaftlicher Aspekte möglichst ausgewogen zu definieren.

Angesichts der besorgniserregenden Situation ist die Empfehlung einer „Minimal“-Diagnostik nicht zu verantworten. Deshalb wurden in diese MIQ die neuen empfindlicheren und „schnelleren“ Kulturtechniken als Standard mit aufgenommen und ebenso die Beschreibung der klassischen und der neuen Empfindlichkeitsprüfungen. *Diese müssen bei allen neu isolierten Tuberkulosebakterien durchgeführt werden*, weil die Resistenzrate im deutschsprachigen Raum konstant bei etwa 10 % liegt und nicht abnimmt, insbesondere aber, weil es in einigen europäischen Ländern zu einem äußerst bedrohlichen und vorläufig nicht beherrschbaren Anstieg der Resistenz, insbesondere multiresistenter Tuberkuloseerreger, auf 30 % und mehr gekommen ist. Diese resistenten Tuberkuloseerreger werden weiterhin zu uns transferiert. Die schnelle und exakte Erkennung ist nur gewährleistet, wenn alle Routinelaboratorien wissen, welche Methoden sie anwenden und wie sie die Befunde bewerten sollen („Präanalytik, Analytik und Postanalytik“). Die neue „MIQ-Tuberkulose/Mykobakteriose“ leistet hierzu Hilfestellung und ist ebenso von Bedeutung für die *Akkreditierungen* von Laboratorien.

Da trotz aller Bemühungen der Autoren Fehler, Mißverständnisse oder nicht korrekt formulierte Aussagen unvermeidlich sind, bitten wir Sie **um Zusendung Ihrer Kritik und Stellungnahmen an das MIQ-Sekretariat oder an die Autoren (Adressen s. 2. Umschlagseite)**, damit Ihre Vorschläge nach Diskussion in der Experten-Gruppe in die Neuauflage eingearbeitet werden können, die möglichst bald publiziert werden soll.

H. Mauch  
R. Küchler

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> . . . . .	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Einteilung der Mykobakterien</b> . . . . .	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>Gewinnung und Transport von Untersuchungsmaterial</b> . . . . .	<b>15</b>
<b>5</b>	<b>Mikroskopie</b> . . . . .	<b>19</b>
5.1	Allgemeines . . . . .	19
5.2	Herstellung mikroskopischer Präparate . . . . .	19
5.3.	Lichtmikroskopische Untersuchung . . . . .	20
5.4	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung . . . . .	21
5.5	Fehlerquellen bei der Färbung, Beurteilung mikroskopischer Präparate . . . . .	21
5.6	Beurteilung mikroskopischer Präparate . . . . .	22
<b>6</b>	<b>Kultur</b> . . . . .	<b>24</b>
6.1	Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials . . . . .	24
6.2	Kulturbedien . . . . .	25
6.3	Beimpfung, Ablesung und Beurteilung . . . . .	28
6.4	Fehlermöglichkeiten . . . . .	30
<b>7</b>	<b>Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT, z. B. PCR)</b> . . . . .	<b>32</b>
7.1	Allgemeines . . . . .	32
7.2	Spezifität und Sensitivität . . . . .	32
7.3	Bewertung der Technik . . . . .	33
7.4	Ausreichend validierte Indikationen für die Schnelldiagnostik mittels NAT . . . . .	34
<b>8</b>	<b>Identifizierung von Mykobakterien</b> . . . . .	<b>35</b>
8.1	Allgemeine Hinweise . . . . .	35
8.2	Differenzierung von Tuberkulosebakterien . . . . .	35
8.3	Identifizierung „atypische“ Mykobakterien . . . . .	37
8.3.1.	Konventionelle Methoden . . . . .	37
8.3.2	Gensonden . . . . .	37

8.3.3	Sequenzierung . . . . .	38
8.3.4	Chromatographische Methoden . . . . .	39
8.3.5	Medizinische Bedeutung . . . . .	39
<b>9</b>	<b>Empfindlichkeitsprüfung . . . . .</b>	<b>41</b>
9.1	Feste Kulturmedien . . . . .	41
9.2	Flüssige Kulturmedien . . . . .	42
9.3	Direkttest . . . . .	42
9.4	Pyrazinamid . . . . .	43
9.5	„Atypische“ Mykobakterien . . . . .	44
<b>10</b>	<b>Serologie, Stellenwert des Antikörpernachweises . . . . .</b>	<b>45</b>
<b>11</b>	<b>Hinweise zur Stufendiagnostik, Indikationen für den Einsatz der verschiedenen Nachweisverfahren . . . . .</b>	<b>46</b>
<b>12</b>	<b>Hinweise zur Wirtschaftlichkeit, unsinnige bzw. zweifelhafte Methoden, Indikationen . . . . .</b>	<b>49</b>
<b>13</b>	<b>Qualitätssicherung . . . . .</b>	<b>51</b>
13.1	Organisation mykobakteriologischer Untersuchungen in Stufen . . . . .	51
13.2	Laborinterne Qualitätsprüfung und Qualitätsmanagement . . . . .	52
13.3	Externe Qualitätsprüfung . . . . .	54
<b>14</b>	<b>Schutz vor Laborinfektion . . . . .</b>	<b>55</b>
<b>15</b>	<b>Literatur . . . . .</b>	<b>58</b>

# 1

## Zusammenfassung

Die Verdachtsdiagnose einer durch Mykobakterien verursachten Infektionskrankheit kann nur durch den Nachweis der Erreger mit mikroskopischen, kulturellen und molekularbiologischen Verfahren bestätigt werden. Der Nachweis von Antikörpern und der Tierversuch haben in der Laboratoriumsdiagnostik der Tuberkulose zur Zeit keine Bedeutung.

Wegen des oft von Probe zu Probe variablen Keimgehaltes sind immer drei zu verschiedenen Zeiten gewonnene Proben zu untersuchen (Atemwegssekrete, Urine).

**Mikroskopie.** Alle Proben müssen mikroskopiert werden – möglichst am selben Tag, spätestens innerhalb von 24 Stunden nach Probeneingang (Ausnahmen s. u.). Bei der häufigsten durch Mykobakterien verursachten Krankheit, der Lungentuberkulose, hat der mikroskopische Nachweis säurefester Stäbchen aus Sekreten der Atemwege eine hohe Aussagekraft für das Vorliegen einer Tuberkulose – vor allem im Zusammenhang mit der Anamnese, den klinischen und röntgenologischen Befunden. Die mikroskopische Untersuchung von Urin und Stuhl ist nicht oder nur bei sehr begründetem Verdacht empfehlenswert, da die Sensitivität gering ist, und/oder falsch positive Befunde zu häufig vorkommen.

**Kultur.** Jede Untersuchung zum Nachweis von Mykobakterien muß eine Kultur beinhalten (= Goldstandard). Nach Vorbehandlung der Proben, z. B. mit N-Acetyl-L-Cystein-NaOH (NALC-NaOH) zur Homogenisierung und Dekontamination mit anschließender Zentrifugation sind drei verschiedene Kulturmedien zu beimpfen (ein flüssiges und zwei feste Nährmedien) und bis zum Nachweis von Mykobakterien bzw. bis zu acht Wochen bei 37 °C zu inkubieren (zusätzlich bei 30 °C für Hautproben).

**Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT, z. B. PCR).** Für folgende Materialien und Indikationen gilt zur Zeit in deutschsprachigen Ländern der routinemäßige Einsatz der NAT zum Nachweis von Nukleinsäuren von Tuberkulosebakterien (nur in Ergänzung zur Mikroskopie und Kultur) als ausreichend validiert:

1. für *Atemwegssekrete* nur bei dringendem klinisch-radiologischem Tuberkuloseverdacht, aber negativer oder zweifelhaft positiver Mikroskopie
2. bei *AIDS-Patienten* mit mikroskopisch positivem Atemwegssekret (säurefeste Stäbchen nachgewiesen), und

3. für **Liquor** bei Verdacht auf Meningitis (mangels Standardisierung und Validierung der Probenaufbereitung ist die NAT nur in spezialisierten Laboratorien durchzuführen).

Als *Screening*-Methode ist die NAT bisher *nicht spezifisch und empfindlich* genug, zu aufwendig und zu teuer.

Die Ergebnisse der Mikroskopie und der Nukleinsäureamplifikationstechnik müssen mit den Ergebnissen der Kultur verglichen werden und sollen deshalb im selben Labor durchgeführt werden. Sie dürfen insbesondere bei positivem Ausfall nur im Zusammenhang mit den klinischen Daten beurteilt werden.

**Differenzierung der Mykobakterien.** Wenn säurefeste Bakterien in der Kultur nachgewiesen werden, ist zuerst eine Differenzierung zwischen Tuberkulosebakterien (*M. tuberculosis*-Komplex) und „atypischen“ Mykobakterien z. B. mit der Tuberkulose-DNS-Sonde vorzunehmen. In der Routine **müssen zur Absicherung konventionelle Bestätigungstests durchgeführt werden** (s. u.). Tuberkulosebakterien müssen weiter in *M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. bovis* BCG differenziert werden. Die Identifizierung von *M. tuberculosis* erfolgt aufgrund 1. der Säurefestigkeit, 2. der typischen Morphologie auf *Löwenstein-Jensen*-Medium, 3. dem Nachweis von Nikotinsäure (Niacintest) und 4. der Nitratreduktase. Eine Identifizierung von „atypischen“ Mykobakterien ist nur dann sinnvoll, wenn der dringende Verdacht besteht, daß sie ursächlich an dem Krankheitsbild beteiligt sind (Voraussetzungen s. 8.3.5). Zur Identifizierung „atypischer“ Mykobakterien werden zeit- und arbeitsaufwendige biochemische Verfahren eingesetzt, vereinzelt jedoch auch die schnelleren molekularbiologischen Verfahren (spezialisierte Laboratorien).

**Empfindlichkeitsprüfung.** Beim Nachweis von Tuberkulosebakterien ist vom ersten Isolat, und falls unter der Therapie noch Kulturen positiv bleiben, alle acht Wochen eine Empfindlichkeitsprüfung durchzuführen – mit der Proportionsmethode auf *Löwenstein-Jensen*-Medium, bevorzugt jedoch mit der schnelleren Empfindlichkeitsprüfung in flüssigen Kulturmedien.

**Allgemeine Laborvoraussetzungen.** Die Mikroskopie zum Nachweis von Tuberkulosebakterien soll in jedem bakteriologischen Labor durchführbar sein und für Notfälle, z. B. bei Verdacht auf *Meningitis tuberculosa* auch am Wochenende sofort zur Verfügung stehen. Die NAT, eine Keimidentifizierung und Empfindlichkeitsprüfung sollen nur in Laboratorien erfolgen, die bei diesen Untersuchungen die erforderliche Erfahrung haben (MiQ-1-NAT) und deren Ausstattung den Sicherheitsanforderungen nach der europäischen Norm entspricht (s. Kapitel 14).

# 2

## Einleitung

Mykobakterien sind Ursache chronischer, granulomatöser Entzündungen. Der Verlauf der durch Mykobakterien verursachten Erkrankungen (Mykobakteriosen) ist abhängig von der Mykobakterienart und deren Eigenschaften, vom Infektionsort und ganz besonders von der Immunitätslage des einzelnen Patienten. Generalisierte Infektionen kommen bei Versagen der zellulären Immunantwort vor. Schwerwiegende Krankheitsverläufe wie Miliartuberkulose oder *Meningitis tuberculosa* werden immer wieder beobachtet, ebenso recht häufig septische Krankheitsbilder bei AIDS-Patienten. Bakterien des *M. avium*-Komplexes und einige andere Mykobakterienarten können bei AIDS-Patienten zu generalisierten Erkrankungen führen.

Seit Jahren ist die Inzidenz der Tuberkulose in Deutschland rückläufig, der Anteil der anderen differentialdiagnostisch in Betracht kommenden Erkrankungen z. B. Malignome, chronische Entzündungen anderer Ursache nimmt jedoch stetig zu. Damit wird die Labordiagnostik für die Erkennung der durch Mykobakterien verursachten Krankheiten immer wichtiger.

Die Familie *Mycobacteriaceae* mit der einzigen Gattung *Mycobacterium* besteht aus aerob oder mikroaerophil, überwiegend langsam wachsenden, nicht beweglichen, stäbchenförmigen Bakterien. Das charakteristische gemeinsame Merkmal ist ihre „Säurefestigkeit“, d. h. aufgenommener Farbstoff ist durch Schwefelsäure oder durch Salzsäure-Alkohol-Gemische nur schwer zu entfernen. Die Säurefestigkeit ist aber kein absolutes Kriterium, weil viele Mitglieder der verwandten Gattungen *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordona*, Zysten von Kryptosporidien und *Cyclospora* (21) eine partielle Säurefestigkeit aufweisen.

# 3

## Einteilung der Mykobakterien

Unter infektiologischen und epidemiologischen Gesichtspunkten lassen sich die verschiedenen Mykobakterienarten in zwei Hauptgruppen einteilen:

1. von Mensch zu Mensch übertragbare Erreger (Tuberkulose- und Leprabakterien)
2. Mykobakterienarten, die in der Regel nicht von Mensch zu Mensch übertragen werden.

### 1. Tuberkulosebakterien (= *M. tuberculosis*-Komplex), Leprabakterien

- *M. tuberculosis* und geografische Varianten wie *M. africanum*
- *M. bovis*
- *Bacille Calmette-Guérin* (BCG), ein dem *M. bovis* verwandter Typ von Tuberkulosebakterium wird aufgrund seiner äußerst geringen Virulenz zur Impfung verwendet
- *M. microti*, eine bisher nahezu ausschließlich bei Nagern als Tuberkuloseerreger beschriebene Art (inzwischen gibt es Einzelfallberichte über das Vorkommen beim Menschen)
- *M. leprae*. Da diese Art bisher nicht auf Kulturmedien gezüchtet werden konnte, erfolgt keine weitere Besprechung.

### 2. „Atypische“ Mykobakterien

Andere Bezeichnungen: „ubiquitäre“ Mykobakterien, „nichttuberkulöse“ Mykobakterien, **mycobacteria other than tuberculosis** (MOTT), **nontuberculous mycobacteria** (NTM):

Keine dieser Bezeichnungen ist absolut zutreffend oder überzeugend. Auch die Bezeichnung „atypisch“ ist nicht korrekt, weil Bakterien nie „atypisch“ sind. Da jedoch dieser Ausdruck am weitesten verbreitet ist und sich fest eingebürgert hat, haben wir diese Bezeichnung vorläufig beibehalten.

In der Gruppe „atypische“ Mykobakterien werden alle Mykobakterien zusammengefaßt, die nicht zu den in Gruppe 1 genannten Arten gehören und bei denen die Übertragung von Mensch zu Mensch nicht nachgewiesen ist.

Keime dieser Gruppe werden häufig in klinischem Untersuchungsmaterial gefunden, und ihr Nachweis spricht nur dann für das Vorliegen einer durch sie verursachten Krankheit, wenn bestimmte klinische, radiologische und bakteriologische Kriterien erfüllt sind (s. 8.3.5.). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht „atypischer“ Mykobakterien mit der richtungsweisenden Angabe der Häufigkeit ihrer potentiellen Pathogenität, bzw. ihrer medizinischen Relevanz.

Von **klinischer Bedeutung** sind

1. vorwiegend als Erreger tuberkuloseähnlicher **Lungenerkrankungen:**  
*M. kansasii*, *M. avium*-Komplex, *M. malmoense*, *M. simiae*, *M. szulgai* und *M. xenopi*;
2. vorwiegend als Erreger von **Hauterkrankungen:**  
*M. marinum* (Erregerreservoir in Aquarien, Schwimmbädern, Fisch tanks),  
*M. haemophilum*, *M. ulcerans* (praktisch nur in West-, Zentralafrika und Australien);
3. Erreger von **Lymphadenitis** (besonders bei Kindern):  
*M. scrofulaceum*, *M. avium*-Komplex, *M. malmoense*, *M. interjectum*;
4. Erreger **unspezifischer eitriger Entzündungen:**  
*M. fortuitum* und *M. chelonae*;
5. bei **AIDS**-Patienten als Erreger generalisierter Erkrankungen:  
*M. avium*-Komplex, *M. genavense*, *M. celatum*, *M. kansasii*.

Tab. 1: Übersicht über die Mykobakterienarten und ihre klinische Bedeutung

Langsam wachsende Mykobakterien		Schnell wachsende Mykobakterien	
Keimart	klinische Relevanz <sup>a,b</sup> des Nachweises in medizinischem Untersuchungsmaterial	Keimart	klinische Relevanz <sup>a,b</sup> des Nachweises in medizinischem Untersuchungsmaterial
<i>M. africanum</i>	1	<i>M. abscessus</i>	3
<i>M. asiaticum</i>	1	<i>M. agri</i>	4
<i>M. avium</i>	2	<i>M. aichiense</i>	4
<i>M. bohemicum</i>	2	<i>M. alvei</i>	4
<i>M. bovis</i>	1	<i>M. aurum</i>	4
<i>M. branderi</i>	2	<i>M. austroafricanum</i>	4
<i>M. celatum</i>	2	<i>M. brumae</i>	4
<i>M. conspicuum</i>	2	<i>M. chelonae</i>	3
<i>M. cookii</i>	4	<i>M. chitae</i>	4
<i>M. gastri</i>	4	<i>M. chubuense</i>	4
<i>M. genavense</i>	2	<i>M. confluentis</i>	4
<i>M. gordonae</i>	4	<i>M. diernhoferi</i>	4
<i>M. haemophilum</i>	2	<i>M. duvalii</i>	4
<i>M. hiberniae</i>	4	<i>M. fallax</i>	4
<i>M. interjectum</i>	2	<i>M. flavescens</i>	4
<i>M. intermedium</i>	2	<i>M. fortuitum</i>	3
<i>M. intracellulare</i>	2	<i>M. gadium</i>	4
<i>M. kansasii</i>	2	<i>M. gilvum</i>	4
<i>M. lentiflavum</i>	3	<i>M. komossense</i>	4
<i>M. leprae</i>	nicht kultivierbar	<i>M. madagascariense</i>	4
<i>M. malmoense</i>	2	<i>M. methylovorum</i>	4
<i>M. marinum</i>	1	<i>M. moriokaense</i>	4
<i>M. microti</i>	bei Tieren gegeben	<i>M. mucogenicum</i>	3
<i>M. nonchromogenicum</i>	4	<i>M. neoaurum</i>	4
<i>M. paratuberculosis</i>	bei Tieren gegeben	<i>M. obuense</i>	4
<i>M. scrofulaceum</i>	2-3	<i>M. parafortuitum</i>	4
<i>M. shimoidei</i>	2	<i>M. peregrinum</i>	3
<i>M. simiae</i>	2-3	<i>M. phlei</i>	4
<i>M. szulgai</i>	2	<i>M. porcinum</i>	bei Tieren gegeben
<i>M. terrae</i>	4	<i>M. poriferae</i>	4
<i>M. triplex</i>	3	<i>M. pulveris</i>	4
<i>M. triviale</i>	4	<i>M. rhodesiae</i>	4
<i>M. tuberculosis</i>	1	<i>M. senegalense</i>	bei Tieren gegeben
<i>M. ulcerans</i>	1	<i>M. shanghaiense</i>	4
<i>M. xenopi</i>	2-3	<i>M. smegmatis</i>	4
		<i>M. sphagni</i>	4
		<i>M. thermoresistibile</i>	4
		<i>M. tokaiense</i>	4
		<i>M. vaccae</i>	4
		<i>M. yunnanense</i>	4

<sup>a</sup> über die klinische Bedeutung „atypischer“ Mykobakterien s. 8.3.5.

<sup>b</sup> als Krankheitserreger nachgewiesen: pathogen bzw. potentiell pathogen mit Einteilung in vier Stufen:

1 nur als Krankheitserreger nachgewiesen.

2 im Regelfall als Krankheitserreger, nur gelegentlich als Kontaminante nachgewiesen.

3 häufig als Kontaminante, nur gelegentlich als Krankheitserreger nachgewiesen.

4 im Regelfall als Kontaminante nachgewiesen.