



TB —

Bakteriologische Diagnose

Prof. Dr. Gaby E. Pfyffer, LUKS, CH-6000 Luzern 16

Inhalt

- ◆ **Déjà-vus:**
Mikroskopie, Kultur, Identifizierung, molekularer Direkt-nachweis
- ◆ **Neues:**
MDR TB, XDR TB und Resistenztestung

Mykobakterien

Säure-Alkohol-fest (SFS), aerob, meist langsam wachsend

M. tuberculosis-Komplex

M. tuberculosis

M. bovis

M. bovis BCG

M. caprae

M. africanum

M. microti

M. canettii

M. pinnipedii

NTM

MAC

M. kansasii

M. simiae

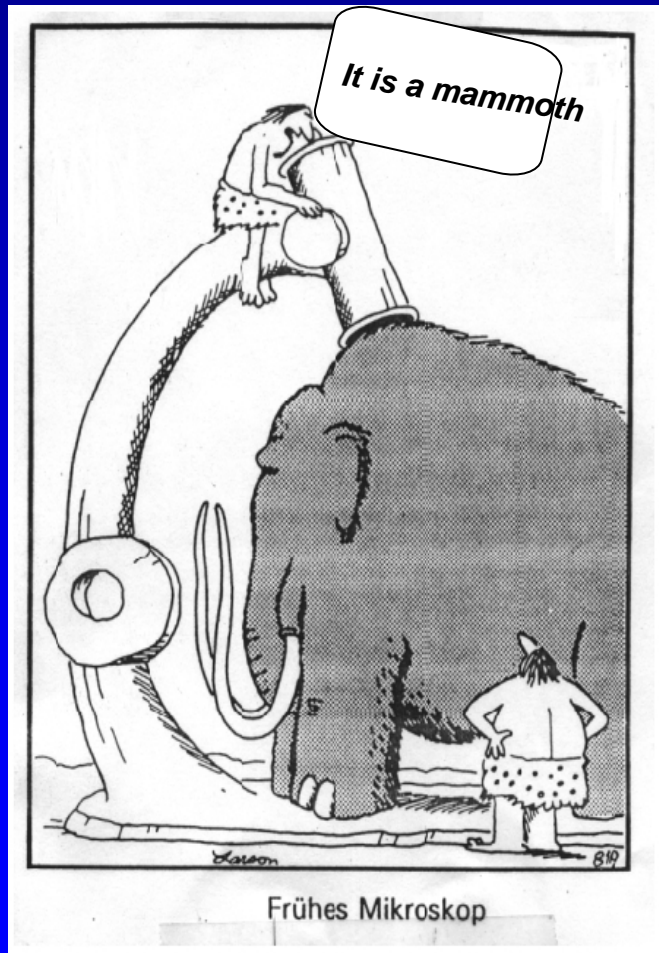
M. fortuitum

M. wolinskyi...

2010: ca. 200 Species

Déjà-vus:
Mikroskopie
Kultur
Identifizierung
Molekularer Direktnachweis

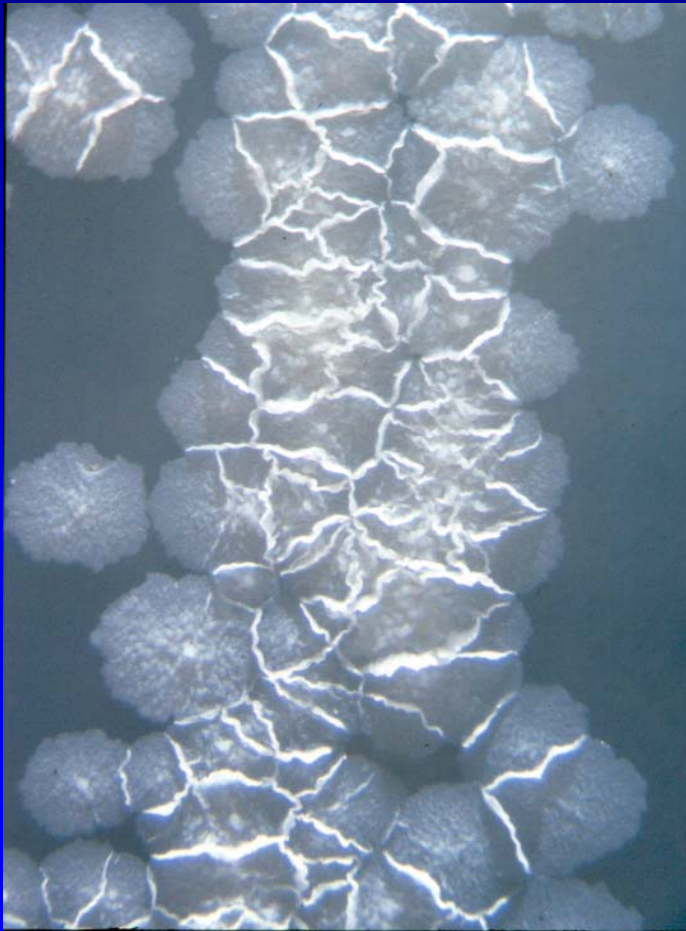
Mikroskopie



Ziehl-Neelsen
Kinyoun
Fluorochromfärbung

Sensitivität: ca. 60%
 $5 \times 10^3 - 10^4$ SFS/ml notwendig

Goldstandard Kultur



Feste Medien

Löwenstein-Jensen

Middlebrook 7H10 Agar, etc.

Flüssige Medien

Dubos

(BACTEC 460TB [¹⁴C])

BACTEC MGIT 960

MB/BacT Alert

Sensitivität: ca. 94%

ca. 10² SFS/ml notwendig



Identifizierung



Gensequenzierung (z.B. 16S rDNA)

(PCR / Restriktionsenzym-Analyse des
65-kDa *hsp*-Gens [PRA])



Line Probe Assays

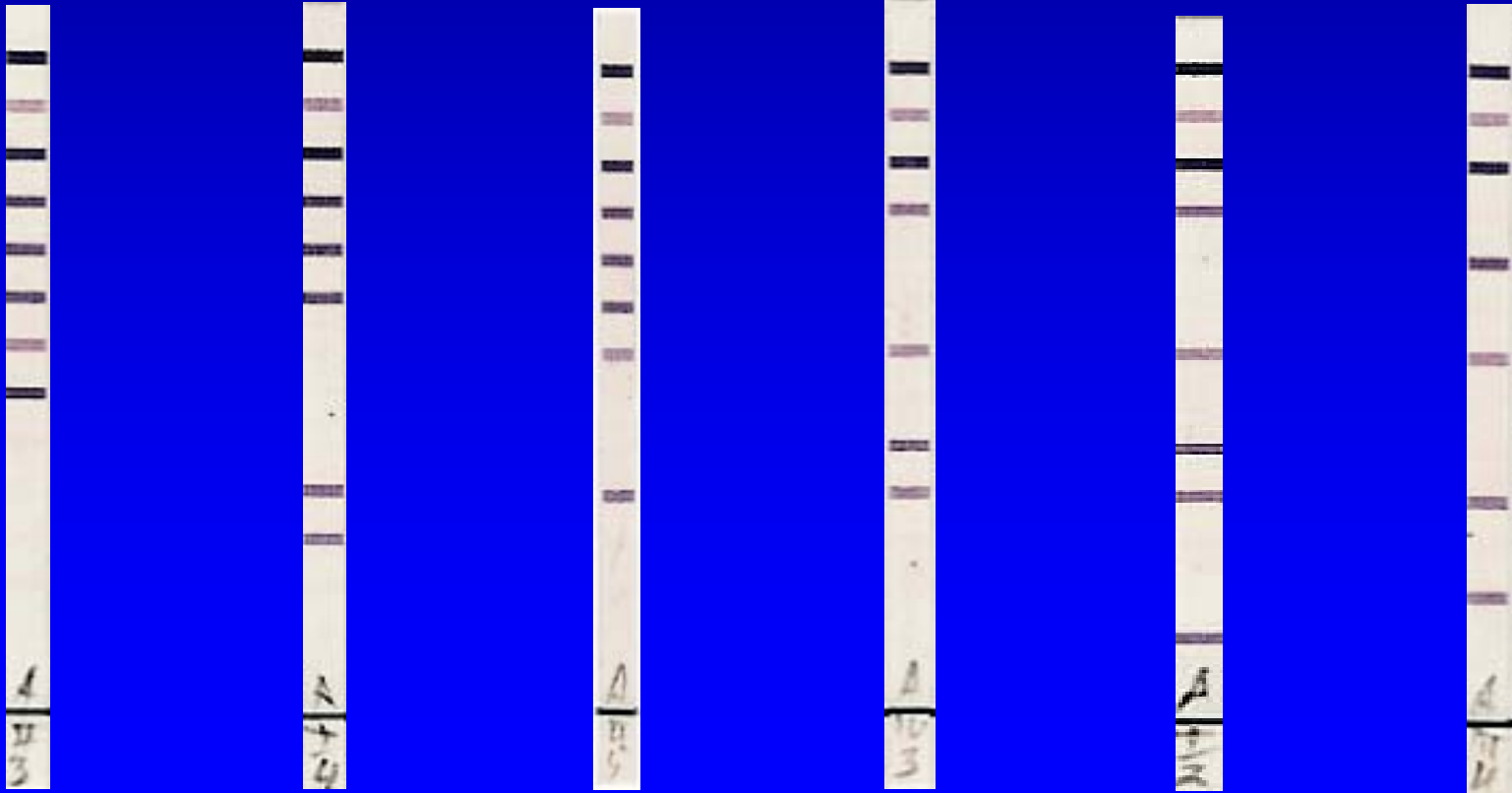
TBdirect (BD)



(Typisierungsmethoden)

Identifizierung von *MTBC* mittels LPA (GenoType® Mycobacterium)

M. tuberculosis / *M. microti* *M. africanum* I *M. bovis* *M. bovis* BCG *M. caprae*
africanum II

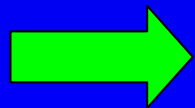


HAIN

Molekularer Direktnachweis von MTBC

	Sensitivität	Spezifität
Mikroskopie	61.5%	99.7%
Cobas Amplicor	95.5% (mik+)	99.9%
	50.0% (mik-)	
BDProbeTec ET	100% (mik+)	99.9%
	64.3% (mik-)	

(*n* = 824 respiratorische Proben)



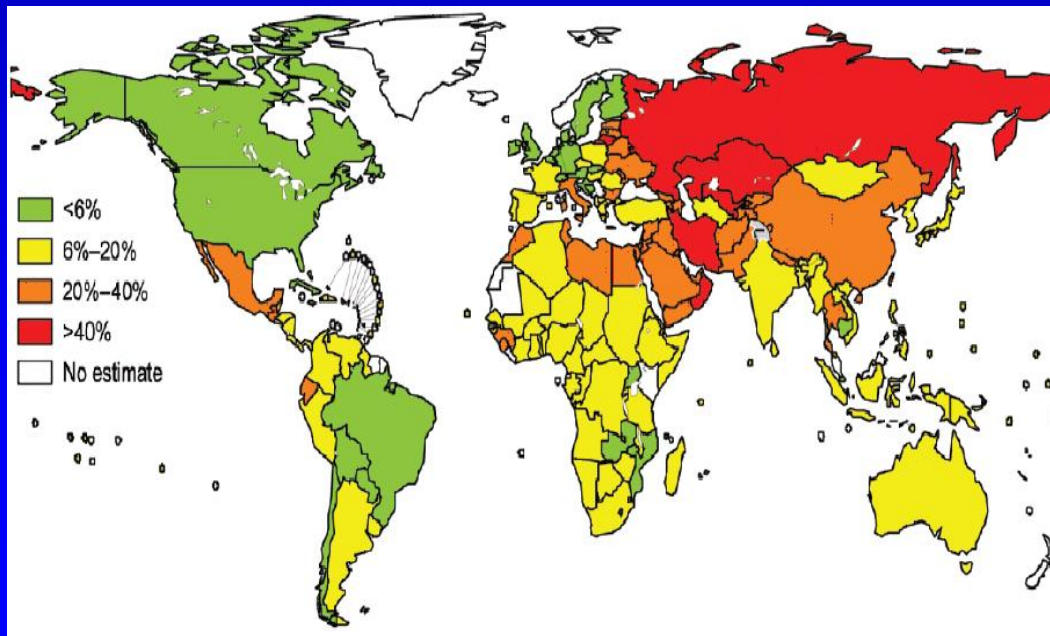
Schlussfolgerung: NAAT = Hilfsmethoden!

Goessens et al. JCM 2005;43:2563-2566

Neues:
MDR TB, XDR TB und
Implikationen für
die Resistenztestung

MDR-TB

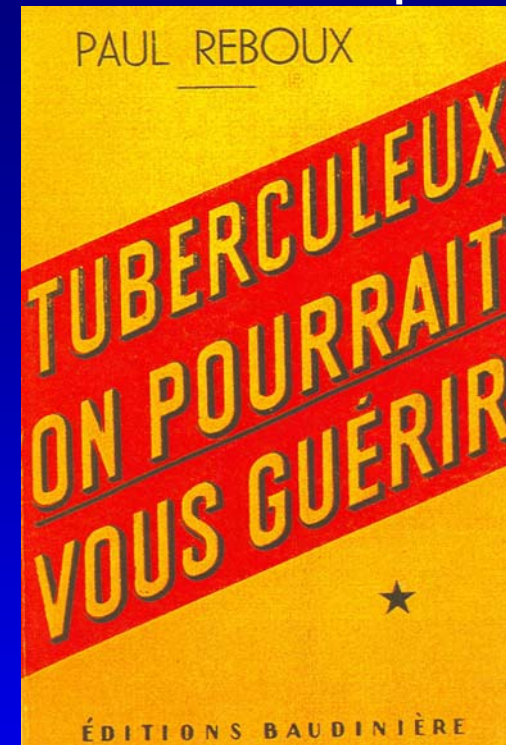
MDR-TB Multi Drug Resistant (mind. INH^R, RMP^R, oft resistent gegen weitere Antibiotika)



- ◆ Dokumentiert in ca. 90 Ländern/Regionen
- ◆ 424 000 Fälle p.a. (= 4.5% aller neuer resp. therapierter TB Fälle)

MDR TB Therapie

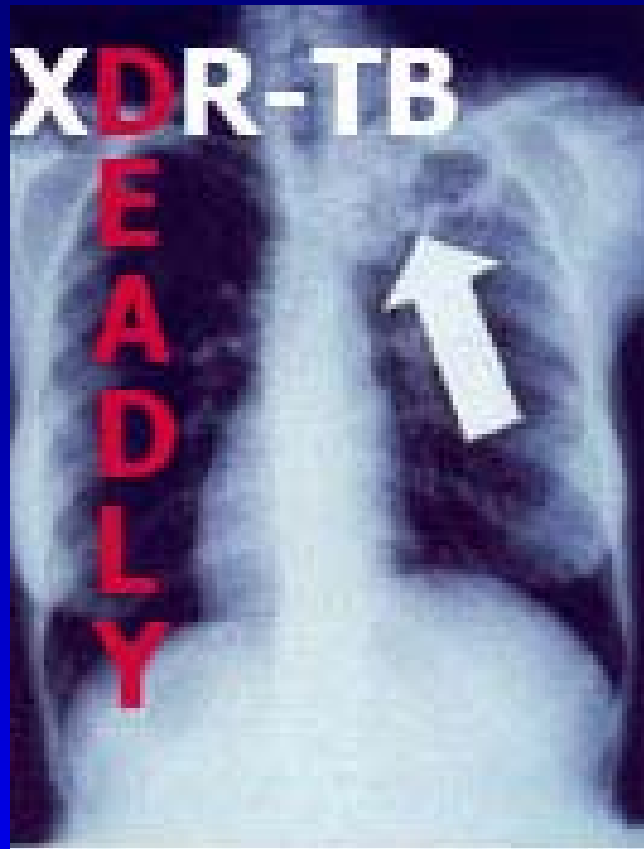
- ◆ **2nd line drugs (SLD)**
Tx für mind. 18 Monate
- ◆ weniger effektiv
- ◆ teurer als 1st line drugs
- ◆ toxischer



'It could cost more to treat the 4.5 % of the new MDR-TB cases than all other new drug susceptible TB cases together.' (WHO)

MDR-TB Therapie plus Linezolid

- ◆ NY City 2006-2008: 6 MDR, 10 XDR
1-29 Mte. Linezolid (median 16 Monate)
- ◆ 69% beendeten Tx, 25% starben, 6% gaben auf
- ◆ **Nebenwirkungen:** Myelosuppression 81%, gastrointestinale Probleme 81%, Neurotoxizität 44%, Leukopenie und Neuropathie (v.a. Männer), Thrombocytopenie (v.a. ältere Patienten) *Anger et al. JAC 2010*



eXtensively Drug Resistant TB

RMP^R, INH^R plus R gegenüber den beiden wichtigsten SLD Klassen (Fluoroquinolone resp. injizierbare Agentien, z.B. AK, K, CAP)

Countries that had reported at least one XDR-TB case by September 2009



- | | | | | | | |
|------------|----------------|------------------------|------------|-------------|---------------------|--------------------------|
| Argentina | Burkina Faso | Georgia | Kenya | Nepal | Qatar | Swaziland |
| Armenia | Canada | Germany | Latvia | Netherlands | Republic of Korea | Sweden |
| Australia | China | India | Lesotho | Norway | Republic of Moldova | Thailand |
| Azerbaijan | Colombia | Iran (Islamic Rep. of) | Lithuania | Oman | Romania | Ukraine |
| Bangladesh | Czech Republic | Ireland | Mexico | Peru | Russian Federation | United Arab Emirates |
| Belgium | Ecuador | Israel | Mozambique | Philippines | Slovenia | United Kingdom |
| Botswana | Estonia | Italy | Myanmar | Poland | South Africa | United States of America |
| Brazil | France | Japan | Namibia | Portugal | Spain | Uzbekistan |
| | | | | | | Viet Nam |

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 lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2009. All rights reserved

63
Länder!

Beispiel Lettland

2000-2002 605 MDR-TB
115 (19%) waren XDR-TB

2000: 30/204 (15%)
2001: 46/215 (21%)
2002: 39/186 (21%)



Riga

MDR TB, XDR TB, HIV

2005-2007 Tugela Ferry, ZA

- ◆ 272 MDR TB, 382 XDR TB
- ◆ HIV Co-Infektionsraten: 90 resp. 98%
- ◆ Mortalität innerhalb eines Jahres:
71% bei MDR TB, 83% bei XDR TB
- ◆ 40% der MDR TB und 51% der XDR TB Patienten
starben innerhalb von 30 d nach der Gewinnung
des Sputums

Gandhi et al. AJRCCM 2010;181:80-86

Resistenztestung: welche Methoden?

Phänotypische Techniken (via Kultur)

- ◆ **Proportions-, Absolutkonzentrations-, Resistenzraten-Methode (BACTEC 460), MGIT, BACTEC MGIT 960**
- ◆ **Nitrat Reductase Assay**
- ◆ **Mikroskopische Beobachtung (Mikrokoloniemethoden etc.)**
- ◆ **Kolorimetrie**
- ◆ **Etest**
- ◆ **Mycobacteriophagen**

luzerner kantonsspital

M24-A

M24-A
Vol. 23 No. 18
Replaces M24-T2
Vol. 20 No. 26

Susceptibility Testing of Mycobacteria,
Nocardiae, and Other Aerobic
Actinomycetes; Approved Standard

This standard provides protocols and related quality control parameters and interpretive criteria for the susceptibility testing of mycobacteria, *Nocardia* spp., and other aerobic actinomycetes.

A standard for global application developed through the NCCLS consensus process.



Drug susceptibility
testing

Second line drugs: Kritische Konzentrationen (mg/L)

SLD	BACTEC MGIT 960	BACTEC 460
Amikacin	1.0	1.0
Capreomycin	2.5	1.25
Ethionamid	5.0	2.5
Prothionamid	2.5	1.25
Ofloxacin	2.0	2.0
Rifabutin	0.5	0.5
Linezolid	1.0	1.0

Rüsch-Gerdes et al. JCM 2006;44:693-699

Pfyffer et al. JCM 1999;37:3179-3186

Resistenztestung Flüssig- vs Festmedium

117 Stämme von *M. tuberculosis*

Übereinstimmung Agar-Proportionsmethode mit
BACTEC MGIT 960 96.4%

Levofloxacin 99.1%

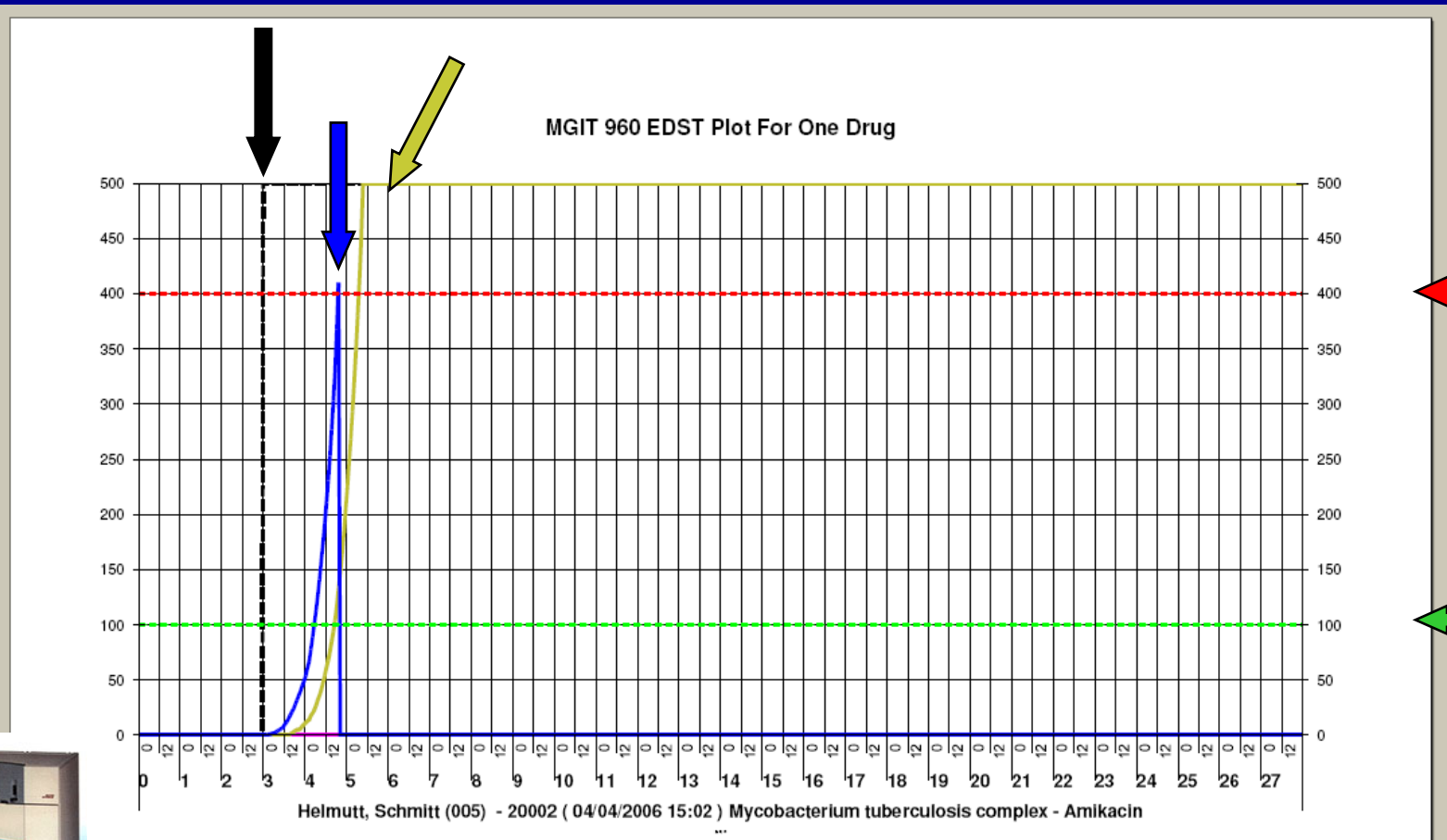
Amikacin 100%

Capreomycin 97.4%

Ethionamid 88.9%

Lin et al. JCM 2009:47:3630-6

Epicenter TB-eXiST plot per drug



Red dashed line	GU=400 Growth Control Threshold	Yellow line	Amikacin 1.0 µg/mL (430126808641)	Grey line	Series7
Green dashed line	GU=100 Resistance Threshold	Magenta line	Amikacin 4.0 µg/mL (430126808639)	Red line	Series8
Blue line	Growth Control (430125909660)	Cyan line	Amikacin 20.0 µg/mL (430126809637)	Black vertical line	Mtb 72hr Interpretation Threshold

Vorteile des EpiCenter TB-eXiST

- ◆ Tests aller TB-Isolate sind möglich, auch jener, die innerhalb von 13 d mit der Wachstumskontrolle nicht 400 erreichen oder bei den Medikamenten nur sanft ansteigen, aber nicht die threshold von 100 erreichen
- ◆ Tests aller beliebiger 2nd /3rd line drugs
- ◆ 1st line drug Testing kann verlängert und beliebige Konzentrationen getestet werden

Quantitative Resistenzprüfung (1)

BACTEC MGIT 960 plus Epicenter software mit
TB eXiST Modul

- ◆ **INH: 0.1 mg/L für Screening**
0.1 R, 1.0 S → Mutation auf *inhA*
1 R → Mutation auf *katG*
10 R → keine klinische Verwendung von INH
- ◆ **RMP: 1 mg/L für Screening**
10 R → Erkennen von HLR
Die meisten Mutationen auf dem *rpoB* sind mit HLR
assoziiert (R bei > 50 mg/L)

Springer et al. JCM 2009;47:1773-80

Quantitative Resistenzprüfung (2)

- ◆ **EMB: 5 mg/L für Screening**
25 S oder I → meistens Mutationen im *embB*
25 R → Erkennen von HLR
- ◆ **SM / AK: 1 mg/L für Screening**
20 R → Erkennen von HLR
4 kann gebraucht werden, um zwischen LLR (R bei 1, S bei 4 mg) und intermediärer Resistenz (R bei 1 mg, I oder R bei 4 mg; S bei 20 mg) zu unterscheiden

Springer et al. JCM 2009;47:1773-80

Probleme am Beispiel von RMP

Resistenzprüfung von **19** Stämmen mit LJ (6), Middlebrook (2), BACTEC 460 (2), BACTEC MGIT 960 (2)

- ◆ **2 S und 3 PS:** alle S, keine Mutation auf *rpoB*
- ◆ **1 R und 1 PR:** Ser531Leu Mutation
- ◆ **5 R und 7 PR:** Mutationen Asp516Tyr (4), Leu511Pro (3), Leu533Pro (2), His526Leu/Ser (1), Ile572Phe (1) — **Alle 12 S mit BACTEC 460 and 960**, davon jedoch nur 1 Stamm S auf LJ und 2 auf Middlebrook!
- ◆ Gewisse Mutationen auf *rpoB* werden wahrscheinlich mit kultureller Resistenztestung verpasst, v.a. mit den automatisierten Systemen!

Van Deun et al. JCM 2009;47:3501-06

Genotypische Techniken

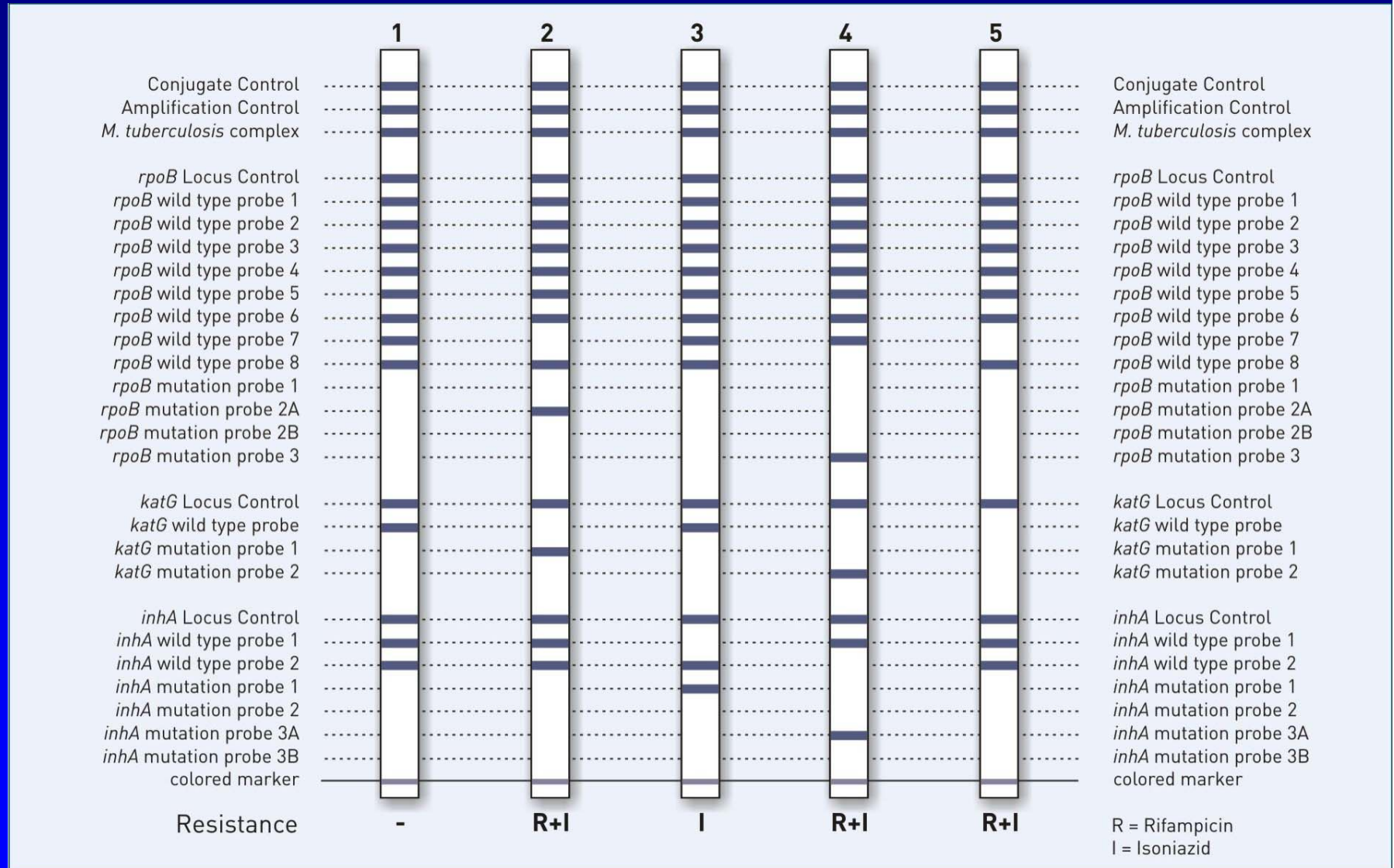
- ◆ Line probe assays: *INNOLiPA Rif.*, *GenoType MTB DRplus*, *GenoTypes/*
- ◆ Microarray
- ◆ DNA Gen-Sequencing
- ◆ etc.



Resistenz-Mechanismen *M. tuberculosis*

AB	Resistenzgen/Produkt	Mutation (%)
RMP	<i>rpoB</i> / RNA Polymerase	90-98
EMB	<i>embB</i> / Arabinosyl transferase	48-62
INH	<i>katG</i> / Katalase-Peroxidase	42-58
	<i>inhA</i>	21-34
	<i>ahpC</i>	10-15

GenoType MTBDRplus



GenoType MTBDRplus vs Sequencing

242 MDR TB Stämme (30 voll empfindlich)

- ◆ INH
katG, inhA vs katG, inhA, inhA locus, oxyR-ahpC
Sensitivität: INH 81.8 vs 93.4% → (P < 0.001)
- ◆ RMP
rpoB
Sensitivität: RMP 95.5 vs 97.9% → gleich (P = 0.13)
- ◆ MDR TB 78.5 vs 91.3% → (P < 0.001)
Spezifität für Nachweis einer MDR TB: 100% (beide Methoden)

Huang JCM 2009;47,2520-2524

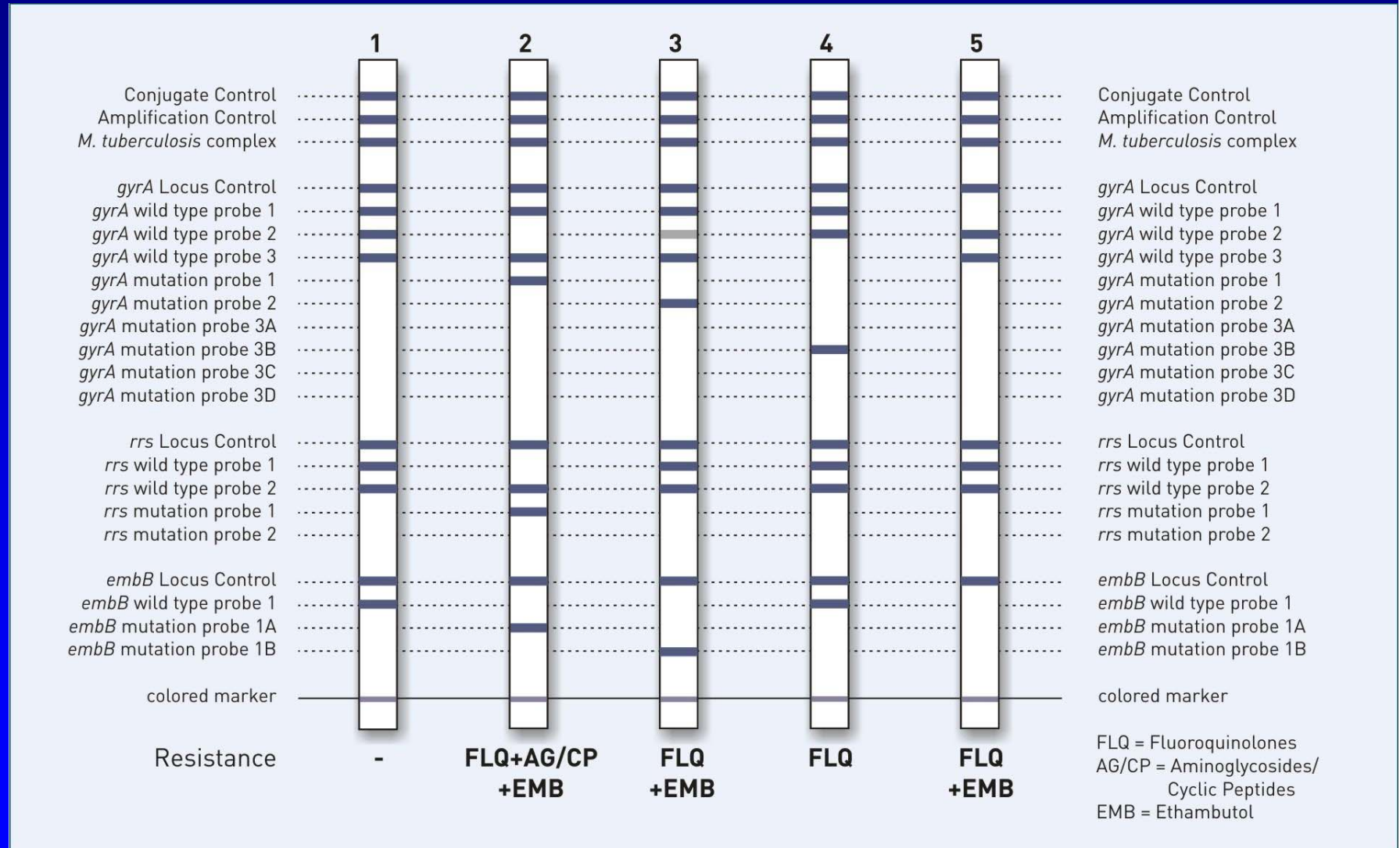
Achtung! Variierende Sensitivität

Südafrika

- ◆ **GenoType MTBDRplus Assay:**
91.5% bei MDR TB, **56.1%** bei INH Monoresistenz,
70% bei RMP Monoresistenz
- ◆ **Multiplex Allele Spezifische PCR:**
91.5% bei MDR TB, **53.7%** bei INH Monoresistenz
- ◆ **Kenntnis der lokalen Muster der TB-Stämme ist wichtig: INH-monoresistente Stämme der X3 Linie haben für INH andere Resistenz-Determinanten als das *katG* oder *inhA* Gen!**

Evans et al. JAC 2009;63:11-16

GenoType MTBDRs/



Genotype MTBDRs/

106 klinische Isolate von *M. tuberculosis* und 64 Sputa (direkt)

Fluorchinolone, Amikacin, Capreomycin, Ethambutol

- ◆ 63 Stämme R auf FQ, AK/CAP, EMB; 43 voll S
- ◆ Genotype, DNA Sequencing, BACTEC MGIT 960, LJ; Keine Diskrepanz zu Sequencing
- ◆ 64 Sputa (42 sm+, 12 +/-, 10 sm-) vs MGIT: FQ^R 8/9 (88.9%), AK^R 6/8 (75%), CAP^R 7/8 (87.5%), EMB^R 10/26 (38.5%). Alle S waren S
- ◆ **Genotype MTBDRs/ ist gut für FQ und AK/CAP, weniger für EMB. Dauer der Analyse: nur 1-2 d!**

Hillemann et al. JCM 2009;47:1767-72

Fall Patient A. A., geb. 1988

BACTEC MGIT 960 (2 x)

INH 0.1/ 0.4 R/R

RMP 1 R

EMB 5* S

PZA 100 R

SM 1/4 R/R

AK, CAP* S, S

FQ, LIN S, S

GenoTypeplus

katG Mutation, *inhA* WT

rpoB Mutation

embB Mutation!

rrs WT!

gyrA WT

*Proportionsmethode: EMB und CAP sind R

Zusammenfassung (1)

- ◆ Goldstandard der Mykobakteriendiagnostik: **Kombination traditioneller** (Mikroskopie, Kultur → Resistenzprüfung) **und molekularer Methoden** (Identifizierung, Direktnachweis, Resistenzprüfung, Typisierung)
- ◆ XDR TB Stämme sind eine neue Bedrohung und könnten die globalen Anstrengungen zur Eradizierung der TB torpedieren.



Zusammenfassung (2)

- ◆ Wichtig ist bei V. a. MDR TB oder XDR TB die rasche Verfügbarkeit von Resistenzresultaten (→ molekulare und moderne kulturelle Verfahren /1-2 d vs 5-10 d)
- ◆ Kritische Konzentrationen für SLD sind verfügbar für BACTEC MGIT 960 resp. MGIT
- ◆ SLD Tests nur durch Laboratorien mit der notwendigen Erfahrung (→ Qualität!)



