

**Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. Dr. U. B. Göbel**

**Einfluss der Lagerungszeit und Lagerungsbedingungen von
Untersuchungsmaterialien auf den Nachweis von
Tuberkuloseerregern**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin**

vorgelegt von

**Anna Stepanyan
Jerewan (Armenien)**

Referent: Prof. Dr. med. Ralf Ignatius

Korreferent: Prof. Dr. med. Achim Kramer

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 30.01.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 7 -
1.1 Epidemiologie der Tuberkulose	- 7 -
1.2 Ätiologie der Tuberkulose	- 8 -
1.3 Die Übertragung von <i>M. tuberculosis</i>	- 9 -
1.4 Therapie	- 9 -
1.5 Mikrobiologische Diagnostik	- 9 -
1.6 Fragestellungen und Ziele der Dissertation	- 15 -
2. Material und Methoden	- 17 -
2.1 Materialverzeichnis	- 17 -
2.1.1 Isolate von <i>M. tuberculosis</i>	- 17 -
2.1.2 Technische Geräte	- 17 -
2.1.3 Reagenzien	- 17 -
2.1.4 Gebrauchsmaterialien	- 18 -
2.2 Methodenverzeichnis	- 19 -
2.2.1 Beschaffung bzw. Herstellung der Untersuchungsmaterialien	- 19 -
2.2.2 Anlage von Mykobakteriensuspensionen	- 19 -
2.2.3. Mikroskopie der Präparate (nach DIN 58943-32)	- 21 -
2.2.4. Auswertung der Daten und Statistik	- 22 -
3. Ergebnisse	- 23 -
3.1. Etablierung des experimentellen Systems	- 23 -
3.2. Bestimmung des Einflusses der Lagerungstemperatur auf die Geschwindigkeit des kulturellen Nachweises von <i>M. tuberculosis</i> aus BAL-, MS- und MSP-Proben	- 28 -
3.3. Bestimmung des Einflusses der Lagerungstemperatur auf die Geschwindigkeit des kulturellen Nachweises von <i>M. tuberculosis</i> aus BAL-Proben	- 32 -
3.4. Bestimmung des Einflusses der Lagerungstemperatur auf die Geschwindigkeit des kulturellen Nachweises von <i>M. tuberculosis</i> aus MSP-Proben	- 35 -
3.5. Bestimmung des Einflusses der Lagerungstemperatur auf die Geschwindigkeit des kulturellen Nachweises von <i>M. tuberculosis</i> aus MS-Proben	- 38 -

3.6. Dauer und Temperatur während der Lagerung von BAL-, MSP und MS-Proben beeinflussen nicht die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung	- 40 -
4. Diskussion	- 42 -
5. Zusammenfassung	- 47 -
6. Literatur	- 48 -
7. Danksagung	- 53 -
8. Lebenslauf	- 54 -
9. Erklärung	- 55 -

Abkürzungen

Abb. – Abbildung

BAL – bronchoalveoläre Lavage

CO₂ – Kohlendioxid

DIN – deutsche Industrienorm

DNS – Desoxyribonukleinsäure

FKS – Fötale Kälberserum

GF – Gesichtsfeld

HCl – Salzsäure

HIV – human immunodeficiency virus

KBE/ml – Kolonien bildende Einheiten pro ml

LCR – ligase chain reaction

M. haemophilum – Mycobakterium haemophilum

M. tuberculosis – Mycobakterium tuberculosis

MDR-TB – multi drug resistance tuberculosis

MGIT – **M**ycobacteria **G**rowth **I**ndicator **T**ube

MOTT – **m**ycobacteria **o**ther than **t**ubercle bacilli

MS – Magensaft

MSP – gepufferter Magensaft

NaCl – Natriumchlorid

NALC – N-Acetyl-L-Cystein

NaOH – Natrium Hydroxid

OADC – **O**leic **A**cid **A**lbumin **D**extrose **C**omplex

PACT – **P**olymyxin, **A**mphotericin **B**, **C**arbenicillin, **T**rimetoprim

PANTA – **P**olymyxin **B**, **A**mphotericin **B**, **N**alidixinsäure, **T**rimethoprim, **A**zlocillin

PCR – polymerase chain reaction

pH – potentia hydrogenii

RNS – Ribonukleinsäure

SPSS – Statistical Package for the social Sciences

T₀, T₁, T₂, T₃ – Tag 0, Tag 1, Tag 2, Tag 3

Tab. – Tabelle

Tbc – Tuberkulose

TMA – transcription-mediated amplification

U/min. – Unit pro Minute

WHO – World Health Organization

XDR-TB – extended (extremely) resistant tuberculosis

ZN – Ziehl-Neelsen

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie der Tuberkulose

Die Tuberkulose (Tbc) oder Morbus Koch ist eine im Wesentlichen durch *Mycobacterium (M.) tuberculosis* verursachte Infektion, an der jedes Jahr ca. 1,6 Millionen Menschen weltweit sterben. Auch 125 Jahre nach Entdeckung des Erregers ist die Tbc ein weltweites Problem. Im Jahr 1993 wurde die Tbc durch die WHO wieder zum globalen Problem erklärt (*WHO, Fact sheet Tuberculosis, 5/2007*). Nach Angaben der WHO wird es im Zeitraum von 2002 bis 2020 ca. 1 Milliarde Neuinfizierte und mehr als 150 Millionen Erkrankungsfälle geben, ca. 36 Millionen Patienten werden an der Tbc sterben. Jährlich werden somit 9 Millionen Menschen erkranken und bis zu 3 Millionen sterben (*WHO, Fact sheet Tuberculosis, 5/2007; Epidemiologisches Bulletin, Robert Koch Institut, Berlin 11/2007*). Die realen Zahlen können noch höher liegen, da die Dunkelziffer bei dieser Krankheit wegen ihrer unspezifischen Symptome relativ hoch ist. Im Jahr 2005 gab es in der EU 445.000 neue Tbc-Fälle und 66.000 Todesfälle (*WHO, Faktenblatt EURO, 3/2007*).

In Deutschland werden die meisten Erkrankungen in Hamburg, Bremen und Berlin gemeldet. Zurzeit liegt die durchschnittliche Inzidenz bei ca. 7 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner. Im Jahr 2004 starben in Deutschland vermutlich 400 bis 600 Patienten an der Tbc (*Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes, 2005*).

Ein Problem stellt die Zunahme von Infektionen mit multiresistenten (MDR-TB = multi-drug-resistance tuberculosis mit Erregern, die gleichzeitig gegen Isoniazid und Rifampicin resistent sind) Erregern dar, da die Patienten nicht auf eine Standardtherapie ansprechen. Weltweit schätzt man rund 450.000 Fälle dieser Art im Jahr 2006, darunter 70.000 in der EU. So beträgt z.B. die Anzahl der MDR-TB in der Ivanovo-Region (Russland) 9%, in Tomsk (Russland) 6,5% und in Estland 14,1% (*WHO, Fact sheet Tuberculosis, 5/2007*). Seit 2006 sind außerdem

Erregerstämme identifiziert worden, die zusätzlich auch Resistenzen gegen Reservemedikamente bzw. Zweitrangmedikamente (z.B. Protionamid, Amikacin, Fluorchinolone) aufweisen.

Infektionen mit diesen Erregern wurden „extended“ oder „extremly resistant tuberculosis“ (XDR-TB) genannt. In Südafrika wurde in der zweiten Hälfte des Jahres 2006 ein Ausbruch mit 53 Fällen von XDR-TB entdeckt, von denen 52 Patienten gestorben sind (*WHO, Faktenblatt EURO, 3/2007; Koch-Mechnikow Journal 1/2007*).

Eine wichtige Ursache für die weltweite Zunahme der Infektionsfälle in den letzten 10 Jahren ist die zunehmende Anzahl von HIV-Infektion (mit 11% ist die Tbc die häufigste Todesursache

HIV-positiver Patienten, zurzeit werden ca. 50 Millionen Koinfizierte vermutet), Tbc in vielen Gefängnissen (dort liegen die Inzidenz 50mal und die Letalität 28mal höher als im zivilen Sektor), die Einwanderung aus Ländern mit hoher Prävalenz, unzureichende politische und finanzielle Unterstützung sowie mangelhafte Gesundheitssysteme und Infrastrukturen (*WHO, Fact sheet Tuberculosis, 5/2007; Koch-Mechnikow Journal 1/2007*).

Bei der heutigen, immer stärker zunehmenden Internationalisierung aller Bereiche, vor allem des Reiseverkehrs, ist die Tbc auch in den westeuropäischen und nordamerikanischen Ländern mit niedriger Inzidenz eine zunehmende Bedrohung. In den USA werden mehr als 40% der Tbc-Fälle bei Einreisenden diagnostiziert, mehr als die Hälfte aller Flüchtlinge in der Welt sind mit Tbc infiziert. Jede nicht behandelte Person mit einer aktiven Tbc steckt im Durchschnitt 10 bis 15 Menschen jährlich an. Das bedeutet, dass jede Sekunde eine Person neu angesteckt wird. Etwa ein Drittel der Weltbevölkerung ist mit Tuberkuloseerregern infiziert, ungefähr 1% der Weltpopulation wird jährlich neu infiziert, ca. 10% mit Tbc infizierter Personen werden im Laufe der Zeit krank (*WHO, Fact sheet Tuberculosis, 5/2007; Koch-Mechnikow Journal 1/2007; WHO, Faktenblatt EURO, 3/2007; Epidemiologisches Bulletin, Robert Koch Institut, Berlin 11/2007*).

1.2 Ätiologie der Tuberkulose

M. tuberculosis ist ein schlankes, etwa $0,2-0,6 \times 1,0-10 \mu\text{m}$ langes, oft leicht gebogenes, langsam wachsendes, säureresistentes, nicht bewegliches Stäbchen. Es wächst mikroaerophil und bildet keine Sporen oder Kapseln. *M. tuberculosis* teilt sich alle 16 bis 20 Stunden und zeigt sich in Kulturen typischerweise in fischzug- oder zopfartigen Strängen (Cordphänomen) gelagert. Das Wachstum in Schnüren spiegelt die Anwesenheit eines Glycolipids (Cordfaktors) wieder. Eine der typischen Eigenschaften der Mykobakterien ist ihre Säurefestigkeit, die auf der Anwesenheit von Hydroxylipiden an der Oberfläche der Zellwand beruht. Diese Mycolsäuremoleküle (komplex verzweigt-kettige Hydroxylipide) sind kovalent mit dem Peptidoglykan der Zellwand verknüpft. Dieses Riesenmolekül umgibt die Zelle mit einem wachsartigen Überzug, der die Zelle hydrophob macht. Dies führt dazu, dass aufgenommener Farbstoff bei den Färbungen nur schwer durch Schwefelsäure- oder Salzsäure-Alkohol-Gemische zu entfernen ist. Aufgrund des hohen Lipidgehalts ihrer Zellhüllen lassen sich die Mykobakterien durch die Gram-Färbung schlecht anfärben. Die lipide Zellwand der Mykobakterien gilt als Grund für eine besondere Umweltresistenz des Erregers. Im infizierten Wirt ist der Erreger in der Lage, in Zellen (Makrophagen) zu überleben (= intrazellulärer Erreger).

1.3 Die Übertragung von *M. tuberculosis*

Die Erreger der Tbc werden durch Tröpfchen, seltener durch direkten Kontakt von Mensch zu Mensch übertragen. Die Patienten, die an einer offenen Lungen-Tbc leiden, sind kontagiös und geben die Erreger beim Husten, Niesen, Sprechen oder Spucken an die Umwelt ab. Ein ml infiziertes Sputum kann bis zu 5000 Erreger enthalten. Abhängig von der Zahl und der Virulenz der Erreger und/oder der Immunität der infizierten Person kann die Infektion zu einer Erkrankung führen. Hohes Lebensalter, Mangelernährung, Langzeittherapie mit Kortikosteroiden, Gabe von Immunsuppressiva und Zytostatika, HIV-Infektion, Drogenabhängigkeit, Alkoholismus und Diabetes mellitus sind prädisponierende Faktoren für eine Erkrankung.

1.4 Therapie

Die antibiotische Therapie von Tbc-Patienten begann im Jahre 1946 mit der Entdeckung des Antibiotikums Streptomycin. In der Folgezeit kamen weitere Substanzen dazu. Schnell stellte sich heraus, dass eine Monotherapie zur Entstehung resistenter Stämme führt, deswegen wird bei modernen Strategien eine Kombinationstherapie mit 3-4 Präparaten (meist Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamide und Ethambutol) eingesetzt. Eine adäquate Dosierung der Medikamente, eine genügende Dauer der Therapie sowie regelmäßige ärztliche Kontrollen, um den Therapieverlauf zu kontrollieren und mögliche Nebenwirkungen zu erkennen, sind notwendig für eine erfolgreiche Therapie der Tbc.

Da sich die Erreger nur sehr langsam teilen und außerdem in den tuberkulösen Granulomen lange Zeit ruhen können, ist die Gefahr der Resistenzentwicklung bei Mykobakterien besonders hoch. Die Behandlungsdauer muss wegen der geringen Teilungsgeschwindigkeit ausreichend lang sein, um Rezidive zu vermeiden.

1.5 Mikrobiologische Diagnostik

Die Labordiagnostik für den Nachweis der Tbc-Erreger umfasst in der Routine die mikroskopische Untersuchung der eingesandten Proben, die Anzucht und Differenzierung der Mykobakterien sowie deren Resistenztestung. Molekularbiologische Methoden (Nukleinsäureamplifikationstechniken, z.B. PCR) stehen sowohl für die Untersuchung der primären Materialien als auch für die Differenzierung der Mykobakterien zur Verfügung.

Der Nachweis von Antikörpern und der Tierversuch haben in der Tuberkulosedagnostik zurzeit keine Bedeutung.

Für den Erregernachweis kommen je nach Lokalisation des Erkrankungsherd unterschiedliche Untersuchungsmaterialien (Sputum, bronchoalveoläre Lavage, Bronchialsekret, Pleurapunktat, Magennüchternsekret, Urin, Liquor, Blut, Stuhl, Punktate, Eiter, Gewebeproben, Biopsiematerialien) in Betracht. Wegen der von Probe zu Probe variablen und häufig nur sehr geringen Bakteriendichte sind soweit möglich mindestens drei, an verschiedenen Tagen gewonnene Proben zu untersuchen. Je größer das Probenvolumen ist, desto besser sind die Nachweischancen. Die Transportgefäße sollten möglichst weitlumig sein, um beim Einfüllen Verschmutzungen der Außenwand zu vermeiden. Die nationalen und internationalen Auflagen an Labore, die Tuberkuloseerreger anzüchten dürfen, sind so, dass in zahlreichen Fällen, insbesondere in Schwellenländern, eine Weiterleitung des Untersuchungsmaterials an entfernte Labore die Regel ist. Der Postversand der Proben quer durch das Land schließt jedoch eine möglichst baldige Verarbeitung der Proben aus. Solche logistische Probleme kommen besonders in Entwicklungsländern vor. Lange Lagerungszeiten und Transportwege von Untersuchungsmaterialien können die Lebensfähigkeit der Mykobakterien gefährden und die Vermehrung von nicht spezifischer Begleitflora fördern. Das hat eine hohe Zahl von Kontaminationen zur Folge, die das Anwachsen von Mykobakterien verhindern (*Padmanabha R. K. et al., 1966; Sula L. et al., 1960*). Das Problem der Überwucherung mit schnell wachsenden Bakterien tritt besonders in tropischen und subtropischen Ländern mit ganzjährig hohen Temperaturen auf, sodass vermehrt falsche negative Kulturergebnisse erzielt werden. Um dies zu vermeiden, wurde der Effekt der Zugabe dekontaminierender Lösungen vor Lagerung und Transport von Sputumproben zum Labor untersucht (*Pardini M. et al., 2005; Bobadilla de Valle M. et al., 2003; Selvakumar N. et al., 1995; Selvakumar N. et al., 1993; Tazir M. et al., 1979; Smithwick R. W. et al., 1975*). Da diese Arbeitsgruppen gezeigt haben, dass die Anwendung von Dekontaminationslösungen wie 0,6% Cetylpyridiniumbromid oder 1% Cetylpyridiniumchlorid während des Transports der Sputumproben zum Labor einen positiven Einfluss auf die Nachweisrate von *M. tuberculosis* hat, wird von der WHO die Anwendung dieser Lösungen empfohlen. Jedoch ist dabei die längere Lagerung der Proben bei Kühlschranktemperatur nicht wünschenswert, da durch niedrige Temperaturen diese Mittel kristallisieren und damit inaktiv werden (*WHO, 2003*). Die Zusätze müssen vor der Anlage auf Kulturmedien durch Zentrifugation entfernt werden (*Rieder H. L. et al., 1998*). *Aparna K. et al. (Aparna K. et al., 2006)* haben gezeigt, dass beim 1-3 wöchigen Transport von Sputumproben mit 1% Cetylpyridiniumchlorid-Zusatz noch 80% der Tbc-positiven Sputumproben positive Kulturergebnisse ergaben. Die Kontaminationsrate betrug 6,2%. Bei Proben, die innerhalb einer Woche angelegt wurden, zeigten sich positive Kulturergebnisse in 86,1% der Fälle vs. 74,2% bei

einer Transportdauer von mehr als einer Woche. Die Dekontamination der Sputumproben mit Cetylpyridiniumchlorid-Lösung scheint bei längerer Einwirkzeit das Mykobakterienwachstum zu beeinträchtigen. In einer anderen Arbeit wurde berichtet, dass die Vorbehandlung mit Cetylpyridiniumchlorid bis zu sieben Tagen die Mikroskopieergebnisse von säurefesten Stäbchen beeinflusst. Bei Proben, die sofort verarbeitet wurden, zeigten sich signifikant höhere positive Ziehl-Neelsen-Mikroskopieraten im Vergleich zu den Proben, die mit Cetylpyridiniumchlorid gelagert wurden ($p=0,004$). Der Dekontaminationszusatz hatte jedoch keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Auramin-Phenol-Färbemethode (Ziehl-Neelsen 74,5% vs. Auramin-Phenol 61,8%; $p<0.001$) (Selvakumar N. et al., 2004). Diese Form der Vorbehandlung zum Transportschutz der Proben scheint nur für längere Transport- oder Lagerungszeiten (über 3 Tage), die in Deutschland eher die Ausnahme sind, sinnvoll zu sein, wenn auch mit deutlichen Nachteilen bei Lagerungszeiten über einer Woche.

Die Mikroskopie ist die schnellste und preiswerteste Methode, die innerhalb kurzer Zeit die Erkennung hochinfektiöser Patienten erlaubt. Alle Proben mit Ausnahme von Urin- und Stuhlproben, bei denen die Mikroskopie nur eine geringe Sensitivität und Spezifität besitzt, müssen mikroskopiert werden. Bei einer Erregerdichte von 10^4 KBE/ml ist nur in ca. 60% von Sputumpräparaten mit einem positiven mikroskopischen Befund zu rechnen. Meistens werden „angereicherte“ Präparate (nach Homogenisierung, Dekontamination mit NALC-NaOH und Zentrifugation) angefertigt. Diese werden durch Hitze fixiert und danach nach Ziehl-Neelsen (ZN), nach Kinyoun (Kaltfärbung) oder mit Auramin nach Hagemann gefärbt. Die Gegenfärbung erfolgt mit Methylenblau-Lösung. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, sollten die Objektträger einzeln auf einer Färbepanck gefärbt werden, um die Übertragung säurefester Stäbchen bei Färbung mehrerer Objektträger in einer Wanne zu vermeiden. Falsch negative Ergebnisse können bei zu dicken Ausstrichen, zu langer Gegenfärbung oder zu langem Entfärben mit Salzsäure-Alkohol auftreten.

Bei der Lichtmikroskopie (ZN, Kinyoun) erscheint *M. tuberculosis* bei 1000facher Vergrößerung als rotgefärbtes, parallel gelagertes oder am Ende abgebogenes Stäbchen, mit gekörnten Strukturen auf hellblauem Hintergrund, ist aber nur bedingt von anderen Mykobakterien (MOTT- mycobacteria other than tubercle bacilli) zu unterscheiden. Es müssen mindestens 100 Gesichtsfelder durchmustert werden, bevor ein Präparat als negativ beurteilt werden darf. Für ein Präparat werden dafür durchschnittlich 5 Minuten benötigt.

Der Vorteil der Auramin-Fluoreszenzmikroskopie besteht darin, dass wegen der stärker leuchtenden angefärbten Objekte die Durchmusterung ohne Immersionsöl mit kleinerer Vergrößerung (150 bis 400fach) durchgeführt werden kann. Dadurch wird in einem Gesichtsfeld

eine größere Probenmenge mikroskopiert und die Untersuchung eines einzelnen Präparates benötigt weniger Zeit. Es ist das ganze Präparat durchzusehen. Wegen des größeren apparativen Aufwandes ist die Anwendung dieser Methode jedoch erst bei mindestens 30-40 Proben pro Tag sinnvoll. Die Befundmitteilung erfolgt durch semiquantitative Angabe der Bakterienzahlen (Tab. 1).

Tabelle 1: Bewertungsschema für mikroskopische Befunde (Leitlinien bei der Auswertung von Mikroskopiebefunden)

Bakteriendichte		Befundmitteilung
Lichtmikroskopie (1000fach)	Fluoreszenzmikroskopie (450fach)	
0 säurefeste Stäbchen/Ausstrich ^a	0 säurefeste Stäbchen/Ausstrich ^b	- = negativ
1-3 säurefeste Stäbchen/Ausstrich ^a	1-3 säurefeste Stäbchen/Ausstrich ^b	± oder kontrollbedürftig
4-9 säurefeste Stäbchen/Ausstrich ^a	4-9 säurefeste Stäbchen/Ausstrich ^b	+
1-9/10 Gesichtsfeldern	5-49/10 Gesichtsfeldern	++
1-9/1 Gesichtsfeld	5-49/1 Gesichtsfeld	+++
≥10/1 Gesichtsfeld	≥50/1 Gesichtsfeld	++++

^a Ausstrich bzw. Präparat bei Ziehl-Neelsen-Färbung entspricht etwa 100 Gesichtsfeldern (=gesamtes Präparat)

^b Das gesamte Präparat muss mikroskopiert werden

Die Kultur ist der „Goldstandard“ in der Mykobakteriendiagnostik. Der kulturelle Nachweis von *M. tuberculosis* bestätigt beim Vorliegen einer Tbc-Symptomatik die Diagnose, wenn eine Probenverwechslung oder eine Kontamination ausgeschlossen sind. Die Nachweisgrenze der Kultur liegt zwischen 10–100 Bakterien/ml.

Wegen der oft nur geringen Bakteriendichte, der häufigen Inhomogenität klinischer Proben und der Gefahr einer Verunreinigung der Kulturen durch schnell wachsende Mikroorganismen müssen respiratorische Proben, Magensaft, Urin und Stuhl vorbehandelt werden. Proben aus primär sterilen Körpermaterialien (Liquor, Punktate) werden nicht vorbehandelt. Ziele der Vorbehandlung der Proben sind die Homogenisierung der Probe, die Dekontamination oder Abtötung der Begleitflora bei möglichst weitgehender Schonung der Mykobakterien und die Anreicherung der Mykobakterien durch Zentrifugieren des Materials. Die mikroskopische und kulturelle Ausbeute ist wesentlich von der Sedimentierung der Mykobakterien abhängig. Zu diesem Zweck müssen die Proben mindestens 20 Minuten bei 3000g relativer Zentrifugalbeschleunigung zentrifugiert werden. Bewährt für die Dekontamination der Proben

haben sich die N-Acetyl-L-Cystein- oder NALC-NaOH-, Pankreatin-Desogen-, Nekal-, Natriumlaurylsulfat- und Schwefelsäure-Methoden. Alle bekannten Verfahren führen jedoch auch zur Schädigung der Mykobakterien. Selbst bei korrektem Vorgehen überleben nur 10-20% der vermehrungsfähigen Erreger. Deshalb sind angegebene Konzentrationen und Einwirkzeiten genau einzuhalten.

Die Anzucht erfolgt auf mindestens zwei Festnährböden und in einem Flüssigmedium. Feste Kulturmedien auf Eibasis (z.B. Löwenstein-Jensen oder Stonebrink) zeichnen sich durch gute Pufferkapazität aus, inaktivieren toxische Stoffe im Untersuchungsmaterial, hemmen teilweise andere schnell wachsende Bakterien und verunreinigen deshalb selten. Löwenstein-Jensen-Nährböden enthalten Glycerin; anstelle von Glycerin enthalten Stonebrink-Nährböden Pyruvat, das das Wachstum von Isoniazid-resistenten *M. tuberculosis*-Stämmen fördert. Sie enthalten den Farbstoff Malachitgrün, der das Wachstum von anderen Bakterien inhibiert. Das Wachstum auf festen Medien kann im Durchschnitt nach 18-24 Tagen beobachtet werden. *M. tuberculosis* bildet eine charakteristische Kulturmorphologie, d.h. cremefarbene, trockene, krümelige, fest anhaftende Kolonien (= eugones Wachstum), aus. Kulturmedien auf Agarbasis (z.B. Middlebrook 7H10 oder 7H11) sind transparent. Dadurch ist die Morphologie der Kolonien leichter zu beurteilen. Das Wachstum der Bakterien ist dank Anwesenheit von Biotin und Katalase in der Regel eine Woche früher erkennbar als auf Kulturmedien auf Eibasis, jedoch sind diese Kulturmedien gegenüber Kontaminationen empfindlicher als die zuvor genannten Medien. Weitere negative Aspekte der agarhaltigen Medien sind hohe Vorbereitungskosten, limitierte Aufbewahrungszeit und CO₂-Bedarf. Flüssige Nährmedien (z.B. Kirchnermedium, Middlebrook 7H9) wurden speziell für den Nachweis geringer Erregermengen entwickelt. Sie können Indikatorsysteme enthalten, die Bakterienwachstum anzeigen. Ein ZN-Präparat aus einer Wachstum anzeigenden Bouillon klärt, ob es sich um Mykobakterien oder andere Bakterien handelt. Im Durchschnitt sind die Mykobakterien 5 bis 12 Tage früher erkennbar als auf den festen Kulturmedien.

In der vorliegenden Arbeit wurden ein flüssiges Nährmedium (BBL MGIT- Indikationsröhrchen, modifizierte Middlebrook 7H9 Bouillonbasis mit Glycerol und Casein-Pepton) und zwei feste Nährböden (Löwenstein-Jensen und Stonebrink) verwendet. Diese Kombination wird für die Routinediagnostik empfohlen (Nolte F. S. et al., 1995; Kent P. T. et al., 1985). Den flüssigen Nährmedien wurde außerdem Ölsäure/Albumin/Dextrose/Katalase (OADC) zugesetzt. Die Ölsäure ist ein aktiver metabolischer Stimulator für Mykobakterien, Albumin bindet toxische freie Ölsäuren, Dextrose ist eine Energiequelle und Katalase baut toxische Peroxidase, die sich in den beimpften Medien befinden kann, ab. Außerdem wurden die Medien mit

Antibiotika/Antimykotikalösungen supplementiert. Die kulturelle Anlage vom Patientenmaterial auf *M. tuberculosis* erfordert ein L2-Labor, welches das Arbeiten unter S2-Bedingungen nach Biostoffverordnung ermöglicht.

Die Bebrütung erfolgt bei 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$); 36°C sollten für die Anzucht von *M. tuberculosis* nicht überschritten werden. Die festen Kulturen werden in einwöchigen Abständen auf Wachstum kontrolliert. Kulturen in Flüssigmedien werden in den ersten 2 Wochen zweimal, dann wöchentlich abgelesen. Die Beobachtung der Kulturen ist im Allgemeinen nach 8 Wochen abgeschlossen, in Einzelfällen nach 12 Wochen (z.B. bei Diskrepanz zum mikroskopischen oder molekularbiologischen Befund, bei weiter bestehendem Verdacht einer Tuberkulose, unter Umständen auch bei Gewebe- oder Urinproben).

Falsch positive Kulturergebnisse können aufgrund von Kontaminationen im mykobakteriologischen Labor oder beim Verwechseln von Proben auftreten. Zweifel des behandelnden Arztes an der Diagnose einer Tbc, ein stark verzögertes Wachstum (erst nach 5 bis 6 Wochen), eine geringe Koloniezahl (z.B. weniger als 5 Kolonien) auf den festen Kulturmedien und eine benachbarte Probe mit hoher Erregerzahl können auf ein falsch positives Ergebnis hinweisen. Falsch negative Ergebnisse treten bei abgestorbenen Erregern, z.B. bei unter Therapie gewonnenem Material, bei anspruchsvollen, schwer anzüchtbaren Mykobakterien (z.B. *M. haemophilum*) oder beim Auftreten technischer Fehler bei der Dekontamination, der Nährbodenherstellung und bei Probenverwechslung auf.

Molekularbiologische Methoden oder Nukleinsäureamplifikationstechniken dienen dem Direktnachweis von Mykobakterien im klinischen Untersuchungsmaterial. Hierbei werden definierte spezifische Sequenzen der DNS oder der RNS in vitro vermehrt und anschließend mit geeigneten Methoden detektiert. Es werden nur einzelne Nukleinsäureabschnitte, nicht das gesamte Mykobakterium, nachgewiesen. Als Amplifikationsverfahren werden PCR (polymerase chain reaction), TMA (transcription-mediated amplification) und LCR (ligase chain reaction) eingesetzt. Die Vorteile dieser Techniken sind Schnelligkeit, hohe Spezifität und eine gegenüber der Mikroskopie verbesserte Sensitivität. Allerdings ist es bisher nicht möglich, molekularbiologisch alle Resistenzmechanismen zu erkennen, sodass die phänotypische Empfindlichkeitsprüfung nach Anzucht des Erregers noch lange Zeit das wichtigste Verfahren in der Diagnostik bleiben wird. Tabelle 2 fasst die Vor- und Nachteile der verschiedenen Teile der mikrobiologischen Tbc-Diagnostik zusammen.

Tabelle 2: Vergleich der Methoden zum mikrobiologischen Nachweis der Tuberkulose (nach Kaufmann S. H. E., Hahn H., Zeichardt H., Mahy B. „Mycobacteria and TB“, Vol. 2/2003)

Methode	Bearbeitungszeit	Kommentar	Vorteile	Nachteile
Mikroskopie	2 - 4 Stunden	Positive Befunde erst bei hoher Erregerdichte (in der Regel ab 10^4 /ml)	Hohe Spezifität Schnell, preiswert Identifikation von hochkontagiösen Patienten Hoher Aussagewert (≥ 90 %) bei positiven respiratorischen Untersuchungsmaterialien	Sensitivität 22-80 % Keine Mykobakterienidentifikation möglich Nicht für Kontrolle der Therapiewirksamkeit geeignet
Kultur	Tage bis Wochen	Positive Befunde bei Erregerdichte von 10^2 /ml „Goldstandard“	Methode zur Kontrolle der Therapiewirksamkeit und Differenzierung Empfindlichkeitsprüfung möglich	Zeitaufwand Lange Wartezeit bis Ergebnis vorhanden Kombination von Fest- und Flüssigmedium erforderlich
NAT	6-48 Stunden	Speziallabore und erfahrene Personal erforderlich Analyse von multiplen Untersuchungsmaterialien eines Patienten empfehlenswert	Schnelle Diagnose möglich Hohe Sensitivität (95-100%)	Falsch positive Ergebnisse möglich durch Kontamination Keine Empfindlichkeitsprüfung möglich Nicht für Kontrolle der Therapiewirksamkeit geeignet

1.6 Fragestellungen und Ziele der Dissertation

Die mikrobiologisch-diagnostische Labore sind – wie alle Bereiche der Medizin – durch Einsparmaßnahmen, Personalverminderung und Zentralisierung der Infrastrukturen geprägt. Auch spezialisierte Labore, die meist auch eine allgemeine bakteriologische Diagnostik betreiben, sind aus wirtschaftlichen Gründen dazu übergegangen, an Wochenenden und Feiertagen Materialien, die auf vermeintlich umweltstabilere Erreger untersucht werden sollen, erst an den Tagen mit vollständiger Personalbesetzung zu untersuchen; dabei wird „vermutlich stabiles“ Probenmaterial gelagert und erst am folgenden vollbesetzten Arbeitstag verarbeitet. Zu diesen Proben gehören auch solche zum Nachweis von Mykobakterien, da diese aufgrund ihrer Zellwand stabiler gegen Umwelteinflüssen sind als andere Bakterien. Auch entfernte Labore stellen ein Problem dar, da der Postversand der Proben eine sofortige Verarbeitung der Proben ausschließt.

Während Studien zum Einfluss von Lagerungszeit und Lagerungsbedingungen auf Tbc-Diagnostik aus Sputumproben publiziert wurden, liegen zu BAL- und Magensaftproben keine Daten vor. In der BAL liegt das Untersuchungsmaterial, anders als bei einem eitrigem Sputum, in etwa 5-10 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt vor, sodass es möglich ist, dass Mykobakterien ungeschützt den Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. Der morgendliche Magensaft ist ein „natürliches“ Anreicherungsmedium, in dem durch Herunterschlucken von Bronchialmaterial im Schlaf Mykobakterien im meist sauren Magensekret verweilen. Weil Mykobakterien nur bedingt säurefest sind, wird empfohlen, die Proben in eine Pufferlösung zu geben, um ein Absterben sensiblerer Mykobakterien zu verhindern. Alle drei Untersuchungsmaterialien (BAL, Magensaft und gepufferter Magensaft) wurden mit definierten Erregerkonzentrationen (10^1 KBE/ml, 10^3 KBE/ml und 10^5 KBE/ml) von 10 verschiedenen *M. tuberculosis* Isolaten versetzt. Die Materialien wurden sofort und nach 1-3 Tagen Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen (Kühlschrank, Zimmertemperatur, Brutschrank) mikroskopiert (ZN) und auf Kulturröhrchen gebracht.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

Hat die Lagerungszeit (24, 48 bzw. 72 Stunden) von relevanten Untersuchungsmaterialien bei Verdacht auf Lungentuberkulose (BAL, Magensaft und gepufferter Magensaft) mit unterschiedlichen Erregerdichten (10^5 KBE/ml, 10^3 KBE/ml und 10^1 KBE/ml) und Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen (4°C, 20°C bzw. 36°C) einen Einfluss auf den kulturellen Nachweis der Mykobakterien?

Haben die zuvor beschriebenen Lagerungsbedingungen von mykobakterienhaltigen BAL-, Magensaft- und gepufferten Magensaftproben mit unterschiedlichen Erregerdichten einen Einfluss auf den mikroskopischen Nachweis von Mykobakterien?

2. Material und Methoden

2.1 Materialverzeichnis

2.1.1 Isolate von *M. tuberculosis*

Für die Versuche wurden neun Patientenisolate und der H37Rv-Laborstamm verwendet.

2.1.2 Technische Geräte

Brutschrank (Heraeus, Hanau)

Vortex Mixer Reax 2000 (Heidolph, Schwabach)

Lichtmikroskop mit 100, 1000facher Vergrößerung (Zeiss, Jena)

Zentrifuge, Rotixa/P (Hettich)

Bunsenbrenner

Kühlschrank mit Gefrierfach (AEG)

Wasserbad (36°C)

pH-Meter

Lampe von Wood, oder long-wave ultraviolet light

Heizblock 60°C (60±1°C)

2.1.3 Reagenzien

Karbofuchsin-Lösung konzentriert: 10 ml gesättigte alkoholische Fuchsin-Lösung (10 g in 100 ml Ethanol) wurden in 90 ml einer 5% Lösung von verflüssigtem Phenol versetzt

Gesättigte Methylenblau-Lösung nach Löffler

3% Salzsäure-Alkohol (80% Alkohol mit 3% HCl)

Löwenstein-Jensen-Nährböden mit Glycerin und PACT (BAG, Lich)

Stonebrink mit PACT (BAG)

Middlebrook-Schrägagar 7H10 mit OADC

Middlebrookagar 7H10, in Petrischalen gegossen

BBL MGIT-Indikationsröhrchen (**M**ycobacteria **G**rowth **I**ndicator **T**ube): 4 ml mit 5,9 g modifizierter Middlebrook 7H9 Boullionbasis, 3,1 ml Glycerol, 1,25 ml Casein-Pepton (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparkes, MD, USA)

OADC: Ölsäure 0,6 µg, Rinderalbumin 50 µg, Dextrose 20 µg, Katalase 0,03 g (Becton Dickinson Microbiology Systems)

PANTA: 6000 Einheiten Polymyxin B, 600 µg Amphotericin B, 2400 Einheiten Nalidixinsäure, 600 µg Trimethoprim, 600 µg Azlocillin (Becton Dickinson Microbiology Systems)

N-Acetyl-L-Cystein (Sigma-Aldrich, München), 1 g gelöst in 100 ml steriler NaOH-Lösung und 100 ml steriler Na₃-Citrat-Lösung

Na₃-Citrat-Lösung

NaOH, 4%

PACT: 100000 Einheiten Polymyxin, 5 mg Amphotericin B, 50 mg Carbenicillin, 5 mg Trimetoprim (Mast Diagnostika, Reinfeld)

Sterile isotone 0,9% NaCl-Lösung (Braun, Melsungen)

Aqua destillata (Delta Pharma GmbH, Deerfield)

HCl, 10% und 37%

Gesättigte Trinatriumphosphat-Lösung

Fötale Kälberserum (FKS)

Flächendesinfektionsmittel (Antifekt Liquid, Schülke & Mayr)

2.1.4 Gebrauchsmaterialien

Diagnostische Objektträger mit 3 Feldern (Roth, Karlsruhe)

Objektträgerschienen

Sterile Impfösen

Sterile blaue Stoffunterlagen

Sterile Messbecher: 30 ml, 100 ml und 1000 ml

Sterile Aufbewahrungsgefäße mit festem Verschluss, 300 ml

Sterile Erlenmeyerkolben: 100 ml, 250 ml, 300 ml und 400 ml

Sterile Blue-Cap-Zentrifugenröhrchen, 50 ml (Becton-Dickinson Labware)

Sterile verschraubbare 10 ml-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)

Sterile 30 ml-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt)

Ständer für 12 Blue-Cap-Zentrifugenröhrchen

Sterile Plastikröhrchen, 10 ml

Sterile Glasröhrchen, 10 ml

Sterile Glasstäbe

Sterile Pasteurpipetten, 3 ml (Schmidt, Mainz)

Sterile Glaspipetten: 1 ml und 10 ml
Mikropipetten: 1, 10, 100 und 300 µl (Eppendorf, Hamburg)
Glaskugeln zur Homogenisierung
Sterile Spatel
Eimer für Desinfektionsmittel
Pipettensauger
Sterile Handschuhe
Sterile Tupfer
Rührer

2.2 Methodenverzeichnis

2.2.1 Beschaffung bzw. Herstellung der Untersuchungsmaterialien

Mykobakterienfreie BAL-Proben wurden zwischen September 2002 und Juni 2003 von stationären und ambulanten Patienten der Universitätsklinik Charité, Campus Benjamin Franklin gesammelt.

Da es unmöglich war, ausreichende Mengen Magensaft von Patienten zu bekommen, wurde entschieden, eine magensaftähnliche Lösung (MS) herzustellen. Hierzu wurden 1200 ml isotonischer NaCl-Lösung mit 30 ml Protein (1 ml von ca. 2% FKS pro Probe) versetzt. Dann wurde durch Zugabe von 10%iger oder 37%iger HCl-Lösung der pH-Wert der Lösung auf pH 2 eingestellt.

Zusätzlich wurde, wie für die Routine empfohlen, eine gepufferte magensaftähnliche Lösung (MSP) hergestellt. Hierzu wurden nach Beimpfung des MS mit Bakterien jeweils 10 ml gesättigter Trinatriumphosphatlösung pro 200 ml Volumen MS zugegeben.

2.2.2 Anlage von Mykobakteriensuspensionen

Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter einer Sicherheitswerkbank in einem Labor unter S3-Bedingungen nach Biostoffverordnung durchgeführt.

2.2.2.1 Anlage von Subkulturen

Für die Untersuchung wurden regelmäßig frische Subkulturen der Mykobakterien-Isolate auf Middlebrook 7H10-Schrägagar angelegt. Hierzu wurden mit einer sterilen Öse mehrere Bakterienkolonien von einem bewachsenen Nährboden entnommen und in ein zur Vermeidung

der Austrocknung mit 0,5 ml isotonischer NaCl-Lösung versetztes Agarröhrchen gegeben. Die beimpften Nährböden wurden über Nacht schräg gelagert, anschließend aufgestellt und für 1-6 Wochen im Brutschrank bei 36°C bebrütet.

2.2.2.2 Beimpfung der Untersuchungsmaterialien

Für die kulturelle und mikroskopische Untersuchung von BAL-Proben sind mindestens 10 ml Probenvolumen erforderlich. Um über ein für alle Kulturbedingungen ausreichendes Probenvolumen zu verfügen, wurden insgesamt 300 ml pro Mykobakterien-Isolat benötigt. Die 300 ml BAL-Proben wurden mit Glaskugeln in einem sterilen Gefäß homogenisiert und in 3 Proben von je 100 ml geteilt.

Aus den Subkulturen der Mykobakterien-Isolate und isotonischer NaCl-Lösung wurde eine homogene Suspension bereitet, deren Trübung der definierten Bariumsulfatsuspension entsprach, die im Rahmen der Resistenztestung von Mykobakterien verwendet wird. Aus dieser Suspension wurde 1 ml zu den ersten 100 ml BAL-Probe gegeben, da Vorversuche ergeben hatten, dass hieraus eine Erregerdichte von 10^5 KBE/ml resultiert. Durch weitere serielle 1:100 Verdünnungen wurden in den beiden anderen Proben-Aliquots die gewünschten Konzentrationen von 10^3 KBE/ml bzw. 10^1 KBE/ml eingestellt. Aus jeder dieser drei BAL-Suspensionen wurden dann je 90 ml in 3 Zentrifugenröhrchen gegeben, wovon jeweils eines im Kühlschrank (4°C), bei Raumtemperatur (20°C) oder im Brutschrank (36°C) gelagert wurde. Die restlichen 10 ml jeder BAL-Suspensionen wurden sofort für Mikroskopie und Kulturanzucht verwendet (T_0). Nach 24 (T_1), 48 (T_2) und 72 (T_3) Stunden Lagerung wurden aus jedem Zentrifugenröhrchen 10 ml Probe entnommen und wiederum für Mikroskopie und Kultur verarbeitet.

Von MS (hierfür wird die Verarbeitung von mindestens 20 ml empfohlen) wurden 1200 ml hergestellt, in drei Proben zu je 400 ml geteilt und mit Mykobakterien beimpft wie zuvor für die BAL-Proben beschrieben. Jeweils die Hälfte der Suspensionen wurde mit Trinatriumphosphat versetzt (MSP). Die Suspensionen wurden wie die BAL-Proben aufgeteilt und ebenfalls bis zu 72 Stunden bei 4°C, 20°C oder 36°C gelagert. Die 20 ml, die für jede Konzentration von MS und MSP verblieben, wurden sofort für Mikroskopie und Kulturanzucht angewendet (T_0). Nach 24, 48 und 72 Stunden Lagerung wurden jeweils 20 ml den einzelnen Suspensionen entnommen und wiederum für Mikroskopie und Kultur verarbeitet.

Die Erregerzahl in den Proben wurde bei jedem Ansatz durch serielle Verdünnung und Kultur auf Middlebrook 7H10-Agar verifiziert.

2.2.2.3 Dekontamination der Proben mit Hilfe der N-Acetyl-L-Cystein(NALC) NaOH-Methode und Anlage der Kulturen (DIN 58943-3, Abs. 8 und 9)

Um alle Proben unter routineähnlichen Bedingungen zu bearbeiten, wurden sie mittels Zugabe von N-Acetyl-L-Cystein (NALC)-NaOH-Lösung dekontaminiert. Hierzu wurden 10 ml (BAL-Proben) bzw. 20 ml (MS-/MSP-Proben) mit einer sterilen Pipette in 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben, diese mit den identischen Volumina NALC-NaOH-Lösung versetzt, 10 Sek. mittels Vortex homogenisiert und anschließend 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen mit 20 ml bzw. 10 ml Aqua destillata aufgefüllt, wiederum für 10 Sek. mittels Vortex homogenisiert und 20 Min. bei 4000 U/Min. zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgossen und verworfen. Ein bis zwei Tropfen des Sediments wurden zum Anfertigen eines Mikroskopiepräparates auf die Objektträger aufgetragen und diese unter dem Abzug luftgetrocknet. Das restliche Sediment wurde in 1-2 ml PACT- Lösung resuspendiert und jeweils 0,5 bis 1 ml mit einer sterilen Pipette auf die festen Nährböden (Löwenstein-Jensen und Stonebrink) aufgebracht bzw. in die flüssigen Nährmedien gegeben. Die flüssigen Medien waren zuvor mit 0,5 ml OADC und 0,1 ml PANTA angereicht worden.

Die beimpften festen Nährböden wurden über Nacht schräg gelagert und anschließend aufgestellt. Alle Proben wurden bis zu 14 Wochen bei 36°C im Brutschrank bebrütet. Das Wachstum der Mykobakterien wurde in den ersten zehn Wochen zweimal wöchentlich, in den letzten vier Wochen einmal wöchentlich kontrolliert. Dabei wurde Wachstum auf den festen Nährböden durch den Nachweis der typischen Kolonien (Färbung, Morphologie) verifiziert. Wachstum in den Flüssigmedien wurde unter Verwendung langwelligen UV-Lichts (365 nm) beurteilt. Im verwendeten Flüssigmedium befindet sich am Boden eingebettet in Silikon eine fluoreszierende Verbindung, deren Emission durch Sauerstoff, der in der Bouillon enthalten ist, absorbiert wird. Beim Wachstum verbrauchen die Mykobakterien zunehmend den Sauerstoff und verursachen damit die Demaskierung von Fluoreszein, das unter langwelligem ultraviolettem Licht (Lampe nach Wood) nachgewiesen werden kann.

2.2.3. Mikroskopie der Präparate (nach DIN 58943-32)

Die luftgetrockneten Objektträger wurden mittels Bunsenbrennerflamme hitzefixiert. Nach Abkühlen wurden die Objektträger mit Karbol-Fuchsin bedeckt, bis zur Dampfentwicklung vorsichtig mit ruhiger Bunsenbrennerflamme erhitzt und nach ca. 5 Min. mit Leitungswasser abgespült. Die Präparate wurden daraufhin für 10-30 Sek. mit HCl-Alkohol entfärbt, bis keine Farbwolken mehr abgingen und wiederum mit Leitungswasser abgespült. Nach Lufttrocknung

wurden die Präparate bei 1000facher Vergrößerung mikroskopiert und mindestens 100 Gesichtsfelder (GF) beurteilt.

Tabelle 3: Bewertung der mikroskopischen Präparate

Bakteriendichte	Befundmitteilung
0 säurefeste Stäbchen/Ausstrich ^a	- = negativ
1-3 säurefeste Stäbchen/Ausstrich ^a	± oder kontrollbedürftig
4-9 säurefeste Stäbchen/Ausstrich ^a	+
1-9/10 Gesichtsfeldern	++
1-9/1 Gesichtsfeld	+++
≥10/1 Gesichtsfeld	++++

^a Ausstrich bzw. Präparat bei Ziehl-Neelsen-Färbung entspricht etwa 100 Gesichtsfeldern (=gesamtes Präparat)

^b Das gesamte Präparat muss mikroskopiert werden

2.2.4. Auswertung der Daten und Statistik

Als Kriterium für die Auswertung des kulturellen Wachstums der Proben galt die Differenz zwischen dem Tag der Anlage der Probe (Eingangsdatum) und dem Tag, an dem erstmalig Wachstum auf/in einem der Medien beobachtet wurde. Die Daten wurden mittels SPSS-Programm, Version 11.5.1, ausgewertet und mittels Chi²-Test auf Signifikanz überprüft.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung des experimentellen Systems

Um die für die vorliegende Arbeit erforderlichen Probenvolumina zu erhalten, wurden Proben aus dem Respirationstrakt (BAL) gepoolt bzw. Magensaftproben (mit und ohne Pufferung) hergestellt, anschließend mit definierten Erregerkonzentrationen (10^1 KBE/ml, 10^3 KBE/ml und 10^5 KBE/ml) versetzt und bis zu drei Tagen bei unterschiedlicher Umgebungstemperatur gelagert.

Bei den BAL-Proben gelang der kulturelle Nachweis der Bakterien mittels Flüssigkulturen signifikant schneller als auf den Festnährböden. Bereits nach 10 Tagen waren 16,7% ($p < 0,00001$), nach 20 Tagen bereits 40,3% ($p < 0,00001$) der Kulturen positiv (Abb. 1). Im Vergleich dazu waren auf Löwenstein-Jensen-Agar nach 10 Tagen 1,7% und nach 20 Tagen 14,7%, auf Stonebrink-Agar nach 10 Tagen 2,7% und nach 20 Tagen 21,9% der Kulturen positiv.

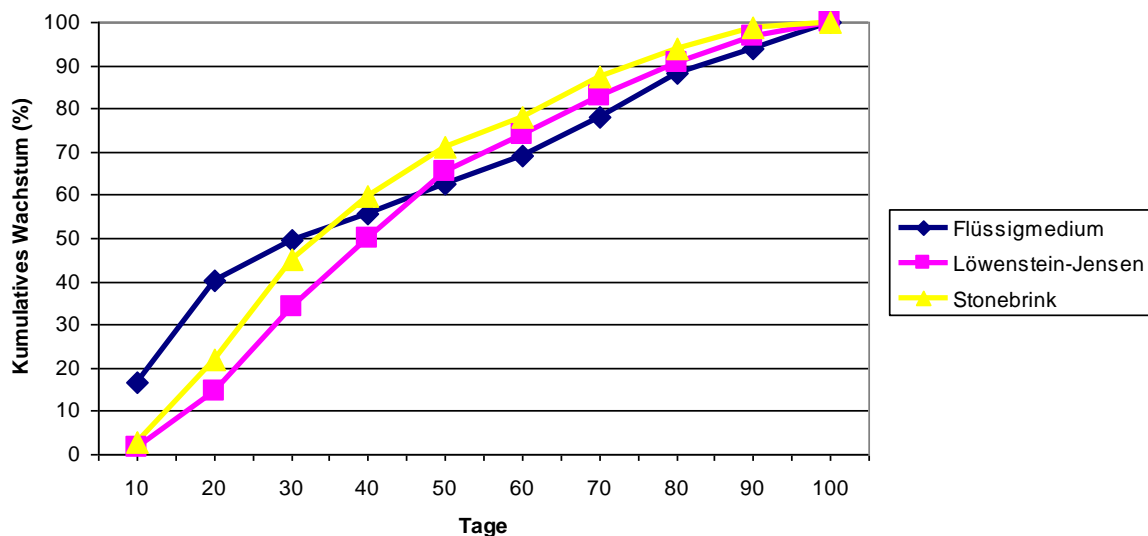


Abb. 1: Schnelleres Wachstum von *M. tuberculosis* aus BAL-Proben (n=300) im Flüssigmedium verglichen mit Wachstum auf festen Nährmedien (Löwenstein-Jensen- und Stonebrink-Agar).

Am Ende der Beobachtungszeit waren in den Flüssigkulturen alle 300 Proben (100%) gewachsen. Auf Löwenstein-Jensen-Agar wurden in 292 von 300 Proben (97,3%) Mykobakterien angezüchtet. Am Ende der Beobachtungszeit waren sieben Proben (2,3%)

kontaminiert und eine Probe (0,3%) nicht gewachsen. Auf Stonebrink-Agar wurden ebenfalls aus 292 von 300 Proben (97,3%) Mykobakterien angezüchtet. Vier Proben (1,3%) waren kontaminiert und vier (1,3%) nicht gewachsen. Die Gesamtkontaminationsrate der BAL-Proben war 1,2% (11 von 900 Medien).

Wie zuvor bei den BAL-Proben zeigten auch Kulturen aus MS-Proben in Flüssigmedien ein schnelleres Wachstum als auf festen Nährmedien. Nach 10 Tagen waren 22,1% ($p=0,01$), nach 20 Tagen bereits 39,5% ($p=0,001$) und nach 30 Tagen 52,2% der Proben positiv (Abb. 2). Im Gegensatz dazu zeigten auf Löwenstein-Jensen-Agar nach 10 Tagen 14,0%, nach 20 Tagen 27,1% und nach 30 Tagen 37,7% der Proben Wachstum. Auf Stonebrink-Agar war die Wachstumsgeschwindigkeit wiederum vergleichbar mit derjenigen auf Löwenstein-Jensen-Agar (14,6% positiv nach 10 Tagen, 27,8% nach 20 Tagen und 40,7% nach 30 Tagen).

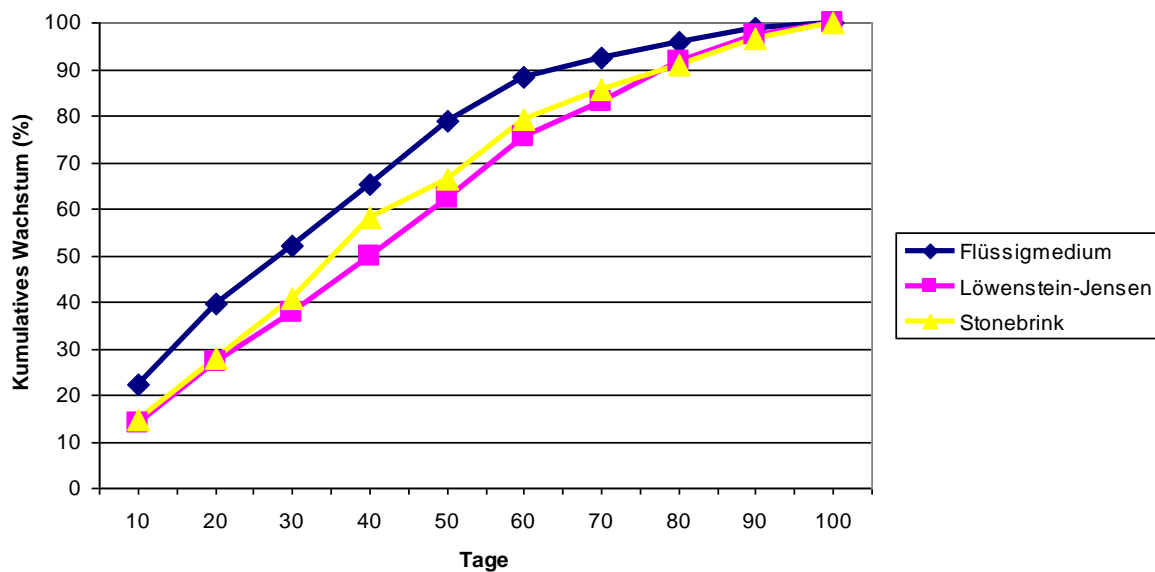


Abb. 2: Schnelleres Wachstum von *M. tuberculosis* aus MS-Proben (n=300) im Flüssigmedium verglichen mit Wachstum auf festen Nährmedien (Löwenstein-Jensen- und Stonebrink-Agar).

Insgesamt konnten in Flüssigmedien aus 299 von 300 MS-Proben (99,7%) Mykobakterien angezüchtet werden, eine Probe (0,3%) war nicht gewachsen. Auf Löwenstein-Jensen-Agar konnten aus 292 von 300 Proben (97,3%) Mykobakterien angezüchtet werden. Eine Probe war kontaminiert (0,3%) und sieben (2,3%) bis zum Ende der Beobachtungszeit nicht gewachsen. Auf Stonebrink-Medien wuchsen in Kulturen aus 295 von 300 Proben (98,3%) Mykobakterien.

Am Ende der Beobachtungszeit waren zwei Proben (0,7%) kontaminiert und drei (1,0%) nicht gewachsen.

Auch die Kulturen der MSP-Proben wuchsen in Flüssignährmedien schneller als auf den Festnährböden (Abb. 3). Während nach 10 Tagen Bebrütungszeit signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wachstum auf Löwenstein-Jensen-Agar (18,6% vs. 11,4%; $p=0,01$), nicht jedoch im Vergleich zum Stonebrink-Agar (18,6% vs. 16,4%; $p=0,50$) gesehen wurden, waren nach 20 Tagen in Flüssigmedien bereits 36,8% (Löwenstein-Jensen-Agar: 25,3%, Stonebrink-Agar: 28,4%; $p=0,007$) sowie nach 30 Tagen 51,4% (Löwenstein-Jensen-Agar: 36,3%, Stonebrink-Agar: 28,4%; $p=0,007$) sowie nach 30 Tagen 51,4% (Löwenstein-Jensen-Agar: 36,3%, Stonebrink-Agar: 28,4%) der Kulturen aus MSP-Proben positiv.

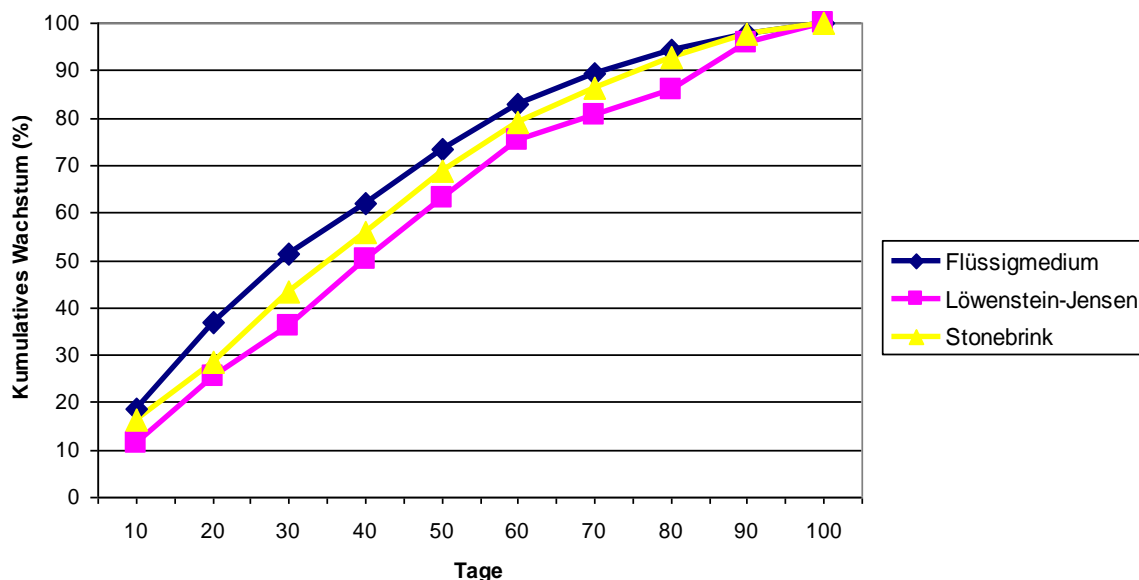


Abb. 3: Schnelleres Wachstum von *M. tuberculosis* aus MSP-Proben (n=300) im Flüssigmedium verglichen mit Wachstum auf festen Nährmedien (Löwenstein-Jensen- und Stonebrink-Agar).

Während in Flüssigkulturen 296 (98,7%) der 300 Proben (vier Proben, d.h., 1,3%, waren nicht gewachsen) positiv waren, waren auf Löwenstein-Jensen-Agar 289 (96,3%) der 300 Proben gewachsen. Sieben Proben (2,3%) waren nicht gewachsen und vier (1,3%) waren kontaminiert. Auf Stonebrink-Agar wuchsen 292 der 300 Proben (97,3%); fünf Proben (1,7%) waren nicht gewachsen und drei (1,0%) waren kontaminiert.

Verglichen mit den MS-Proben (Abb. 2) wuchsen die Kulturen aus MSP-Proben nicht schneller (Tag 10 positiv/sämtlichen Medien: 150/886 MS- vs. 136/877 MSP-Proben, $p=0,53$), d.h. ein

positiver Effekt der Pufferung der Proben auf die kulturellen Ergebnisse der MSP-Proben war nicht ersichtlich. Es ist möglich, dass die vitalen Mykobakterienstämme, auf nährstoffreichen Medien vorkultiviert, eine nur bedingte Säureinstabilität hatten und deswegen den Vorteil der frühzeitigen Pufferung nicht brauchten.

Da Kulturen aus Proben mit höherer Erregerdichte generell ein schnelleres Wachstum zeigen als Kulturen aus Proben mit geringer Anzahl von Mykobakterien, wurde geprüft, ob die Proben, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden, auch diesen Kriterien entsprechen.

Von den jeweils 900 Proben waren von denen mit einer Erregerdichte von 10^5 KBE/ml 881 (97,9%), von 10^3 KBE/ml 874 (97,1%) und von 10^1 KBE/ml 877 (97,4%) gewachsen. 19 (2,1%), 26 (2,9%) bzw. 23 (2,7%) Proben waren kontaminiert oder nicht gewachsen. Während nach 10 Tagen bei einer Erregerkonzentration von 10^5 KBE/ml bereits 16,3% der Kulturen positiv waren, zeigten zu diesen Zeitpunkten erst 10,2% bzw. 11,7% der Kulturen von Proben mit 10^3 KBE/ml bzw. 10^1 KBE/ml im Ausgangsmaterial Wachstum ($p < 0,0004$). Auch nach 20 Tagen Bebrütungszeit waren mehr Kulturen aus Proben mit hoher Erregerzahl positiv als aus den Materialien mit einer Anzahl $< 10^5$ KBE/ml (10^5 KBE/ml: 35,5%, 10^3 KBE/ml: 27,8%, 10^1 KBE/ml: 23,1%; $p < 0,00001$). Langsameres Wachstum in Proben mit 10^1 KBE/ml verglichen mit Proben der höchsten Erregerkonzentration zeigte sich auch 30 bis 50 Tage nach Anlage (Abb. 4).

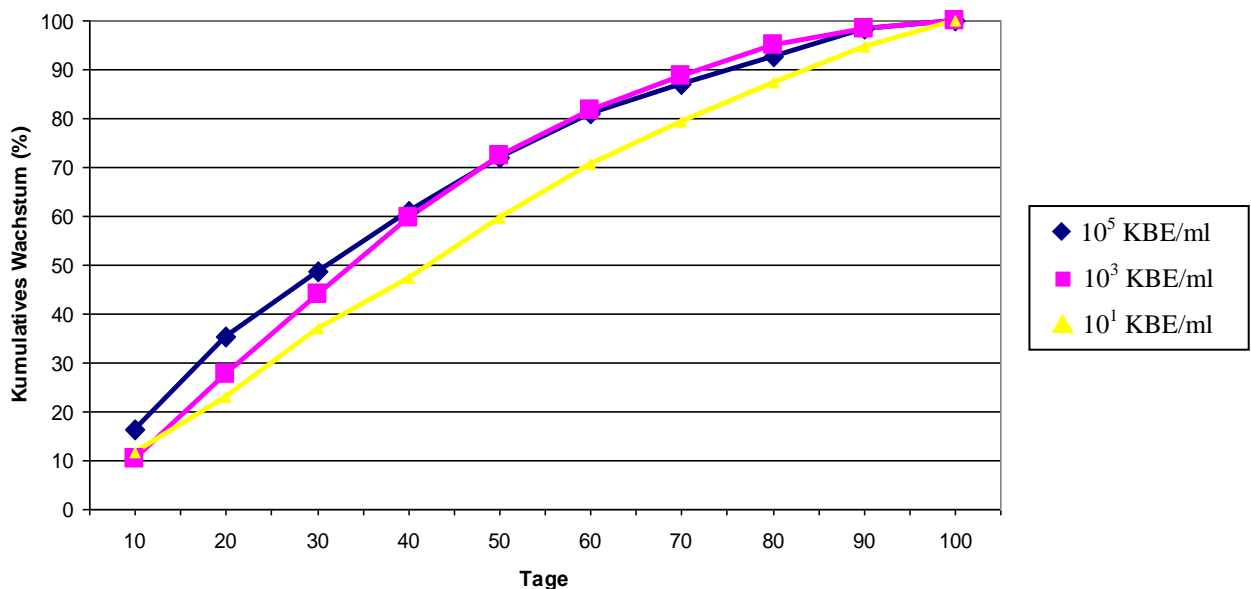


Abb. 4: Langsameres Wachstum von *M. tuberculosis* in Kulturen von Proben mit geringer Erregerdichte im Ausgangsmaterial.

Von sämtlichen Proben wurden vor der kulturellen Anlage Präparate angefertigt, nach Ziehl-Neelsen gefärbt und anschließend bei 1000facher Vergrößerung mikroskopiert. Bei 584 der 900 Proben (64,9%) waren säurefeste Stäbchen nachweisbar. Die Rate der positiven Nachweise war abhängig von der Erregerdichte, d.h., bei der niedrigsten Erregerkonzentration (10^1 KBE/ml) waren signifikant weniger Präparate positiv ($p=0,00002$) als bei den Proben, die 10^3 KBE/ml enthielten. Bei diesen waren wiederum weniger Präparate mikroskopisch positiv ($p<0,00001$) als bei Proben mit 10^5 KBE/ml (Tab. 4).

Tabelle 4: Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung der BAL-, MS- und MSP-Proben (jeweils n=300) in Abhängigkeit von der Erregerdichte

Erregerkonzentration (KBE/ml)	10^5	10^3	10^1
Säurefeste Stäbchen nachweisbar	257 (85,7%)	191 (63,7%)	136 (45,3%)

Die hier beschriebenen Ergebnisse der Kultur und Mikroskopie verdeutlichen, dass das für die vorliegende Arbeit verwendete experimentelle System unter den gewählten Untersuchungsbedingungen den Erfahrungen in der Routinediagnostik entsprach. Proben mit niedriger Erregerkonzentration waren seltener mikroskopisch positiv und wuchsen langsamer als Proben mit höherer Erregerdichte, und das Wachstum wurde bei Kulturen in Flüssigmedien schneller nachgewiesen als bei Kulturen auf Festnährböden.

3.2. Bestimmung des Einflusses der Lagerungstemperatur auf die Geschwindigkeit des kulturellen Nachweises von *M. tuberculosis* aus BAL-, MS- und MSP-Proben

Zunächst wurde der Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Schnelligkeit des kulturellen Erregernachweises bei unterschiedlichen Proben, die aus logistischen Gründen bis zu drei Tagen gelagert werden müssen, bestimmt. Für diese wie auch für die nachfolgenden Auswertungen wurde – analog zum Vorgehen in der Routinediagnostik – jeweils die Zeit bis zum ersten kulturellen Nachweis, unabhängig vom Nährmedium berücksichtigt.

Bei der Auswertung der Daten (90 Proben aus der Sofortanlage, d.h., T_0 , vs. jeweils 270 Proben, die bei 4°C, 20°C oder 36°C für ein bis drei Tage gelagert worden waren) zeigte sich zunächst, dass die Sofortanlage günstiger ist als die Lagerung. Wenn auch nach 10 Tagen keine signifikanten Unterschiede ersichtlich waren, waren 20 Tage nach Anlage der Kulturen signifikant mehr Kulturen nach Sofortanlage als nach Lagerung positiv (T_0 vs. 4°C: $p=0,008$; T_0 vs. 20°C: $p=0,01$; T_0 vs. 36°C: $p=0,008$) (Abb. 5). Durch eine Lagerung des Untersuchungsmaterials bis zu drei Tagen ergibt sich somit in jedem Fall eine signifikante Verzögerung bis zum kulturellen Nachweis. Allerdings zeigte sich zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Lagerungstemperatur (4°C vs. 20°C: $p=0,73$; 4°C vs. 36°C: $p=0,55$; 20°C vs. 36°C: $p=0,79$).

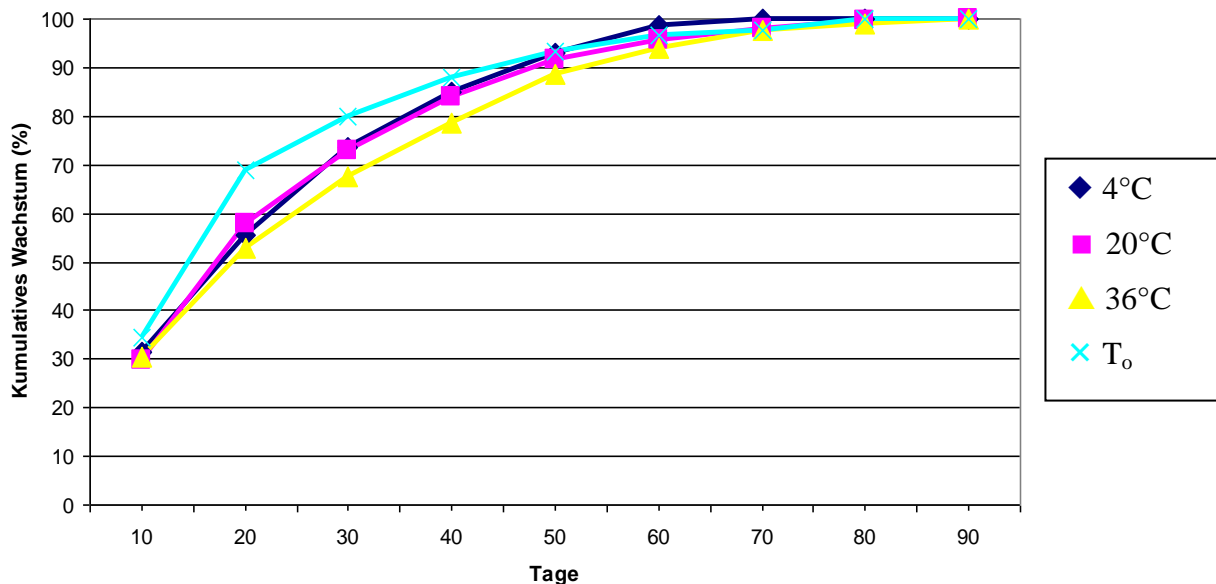


Abb. 5: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus BAL-, MS- und MSP-Proben nach Lagerung bis zu drei Tagen (bei 4°, 20° oder 36°C, jeweils $n=270$) verglichen mit der Sofortanlage (T_0 , $n=90$).

Auch zu früheren oder späteren Zeitpunkten ließ sich kein signifikant nachteiliger Einfluss einer vermeintlich ungünstigeren Lagerungstemperatur von 36°C ermitteln (10 Tage: 4°C vs. 20°C, $p=0,64$; 4°C vs. 36°C, $p=0,78$; 20°C vs. 36°C, $p=0,84$; 30 Tage: 4°C vs. 36°C, $p=0,10$; 20°C vs. 36°C, $p=0,15$; 40 Tage: 4°C vs. 36°C, $p=0,06$; 20°C vs. 36°C, $p=0,09$).

Somit können BAL-, MS- und MSP-Proben, falls eine Sofortanlage nicht möglich ist, auch in Ländern mit höherer Umgebungstemperatur bis zu drei Tagen bei der jeweiligen Umgebungstemperatur gelagert werden, ohne dass sich ein negativer Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Erreger in den aus den Proben angelegten Kulturen zeigt.

Um zu analysieren, bei welcher Temperatur man BAL-, MS- und MSP-Proben optimal lagern sollte, wenn die Lagerungszeit nicht länger als 24 Stunden beträgt, wurden die Ergebnisse aus den Proben der Sofortanlage ($n=90$) mit denjenigen nach 24-stündiger Lagerung bei 4°, 20° oder 36°C (jeweils $n=90$) verglichen. Zunächst zeigte sich bei dieser Auswertung, dass die Sofortanlage nur verglichen mit einer Lagerung bei 36°C zu schnelleren Wachstumsergebnissen ($p=0,04$) führt (Abb. 6). Eine 24-stündige Lagerung der Untersuchungsmaterialien bei Temperaturen von 4° oder 20° verzögerte den kulturellen Nachweis, verglichen mit der Sofortanlage, jedoch nicht (T_0 vs. 4°C: $p=0,12$; T_0 vs. 20°C: $p=0,12$). Falls eine Sofortanlage unmöglich und somit die Lagerung unumgänglich ist, spielt die Umgebungstemperatur offenbar eine untergeordnete Rolle. Auch am 30. Bebrütungstag schnitten die Proben mit einer Lagerung bei 36°C nicht signifikant schlechter ab als die bei 4°C ($p=0,50$) oder 20°C ($p=0,61$) gelagerten Proben (Abb.6).

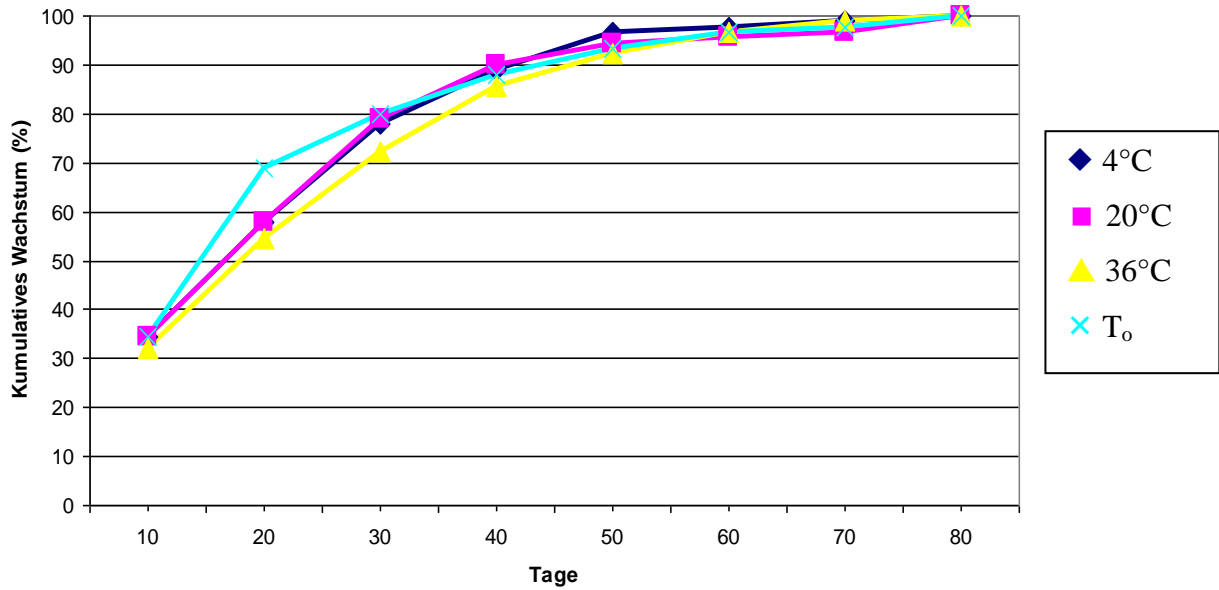


Abb. 6: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus BAL-, MS- und MSP-Proben nach 24-stündiger Lagerung bei 4°, 20° oder 36°C (jeweils n=90) verglichen mit der Sofortanlage (T₀, n=30).

Auch nach 48-stündiger Lagerung zeigte sich kein signifikanter Wachstumsvorteil bei Kulturen aus Proben, die bei Temperaturen <36°C gelagert worden waren (Tag 20 nach Anlage: 20°C vs. 4°C, p=0,23; 20°C vs. 36°C, p=0,17) (Abb. 7).

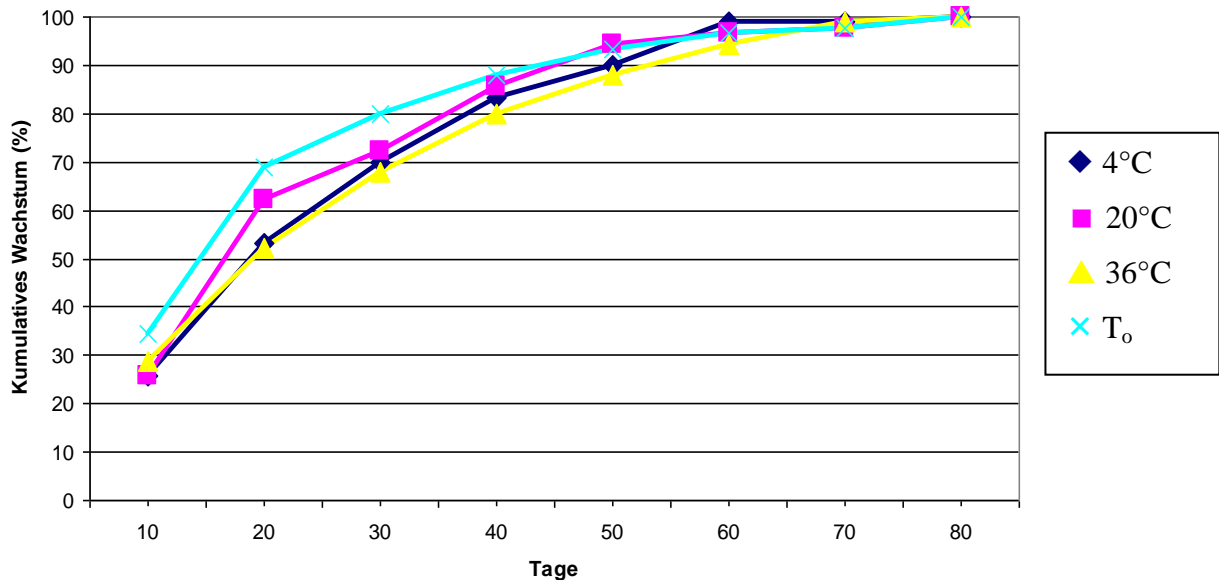


Abb. 7: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus BAL-, MS- und MSP-Proben nach 48-stündiger Lagerung bei 4°, 20° oder 36°C (jeweils n=90) verglichen mit der Sofortanlage (T₀, n=30).

Bei den Kulturen, die nach 72-stündiger Lagerung der BAL-, MS- und MSP-Proben angelegt worden waren, zeigte sich ein nicht signifikanter Trend für bessere Kulturergebnisse nach einer Lagerung bei 4°C, verglichen mit Proben, die während der Lagerung einer Umgebungstemperatur von 36°C ausgesetzt waren (Tag 30 nach Anlage: 4°C vs. 36°C, $p=0,15$; Tag 40 nach Anlage: 4°C vs. 36°C, $p=0,07$) (Abb. 8). Um zu untersuchen, inwieweit sich dieser Trend u.U. aus den Ergebnissen für Proben aus einem Untersuchungsmaterial ergibt, wurden nachfolgend die vorhandenen Daten für BAL-, MSP- und MS-Proben einzeln ausgewertet.

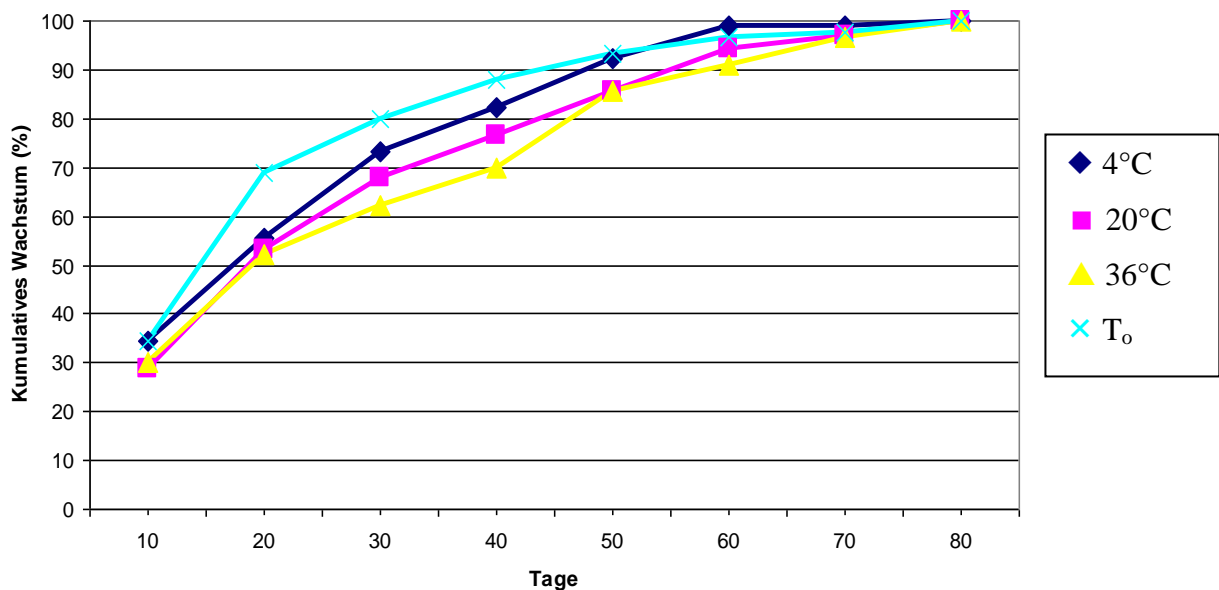


Abb. 8: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus BAL-, MS- und MSP-Proben nach 72-stündiger Lagerung bei 4°, 20° oder 36°C (jeweils n=90) verglichen mit der Sofortanlage (T₀, n=30).

Ein beschleunigtes Wachstum durch eine vorherige Pufferung der MS-Proben zeigte sich jedoch bei diesen am längsten gelagerten Proben nicht. 10 Tage nach Anlage der Kulturen waren 37 aus 90 MSP verglichen mit 32 aus 90 MS-Proben gewachsen ($p=0,55$). Auch 20 Tage nach Kulturanlage waren vergleichbare Anzahlen von MSP- und MS-Proben gewachsen (MSP: 52/90, MS: 52/90; $p=1,0$).

3.3. Bestimmung des Einflusses der Lagerungstemperatur auf die Geschwindigkeit des kulturellen Nachweises von *M. tuberculosis* aus BAL-Proben

Da die Lagerungsbedingungen auf die verschiedenen Untersuchungsmaterialien unterschiedliche Auswirkungen besitzen könnten, wurden zunächst die Daten für die bis zu 72 Stunden gelagerten BAL-Proben isoliert analysiert. Hier zeigte sich zunächst keine Überlegenheit der Sofortanlage, verglichen mit der vermeintlich ungünstigsten Lagerungstemperatur von 36°C (Wachstum nach 20 Tagen: T₀ vs. 36°C, p=0,20; Wachstum nach 30 Tagen: T₀ vs. 36°C, p=0,23; Wachstum nach 40 Tagen: T₀ vs. 36°C, p=0,11) (Abb. 9). Allerdings muss bei dieser Auswertung berücksichtigt werden, dass für den Zeitpunkt „T₀“ nur 30 Proben in die Analyse eingingen. Jedoch ergibt sich auch für die Analyse der bei 20°C gelagerten vs. bei 36°C, bei der Daten für jeweils 90 Proben berücksichtigt werden, allenfalls ein Trend für Vorteile einer Lagerungstemperatur von 20°C verglichen mit 36°C (Wachstum nach 30 Tagen: 20°C vs. 36°C, p=0,06; Wachstum nach 40 Tagen: 20°C vs. 36°C, p=0,05). Vorteile einer Lagerungstemperatur von 4°C waren nicht ersichtlich.

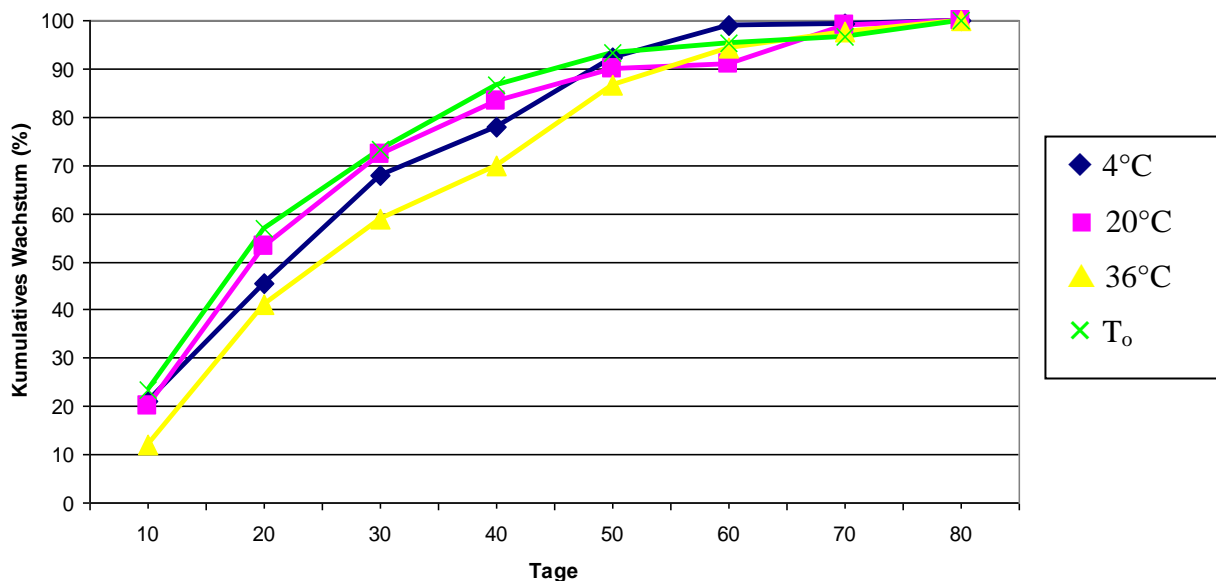


Abb. 9: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus BAL-Proben nach Lagerung bis zu drei Tagen (bei 4°, 20° oder 36°C, jeweils n=90) verglichen mit der Sofortanlage (T₀, n=30).

Die Folgeanalysen für definierte Lagerungszeiten (24, 48 und 72 Stunden) von BAL-Proben sind wegen der geringeren Datenmengen, die, verglichen mit den vorherigen Analysen, in die Auswertung einbezogen werden konnten, nur bedingt aussagekräftig. Dennoch zeigte sich bei

einer Lagerung für 24 Stunden wiederum kein Trend, d.h., die kumulativen Wachstumskurven für die Proben, die bei den drei unterschiedlichen Temperaturen gelagert worden waren (jeweils 30 Proben), lagen dicht beieinander (Abb. 10).

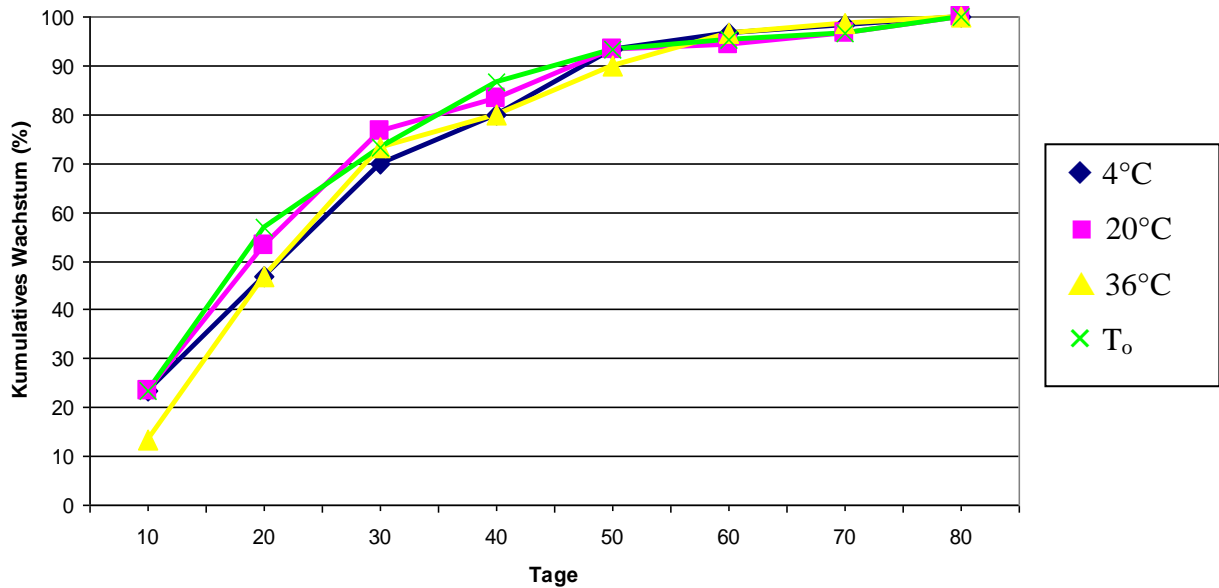


Abb. 10: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus BAL-Proben nach 24-stündiger Lagerung bei 4°, 20° oder 36°C (jeweils n=30) verglichen mit der Sofortanlage (T₀, n=10).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse für die Auswertung der Daten bezüglich einer 48-stündigen Lagerung von BAL-Proben bei definierten Temperaturen zeigte sich ein Trend zu schlechteren Ergebnissen, d.h., langsameren Wachstum nach einer Probenlagerung bei 36°C, jedoch war dieser für die erhobenen Daten nicht signifikant (Wachstum nach 20 Tagen: 20°C vs. 36°C, $p=0,29$; Wachstum nach 30 Tagen: 20°C vs. 36°C, $p=0,28$; Wachstum nach 40 Tagen: 20°C vs. 36°C, $p=0,21$) (Abb. 11).

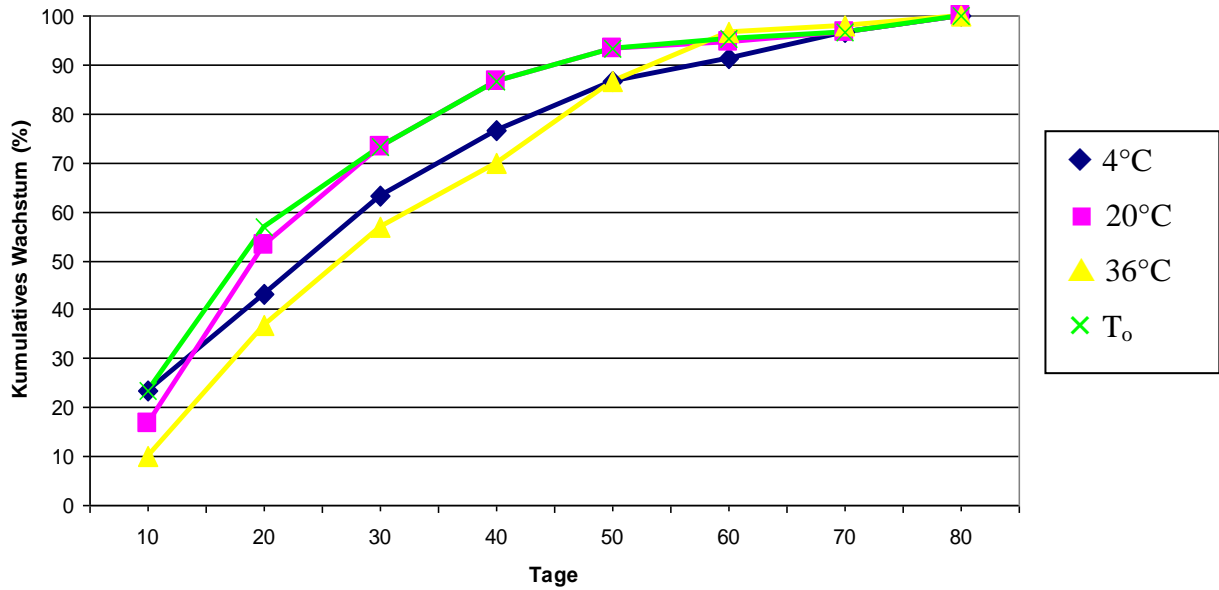


Abb. 11: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus BAL-Proben nach 48-stündiger Lagerung bei 4°, 20° oder 36°C (jeweils n=30) verglichen mit der Sofortanlage (T₀, n=10).

Dennoch zeigte sich ein vergleichbarer Trend zu langsamerem Wachstum nach Lagerung bei 36°C auch nach 72-stündiger Lagerung der BAL-Proben (Wachstum nach 30 Tagen: 4°C vs. 36°C, p=0,11) (Abb. 12), so dass vorstellbar ist, dass die Analyse größerer Datenmengen als für die vorliegende Arbeit verfügbar signifikante Ergebnisse erbringen könnte.

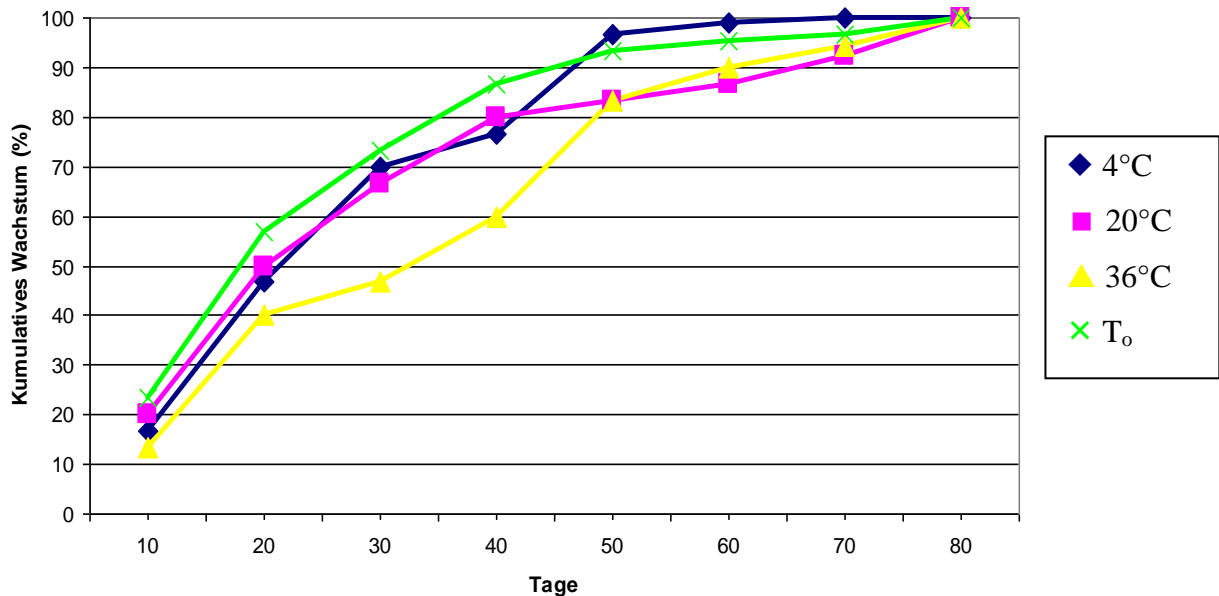


Abb. 12: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus BAL-Proben nach 72-stündiger Lagerung bei 4°, 20° oder 36°C (jeweils n=30) verglichen mit der Sofortanlage (T₀, n=10).

3.4. Bestimmung des Einflusses der Lagerungstemperatur auf die Geschwindigkeit des kulturellen Nachweises von *M. tuberculosis* aus MSP-Proben

Andere Ergebnisse als für die BAL-Proben ergaben die Subanalysen der Daten für die MSP-Proben. Beim Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit nach Sofortanlage mit dem nach bis zu 72-stündiger Lagerung bei unterschiedlicher Temperatur zeigte sich weder eine Überlegenheit der Sofortanlage verglichen mit der Lagerung (Wachstum nach 20 Tagen: T_0 vs. 4°C , $p=0,19$) noch ein Trend zugunsten einer präferenziellen Umgebungstemperatur während der Lagerung (Abb. 13).

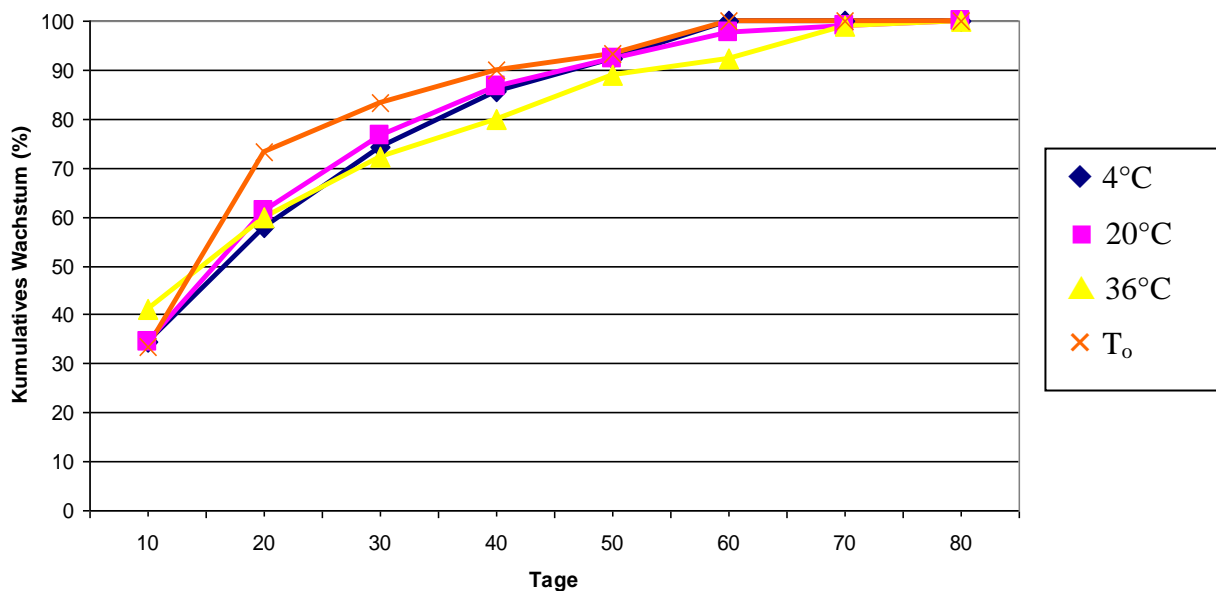


Abb. 13: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus MSP-Proben nach Lagerung bis zu drei Tagen (bei 4° , 20° oder 36°C , jeweils $n=90$) verglichen mit der Sofortanlage (T_0 , $n=30$).

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei den Subanalysen für definierte Lagerungszeiten von MSP-Proben gesehen. Hier zeigten sich weder nach 24-stündiger (Wachstum nach 30 Tagen: 20°C vs. 36°C , $p=0,56$) (Abb. 14), 48-stündiger (Wachstum nach 20 Tagen: 20°C vs. 4°C , $p=0,60$) (Abb. 15) noch nach 72-stündiger Lagerung (Abb. 16) Unterschiede, die auf einen Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Mykobakterien in den anschließend angelegten Kulturen hingedeutet hätten.

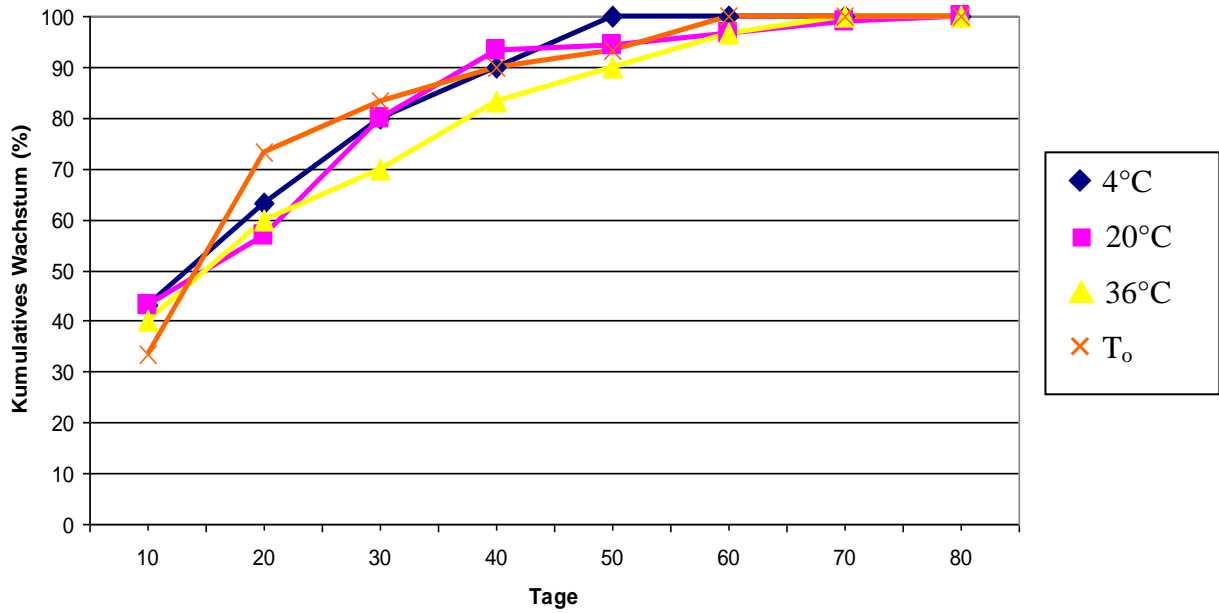


Abb. 14: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus MSP-Proben nach 24-stündiger Lagerung bei 4°, 20° oder 36°C (jeweils n=30) verglichen mit der Sofortanlage (T₀, n=10).

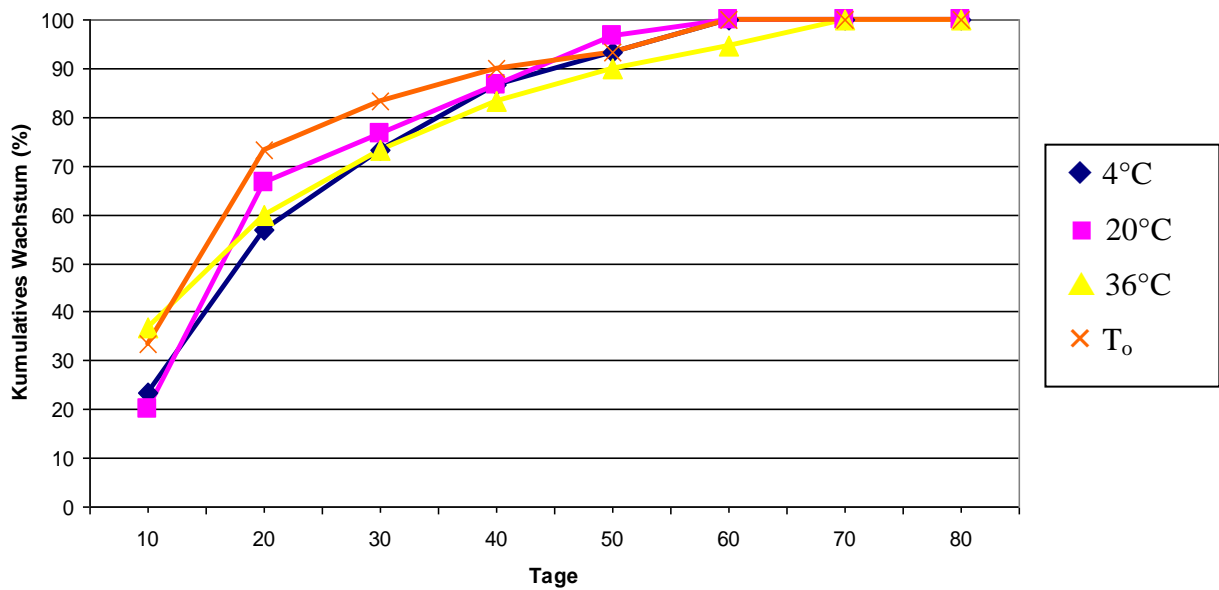


Abb. 15: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus MSP-Proben nach 48-stündiger Lagerung bei 4°, 20° oder 36°C (jeweils n=30) verglichen mit der Sofortanlage (T₀, n=10).

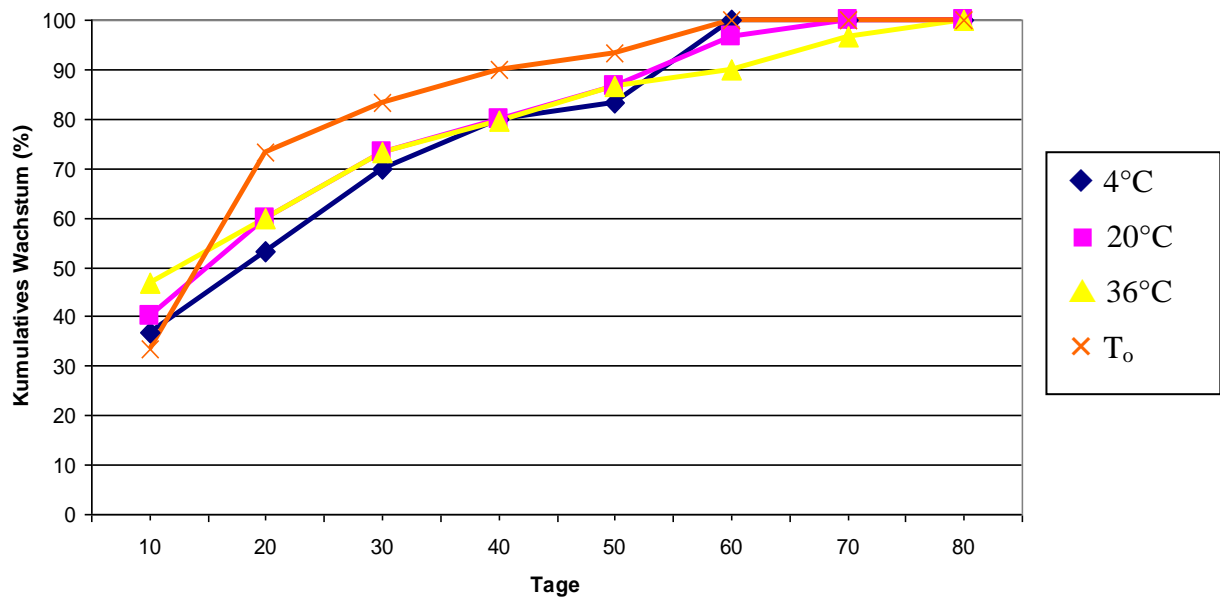


Abb. 16: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus MSP-Proben nach 72-stündiger Lagerung bei 4°, 20° oder 36°C (jeweils n=30) verglichen mit der Sofortanlage (T₀, n=10).

3.5. Bestimmung des Einflusses der Lagerungstemperatur auf die Geschwindigkeit des kulturellen Nachweises von *M. tuberculosis* aus MS-Proben

Abschließend wurden auch Subanalysen für die Daten, die für die MS-Proben gewonnen werden konnten, durchgeführt. Wie zuvor bereits für die MSP-Proben beschrieben, deuteten auch die Daten für die MS-Proben nicht auf einen signifikanten Wachstumsvorteil der Mykobakterien nach Sofortanlage hin (Wachstum nach 20 Tagen: T_0 vs. 36°C , $p=0,10$) (Abb. 17).

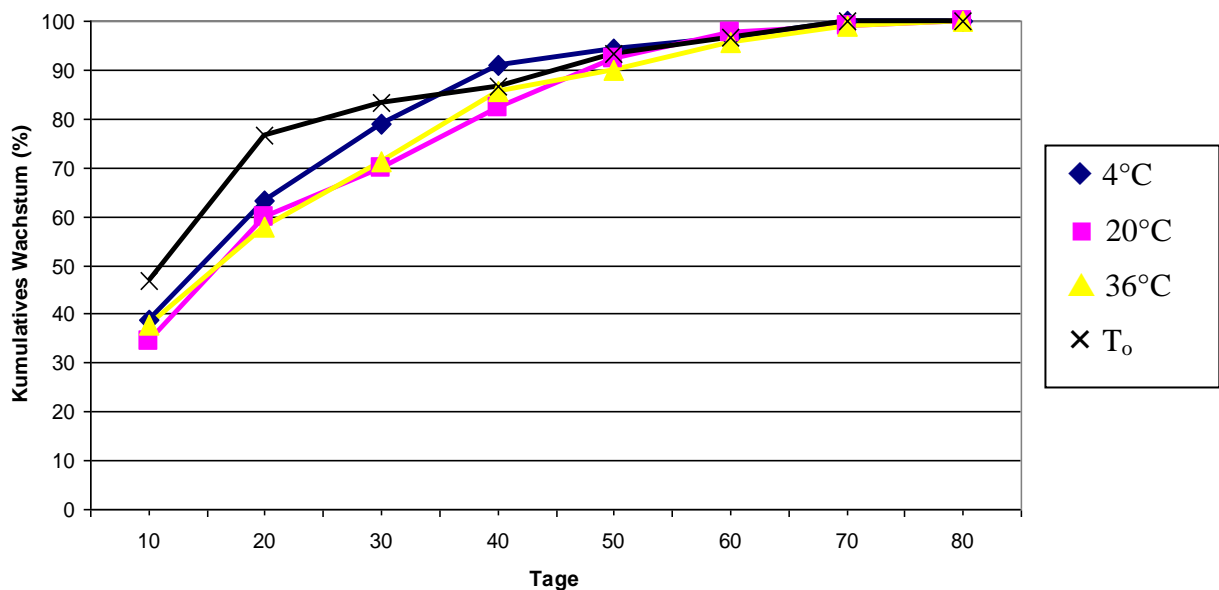


Abb. 17: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus MS-Proben nach Lagerung bis zu drei Tagen (bei 4°C , 20°C oder 36°C , jeweils $n=90$) verglichen mit der Sofortanlage (T_0 , $n=30$).

Auch bei den Subanalysen für definierte Lagerungszeiten (24, 48 und 72 Stunden) zeigte sich keine signifikante Überlegenheit einer Lagerungstemperatur (Abb. 18 bis 20). Bei 72-stündiger Lagerung zeigte sich jedoch ein Trend zu schnelleren Kulturergebnissen nach Lagerung bei 4°C (Wachstum nach 10 Tagen: 4°C vs. 20°C , $p=0,11$). Da dieses zuvor bei den MSP-Proben nicht gesehen wurde, sind ungepufferte MS-Proben unter Umständen bei Umgebungstemperatur (20°C oder 36°C) bei längerer Lagerungsdauer weniger stabil als gepufferte, d.h., bei fehlender Möglichkeit der Kühlung sollten MS-Proben möglichst mit einem Puffer versehen werden.

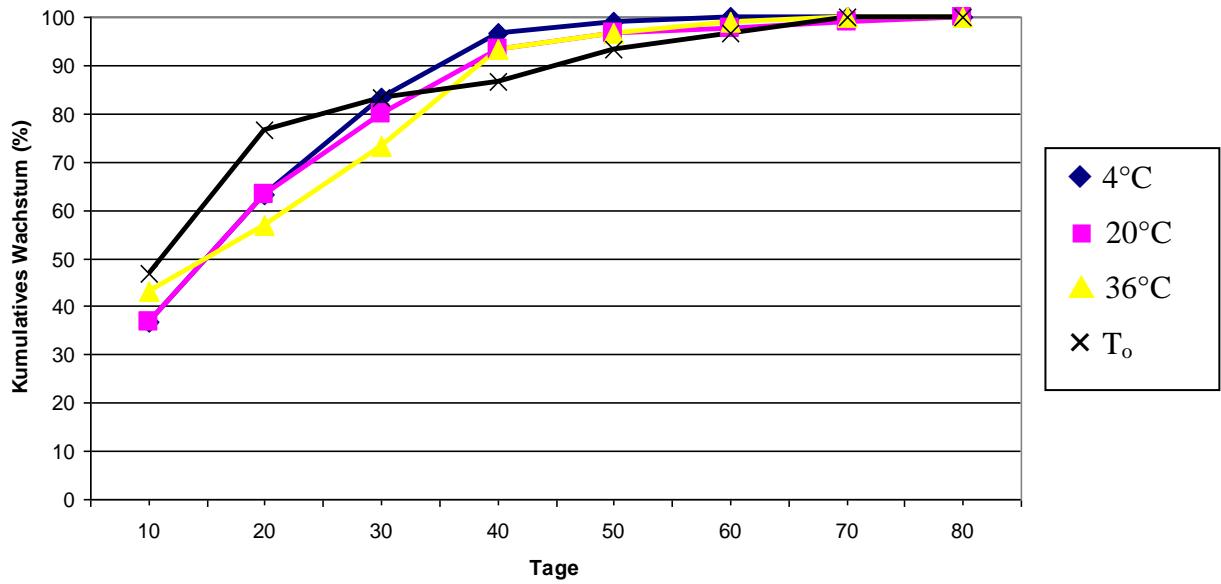


Abb. 18: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus MS-Proben nach 24-stündiger Lagerung bei 4°, 20° oder 36°C (jeweils n=30) verglichen mit der Sofortanlage (T₀, n=10).

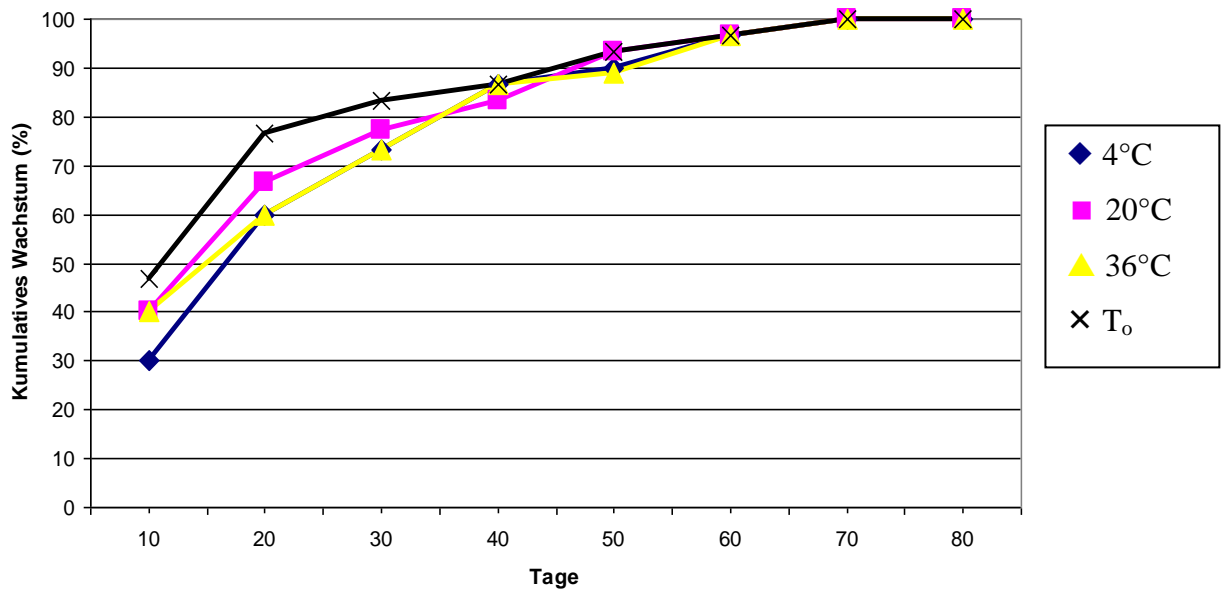


Abb. 19: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus MS-Proben nach 48-stündiger Lagerung bei 4°, 20° oder 36°C (jeweils n=30) verglichen mit der Sofortanlage (T₀, n=10).

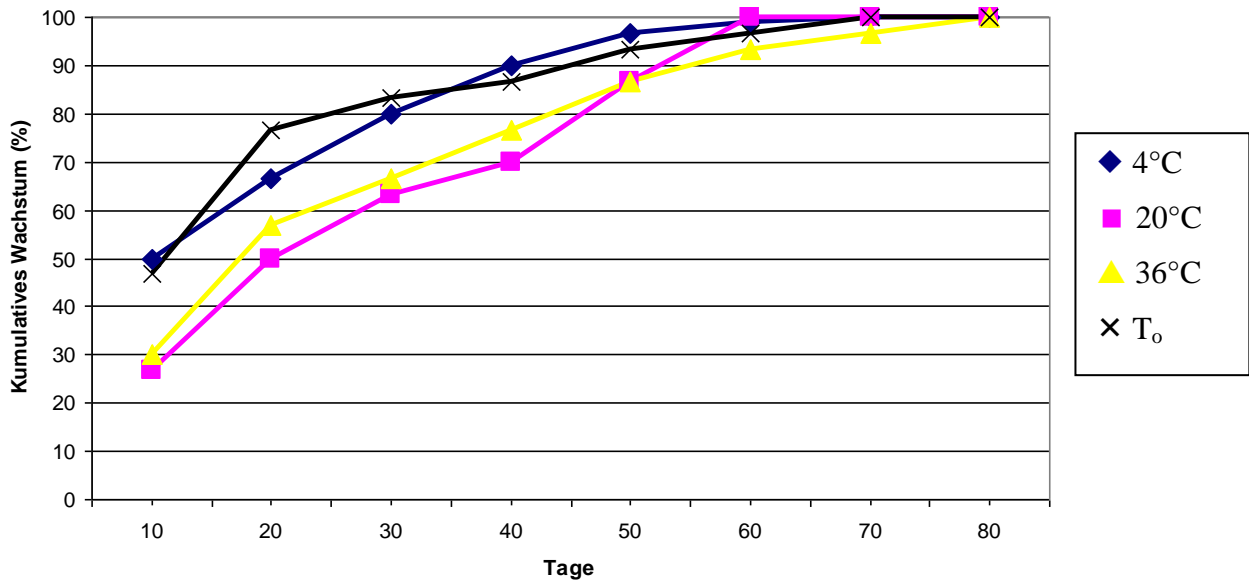


Abb. 20: Kumulatives Wachstum in Kulturen aus MS-Proben nach 72-stündiger Lagerung bei 4°, 20° oder 36°C (jeweils n=30) verglichen mit der Sofortanlage (T₀, n=10).

3.6. Dauer und Temperatur während der Lagerung von BAL-, MSP- und MS-Proben beeinflussen nicht die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung

Die Mikroskopie ist eine schnell durchführbare Untersuchungsmethode und aufgrund ihrer Ergebnisse kann oftmals frühzeitig der Verdacht auf eine offene Tbc geäußert werden. Daher sollte sie so schnell wie möglich nach Gewinnung der Proben durchgeführt werden. Um zu untersuchen, inwieweit eine Lagerung der Untersuchungsmaterialien bei verschiedenen Temperaturen einen negativen Einfluss auf die Nachweisrate mittels dieser Methode hat, wurden die mikroskopischen Ergebnisse, die für die Untersuchungsmaterialien zu den unterschiedlichen Zeitpunkten erzielt worden waren, analysiert. Tatsächlich zeigten sich bei Berücksichtigung sämtlicher BAL-, MS- und MSP-Proben, unabhängig von der Lagerungstemperatur, keine Unterschiede in der mikroskopischen Nachweisrate (T₀: 59/90 vs. 48 Stunden: 169/270; p=0,62) (Tab. 5). Auch die Subanalysen für die einzelnen Tage ergaben keinen Hinweis auf bessere mikroskopische Ergebnisse nach einer definierten Lagerungstemperatur (24-stündige Lagerung bei 20°C: 54/90 vs. 62/90 bei 36°C, p=0,21; 72-stündige Lagerung bei 4°C: 66/90 vs. 57/90 bei 36°C, p=0,19).

Tabelle 5: Anzahl der positiven Mikroskopieergebnisse nach 24-, 48- und 72-stündiger Lagerung sämtlicher BAL-, MS- und MSP-Proben bei 4°C, 20°C bzw. 36°C

Lagerungstemperatur	Lagerungszeit (Stunden)			
	0 (n=90)	24 (n=270)	48 (n=270)	72 (n=270)
Alle Temperaturen	59 (65,6%)	175 (64,8%)	169 (62,6%)	181 (67,0%)
Nur bei 4°C (n=90)	n.d.	59 (21,9%)	57 (21,1%)	66 (24,4%)
Nur bei 20°C (n=90)	n.d.	54 (20,0%)	59 (21,9%)	58 (21,5%)
Nur bei 36°C (n=90)	n.d.	62 (23,0%)	53 (19,6%)	57 (21,1%)

n = Gesamtprobenzahl pro Tag, n.d. = nicht durchgeführt

Da sich eventuelle Verluste der Erreger durch die Lagerung am ehesten bei Proben mit niedriger Erregerzahl offenbaren würden, wurden anschließend die mikroskopischen Ergebnisse für sämtliche Proben (BAL, MS und MSP) mit der Erregerzahl von 10^1 KBE/ml analysiert. Jedoch ergaben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede (T_0 : 11/30 vs. 72 Stunden: 40/90; $p=0,60$), die auf einen Vorteil einer bestimmten Lagerungstemperatur oder auf eine maximale Lagerungsdauer hingewiesen hätten (Tab. 6).

Tabelle 6: Anzahl der positiven Mikroskopieergebnisse für die BAL-, MS- und MSP-Proben mit einer Erregerzahl von 10^1 KBE/ml nach 24-, 48- und 72-stündiger Lagerung bei 4°C, 20°C bzw. 36°C

Lagerungstemperatur	Lagerungszeit (Stunden)			
	0 (n=30)	24 (n=90)	48 (n=90)	72 (n=90)
Alle Temperaturen	11 (36,7%)	43 (47,8%)	42 (46,7%)	40 (44,4%)
Nur bei 4°C (n=30)	n.d.	15 (16,7%)	14 (15,6%)	12 (13,3%)
Nur bei 20°C (n=30)	n.d.	11 (12,2%)	15 (16,7%)	14 (15,6%)
Nur bei 36°C (n=30)	n.d.	17 (18,9%)	13 (14,4%)	14 (15,6%)

n = Gesamtprobenzahl pro Tag, n.d. = nicht durchgeführt

Die Lagerung von BAL-, MS- und MSP-Proben für bis zu 72 Stunden hat somit, unabhängig von der Lagerungstemperatur, keinen negativen Einfluss auf die mikroskopische Nachweisrate.

4. Diskussion

Die Tbc ist ein großes Gesundheitsproblem in vielen Entwicklungsländern, und die WHO hat die Erkrankung im Jahr 1994 als einen globalen Notfall erklärt. Es ist eine durch Tröpfchen von Mensch zu Mensch übertragbare Erkrankung, vor der man sich schützen kann und die heilbar ist. Dennoch gibt es weltweit eine kontinuierliche Zunahme von Tuberkulosefällen in den letzten Jahren und eine zunehmende Gefahr der Entstehung von mehrfachresistenten Mykobakterienstämmen. Ein frühes Entdecken eines Erkrankten, vor allem mit offener Lungentuberkulose, seine frühzeitige Isolierung sowie eine adäquate Therapie sind wichtige Schritte zur Eindämmung der weiteren Verbreitung. Der Nachweis der Erreger durch Mikroskopie und Kultur und die sich anschließende Empfindlichkeitsbestimmung bilden die Grundlage der Tbc-Diagnostik. Dazu bedarf es bakteriologischer Labore, die internationalen Standards entsprechen, aber auch genügend dezentraler diagnostischer Einrichtungen mit professionellem Niveau.

Ziel dieser Arbeit war es zu bestimmen, unter welchen Temperaturverhältnissen BAL-, MS- und MSP-Proben bis zu 3 Tagen gelagert werden können, ohne dass die Kultur- und Mikroskopieergebnisse negativ beeinflusst werden. Um diese Fragestellungen zu beantworten, wurden 2700 Proben von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BAL), Magensaft und gepufferten Magensaft untersucht. Aus allen Proben konnten die zugesetzten Mykobakterien mindestens aus einem der drei Medien angezüchtet werden; das heißt, dass trotz Lagerung in allen Untersuchungsproben Mykobakterien nachweisbar waren. Die Kontaminationsrate bei den BAL-Proben lag mit 1,2% unter der empfohlenen Kontaminationsrate von 3-5% (DIN-Norm 59943). Dieses ist mit großer Wahrscheinlichkeit jedoch nicht auf eine zu intensive Dekontamination zurückzuführen, da aus sämtlichen Proben Mykobakterien angezüchtet werden konnten.

Zuerst wurde geprüft, ob die angewandte Methode dem in der Routine bei der Diagnostik der Tbc entsprechenden System vergleichbare Ergebnisse erbrachte. Dabei zeigte sich, dass bei allen drei Untersuchungsmaterialien (BAL, MS und MSP), verglichen mit dem Wachstum auf festen Nährböden, ein schnelleres Wachstum von *M. tuberculosis* im Flüssigmedium auftrat (Abb. 1-3). Verschiedene Studien haben den Wachstumsvorteil für *M. tuberculosis* im Flüssigmedium im Vergleich zu festen Medien gezeigt (*Tortoli E. et al., 1999; Hanna B. A. et al., 1999; Somoskövi A. et al., 1999; Pfyffer G. E. et al., 1997; Badak Z. F. et al., 1996; Siddiqi S. H., 1996; Hanna B. A. et al., 1995; Stitt D. T. et al., 1994*). Die Studie von *Rivera A. B. et al. (Rivera A. B. et al.,*

1997) zeigte, dass die kombinierte Kulturanlage im flüssigen MGIT-Kultursystem und Löwenstein-Jensen-Agar nicht nur die Nachweisrate im Vergleich zur alleinigen Anlage auf Löwenstein-Jensen-Agar von 63,4% auf 70,9% erhöht (99% der positiven Proben wuchsen im MGIT-Röhrchen, verglichen mit 89% auf Löwenstein-Jensen-Agar), sondern das auch bei Proben mit sehr geringen Mykobakterien-Konzentrationen im Flüssigsystem durchschnittlich 6,3 Tage früher Wachstum nachweisbar war als auf Löwenstein-Jensen-Agar.

Als weiteres konnten wir feststellen, dass die Kulturen von Proben mit höherer Erregerkonzentration (10^5 KBE/ml) signifikant früher positiv wurden als diejenigen von Proben mit niedriger Konzentration (Abb. 4). Auch dies entspricht den Erfahrungen aus der Routinediagnostik.

Von sämtlichen Proben wurden vor der kulturellen Anlage Präparate angefertigt, nach Ziehl-Neelsen gefärbt und anschließend bei 1000facher Vergrößerung mikroskopiert. Hierbei waren in 64,9% der Präparate Mykobakterien mikroskopisch nachweisbar. Nach Angaben von *Saceanu C. A. et al.* (*Saceanu C. A. et al., 1993*) beträgt die Korrelation zwischen positiven Kulturen und positiven Mikroskopieergebnissen ca. 33%. Andere Arbeiten zeigten eine Sensitivität zwischen 20% und 80% (*Perkins M. D. et al., 2000; Peterson E. et al., 1999; Burdash N. M. et al., 1976; Boyd J. C. and Marr J. J., 1975; Marraro R. V. et al., 1975*). Die Ergebnisse der hier eingesetzten Untersuchungsverfahren zeigen demnach eine Übereinstimmung mit den Erfahrungen der Tbc-Diagnostik.

Die bis jetzt bekannten Studien über die Folgen einer länger dauernden Lagerung von Untersuchungsmaterialien auf Tuberkulosedagnostik beziehen sich hauptsächlich auf Sputumproben. In diesen Studien werden möglichst kurze Lagerungszeiten und niedrige Transporttemperaturen gefordert (*Banda H. T. et al., 2000; Noordhoek G. T. et al., 1994; Traore I. et al., 1981*). In unserer Arbeit konnten wir auch für BAL- und Magensaftproben zeigen, dass eine verzögerte Materialanlage zu einem über die 3 Tage der Lagerung hinausgehenden, verspäteten Mykobakterienwachstum führte (Abb. 5). Wenn es die örtlichen Voraussetzungen erlauben, sollte man daher die Sofortanlage bevorzugen. Die Lagerung unserer drei Untersuchungsmaterialien bis zu drei Tagen ergab keine falsch negativen Proben, jedoch zeigte sich eine signifikante Verzögerung des Wachstums. Nach 24-stündiger oder 48-stündiger Lagerung der Proben zeigte sich ein tendenziell schlechteres Wachstum bei den Kulturen, die bei höheren Temperaturen (36°C) gelagert wurden (Abb. 6 und Abb. 7). Bei einer Lagerung von 72 Stunden erschien eine Lagerung bei 4°C günstiger (Abb. 8), jedoch waren die Ergebnisse nicht signifikant, so dass sich hieraus keine eindeutige Empfehlung ableiten lässt. Auch bei der Analyse der Ergebnisse der BAL-Proben erschien die Lagerung bei 36°C am ungünstigsten, ein

tendenzieller Vorteil fand sich bei der Lagerung bei 20°C (Abb. 9-12). Bei den MS- und MSP-Proben ergab sich keine optimale Lagerungstemperatur (Abb. 17-20 und Abb. 13-16).

Lumb R. et al. (Lumb R. et al., 2006) haben untersucht, wie sich die Kulturrate ändert, wenn von Patienten gewonnene, positive Sputumproben im Kühlschrank bei 4°C bis zu 12 Tagen gelagert und anschließend in BACTEC MGIT Flüssigkulturen angelegt werden. Es wurde dabei kein Konservierungsmittel während der Lagerung verwendet und alle Proben wurden vor der Anlage mit NALC-NaOH dekontaminiert. Die anschließende Transportzeit der Proben (nicht gekühlt) betrug durchschnittlich 4 Tage. Es zeigte sich, dass sich in 3,7% der Proben (insgesamt 107) keine Mykobakterien mehr nachweisen ließen, aus 94,4% der Proben wurde *M. tuberculosis* isoliert, 1,9% der Proben waren kontaminiert. Trotz der langen Zeitspanne zwischen Probengewinnung und Anlage und trotz fehlender Konservierungsmittel war die positive Kulturrate sehr hoch. Die Lagerungszeit und verzögerte Materialanlage hatten keinen signifikanten Einfluss auf den Zeitpunkt des Positivwerdens der Kulturen. Dieses entspricht nicht unseren Ergebnissen, was daran liegen könnte, dass in der Studie Sputumproben von Tbc-Patienten mit u.U. hoher Erregerzahl und nur Flüssigkulturen verwendet wurden. Hierfür spricht die relativ kurze Zeit bis zum Positivwerden der Kulturen (ca. 13 Tage nach Anlage).

Pardini M. et al. (Pardini M. et al., 2005) haben 276 Sputumproben von Tbc-Patienten untersucht. Es wurden die Kulturraten von Proben, die 20 ± 9 Tage bei 4°C aufbewahrt und zuvor mit Cetylpyridiniumchlorid homogenisiert wurden, mit Proben verglichen, die nach einer Lagerung ohne Zusatz nur mit NALC-NaOH vorbehandelt wurden. Die Anzucht erfolgte auf Löwenstein-Jensen- und 7H10 Agar. Die Kulturrate der Proben, die zuvor mit Cetylpyridiniumchlorid versetzt wurden, war signifikant höher als die, die nur nach Lagerung mit NALC-NaOH behandelt wurden (63,8% vs. 47,1%). Genauso wie in dieser Studie wurden auch unsere Untersuchungsmaterialien am Tag der Anlage mit NALC-NaOH dekontaminiert, jedoch zeigten sich in unserer Arbeit deutlich niedrigere kulturelle Verlustraten. Dies könnte an den unterschiedlich langen Lagerungszeiten, der Verwendung von Proben von zum Teil anbehandelten Patienten in der Studie von *Pardini et al.* sowie an den verschiedenen Untersuchungsmaterialien liegen.

Paramasivan C. N. et al. (Paramasivan C. N. et al., 1983) haben 41 Sputumproben von nicht behandelten Tbc-Patienten bis zu 28 Tagen bei Raumtemperatur gelagert und danach die Kulturergebnisse mit den Proben, die sofort verarbeitet wurden, verglichen. Dabei zeigte sich ein signifikanter Rückgang der positiven Kulturrate mit zunehmender Lagerungsdauer. Während die Nachweisrate 88% bei Sofortanlage betrug, reduzierte sie sich nach einer Lagerungszeit von 3, 7, 14, 21 und 28 Tagen auf 83%, 68%, 22%, 13% und 0%. Dieselbe Gruppe beschrieb in derselben

Arbeit die Untersuchung von weiteren 163 Sputumproben, die für 3, 5 bzw. 7 Tage bei Raumtemperatur gelagert wurden. Auch hier ließ sich ein signifikanter Rückgang der Kulturrate im Vergleich zur Sofortanlage nachweisen (92% bei Sofortanlage, 83% nach 3, 71% nach 5 bzw. 63% nach 7 Tagen Lagerungszeit), während die Kontaminationsrate anstieg (5% bei Sofortanlage, 7%, 12% bzw. 18% nach 3, 5 bzw. 7 Tagen Lagerungszeit). Auch unsere Daten zeigen, dass eine Sofortanlage bevorzugt werden sollte. Wir konnten jedoch einen Nachteil der Lagerung bei Raumtemperatur bis zu 3 Tagen, verglichen mit der Sofortanlage, nicht bestätigen. Diese Differenzen sind möglicherweise auf die unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien zurückzuführen.

Banda H. T. et al. (Banda H. T. et al., 2000) untersuchten, wie lange von Tuberkulosepatienten gewonnene Sputumproben positive Kultur- und Mikroskopieergebnisse aufwiesen, wenn sie bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank für 4 (30 Proben) oder 8 Wochen (13 Proben) gelagert wurden. Die Anzucht erfolgte ausschließlich auf Löwenstein-Jensen-Agar. Es zeigte sich, dass nach 4 Wochen Raumtemperaturlagerung in 37-39% und nach 4 Wochen Kühlschranklagerung in 54-67% der Kulturen Mykobakterien gewachsen waren. Nach 8 Wochen Lagerung waren nur noch 25% der bei Raumtemperatur gelagerten Proben und 50% der bei Kühlschranktemperatur gelagerten Proben positiv. Deshalb haben die Autoren bei Lagerungszeiten > 4 Wochen niedrige Lagerungstemperaturen empfohlen. In beiden Gruppen waren jedoch alle Proben trotz unterschiedlicher Lagerungsbedingungen (Kühlschrank- oder Raumtemperatur, 4 oder 8 Wochen Lagerungszeit) weiterhin mikroskopisch in der Ziehl-Neelsen-Färbung positiv.

Bei der Analyse der Mikroskopie in der vorliegenden Arbeit zeigte sich ebenfalls, dass Lagerungstemperatur und Lagerungszeit keinen Einfluss auf die mikroskopische Nachweisrate haben (Tab. 5). Da die Mikroskopie nicht zwischen lebenden und toten Erregern unterscheiden kann, waren hier signifikante Unterschiede durch die Lagerungsdauer oder Lagerungstemperatur unwahrscheinlich. Die Rate der positiven Mikroskopieergebnisse steigt, je höher die Erregerdichte in der Probe ist. Deshalb wurde zusätzlich von uns der Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Mikroskopieergebnisse von Proben mit niedrigster Erregerdichte (10^1 KBE/ml) untersucht. Bei diesen Proben könnte ein geringfügiger Verlust an Mykobakterien eher einen Einfluss auf die mikroskopische Nachweisrate haben als bei Proben mit hoher Erregerdichte. Auch hier zeigten sich keine signifikante Unterschiede nach Lagerung bei 4°C, 20°C oder 36°C (Tab. 6). Auch in der Studie von *Paramasivan C. N. et al. (Paramasivan C. N. et al., 1983)* zeigte sich bei den Mikroskopieergebnissen kein signifikanter Unterschied zwischen den sofort mikroskopierten und den bis zu 28 Tagen gelagerten Proben. *Pathak D. et al. (Pathak D. et al., 2007)* haben 87 frische bzw. nach 1 bis 2 Monaten bei -20°C gelagerte Sputumproben

von Tbc-Patienten mit NALC-NaOH dekontaminiert und nach der Ziehl-Neelsen-Methode gefärbt. Obwohl nach Lagerung statistisch signifikant weniger Mykobakterien in den einzelnen Proben mikroskopisch gesehen wurden, war nur eine vorher auf säurefeste Stäbchen positive Probe nach der Lagerung negativ. Das bestätigt die Aussage der vorliegenden Arbeit, dass die Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur nicht nachteilhaft für die Mikroskopierate sind.

Wie schon erwähnt, können die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen anderer Studien nur eingeschränkt verglichen werden. Während in der vorliegenden Arbeit die BAL-Flüssigkeit und Magensaft als gut homogenisierbare und relevante Untersuchungsmaterialien untersucht wurden, wurden in den anderen Arbeiten Sputumproben analysiert. In Europa wird die Kühlschranktemperatur zur Lagerung von Untersuchungsgut in den meisten Laboren bevorzugt. Nach unseren Ergebnissen hat eine Lagerungstemperatur unter 36°C bis zu 72 Stunden bei den von uns untersuchten Untersuchungsmaterialien jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Wachstumsrate sowie auf den mikroskopischen Nachweis von *M. tuberculosis*. Allerdings führt die verspätete Anlage zu einer gewissen Verzögerung des kulturellen Nachweises.

Es ist zwar empfehlenswert zum Erlangen früherer mykobakteriologischer Diagnosen auch die Untersuchungsmaterialien auf *M. tuberculosis* so schnell wie möglich zu verarbeiten, aber eine Lagerung des Untersuchungsgutes für 3 Tage unterhalb von Temperaturen von 36°C verfälscht das Untersuchungsergebnis bezüglich Mikroskopie und Kultur aus BAL-Flüssigkeit und Magensaft nicht.

5. Zusammenfassung

Die weltweite Zunahme der Tuberkulose, die Gefahr der schnellen Verbreitung der Erkrankung und die Entstehung multiresistenter Stämme von *M. tuberculosis* erfordern eine frühzeitige Diagnose der Erkrankung. Um dies zu gewährleisten, sollte der Nachweis und die Anzucht von *M. tuberculosis* aus Untersuchungsmaterialien möglichst schnell erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Lagerung von relevantem Untersuchungsmaterial mit unterschiedlichen Erregerdichten (10^5 KBE/ml, 10^3 KBE/ml und 10^1 KBE/ml) über 24, 48 bzw. 72 Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen (4°C, 20°C bzw. 36°C) einen Einfluss auf den kulturellen und mikroskopischen Nachweis von *M. tuberculosis* hat. Dafür wurden drei Untersuchungsmaterialien (BAL-Flüssigkeit, Magensaft und gepufferter Magensaft) mit 10 verschiedenen *M. tuberculosis*-Isolaten versetzt. Alle 2700 Proben wurden entsprechend der Routinediagnostik zur Tuberkulose dekontaminiert, nach der Ziehl-Neelsen-Methode gefärbt und mikroskopiert und auf ein flüssiges und zwei feste Nährmedien verimpft. Die verwendeten Medien waren MGIT-Flüssigkulturen, Löwenstein-Jensen- und Stonebrink-Agar.

Es konnten nach bis zu 3 Tagen Lagerung aus allen Proben Mykobakterien angezüchtet werden. Die Lagerung führte zwar zu einer signifikanten Verzögerung des Wachstums, wobei der Nachweis in den MGIT-Röhrchen früher als auf den festen Nährböden gelang. Die Einflüsse der unterschiedlichen Lagerungstemperaturen und -zeiten auf den kulturellen Nachweis waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich, sodass sich keine Empfehlung für eine optimale Lagerungstemperatur unter 36°C ablesen ließ. Die Mikroskopieergebnisse zeigten ebenfalls keine Einbußen durch die gewählten Lagerungsbedingungen. Somit können BAL- und Magensaftproben, falls erforderlich, bedenkenlos bis zu drei Tagen bei der jeweiligen Umgebungstemperatur gelagert werden, ohne dass sich dieses auf die anschließende Diagnostik negativ auswirkt.

6. Literatur

Aparna K., Moorthy K. V. K., Gokhale S. From microscopy centre to culture laboratory: a viable ride for mycobacteria. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2006; 10(4):447-449

Badak Z. F., Kiska D. L., Setterquist S., Hartley C., O'Connell M. A., Hopfer R. L. Comparison of mycobacteria growth indicator tube with BACTEC 460 for the detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 1996; 34:2236-2239

Banda H. T., Harries A. D., Boeree M. J., Nyirenda T. E., Banerjee A., Salaniponi F. M. Viability of stored sputum specimens for smear microscopy and culture. *Int J Tubercule Lung Dis*, 2000; 4:272-274

Bobadilla de Valle M., Ponce de Leon A., Kato-Maeda M., Hernandez-Cruz A., Calva-Mercado J. J., Chavez-Mazari B. et al. Comparison of sodium carbonate, cetyl-pyridinium chloride and sodium borate for preservation of sputa for culture of *Mycobakterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2003; 41:4487-4488

Boyd J. C., Marr J. J. Decreasing reliability of acid-fast smear techniques for detection of tuberculosis. *Ann. Intern. Med*, 1975; 82:489-492

Burdash N. M., Manos J. P., Ross D., Bannister E. R. Evaluation of the acid-fast smear. *J. Clin. Microbiol*, 1976; 4:190-191

Epidemiologisches Bulletin, Robert Koch Institut, Berlin 11/2007

Hanna B. A., Ebrahimzadeh A., Elliott L. B. et al. Multicenter evaluation of BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 1999; 37:748-752

Hanna B. A., Walters S. B., Bonk S. J., Tick L. J. Recovery of Mycobacteria from blood in mycobacteria growth indicator tube and Löwenstein-Jensen slant after lysis-centrifugation. *J Clin Microbiol*, 1995; 33:3315-3316

Kaufmann S. H. E., Hahn H., Zeichardt H., Mahy B. Mycobacteria and TB, Vol. 2 2003

Kent P. T., Kubica G. P. Public health microbiology. A guide for the level III laboratory. Atlanta, Georgia: Centers for disease control, 1985

Koch-Mechnikow Journal 1/2007

Lumb R., Ardian M., Waramori G., Syahrial H., Tjitra E., Maguire G. P. et al. An alternative method for sputum storage and transport for Mycobacterium tuberculosis drug resistance surveys. Int J Tuberc Lung Dis, 2006; 10:172-177

Marraro R. V., Rogers E. M., Roberta T. H. The acid-fast smear: fact or fiction? J. Am. Med. Technol, 1975; 37:277-279

Nolte F. S., Metchcock B. Mycobakterium. In: Murray P. R., Baron E. J., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover F. C., Tenover R. H., eds. Manual of clinical microbiology, 6th ed., Washington, DC: A S M Press, 1995. Pp. 400-437

Noordhoek G. T., Kolk A. H. J., Bjune G., Catty D., Dale J. W., Fine P. E. M. et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis: a blind comparison study among seven laboratories. J Clin Microbiol, 1994; 32: 277-284

Padmanabha R. K., Nair S. S., Cabbold N., Naganathan N. Some operational factors influencing the utility of culture examination in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Bull World Health Organ, 1966; 34:589-604

Paramasivan C. N., Narayana A. S., Parbhakar R., Rajagopal M. S., Somasundaram P. R., Tripathy S. P. Effect of storage of sputum specimens at room temperature on smear and culture results. Tubercle, 1983; 64:119-124

Pardini M., Varaine F., Iona E., Arzumanian E., Checchi F., Oggioni M. R. et al. Cetylpyridinium chloride is useful for isolation of Mycobacterium tuberculosis from sputa subjected to long term storage. J Clin Microbiol, 2005; 43:442-444

Pathak D., Chakravorty M., Hanif M., Tyagi J. S. Lysis of tubercle bacilli in fresh and stored sputum specimens: implications for diagnosing tuberculosis in stored and paucibacillary specimens by PCR. *BMC Microbiology*, 2007; 7:83

Perkins M. D. New diagnostic tools for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2000; 4:182-188

Peterson E., Nakasone M. A., Platon-De L. J. M., Jang Y., de La Maza L. M., Desmond E. Comparison of direct and concentrated acid-fast smears to identify specimens culture positive for *Mycobacterium* spp. *J Clin Microbiol*, 11/1999, 37:3564-3568

Pfyffer G. E., Welscher H. M., Kissling P., Cieslak C., Casal M., Gutierrez J. Comparison of the *Mycobacteria* Growth Indikator Tube (MGIT) with radiometric and solid media for recovery of acid-fast bacilli. *J. Clin Microbiol*, 1997; 35:364-368

Rieder H. L., Chonde T. M., Myking H. et al. The public health service national tuberculosis reference laboratory and the national laboratory network: minimum requirements, role and operation in a low-income country. Paris, France: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 1998.

Rivera A. B., Tupasi T. E., Grimaldo E. R., Cardano R. C., Co V. M. Rapid and improved recovery rate of *Mycobacterium tuberculosis* in *Mycobacteria* Growth Indicator Tube combined with solid Löwenstein Jensen medium. *Int J Tuberc Lung Dis*, 1997; 1(5):454-459

Saceanu C. A., Pfeiffer N. C., McLean T. Evaluation of Sputum Smears Concentrated by Cytocentrifugation for Detection of Acid-Fast Bacilli. *J Clin Microbiol*, 1993; 31:2371-2374

Selvakumar N., Ilampuranan K. J., Ponnuraja C., Narayanan P. R. Increased detection of acid-fast bacilli in sputum samples preserved in cetylpyridinium chloride solution by a modified auramine-phenol staining procedure. *J Clin Microbiol*, 2004

Selvakumar N., Kumar V., Narayana A. S. L. et al. Use of cetylpyridinium chloride for storage of sputum specimens and isolation of *M. tuberculosis*. *Indian J Tuberc*, 1993; 40:95-97

Selvakumar N., Sudhamathi S., Duraipandian M., Frieden T. R., Narayanan P. R. Reduced detection by Ziehl-Neelsen method of acid fast bacilli in sputum samples preserved in cetylpyridinium chloride solution. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2004, 8(2): 248-252

Selvakumar N., Vanajakumar P. G., Gopi K. V. et al. Isolation of tubercle bacilli from sputum samples from patients in the field studies by the cetylpyridinium chloride-sodium chloride and sodium hydroxide methods. *Indian J Med Res* 1995; 102: 149-151

Siddiqi S. H. BACTEC 460 TB System. Product and Procedural Manual, Revision E, Sparks, Maryland: Becton Dickinson and Co., 1996

Smithwick R. W., Stratigos C. B., David H. L. Use of cetylpyridinium chloride and sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 1975; 1:411-413

Somoskövi A., Magyar P. Comparison of the Mycobacteria Groth Indikator Tube with MB Redox, Löwenstein-Jensen and Middlebrook 7H11 Media for recovery of mycobacteria in clinical specimens, *J of Clin. Microbiology*, May 1999, p.1366-1369

Stitt D. T., Kodosi S. E. A rapid method for the growth and detection of mycobacteria in clinical and stock cultures. In: Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology, Las Vegas, Nevada, 1994. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994. Abstr. C-115, p.510

Sula L., Sundaresan T. K., Langerova M. Effects of storage and transport on the cultivability of mycobacteria. *Bull World Health Organ*, 1960; 23:635-651

Tazir M., David H. L., Boulahbal F. Evaluation of the chloride and bromide salts of cetylpyridinium for the transportation of sputum in tuberculosis bacteriology. *Tubercle* 1979; 60:31-36

Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes, 2005

Tortoli E., Cichero P., Piersimoni C., Simonetti M. T., Gesu G., Nista D. Use of the BACTEC MGIT 960 for the recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. J Clin Microbiol, 1999; 37:3578-3582

Traore I., Slosarek M. Survival of mycobacteria in sputum at different temperatures. Czech Med 1981; 4 (4): 203-8

World Health Organization. Guidelines for surveillance of drug resistance in surveillance. WHO/CDS/TB/2003.320. Geneva, Switzerland: WHO, 2003

World Health Organization. Faktenblatt EURO, März 2007

World Health Organization. Fact sheet Tuberculosis, May 2007

WHO tuberculosis programme. Framework for effective tuberculosis control. WHO/TE/94. P170, Geneva, Switzerland: WHO, 1994

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Hahn danke ich sehr für die Möglichkeit im Institut für Mikrobiologie und Hygiene diese Arbeit durchführen zu können.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Ignatius für die sehr gute Zusammenarbeit und die gesamte Betreuung während der Erstellung der Dissertation.

Ich danke sehr Fr. Dr. J. Wagner. Ohne Ihre geduldige und wertvolle Unterstützung wäre es mir nicht gelungen, die Dissertation in dieser Form durchzuführen.

Mein Dank gilt auch Frau H. Mellentin und Frau D. Piske (Mitarbeiterinnen des Instituts) für die Einleitung bei der Durchführung mikrobiologischer Untersuchungen.

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. med. W. Hopfenmüller vom Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie CBF/CCM für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Inbesondere möchte ich meiner Familie und meinem guten Freund H. Tillack für die liebevolle und unermüdliche Unterstützung während der gesamten Durchführung der Dissertation danken.

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9. Erklärung

„Ich, Anna Stepanyan, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *„Einfluss der Lagerungszeit und Lagerungsbedingungen von Untersuchungsmaterialien auf den Nachweis von Tuberkuloseerregern“* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 19. Juni 2008

Anna Stepanyan