

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Hohe Prävalenzrate multiresistenter *Mycobacterium*
tuberculosis-Isolate in Georgetown, Guyana

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nikolai Menner

aus Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ralf Ignatius
2. Prof. Dr. Dr. Thomas Schneider
3. PD Dr. Joachim Richter

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Tuberkulose	5
1.1.1	Epidemiologie der Tuberkulose	5
1.1.2	Ätiologie der Tuberkulose, Bakteriologie der Mykobakterien	6
1.1.3	Klinik der Tuberkulose	6
1.1.3.1	Primäre Tuberkulose	6
1.1.3.2	Postprimäre Tuberkulose	7
1.1.3.3	HIV und Tuberkulose	8
1.1.4	Diagnostik	9
1.1.4.1	Röntgenbild der Lunge	9
1.1.4.2	Tuberkulinreaktion	9
1.1.4.3	Sputumdiagnostik	9
1.1.4.4	Mikroskopische Diagnostik	10
1.1.4.5	Kulturelle Nachweismethoden	10
1.1.4.6	Identifizierung der isolierten Mykobakterien	10
1.1.4.7	Resistenzbestimmung	10
1.1.5	Therapie	11
1.1.5.1	Tuberkulostatika	11
1.1.5.2	Therapieregime und Resistenzentwicklung	11
1.1.6	Das DOTS-Programm der WHO zur Bekämpfung der Tuberkulose	15
1.1.6.1	Voraussetzungen für das DOTS-Programm	15
1.1.6.2	Ziele und Auswirkungen des DOTS-Programms	16
1.1.6.3	DOTS-Plus	18
1.2	Guyana	19
1.2.1	Land und Bevölkerung	19
1.2.2	Wirtschaftsstruktur	21
1.2.3	Probleme des öffentlichen Gesundheitswesens	22
1.2.3.1	Tuberkulose in Guyana	22
1.2.3.2	Vermutete epidemiologische Faktoren der Tuberkulose in Guyana	23
1.3	Fragestellung	23

2	Material und Methoden	25
2.1	Probensammlung und Einschluss der Patienten in die Studie	25
2.2	Materialverzeichnis	25
2.2.1	Reagenzien	25
2.2.2	Gebrauchsmaterialien	27
2.2.3	Technische Geräte	28
2.3	Methodenverzeichnis	28
2.3.1	Ziehl-Neelsen-Färbung	28
2.3.1.1	Ansetzen der Färbelösungen in Guyana	28
2.3.1.2	Mikroskopische Diagnostik	29
2.3.2	Mykobakterienkulturen	30
2.3.2.1	Dekontamination der Sputumproben mit N-Acetyl-L-Cystein	30
2.3.2.2	Anlegen der Primärkulturen	30
2.3.2.3	Anlegen von Subkulturen	31
2.3.3	Differenzierung von Mykobakterien des <i>M. tuberculosis</i> -Komplex	31
2.3.3.1	Nukleinsäure-Hybridisierung, AccuProbe [®] DNA-Sonden	31
2.3.3.2	Biochemische Identifizierung von <i>M. tuberculosis</i>	32
2.3.3.3	GenoType MTBC [®] -Test, Molekulargenetische Differenzierung mit PCR	33
2.3.4	Identifizierung isolierter atypischer Mykobakterien-Stämme mit PCR	35
2.3.5	Empfindlichkeitsprüfung der <i>M. tuberculosis</i> -Isolate	35
2.3.5.1	Empfindlichkeitsprüfung auf festen Nährmedien	35
2.3.5.2	Empfindlichkeitsprüfung in flüssigen Nährmedien	37
2.3.5.3	Pyrazinamidase-Reaktion	38
2.3.6	Statistische Auswertung	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Umfang der Studie	39
3.2	Mikroskopische Präparate	39
3.3	Mykobakterien-Kulturen	39
3.4	Differenzierung der isolierten Mykobakterien	40
3.4.1	AccuProbe [®] MTBC Culture Identification Test	40
3.4.2	Biochemische Identifizierung von <i>M. tuberculosis</i>	40
3.4.3	GenoType [®] MTBC Differenzierungs Test	40
3.5	Identifizierung atypischer Mykobakterien-Isolate	40

3.7	Empfindlichkeitsprüfung der <i>M. tuberculosis</i> -Stämme	41
3.8	Epidemiologie	43
4	Diskussion	45
4.1	Resistenz von <i>M. tuberculosis</i>	45
4.1.1	Primäre Resistenzen	46
4.1.2	Sekundäre Resistenzen	46
4.2	Faktoren, die die Epidemiologie der Tuberkulose in Guyana beeinflussen	47
4.2.1	Alter der Patienten	47
4.2.2	Vorherige antituberkulöse Therapie	48
4.3	Mögliche Gründe für die Verbreitung resistenter <i>M. tuberculosis</i> -Stämme	48
4.3.1	Ineffektive Fallfindung	49
4.3.2	Fehlende Umsetzung der direkt überwachten Medikamenteneinnahme	50
4.4	Strategien zur Verbesserung der Situation	51
4.4.1	Verbesserte Diagnostik zur Fallfindung	51
4.4.2	Überwachung der Medikamenteneinnahme	52
4.4.3	Labore und Referenzlabor	53
4.4.4	Effektive Therapie mit Zweitrang-Medikamenten	53
5	Zusammenfassung	55
6	Literatur	57
7	Abkürzungen	69
8	Danksagung	70
9	Lebenslauf	71
10	Veröffentlichung	72

1 Einleitung

1.1 Tuberkulose

1.1.1 Epidemiologie der Tuberkulose

Die Tuberkulose ist die häufigste chronische Infektionskrankheit weltweit. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht davon aus, dass ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem Erreger der Tuberkulose infiziert ist. Für das Jahr 2004 wurden weltweit 9,9 Millionen Erkrankte angenommen (Zigniol et al. 2006), und mit über zwei Millionen Todesfällen pro Jahr ist sie mit AIDS und Malaria eine der drei am häufigsten zum Tode führenden Infektionskrankheiten.

In den Industrienationen haben die Morbidität und Mortalität der Tuberkulose in den letzten beiden Jahrhunderten, zunächst durch eine Verbesserung der Lebensbedingungen und später auch aufgrund der medizinischen Versorgung, stetig abgenommen. Diese Tendenz blieb in den weniger entwickelten Ländern weit zurück. In Indien, China und den Entwicklungsländern werden heute über 90% der neu aufgetretenen Tuberkulose-Fälle registriert, wobei die Erkrankung besonders Menschen im erwerbsfähigen Alter betrifft (De Melo et al. 2003, Selig et al. 2003). Die Tuberkulose ist eines der größten Gesundheitsprobleme unserer Zeit, obwohl sie durch einen gezielten Einsatz von Antibiotika heilbar ist. Sie breitet sich besonders schnell aus, wo Armut, Wohnungsnot, erzwungene Bevölkerungsbewegungen, Mangelernährung, Alkoholismus und Drogensucht herrschen. Insbesondere jedoch die erworbene Immunschwäche AIDS trägt in den letzten Jahren zur zunehmenden Inzidenz der Tuberkulose bei (Cantwell et al. 1996, Campos et al. 2003).

Aus epidemiologischer Sicht ist die Fallfindung und effektive Therapie der Personen mit offener, durch Tröpfcheninfektion übertragbarer Tuberkulose entscheidend, um die weitere Verbreitung der Erkrankung zu verhindern. Die weltweit in zunehmendem Maße beobachteten Resistenzen der Erreger gegen Antibiotika (Espinal et al. 2001) erfordern besondere Aufmerksamkeit und therapeutische Konsequenzen (Mukherjee et al. 2004), und die lange Therapiedauer, die kontinuierliche Verfügbarkeit der Medikamente und deren regelmäßige Einnahme stellen bei der Behandlung von Patienten mit Tuberkulose in Entwicklungsländern besondere Herausforderungen dar (IUATLD 2000).

1.1.2 Ätiologie der Tuberkulose, Bakteriologie der Mykobakterien

Die Tuberkulose wird durch die obligat humanpathogenen Mykobakterien *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum I und II* verursacht, die mit *M. bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) und *M. microti* zum *M. tuberculosis*-Komplex zusammengefasst werden. Bei stark immunsupprimierten Patienten kann auch BCG Erkrankungen auslösen. In über 90% ist *M. tuberculosis* der Erreger der Erkrankung. Mykobakterien sind obligat aerobe, unbewegliche, nicht sporenbildende, 1 bis 4 µm große Stäbchen aus der Familie der Mycobacteriaceae mit einer sehr langsamen Replikationszeit. Sie zeichnen sich durch einen hohen Anteil an Fetten, vor allem Wachsen, in der Zellwand aus, die sie besonders resistent gegen Umwelteinflüsse machen und ihnen eine relative Alkohol- und Säurefestigkeit verleihen. Dadurch haben sie ein charakteristisches, das so genannte säurefeste Färbeverhalten, z. B. in der Ziehl-Neelsen-Färbung. Weitere Bakterien aus dieser Familie, mit geringerer Pathogenität, werden unter dem Namen atypische Mykobakterien zusammengefasst. *M. tuberculosis* wurde im Jahr 1882 durch Robert Koch entdeckt und als Erreger der Tuberkulose identifiziert.

1.1.3 Klinik der Tuberkulose

Der klinische Verlauf der Tuberkulose kann in eine primäre und postprimäre Tuberkulose eingeteilt werden. Er ist sehr variabel und wird in hohem Maße von der Immunkompetenz des Wirts bestimmt. Dabei müssen die Begriffe Infektion und Erkrankung streng getrennt werden. Zwischen dem Zeitpunkt der Infektion und dem Ausbruch der Erkrankung können Jahrzehnte vergehen; die Infektion bleibt häufig auf Lebenszeit klinisch latent. Nur 10 - 20 % nicht immunsupprimierter Personen, die mit *M. tuberculosis* infiziert sind, entwickeln in ihrem Leben eine Tuberkulose (Sutherland 1976, Vynnycky et al. 1997).

1.1.3.1 Primäre Tuberkulose

Nach der Infektion, die überwiegend aerogen, durch erregerehaltige, alveolargängige Aerosole von Mensch zu Mensch erfolgt, kommt es im Primärstadium nur selten zu einer erkennbaren Erkrankung. Die Progression von der Infektion zur Krankheit hängt dabei ab von einer zunehmenden Exposition, der Dauer und der Enge des Kontaktes zur Infektionsquelle (Teixeira et al. 2001, Guwatudde et al. 2003). Alveolar-Makrophagen phagozytieren die Erreger nach der Inhalation. Aufgrund der Lipidschicht und der Fähigkeit der Mykobakterien, ein Verschmelzen von Phagosomen und Lysosomen zu verhindern und die Phagosomenmembran zu zerstören (Myrvik et al. 1988), gelingt es den Makrophagen nicht, die Bakterien abzutöten, und es kommt zu einer intrazellulären Vermehrung. Die Makrophagen sterben und geben proinflammatorische

Stoffe ab. Die Mykobakterien werden dabei freigesetzt und erneut von Makrophagen aufgenommen. So kommt es am Ort der Infektion zu einem lokalen Entzündungsherd, der Primäraffekt genannt wird. Über die Lymphwege gelangen die Mykobakterien in die regionalen Lymphknoten. Die Antigenpräsentation stimuliert eine spezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort; der Lymphknoten schwillt an. Der Primäraffekt und der regional betroffene, im Falle einer pulmonalen Infektion hiläre Lymphknoten bilden zusammen den Ghonschen Primärkomplex. Die Entwicklung des Primärkomplexes bildet die Grundlage für die histologisch für die Tuberkulose typischen Granulome mit einem lymphozytären Randwall, Epitheloidzellen, Langhansschen Riesenzellen und einer zentral verkäsenden Nekrose. Dies ist der Ausdruck des Übergangs von einer unspezifischen zellulären Abwehr in die, nach Ausbildung spezifischer $CD4^+$ -T-Lymphozyten, spezifische Immunreaktion, gekennzeichnet durch eine positive Tuberkulinhautreaktion (allergische Reaktion vom verzögerten Typ) (Orme et al. 1984).

In über 90% der Fälle bleibt die Infektion auf dieses Stadium begrenzt, der Primäraffekt verkalkt und kann röntgenologisch nachweisbar bleiben. Es gelingt dem Körper jedoch nicht, die Mykobakterien abzutöten, sondern nur, die Infektion lokal zu begrenzen. Man spricht von einer inaktiven oder latenten Tuberkulose. Die Mykobakterien persistieren Jahrzehnte und können bei einer Schwächung des Immunsystems des Wirts aktiviert werden und zum Ausbruch der Erkrankung führen.

Bei einem eingeschränkten Immunsystem kommt es schon in der Primärphase zu einer raschen Progression der Erkrankung. Vom Primäraffekt ausgehend kann es dann nach der Infektion zu einer lymphogen-hämatogenen Streuung kommen, ohne dass ein Primärkomplex ausgebildet wird.

1.1.3.2 Postprimäre Tuberkulose

Die Reaktivierung, der eigentliche Ausbruch der Erkrankung, folgt einer Schwächung des Immunsystems des Wirts. Die Mykobakterien können nicht mehr effektiv eingegrenzt werden, und es kommt zur Dissemination, zur aktiven Tuberkulose. Die Schwächung kann durch zahlreiche Ursachen bedingt sein: Unterernährung, körperliche Belastung, hohes Alter, andere Infektionskrankheiten, Diabetes mellitus, Alkoholismus, Drogenkonsum, immunsuppressive Therapie, Strahlentherapie oder eine erworbene Immunschwäche im T-Zell-Bereich, z.B. durch eine HIV-Infektion. Die für die Tuberkulose typischen Kavernen in der Lunge entstehen, wenn über $Th1-CD4^+$ -Zellen eine Interferon- γ und Tumor-Nekrose-Faktor- α vermittelte verkäsende Nekrose (Bloom et al. 1992, Orme et al. 1993, Rom et al. 1993) Anschluss an einen Bronchus

findet. Da nun erregerehaltiges, hochinfektiöses Material abgehustet wird, spricht man von einer offenen Tuberkulose.

Wenn die Nekrose Anschluss an ein Blutgefäß erhält, kann es zur hämatogenen Streuung in den gesamten Körper des Wirts kommen. Dabei kann jedes Organ befallen werden. Häufig sind die Lymphknoten (besonders supraklavikulär und zervikal), daneben auch Knochen, ZNS (Meningen), Nieren und Nebennieren betroffen. Bei schlechtem Immunstatus kommt es durch die hämatogene Streuung zur Miliar-Tuberkulose mit zahlreichen hirsekornartigen (lat. milium, Hirsekorn) Herden, die kleinen Granulomen bei schlechter Eingrenzungsfähigkeit entsprechen. Knochenmark, Leber und Meningen sind dabei besonders häufig betroffen. Die schwerste Form ist die Landouzy-Sepsis mit ungehemmter hämatogener Streuung durch völlig ausbleibende Granulombildung bei stark immungeschwächten Patienten.

1.1.3.3 HIV und Tuberkulose

Die Tuberkulose ist die häufigste Todesursache bei HIV-infizierten Erwachsenen in schlechter entwickelten Ländern (Thongcharoen et al. 1992, Mohar et al. 1992, Grant et al. 1997, McDonald et al. 1999, Rana et al. 2000), obwohl sie auch bei diesen Patienten eine heilbare Erkrankung ist. Die HIV-Pandemie stellt die weltweit größte Herausforderung für die Kontrolle der Tuberkulose dar (Corbett et al. 2003). Zum einen ist die HIV-Infektion mit einem erhöhten Risiko verbunden, eine Tuberkulose zu reaktivieren (Bucher et al. 1999), zum anderen kann sie nach der Infektion oder Reinfektion zu einer schnelleren Progression der Tuberkulose führen (Daley et al. 1992, Shafer et al. 1995). Bei Personen, die nur mit *M. tuberculosis* infiziert sind, liegt das lebenslange Risiko, eine aktive Tuberkulose zu entwickeln, bei 10-20% (Sutherland 1976, Vynnycky et al. 1997). Bei Personen, bei denen eine Koinfektion von HIV und *M. tuberculosis* besteht, kann bereits das jährliche Risiko, eine Tuberkulose zu entwickeln, 10% überschreiten (Selwyn et al. 1989, Bucher et al. 1999, Girardi et al. 2000).

Die Verbreitung der Tuberkulose hat in Ländern mit einer hohen HIV-Prävalenz in den letzten Jahren rasant zugenommen, insbesondere in den am schwersten betroffenen Regionen im östlichen und südlichen Afrika (Cantwell et al. 1996, Raviglione et al. 1997b, Kenyon et al. 1999), aber in geringerem Maße auch in der Karibik und in Lateinamerika (Campos et al. 2003). Neben einer erhöhten Empfänglichkeit der HIV-Infizierten scheint in einigen Regionen die vermehrte Verbreitung der Tuberkulose durch HIV-Infizierte auch eine Zunahme der Tuberkulose-Inzidenz bei nicht HIV-Infizierten bewirkt zu haben (Obhiambo et al. 1999).

1.1.4 Diagnostik

Aus klinischer und epidemiologischer Sicht ist die frühzeitige Erkennung und Behandlung der Patienten mit offener Lungentuberkulose entscheidend, um die Verbreitung der Erkrankung zu verhindern. Die diagnostischen Schritte zielen deshalb vor allem auf eine frühzeitige Verdachtsdiagnose sowie den Nachweis von Mykobakterien im Sputum.

1.1.4.1 Röntgenbild der Lunge

Zur Standarddiagnostik der Lungentuberkulose wird zunächst ein Röntgenbild der Lunge in zwei Ebenen angefertigt, in dem verkalkte Granulome in der Lunge oder den Hiluslymphknoten, Lage und Größe von Kavernen oder eine miliare Zeichnung sichtbar werden können. Dadurch kann eine Aussage über die Schwere, die Ausdehnung und, durch wiederholte Aufnahmen, über den Verlauf getroffen werden.

1.1.4.2 Tuberkulinreaktion

Durch die intradermale Injektion von Tuberkulin nach Mendel-Mantoux lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob das Immunsystem des untersuchten Individuums sich mit Mykobakterienantigenen auseinandergesetzt hat. Bei einem positiven Ergebnis kann man jedoch nicht zwischen der Reaktion auf eine vorangegangene BCG-Impfung oder einer tatsächlich vorliegenden Infektion unterscheiden. Bei negativem Ergebnis bleibt unsicher, ob wirklich keine Infektion stattgefunden oder ob lediglich die immunologische Reaktion ausgeblieben ist. Dies ist zum Beispiel im Falle einer HIV-Infektion möglich.

1.1.4.3 Sputumdiagnostik

Um die Sensitivität und Spezifität der Diagnostik zu verbessern, werden drei Sputumproben an drei aufeinander folgenden Tagen gewonnen. Da man von einer niedrigen Zahl Mykobakterien und einer hohen Zahl schnell wachsender kontaminierender Keime des oberen Respirationstraktes im Sputum ausgehen muss, werden die Proben in sterilen Gefäßen gekühlt aufbewahrt. Anschließend wird die Standortflora durch Dekontamination der Proben abgetötet, und die in der Probe enthaltenen Mykobakterien werden durch Zentrifugieren angereichert. Das dadurch gewonnene Material kann für die mikroskopische Diagnostik und für kulturelle Nachweisverfahren mit anschließender Resistenzbestimmung der isolierten Mykobakterien verwendet werden.

1.1.4.4 Mikroskopische Diagnostik

Die Präparate werden nach Ziehl-Neelsen oder mit Auramin (Fluoreszenzfärbung) gefärbt. Die Ziehl-Neelsen-Färbung hat bei einer Lungentuberkulose in Studien eine Sensitivität von 60 bis 80% (Kim et al. 1984, Isaac-Renton et al. 1985, Ulukanligil et al. 2000), liefert aber sehr rasch ein Ergebnis mit einer hohen Spezifität von ca. 98% (Gordin et al. 1990).

1.1.4.5 Kulturelle Nachweismethoden

Der Goldstandard der Nachweisverfahren für Mykobakterien ist der Erregernachweis auf festen oder in flüssigen Kulturmedien. Feste Nährböden, von denen das Loewenstein-Jensen-Kulturmedium am gebräuchlichsten ist, enthalten meist eine Lipidquelle auf Eigelb-Basis, Glycerin sowie Malachitgrün, welches das Wachstum kontaminierender Keime unterdrückt. Es besitzt eine gute Pufferkapazität, um toxische Stoffe aus dem aufgeimpften Material zu inaktivieren. Anstelle von Glycerin enthalten Stonebrink-Nährböden Pyruvat, das das Wachstum von *M. bovis* und von Isoniazid-resistenten *M. tuberculosis*-Stämmen fördert. Während die festen Nährböden erst nach zwei bis vier Wochen die Aussage über ein Wachstum der Mykobakterien erlauben, ist das Wachstum in den neueren, flüssigen Nährmedien meist früher zu beurteilen. Nach dem Anzüchten der Mykobakterien sind durch die Anlage von Subkulturen weitere Untersuchungen, wie Speziesidentifizierung und Resistenzbestimmung, möglich.

1.1.4.6 Identifizierung der isolierten Mykobakterien

Die Identifikation der Mykobakterien aus dem *M. tuberculosis*-Komplex und die weitere Einteilung kann durch Prüfen der biochemischen Leistungsmerkmale oder mit Hilfe molekularbiologischer Nachweismethoden, mittels PCR oder spezifischer Sonden erfolgen.

1.1.4.7 Resistenzbestimmung

Die Resistenz der isolierten Mykobakterien gegenüber Tuberkulostatika kann durch Zusatz von Antibiotika in standardisierten Konzentrationen zu den festen oder flüssigen Nährmedien überprüft werden. Bei nachgewiesener Resistenz gegen eines oder mehrere der verwendeten Antibiotika kann die Therapie gezielt umgestellt werden. Zudem werden die Daten über Resistenzentwicklungen für lokale und weltweite epidemiologische Untersuchungen und sich daran ableitende Therapieempfehlungen benötigt.

1.1.5 Therapie

1.1.5.1 Tuberkulostatika

Bevor Medikamente für die Behandlung von Patienten mit Tuberkulose zur Verfügung standen, starben 50% mit aktiver Tuberkulose innerhalb von zwei Jahren, nur 25% der Patienten konnten geheilt werden (Styblo et al. 1980). Das erste wirksame Medikament zur Behandlung der Tuberkulose, das Streptomycin (SM), wurde 1946 von Selman A. Waksman erfunden. In den folgenden Jahren wurden SM und Paraaminosalicylsäure (PAS) in der Therapie für zwei Jahre in Kombination verabreicht, die Entwicklung von Resistenzen konnte jedoch dadurch nicht verhindert werden. Im Jahr 1952 kam das wesentlich effektivere Isoniazid (Isonicotinsäurehydrazid, INH) hinzu und 1970 Rifampicin (RMP). Durch die höhere Effektivität der neuen Medikamente konnte die Dauer der Kombinationstherapie auf sechs bis acht Monate reduziert werden (ATC & CDC 1994, Mahler 1997).

Heute steht eine ganze Reihe von Medikamenten zur Behandlung von Patienten mit Tuberkulose zur Verfügung. Sie werden in Medikamente der ersten Wahl und Zweitrang- oder Reservemedikamente eingeteilt. Weltweit hat sich die Kombinationstherapie mit mehreren Tuberkulostatika durchgesetzt, um eine Resistenzentwicklung der Erreger unter der langen Therapie zu vermeiden. Diese verspricht auch bei Unwirksamkeit einer Substanz Erfolg und vermindert die Gefahr der Selektion resistenter Bakterien.

Die Mittel der ersten Wahl sind heute INH, RMP, Pyrazinamid (PZA), Ethambutol (EMB) und SM. Als Mittel der zweiten Wahl bei Unverträglichkeit, Resistenz oder speziellen Indikationen kommen Prothionamid (PTH), Capreomycin (CM), Cycloserin (CSE), Amikacin, Fluorchinolone, Rifabutin, PAS, Terizidon und Clofazimin in Betracht. In Tabelle 1 sind die in unserer Studie verwendeten Mittel mit ihren Dosierungen, Nebenwirkungen und Besonderheiten zusammengestellt.

1.1.5.2 Therapieregime und Resistenzentwicklung

Die weltweit am häufigsten eingesetzte und von der WHO als Standard empfohlene Kurzzeittherapie ist (ATC & CDC 1994, WHO 1997):

Initialphase (2 Monate): INH + RMP + PZA + EMB (oder SM)

Erhaltungsphase (4 Monate): INH + RMP

Wird eine Resistenz gegen eines der fünf Medikamente der ersten Wahl nachgewiesen, wird die Therapie auf eine Kombination der übrigen vier Medikamente umgestellt. Die Dauer der Erhaltungsphase erhöht sich dabei auf bis zu 16 Monate (ATC & CDC 1994, Schaberg et al. 2001).

Tabelle 1: Verwendete Tuberkulostatika

Wirkstoff	Dosierung	Besonderheiten	Nebenwirkungen
Isoniazid (INH)	1x 4-6 mg/kg Kg bis 300 mg	liquorgängig, bakterizid gut resorbierbar	Polyneuritis: Pyridoxin-Mangel (Vit. B6-Substitution), Hepatose
Rifampicin (RMP)	1x 8-12 mg/kg Kg bis 600 mg	bakterizid, extra- u. intrazellulär, sterilisierend bei ruhenden Bakt.	Hepatose, Grippe-symptome, Anämie, Thrombopenie
Pyrazinamid (PZA)	15-30 mg/kg Kg bis 2 g	liquorgängig, gut bei saurem pH, sterilisierend bei ruhenden Bakt.	Hepatose, Hyperurikämie Athralgien, Kreislaufreaktionen
Ethambutol (EMB)	15 (-25) mg/kg Kg bis 2,5g	bakterizid, synergistisch, verbessert Penetration anderer Med.	Neuritis nervi optici, periph. Neuropathie, Hyperurikämie
Streptomycin (SM)	12-18 mg/kg Kg bis 1g	nur parenterale Gabe	Neuro- und Nephrotoxizität, Agranulozytose, aplast. Anämie
Prothionamid (PTH)	15 mg/kg Kg (7,5 g mit INH) bis (0,5-) 1g	Kreuzresistenz zu Thiacetazon	Hepatose, zentralnervöse und endokrine Störungen, Allergie
Capreomycin (CM)	20 mg/kg Kg bis 1g	nur parenterale Gabe, keine Kreuzresistenz zu SM	besonders Nephrotoxizität, Neurotoxizität (VIII. Hirnnerv)
Cycloserin (CSE)	15-25 mg/kg Kg bis 1g	nur parenterale Gabe	Depression, Konvulsionen, Psychosen

(modifiziert nach Ferlitz 1995)

Eine Resistenz gegen INH und RMP entspricht definitionsgemäß einer Multiresistenz (multi-drug-resistance, MDR). Sind andere Medikamente betroffen, spricht man von einer mehrfachen Resistenz. Wenn neben INH und RMP Fluorochinolone und mindestens eins der drei injizierbaren Medikamente Amikacin, Kanamycin oder Capreomycin betroffen sind, bezeichnet man die Bakterien seit 2006 als „extensively drug resistant“ (XDR) (CDC 2006).

Insbesondere die inzwischen weit verbreitete Multiresistenz stellt an die Therapie besondere Anforderungen (Mukherjee et al. 2004) und erfordert komplexe und lang andauernde Therapieregime (ATC & CDC 1994, Schaberg et al. 2001). Tuberkulosepatienten müssen, selbst wenn eine kontinuierliche und kostenlose Bereitstellung der Medikamente gesichert ist, umfassend und individuell aufgeklärt und in Programme eingebunden werden, da einem erfolgreichen Abschluss der Therapie häufige Nebenwirkungen, die Anzahl der einzunehmenden Medikamente und die Länge der Therapie bei oft rasch nachlassendem Krankheitsgefühl entgegenstehen. Für die Entstehung einer Multiresistenz gilt dadurch eine vorherige antituberkulöse Therapie als der wichtigste Risikofaktor (Telzak et al. 1999, Granich et al. 2005, Faustini et al. 2006).

Die Ausbreitung resistenter und multiresistenter *M. tuberculosis*-Stämme ist ein seit Jahren zunehmendes, globales Problem (Espinal et al. 2001). Nach Berechnungen von Zigniol et al. (Zigniol et al. 2006) geht die WHO für 2004 von weltweit fast einer halben Million Patienten mit multiresistenten Tuberkuloseerregern bei insgesamt 9,9 Millionen Erkrankten aus.

Gegen jedes neue Medikament zur Behandlung der Tuberkulose wurden bereits kurz nach dessen Einführung Resistenzen beobachtet. Diese liegen als primäre Resistenz bei Beginn der Therapie bereits vor oder entstehen unter der Antibiotikatherapie als sekundäre Resistenz (CDC 1993). Durch den Selektionsdruck unter der Therapie kann es dann zur Akkumulation von Resistenzen gegen mehrere Antibiotika kommen. Dies wird durch Fehler in der Therapie wie subtherapeutische Spiegel bei zu niedriger Dosierung, Pausieren der Therapie oder unzureichender Therapiedauer gefördert. Schlechte hygienische Verhältnisse in überfüllten Unterkünften, Mangelernährung, schwerer körperliche Belastung, unzureichende medizinische Versorgung und mangelnde Mitarbeit der Patienten können die Entwicklung und die weitere Verbreitung einer Resistenz noch begünstigen (Drobniewski et al. 1995, Stern et al. 2001). Typische Beispiele dafür sind erzwungene Bevölkerungsmigration in Krisenregionen, Gefängnisaufenthalte oder Minenarbeit unter schlechten Arbeitsbedingungen. Minenarbeit ist in weniger entwickelten Ländern mit dem verstärkten Auftreten einer Tuberkulose assoziiert (Mulenga et al. 2005). Bei Minenarbeitern (Mulenga et al. 2005, Churchyard et al. 2000) und insbesondere bei Gefängnisinsassen wird ein gehäuftes Auftreten von primärer (Portaels et al. 1999, Ruddy et al. 2005) sowie sekundärer Resistenz (Ruddy et al. 2005) beobachtet. Bei Sträflingen ist die Tuberkulose eine der häufigsten Todesursache (Stern et al. 2001). Ein Gefängnisaufenthalt ist in vielen Ländern ein Risikofaktor für eine Tuberkulose mit multiresistenten Stämmen (Ruddy et al. 2005). In einer Studie aus Brasilien kam es auch bei ca. 40% der Personen mit engem familiären Kontakt zu Tuberkulose-Patienten zu einer Infektion (Teixeira et al. 2001). In einer anderen brasilianischen Studie hatten 15% der Betroffenen mit primär multiresistenten Stämmen vorher engen Kontakt zu Patienten mit multiresistenten Isolaten (De Melo et al. 2003). Neben der Immunkompetenz der Kontaktperson waren eine kavernöse sputumpositive Tuberkulose des Erkrankten, die Dauer des täglichen Kontaktes und überfüllte, schlecht belüftete Wohnräume mit einer vermehrten Übertragung der Erreger assoziiert (Guwatudde et al. 2003). Patienten aus einer niedrigeren sozialen Schicht sind somit häufiger betroffen. Bei der Tuberkuloseinzidenz und dem Auftreten von Resistenzen sind außerdem männliche Patienten in Südamerika signifikant häufiger betroffen (De Melo et al. 2003, Selig et al. 2003, Tindo et al. 2004).

Bei einer Infektion mit multiresistenten Erregern versagen die etablierten Therapieprogramme, da die Standard-Therapie unzureichend ist (Espinal et al. 2000). So kommt es zu hohen Raten an Therapieversagen und Rückfällen (Farmer et al. 1997, Kimerling et al. 1999, Espinal et al. 2000). Ohne eine gezielte (antibiogrammgerichte) Behandlung breiten sich multiresistente Mykobakterien-Stämme schnell in empfänglichen Populationen aus (Ridzon et al. 1997, Davies et al. 1999, Laserson et al. 2000). Espinal et al. (Espinal et al. 2001) vermuten einen Großteil der Patienten mit multiresistenten Erregern in China, Indien und der Russischen Föderation. Einzelne Länder der EU haben jedoch auch einen hohen Anteil multiresistenter Bakterien (z.B. Estland 37,8%) .

In Lateinamerika ist die Rate an Multiresistenz mit durchschnittlich 2,9% deutlich geringer als in vielen anderen Teilen der Welt (Tabelle 2) (Zignol et al. 2006). In einzelnen Regionen mit hoher Prävalenz der Multiresistenz wie Lima, Peru, zeigten jedoch bis zu 40% der multiresistenten Isolate eine Resistenz gegen alle fünf Tuberkulostatika der ersten Wahl (Timperi et al. 2005). Um eine Kontrolle der Tuberkulose unter solchen Voraussetzungen zu ermöglichen, werden weltweite, standardisierte Therapieprogramme unter der Leitung der WHO benötigt. Durch die Einführung des DOTS-Programmes (directly-observed treatment, short course) wurden die ersten Schritte eingeleitet (WHO DOTS 1999).

Tabelle 2: Resistenz von *M. tuberculosis*-Isolaten gegen Medikamente der ersten Wahl von behandlungsnaiven und vorbehandelten Patienten in Amerika (WHO 2003)

Land	<u>Resistenz bei behandlungsnaiven Patienten</u>					(in %)	<u>Resistenz bei vorbehandelte Patienten</u>				
	INH	RMP	EMB	SM	MDR		INH	RMP	EMB	SM	MDR
Chile	5,0	0,9	0,2	10,0	0,7	21,6	9,5	4,3	22,5	4,8	
Ecuador	14,0	10,2	0,8	10,9	6,6	33,8	35,3	5,3	18,8	24,8	
El Salvador	1,3	1,1	0,3	3,8	0,3	12,0	13,0	3,0	9,0	7,0	
Honduras	6,5	2,4	1,2	14,8	1,8	17,2	17,2	3,4	27,6	6,9	
Kolumbien	9,5	1,7	0,8	11,5	1,5	-	-	-	-	-	
Kuba	1,1	0,8	0,0	4,5	0,3	7,9	2,6	2,6	15,8	2,6	
Puerto Rico	6,5	2,4	1,2	14,8	2,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	
Uruguay	1,6	0,3	0,0	1,6	0,3	-	-	-	-	-	
USA	7,7	1,5	1,6	7,4	1,1	14,0	6,5	3,5	8,6	5,2	
Venezuela	3,9	1,0	1,0	4,7	0,5	23,1	18,3	7,7	15,4	13,5	
Median	6,5	1,5	1,0	7,0	1,1	16,4	13,0	3,5	15,8	7,0	

1.1.6 Das DOTS-Programm der WHO zur Bekämpfung der Tuberkulose

Die DOTS-Strategie, eine standardisierte Kurzzeit-Therapie mit direkt überwachter Medikamenteneinnahme (WHO DOTS 1999, WHO DOTS 2002), wurde im Jahr 1994 erstmals beschrieben (WHO 1994) und bis 2005 als Therapieprogramm in 187 Ländern der Welt etabliert (WHO Global TB Report 2007). Die Effektivität dieses Programms in der Kontrolle und Behandlung der Tuberkulose ist allgemein anerkannt (Weis et al. 1994, Chaulk et al. 1995, CTC 1996, Chaulk et al. 1998).

1.1.6.1 Voraussetzungen für das DOTS-Programm

Die DOTS-Strategie benennt fünf Punkte, die als Voraussetzung für die Etablierung eines effektiven Therapieprogramms gelten (Raviglione et al. 2002):

1. den politischen Willen der Verantwortlichen zur Bekämpfung der Tuberkulose
2. die Fallfindung sputumpositiver Patienten durch Mikroskopie
3. die Kurzzeit-Chemotherapie mit überwachter Medikamenteneinnahme
4. die kontinuierliche Verfügbarkeit der Medikamente
5. die Überwachung und Dokumentation der Therapieprogramme und -ergebnisse

Jeden dieser Punkte umzusetzen gilt als essenziell, um ein erfolgreiches Programm zur Bekämpfung der Tuberkulose zu etablieren (Enarson 1991, IUATLD 2000, Mahler 1997). Gelingt dies, führt DOTS nachgewiesenermaßen zu besseren Ergebnissen als eine Behandlung der Tuberkulose ohne ein standardisiertes Therapieprogramm (Raviglione 1997a), da die Kurzzeit-Therapie die effektivste Therapie für die meisten Patienten mit Tuberkulose ist und die direkt überwachte Medikamenteneinnahme den Patienten hilft, die sechs- bis achtmonatige Therapie zu beenden (Fox 1975, Iseman 1993, Bayer 1995). Es konnte außerdem mittlerweile in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass die Entwicklung und Ausbreitung multiresistenter Stämme unter DOTS erfolgreich bekämpft werden können (Mahler 1997, Espinal 1999, Dye et al. 2002).

1.1.6.2 Ziele und Auswirkungen des DOTS-Programms

Die primären Ziele, die den langfristigen Erfolg des Programms sichern sollen, sind

1. 70% Fallfindung neuer sputumpositiver, also kontagiöser Erkrankter und
2. 85% Heilungserfolg bei diesen Erkrankten

Die WHO will so die Inzidenz und die Letalität weltweit nachhaltig reduzieren (Blank 2001, Dye et al. 2002). Wenn DOTS erfolgreich in Populationen mit einem hohen Anteil junger erkrankter Erwachsener eingeführt wird, wird nach Berechnungen der WHO die Prävalenz pro Jahr um 11% und die Letalität um 12% abnehmen (Dye et al. 1998). Die genannte Altersverteilung entspricht der Bevölkerung in Afrika südlich der Sahara und den meisten anderen Entwicklungsländern. Dabei ist der Effekt besonders groß, wenn DOTS ein bisher ineffektives Programm zur Bekämpfung der Tuberkulose in einer jungen Population ersetzt. Im Jahr 1997 lagen die Fallfindungsrate bei sputumpositiven Patienten weltweit bei 63% und die Heilungsrate bei 57% (Raviglione et al. 1997a). Aber auch in gut etablierten DOTS-Programmen kann es zur Übertragung von Erregern kommen, bevor der Erkrankte als Tuberkulose-Fall identifiziert wird (Bishai et al. 1998). Bis 2004 wurden in vielen Ländern die Ziele von 70% Fallfindung und 85% Heilung der sputumpositiven Erkrankungen noch nicht erreicht, so auch in den meisten Ländern Lateinamerikas (Tabelle 3) (WHO Global TB Report 2004).

Ohne eine Verbesserung läge die jährliche Inzidenzsteigerung der Tuberkulose bei bis zu 41% oder 10,6 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr weltweit und bis zu 203 Millionen betroffenen Patienten bis zum Jahr 2020 (Dye et al. 1998). Wenn die Ziele von 70% Fallfindung und 85% Heilung Neuerkrankter bis zum Jahr 2010 erreicht würden, könnten hingegen in den darauf folgenden 10 Jahren in Nord- und Süd-Amerika insgesamt 16% der Erkrankungen an Tuberkulose und 18% der Todesfälle verhindert werden. In stärker betroffenen Regionen der Welt, wie Südostasien, wären die Effekte nahezu doppelt so hoch. Würden diese Ziele weltweit bis zum Jahr 2010 erreicht, könnten so insgesamt 43 Millionen Tuberkulosefälle und 18 Millionen Todesfällen verhindert werden mit einer Abnahme der Inzidenz von 7% pro Jahr bis zum Jahr 2020 (Dye et al. 1998).

Tabelle 3: Beispiele der Landesabdeckung und Erfolgsquoten von DOTS im Zeitraum der Datenerhebung für die vorliegende Arbeit (nach WHO TB Report 2004)

Land	<u>DOTS</u>	<u>Fallfindungsrate</u>	<u>Therapieerfolg</u>	
	Abdeckung des Landes (%)	(DOTS) neuer sputum-pos. Pat. (%)	Neuer sputum-pos. Pat. (%)	wiederholte Behandlung (%)
Argentinien	100	51	64	k. A.
Bolivien	86	75	82	68
Brasilien	25	10	67	47
Dominik. Republik	40	43	85	61
Ecuador	37	31	82	59
Guyana	25	11	90	67
Haiti	45	41	75	69
Kolumbien	14	9	85	k. A.
Kuba	100	91	93	k. A.
Paraguay	10	8	86	74
Peru	100	84	90	79
Surinam	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
USA	100	87	70	k. A.
Venezuela	88	65	80	k. A.
Median (Americas)	73	46	81	69

sputum-pos. Pat. = sputumpositive Patienten , k. A. = keine Angaben

In Peru, einem der sieben von 127 Ländern, die 1999 nach Einschätzung der WHO die primären Ziele von DOTS erfüllten (WHO TB Report 2001), wurden durch ein auf der DOTS-Strategie basierendes nationales Tuberkulose-Programm von 1991 bis 2000 bemerkenswerte Erfolge in der Diagnostik und der Therapie der Tuberkulose erzielt. Mit einer Abnahme der Tuberkulose-Inzidenz von durchschnittlich 5,8% pro Jahr geht man von 158.000 (27%) vermiedenen Erkrankungen und 91.000 (70%) vermiedenen Todesfällen bis 2000 aus (Ministerio de Salud Peru 2001, Suarez et al. 2002). In einzelnen Regionen des Landes, in denen Multiresistenz weit verbreitet ist, liegen die Heilungsraten von standardisierten Therapieregimen jedoch bei unter 50% (Suarez et al. 2002, Chavez et al. 2004). In manchen Regionen in Russland ist die Anzahl an multiresistenten Isolaten bei Tuberkulosepatienten bereits so hoch, dass die Effektivität der nationalen DOTS-Programme entscheidend beeinträchtigt wird (Coninx 1999, Kimerling 1999, CDC 1999, Portales et al. 1999).

Von der WHO und den CDC wird die seit wenigen Jahren zunehmende Verbreitung von XDR *M. tuberculosis*-Stämmen besonders aufmerksam verfolgt. Die CDC haben 2006 erste Daten veröffentlicht, wonach von weltweit 17.690 untersuchten Isolaten aus den Jahren 2000 bis 2004

insgesamt 20% multiresistent und 2% XDR waren. Aus den USA, Lettland und Südkorea liegen Daten vor, die retrospektiv einem XDR-Anteil von 4% (1993 bis 2004), 19% (2000 bis 2002) und 15% (2004) an den multiresistenten Isolaten entsprechen; in Südamerika waren in den Jahren 2000 bis 2004 6% der multiresistenten Isolate XDR (CDC 2006 b). Bis zum Jahr 2007 wurden aus 41 Ländern von allen Kontinenten Fälle von XDR gemeldet (WHO 2007).

Angesichts dieser Entwicklungen sind die Kenntnis der Resistenzprofile der multiresistenten Stämme und eine effektive Behandlungsstrategie mit Reservemedikamenten unerlässlich. Dies hat zu der Einführung des DOTS-Plus Programms geführt.

1.1.6.3 DOTS-Plus

Das DOTS-Plus Programm ist ein Konzept zur Behandlung von Patienten mit multiresistenten *M. tuberculosis*-Isolaten in ressourcenschwachen Regionen mit Reservemedikamenten (WHO 2000, Gupta et al. 2001). DOTS-Plus sieht für Patienten mit lange bestehender Erkrankung durch hochresistente Stämme (Farmer et al. 2000a, Farmer et al. 2000b) neben der Verwendung von Reservemedikamenten eine Kontrolle der Therapie durch Sputumkulturen, eine Empfindlichkeitsprüfung der isolierten Stämme und antibiogrammgerichte Medikamentenregime vor (Farmer et al. 1998).

Die Medikamente werden entweder in individualisierten Therapieregimen eingesetzt, die auf die Resistenzprofile der isolierten Stämme zugeschnitten sind, oder in standardisierten Therapieregimen, falls eine Resistenzbestimmung nicht möglich ist (WHO 2000). Mitnick et al. (Mitnick et al. 2003) konnten zeigen, dass individualisierte Therapieregime bei Patienten mit chronischer Tuberkulose in Peru, die zuvor in wiederholten Therapieversuchen unter DOTS nicht geheilt werden konnten, mit Heilungsraten von bis zu 83% äußerst effektiv sind. Aber auch standardisierte Therapieprogramme können zur Behandlung hocheffektiv sein, insbesondere bei der Verwendung von Medikamenten, denen die Population zuvor nicht ausgesetzt war (Jancik et al. 1963, Zierski et al. 1964, Weyer 2003).

Die Reserve-Tuberkulostatika sind jedoch häufig, verglichen mit der Standard-Chemotherapie, teurer, toxischer, weniger effektiv und müssen über eine längere Zeit verabreicht werden (Mukherjee et al. 2004). Durch die hohen Behandlungskosten war die Therapie einer Tuberkulose mit multiresistenten Erregern in vielen armen Ländern bisher äußerst schwierig; die angestrebte Kostenreduktion vieler Reserve-Medikamente durch das Green-Light Committee der WHO könnte eine entscheidende Verbesserung bringen (Mukherjee et al. 2004).

Auch die Assoziation von HIV mit dem Auftreten von multiresistenten *M. tuberculosis*-Isolaten ist ein zunehmendes Problem (Vasques-Campos et al. 2004). In vielen Ländern war die HIV-

Infektion mit epidemischen Ausbrüchen von Tuberkulose assoziiert, und in vielen dieser Ausbrüche waren multiresistente Stämme beteiligt (Moss et al. 1997, Ritacco et al. 1997, Agerton et al. 1999), die schlecht auf Standardtherapien ansprachen (Goble et al. 1993, Dye et al. 2000). In einer peruanischen Studie konnten zehnfach höhere Infektionsraten mit multiresistenten Mykobakterien bei HIV-infizierten im Vergleich zu nicht HIV-infizierten Tuberkulosepatienten festgestellt werden (Campos et al. 2003).

In Afrika südlich der Sahara wurde trotz DOTS eine Zunahme der Anzahl an Tuberkulosekranken beobachtet, obwohl eine vergleichsweise hohe Zahl an erfolgreich abgeschlossenen Therapien erreicht wurde (Cantwell et al. 1996, Kenyon et al. 1999). Es gibt Modelle, die zeigen konnten, dass eine Kombination der Behandlung für latente und aktive Tuberkulose in einer Population HIV-Infizierter effektiver in der Reduktion von Tuberkulose-Fällen ist als lediglich die Therapie der Erkrankten (Heymann 1993), und es wurde bereits die Therapie sämtlicher Patienten mit latenter Tuberkulose diskutiert (De Cock et al. 1999).

1.2 Guyana

Die Quellen der demographischen Daten und der Wirtschaftsdaten sind die Länderinformationen zu Guyana des Auswärtiges Amtes, Berlin (Auswärtiges Amt 2007), und der Central Intelligence Agency, USA (CIA 2007).

1.2.1 Land und Bevölkerung

Die Republik Guyana liegt an der Nordküste Südamerikas, zwischen Venezuela im Westen, Surinam im Osten und Brasilien im Süden (Abbildung 1). Mit einer Fläche von 214.970 qkm ist das Land nahezu so groß wie die Bundesrepublik Deutschland vor der Wiedervereinigung, hat aber nur 770.000 Bewohner. In der Hauptstadt Georgetown im Norden an der Küste zum Karibischen Meer leben 220.000 Menschen. Das Klima des Landes wird vom tropischen Regenwald beherrscht.

In historischer Zeit war das Land von indianischen Völkern besiedelt. Der erste holländische Handelsposten wurde 1580 errichtet. Der Zuckerrohranbau begann 1620 mit afrikanischen Sklaven. Großbritannien machte Guyana 1831 zur britischen Kolonie. Nach der Aufhebung der Sklaverei im Jahr 1834 wanderten die Afrokariben in die Städte ab, und es strömten vor allem Inder als Vertragsarbeiter ins Land. Die politische Unabhängigkeit erhielt Guyana 1966, es verblieb im britischen Commonwealth und wurde 1970 Republik.



Abbildung 1: Geographische Karte von Guyana mit den angrenzenden Ländern

Die Bevölkerung des Landes ist geprägt durch seine britische Kolonialgeschichte; Kultur und Lebensart entsprechen der englischsprachigen Karibik. Von den 770.000 Einwohnern des Landes sind 49% indischer, 36% afrokaribischer, 7% indianischer und die anderen 8% gemischter Abstammung. Der größte Teil der Bevölkerung lebt im schmalen Küstenstreifen im Norden, in der Hauptstadt und mehreren Städten und Dörfern entlang der Küstenstraße. Die Wachstumsrate der Bevölkerung stagniert seit Jahren aufgrund einer hohen Abwanderung. Die Lebenserwartung liegt bei 63,2 Jahren für Männer und 68,6 Jahren für Frauen. Die Geburtenrate wird mit 18,28 Geburten/1000 Bevölkerung angegeben, das mittlere Lebensalter mit 27,4 Jahren. 26,2% der Bevölkerung sind 0-14 Jahre alt, 68,6% 15-64 Jahre und 5,2% älter als 65. Die Kindersterblichkeit beträgt 32,19 auf 1000 Lebendgeborene. Die Alphabetisierungsrate liegt bei 98,8%. Nach der Religionszugehörigkeit sind 42% Christen, 34% Hindus, 10% Moslems und 14% andere.

Das Verkehrsnetz in Guyana ist wenig entwickelt, einzig der flache Küstenstreifen hat stabile zweispurige Straßen. Ein öffentliches Verkehrssystem existiert nicht. In der Küstenregion operieren private Minibusse auf festen Routen. Auf den Straßen kommt es häufig zu Überfällen. Eine teils unbefestigte Straße durch den Regenwald im bergigen Hinterland verbindet die Hauptstadt mit den südlichen Regionen und ermöglicht einen Handelsweg nach Brasilien. Surinam und Venezuela können dagegen über den Landweg nicht erreicht werden. Die unwegsamen Regionen sind entweder auf den Flüssen, zu Lande mit großem Zeit- und Materialaufwand oder nur mit Flugzeugen zu erreichen.

1.2.2 Wirtschaftsstruktur

Das nutzbare Ackerland beträgt nur etwa 2% der Gesamtfläche des Landes; Zuckerrohr, Rum und Reis sind die wichtigsten Produkte. Natürliche Ressourcen sind Bauxit, Gold, Diamanten und tropische Harthölzer sowie Garnelen und Fisch. Sie könnten bessere Lebensbedingungen ermöglichen, wenn eine geordnete Wirtschaftsführung vorläge. Strukturell aber steht Guyana vor Problemen. Der Binnenmarkt ist klein, die eigene Industrie wenig diversifiziert und die Infrastruktur rudimentär. All dies macht es abhängig von ausländischen Investoren, von Importen und den internationalen Marktbedingungen.

Das Bruttosozialprodukt (BSP) betrug im Jahr 2005 765,6 Millionen US\$, das Pro-Kopf-BSP 1019 US\$. Damit nahm Guyana die Stelle 104 der 193 Länder in der Welt ein. Die Staatsverschuldung beläuft sich auf 140,6% des BSP.

Laut einem Strategiepapier der Regierung zur Bekämpfung der Armut leben 35% der Bevölkerung unterhalb der Armutsgrenze, mehr als die Hälfte von ihnen wird als extrem arm eingestuft. Der am stärksten betroffene Bevölkerungsteil sind die Ureinwohner im Regenwald. Die Weltbank sieht die Ursachen der Armut in schlechtem Management, verfehlter Ordnungspolitik, inadäquater Infrastruktur und schlechter sozialer Versorgung.

Das politische Leben wird vom Antagonismus der indisch- und der afrikanischstämmigen Bevölkerungsteile bestimmt und ist durch wiederkehrende politische Turbulenzen gekennzeichnet. Die Regierung steht vor der Aufgabe, umfassende politische und wirtschaftliche Reformen anzugehen. Dringend geboten sind eine Belebung des Wirtschaftswachstums, die Verbesserung der internen Sicherheitslage und der sozialen Bedingungen.

1.2.3 Probleme des öffentlichen Gesundheitswesens

Malaria, AIDS und Tuberkulose sind die entscheidenden medizinischen Probleme Guyanas, neben den in allen tropischen Ländern weit verbreiteten Erkrankungen durch unzureichende Trinkwasserqualität wie Durchfallkrankheiten, Hepatitis A und Typhus. Die Malaria, verursacht durch *Plasmodium falciparum* und *P. vivax*, ist mit über 30.000 Fällen/Jahr endemisch in allen Gebieten (Validum 2000). In den Küstenregionen ist zudem die lymphatische Filariasis verbreitet. Dengue-Fieber kommt im gesamten Land vor.

1.2.3.1 Tuberkulose in Guyana

Zur Zeit der Durchführung der vorliegenden Studie hatte Guyana mit 115 pro 100.000 Einwohner die fünfthöchste Inzidenz an Tuberkulose und eine der niedrigsten Fallfindungsraten aller Staaten in Nord- und Südamerika (Tabelle 4) (WHO TB Report 2004). Daten über die Resistenz von *M. tuberculosis* gegenüber Antibiotika wurden in diesem Land bis zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht erhoben.

Tabelle 4: Tuberkulose-Inzidenz in Amerika

Land	Tuberkulose Inzidenz		Inzidenz sputumpositive Tuberkulose		
	gemeldet (pro 100.000 Einwohner)	erwartet	gemeldet (pro 100.000 Einwohner)	erwartet	Fallfindungs- Rate (ges.) (%)
Argentinien	30	46	14	21	70
Barbados	2	17	2	8	24
Bolivien	118	234	79	105	75
Brasilien	46	62	23	28	84
Dom. Republik	47	95	25	42	61
Ecuador	46	137	33	61	54
Guyana	77	115	18	51	36
Haiti	147	319	75	138	55
Kolumbien	26	45	18	20	88
Kuba	8	12	5	5	91
Paraguay	37	70	17	31	56
Peru	135	205	77	91	84
Surinam	22	68	9	30	31
USA	5	5	2	2	87
Venezuela	25	42	14	19	73
Median (Amerikas)	27	43	15	19	77

(Quelle: WHO TB Report 2004)

1.2.3.2 Vermutete epidemiologische Faktoren der Tuberkulose in Guyana

Insbesondere junge Menschen im erwerbsfähigen Alter erkranken und sterben in Lateinamerika an der Tuberkulose. In zwei Studien aus Brasilien lag das durchschnittliche Alter der Tuberkulosepatienten zwischen 35 und 46 Jahren (De Melo et al. 2003, Selig et al. 2003). Der Verlust erwerbsfähiger junger Menschen durch die Tuberkulose hat besonders schwere soziale und ökonomische Auswirkungen (Molina Serpa et al. 2003). Für arme Einwohner Guyanas ist die Arbeit in Minen häufig eine der wenigen Arbeitsmöglichkeiten. Wie in 1.1.5.2 gezeigt wurde findet man bei Minenarbeitern und Gefängnisinsassen in weniger entwickelten Ländern eine erhöhte Inzidenz an Tuberkulose, Resistenzen und Multiresistenzen. Männliche Patienten sind außerdem in Südamerika bei der Tuberkuloseinzidenz und dem Auftreten von Resistenzen häufiger betroffen (De Melo et al. 2003, Selig et al. 2003, Tindo et al. 2004).

HIV/AIDS ist in Guyana wie in vielen Ländern der Karibik weit verbreitet. Nach Schätzungen der WHO liegt die Prävalenz bei 2,5% unter der erwachsenen Bevölkerung (UNAIDS 2005). Tuberkulosepatienten sind nach einer neueren Untersuchung des guyanischen Gesundheitsministeriums zu 20% mit HIV infiziert (MoH Guyana, 2005). Die Inzidenz an HIV in Südamerika ist, verglichen mit schwer betroffenen Regionen in Afrika, dennoch relativ gering. Trotzdem hat HIV die Epidemiologie der Tuberkulose in Südamerika beeinflusst, besonders durch eine erhöhte Letalität HIV-infizierter Tuberkulosepatienten (Santo et al. 2003, Aerts et al. 2004).

1.3 Fragestellung

Für Guyana wird eine hohe Tuberkuloseinzidenz, eine schlechte Fallfindungsrate und eine mangelhafte Abdeckung des Landes durch DOTS beschrieben. Bis zur Durchführung der vorliegenden Arbeit existierten für Guyana keine Daten über das Vorkommen resistenter *M. tuberculosis*-Stämme, und es wurden nur Medikamente der ersten Wahl in einem festen Therapieschema eingesetzt.

Ziel dieser Studie war es daher, erste Daten über das Vorkommen resistenter und multiresistenter *M. tuberculosis*-Isolate von Tuberkulose-Patienten aus Guyana zu erheben, Resistenzprofile isolierter Stämme zu bestimmen und Risikofaktoren für das Auftreten einer Tuberkulostatika-Resistenz zu identifizieren. Hierzu befragten wir Tuberkulosepatienten, von denen *M. tuberculosis* isoliert werden konnte, zu vorangegangener Einnahme antituberkulöser Medikamente und außerdem zu Tuberkulosekranken in ihrer Familie oder ihrer näheren Umgebung, zu Gefängnisaufenthalten und zu Aufenthalten im Hinterland zur Minenarbeit. Die anamnestischen Daten zum Alter, Geschlecht und sozialer Stellung der Patienten gingen

ebenfalls in die Analyse ein. Im öffentlichen Gesundheitswesen Guyanas war zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit ein HIV-Test noch nicht etabliert, weshalb eine mögliche Korrelation von HIV-Infektion und resistenten *M. tuberculosis*-Isolaten in der Studie nicht berücksichtigt werden konnte.

2 Material und Methoden

2.1 Probensammlung und Einschluss der Patienten in die Studie

Die Proben für die vorliegende Arbeit wurden zwischen dem 1. Februar und dem 30. April 2001 in der Chest Clinic des Georgetown Public Hospital in Georgetown, Guyana, gesammelt. Diese Klinik diente zu der Zeit der zentralen Diagnosestellung, der kostenlosen Therapie und statistischen Erfassung der Tuberkulosekranken Guyanas. Alle Patienten, die sich in diesem Zeitraum in der Chest Clinic vorstellten, wurden konsekutiv in die Studie eingeschlossen. Sie wurden gebeten, an drei aufeinander folgenden Tagen Sputumproben im Labor des Georgetown Public Hospital abzugeben, nachdem ihnen die korrekten Abnahme- und Transportbedingungen erläutert und drei sterile Aufbewahrungsgefäße ausgehändigt worden waren. Nach Übernahme der Sputumproben aus dem Labor wurden diese mikroskopisch auf säurefeste Stäbchen untersucht; bei deren Nachweis oder bei starkem klinischen Verdacht auf offene Tuberkulose wurden Kulturen auf Nährböden angelegt.

2.2 Materialverzeichnis

2.2.1 Reagenzien

Ziehl-Neelsen-Färbung:

- 100 ml Fuchsin-Stammlösung (Herstellung des Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité (IMH) Campus Benjamin Franklin)
- 50 g Phenol
- 180 ml gesättigte Methylenblau-Stammlösung (Herstellung des IMH)
- 6 ml 1%ige Kalilauge aus Kaliumhydroxid-Tabletten
- 970 ml 96%iger vergällter Ethanol
- 30 ml 34%ige Salzsäure
- 40 g Natriumhydroxid-Tabletten
- 29 g Natrium3citrat-Tabletten

Feste Nährmedien (BAG Healthcare, Lich):

- Löwenstein-Jensen-Nährböden mit Glycerin und PACT
- Stonebrink mit PACT
- Löwenstein-Jensen-Nährböden-Isoniacid (INH) (0,25 µg/ml und 1,0 µg/ml)
- Löwenstein-Jensen-Nährböden-Streptomycin (SM) (4,0 µg/ml und 8,0 µg/ml)
- Löwenstein-Jensen-Nährböden-Ethambutol (EMB) (1,0 µg/ml und 2,0 µg/ml)
- Löwenstein-Jensen-Nährböden-Rifampicin (RMP) (16,0 µg/ml und 32,0 µg/ml)

- Löwenstein-Jensen-Nährböden-Prothionamid (PTH) (16,0 µg/ml und 32,0 µg/ml)
- Löwenstein-Jensen-Nährböden-Capreomycin (CM) (16,0 µg/ml und 32,0 µg/ml)
- Löwenstein-Jensen-Nährböden-Cycloserin (CSE) (16,0 µg/ml und 32,0 µg/ml)
- Löwenstein-Jensen-Nährmedien mit 1 mg/l Brenzschleimsäurehydrazid

Flüssige Nährmedien:

- BBL MGIT[®]-Indikationsröhrchen, 4 ml (Modifizierte Middlebrook 7H9 Boullionbasis 5,9 g, Glycerol 3,1 ml, Casein-Pepton 1,25) (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)
- BBL MGIT PANTA[®] (enthält: Polymyxin B 6000 Units, Amphotericin B 600 µg, Trimethoprim 600 µg, Azlocillin 600 µg und Nalidixinsäure 2.400 units) (Becton Dickinson GmbH)
- BBL MGIT OADC[®] (enthält: Rinderalbumin 50 g, Dextrose 20 g, Katalase 0,03 g und Ölsäure 0,6 g) (Becton Dickinson GmbH)

Zur Dekontamination der Sputumproben:

- NALC (N-Acetyl-L-Cystein) (Sigma-Aldrich, München)
- PACT-Lsg: (Polymyxin 100.000 units, Amphotericin B 5 mg, Carbenicillin 50 mg und Trimetoprim 5 mg) (Mast Diagnosika GmbH, Reinfeld)

Zur Verflüssigung zäher Sputumproben:

- Sputofluol[®] (enthält NaOH und NaOCl, etwa 5% Cl aktiv) (Werkstätte für Chemie und Photo GmbH, Berlin)

AccuProbe[®] Mycobacterium Tuberculosis Complex Culture Identification Test (Gen-Probe Inc., San Diego, USA):

- AccuProbe[®]-DNA Sonden-Testkit
- Detektionsreagenz I, 1 x 240 ml, enthält 0,1% Hydrogenperoxid in 0,001 N Salpetersäure
- Detektionsreagenz II, 1 x 240 ml, enthält 1 N Natronlauge
- AccuProbe[®]-Reagenzien-Set, 100 Tests

Zur biochemischen Differenzierung:

- Nährmedium mit Lockemann-Lsg. (Herstellung des IMH)
- PZA-Röhrchen, mit TB Broth Base, Pyrazinamid, Na-Pyruvat und Agar (Herstellung des IMH)
- Niacin-Röhrchen (Herstellung des IMH)
- Nitrat-Röhrchen (Herstellung des IMH)
- Sterile isotone NaCl-Lsg. 9% (B.Braun, Melsungen)
- Kaliumcyanid-Lsg. 1% (Herstellung des IMH)
- Chloramin-T-Lsg. 5% (Herstellung des IMH)

- NIT1, Sulfanilsäure, (Bio-Merieux-Deutschland, Nürtingen)
- NIT2, N-Naphtyläthylendiamin (Bio-Merieux-Deutschland)
- Nitratpuffer (Herstellung des IMH)
- Ammonium-EisenII-sulfat-Lösung 1%ig, wässrig (Herstellung des IMH)

GenoType[®] MTBC, Molekulargen. Testsystem zur Differenzierung des MTB-Komplex:

- GenoType[®] MTBC DNA-Streifentest-Testkit (Hain Lifescience, Nehren)
- 10-fach Polymerase-Puffer (Eppendorf, Hamburg)
- MgCl₂-Lösung (25 mmol) (Eppendorf)
- Thermostabile DNA-Polymerase (Eppendorf)

Referenzsuspension:

- Trübungsstandard McFarland (Bariumsulfatsuspension, Ext. 546 nm = 0,35-0,4, aus 9,9 ml Schwefelsäure mit einem Volumenanteil von 1% Bariumchloridlösung mit einem Massenanteil von 1%), entspricht 1 mg/ml Bakterienfeuchtgewicht, zur visuellen Kontrolle (Herstellung des IMH)

Flüssige Nährmedien zur Resistenzbestimmung:

- BBL-MGIT[®]-AST-SIRE-Kit (Becton Dickinson GmbH), enthalten: Isoniacid (INH) 20 µg, Rifampicin (RIF) 200 µg, Ethambutol (EMB) 700 µg und Streptomycin (SM) 160 µg

Übrige Reagenzien:

- Flächendesinfektionsmittel, Antifekt Liquid (Schülke & Mayr, Norderstedt)
- Sterile isotonische 0,9% NaCl-Lsg. (B. Braun)
- Aqua tridestillata (Aqua tridest.) (Delta Pharma GmbH, Pfullingen)

2.2.2 Gebrauchsmaterialien

- Objektträger, 1,3 mm dick, markiert (Medco, Dülmen)
- Sterile verschraubbare Zentrifugenröhrchen, 10 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
- Sterile Pasteurpipetten, 3 ml (Schmidt, Wien, Österreich)
- Sterile Blue-Cap-Zentrifugenröhrchen, 50 ml (Becton Dickinson GmbH)
- Sterile 10 ml-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt)
- Mikropipetten, 1 µl, 10 µl, 100 µl und 300 µl (Eppendorf)
- Sterile 0,5 ml, 1 ml, 2 ml Safe-Lock-Eppendorf-Hütchen (Eppendorf)

2.2.3 Technische Geräte

- Lichtmikroskop mit 100, 400, 1000facher Vergrößerung (Zeiss, Jena)
- Tischzentrifuge (Hettich, Tuttlingen)
- Zentrifuge, Rotixa/P (Hettich)
- Vortex Mixer Reax 2000 (Heidolph, Schwabach)
- Brutschrank (Heraeus, Hanau)
- Ultraschallbad, Elma transsonic 460/H (Elma GmbH, Singen)
- Heizblock 2099-DA 60°, 65°, 90° und 95°C (Gebr. Liebisch, Bielefeld)
- Luminometer, Leader 50i, Gen-Probe (Bio-Merieux-Deutschland)
- Schüttelwasserbad TH 30 (Hortenstein, Würzburg)
- Thermocycler Trio (Biometra, Göttingen)

2.3 Methodenverzeichnis

2.3.1 Ziehl-Neelsen-Färbung (DIN 58943-32)

Die Ziehl-Neelsen-Färbung dient dem mikroskopischen Nachweis von säurefesten Stäbchen. Mykobakterien werden mit Hilfe von Karbol-Fuchsin rot angefärbt, wobei der Farbstoff beim Erhitzen der Präparate in die wachsartige Zellwand der Mykobakterien eindringt. Im Gegensatz zu anderen Bakterien kann der aufgenommene Farbstoff nach dem Abkühlen der Präparate nicht durch Salzsäurealkohol aus der Zellwand gelöst werden. Daher werden die Mykobakterien als säurefest bezeichnet. Mit Hilfe der Methylenblau-Färbung werden in einem zweiten Schritt alle entfärbten Strukturen blau gefärbt.

2.3.1.1 Ansetzen der Färbelösungen in Guyana

Die Färbelösungen wurden als konzentrierte Stammlösungen und die Reagenzien in ungelöster Form nach Guyana mitgebracht und vor Ort zu den gebrauchsfertigen Lösungen angesetzt.

Karbol-Fuchsin-Lösung: 50 g Phenol wurden unter Erhitzen in 1000 ml Aqua dest. Gelöst, 100 ml Fuchsin-Stammlösung zugefügt und die Lösung lichtgeschützt aufbewahrt.

Löfflers Methylenblau: 600 ml Aqua dest. wurden mit 180 ml gesättigter Methylenblau-Stammlösung und 6 ml einer 1%igen Kalilauge versetzt.

Salzsäurealkohol 3%ig: 970 ml eines 96%igen vergällten Ethanol wurden mit 30 ml einer 34%igen Salzsäure versetzten.

2.3.1.2 Mikroskopische Diagnostik

In Guyana stand nur eine begrenzte Anzahl von Nährmedien zur Verfügung. Um möglichst viele Mykobakterienstämme zu isolieren, wurde die mikroskopische Diagnostik nicht nur zur Erfolgskontrolle nach dem Anlegen, sondern auch als Screeningmethode zur Beurteilung der eingegangenen Sputumproben verwendet. Die Sputumproben überprüften wir auf ihre Qualität, wobei besonders auf Eiterflocken in den Proben geachtet wurde, um sie von Speichel abzugrenzen. Bei Patienten mit starkem klinischen Verdacht auf eine offene Tuberkulose und somit einer hohen Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein von Mykobakterien in der Sputumprobe wurde diese direkt nach Eingang auf Nährböden angelegt. Im weiteren Verlauf folgte die mikroskopische Kontrolle des nach Dekontamination und Anreicherung der Mykobakterien (s.u.) hergestellten Präparats.

Wenn kein eindeutiger Verdacht bestand, die Qualität des Sputums zweifelhaft war oder die Patienten zu Nachsorgeuntersuchungen erschienen, wurde zunächst ein mikroskopisches Präparat angefertigt. Nur wenn in diesem Präparat säurefeste Stäbchen nachzuweisen waren, wurden die Proben auf Nährmedien angelegt. Bei fehlendem mikroskopischem Nachweis verwarfen wir die Sputumproben.

Ausführung:

- a) Eine kleine Menge des Sputums wurde steril entnommen und auf einem Objektträger ausgestrichen. Alternativ wurde nach Dekontamination mit NALC–NaOH (s.u.) ein Tropfen des resuspendierten Sediments auf einem Objektträger ausstrichen.
- b) Nach Fixieren der Präparate wurden die Objektträger mit Karbolfuchsin-Lösung bedeckt, bis zur Dampfentwicklung erhitzt und nach dem Abkühlen mit Wasser abgespült.
- c) Die Präparate wurden 10-30 sec mit HCl-Alkohol entfärbt und mit Wasser abgespült.
- d) Die Präparate wurden 1 min mit Methyleneblau bedeckt, dann mit Wasser abgespült.
- e) Die luftgetrockneten Präparate wurden bei 1000-facher Vergrößerung mikroskopiert, wobei mindestens 100 Blickfelder (BF) durchgemustert und bewertet wurden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Bewertung der mikroskopischen Präparate

Anzahl der säurefesten Stäbchen	Bewertung
Keine säurefesten Stäbchen je Ausstrich	- = negativ
1-3 säurefeste Stäbchen je Ausstrich	+/- = verdächtig-kontrollbedürftig
4-10 säurefeste Stäbchen je 100 BF*	+ = positiv
1-10 säurefeste Stäbchen je 10 BF*	++ = positiv
1-10 säurefeste Stäbchen je BF*	+++ = positiv
Über 10 säurefeste Stäbchen je BF*	++++ = positiv

*BF: Blickfelder

2.3.2 Mykobakterienkulturen (DIN 58943-3)

2.3.2.1 Dekontamination der Sputumproben mit N-Acetyl-L-Cystein

Da von einer Kontamination der Sputumproben durch die Standortflora des oberen Respirationstraktes ausgegangen werden musste, dekontaminierten wir alle Proben mit N-Acetyl-L-Cystein (NALC)–NaOH-Lösung nach dem Verflüssigen zähflüssiger Suptumproben durch Sputofluol[®]. Zur Anreicherung der Mykobakterien im verwendeten Probenvolumen wurden die Proben anschließend zentrifugiert.

2.3.2.2 Anlegen der Primärkulturen

Die Primärkulturen wurden nach der Dekontamination der Sputumproben auf Loewenstein-Jensen- und Stonebrink-Nährböden angelegt. PACT-Lösung reduziert das Wachstum von kontaminierenden Mikroorganismen in der Probe.

Vorbereitung:

40 g NaOH-Tabletten sowie 29 g Na₃citrat-Tabletten wurden in jeweils 1 l Aqua dest. gelöst und in sterilen Gefäßen bei 4°C aufbewahrt. Vor jeder Anlage wurde 1 g NALC mit 100 ml NaOH-ösung und 100 ml Na₃Citrat-Lösung angesetzt.

Ausführung:

- a) Die Sputumproben wurden vor der Dekontamination mit 1 ml Sputofluol[®] verflüssigt.
- b) Die Sputumproben wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt und mit 10 ml NALC-NaOH-Dekontaminationslösung versetzt und gemischt. Nach 20 min wurden die Lösung mit 20 ml Aqua dest neutralisierten.
- c) Die Proben wurden 20 min bei 4000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 1-2 ml PACT-Lösung resuspendiert und ein Tropfen zum Anfertigen eines Kontrollpräparates verwendet.
- d) Von dem Probenmaterial wurden mit einer sterilen Pipette 0,25 ml auf die Nährmedien übertragen, diese über Nacht schräg gelagert, anschließend aufgestellt und 3-10 Wochen bei 37°C bebrütet.

Beurteilung:

- Die Bakterien erscheinen als cremefarbene Kolonien auf dem grünen Agar.
- Um säurefeste Stäbchen sicher nachzuweisen und eine Kontamination auszuschließen, wurden Kontrollpräparate angefertigt und nach Ziehl-Neelsen gefärbt.

2.3.2.3 Anlegen von Subkulturen

Waren säurefeste Stäbchen in den Primärkulturen nachzuweisen, wurden Subkulturen zur weiterführenden Diagnostik angelegt. Neben den bereits verwendeten Löwenstein-Jensen- und Stonebrink-Nährböden verwendeten wir zum Anlegen von Subkulturen auch flüssige Nährmedien (s.u.). Sie eignen sich gut zur Anreicherung und zum schnellen kulturellen Nachweis, es kommt jedoch leichter zu Kontaminationen, weshalb wir beim ersten Anlegen auf die Verwendung flüssiger Nährmedien verzichteten.

Ausführung:

- a) Von einem bewachsenen festen Nährboden wurden mit einer sterilen Öse mehrere Bakterienkolonien entnommen. Von MGIT[®]-Röhrchen (s.u.) wurden nach Verrühren mit einer sterilen Pipette 0,5 ml der Nährboullion entnommen.
- b) Das Material wurde auf festen Nährböden ausgestrichen, sie wurden über Nacht schräg gelagert und für 4-8 Wochen bei 37°C bebrütet.
Zum Beimpfen von flüssigen MGIT[®]-Röhrchen (sie enthalten 100 µl MGIT PANTA[®]-Lösung und 500 µl MGIT OADC[®]-Lösung) wurde das entnommene Material in die Nährboullion übertragen, vermischt und für 14 Tage bei 37°C bebrütet.

Beurteilung:

- Auf festen Nährböden erscheinen die Kolonien geringfügig pigmentiert, cremefarben mit einem charakteristischen trocken-krümeligen Aussehen.
- Eingebettet in Silikon am Boden des MGIT[®]-Röhrchens befindet sich eine fluoreszierende Verbindung, deren Emission durch Sauerstoff, der in der Bouillon enthalten ist, absorbiert wird. Bei Wachstum der Mykobakterien im Kulturmedium wird der Sauerstoff zunehmend verbraucht und die Fluoreszenz wird unter langwelligem UV-Licht (365 nm Wood-Licht) sichtbar.

2.3.3 Differenzierung von Mykobakterien des *M. tuberculosis*-Komplex

2.3.3.1 Nukleinsäure-Hybridisierung, AccuProbe[®] DNA-Sonden

Grundlage für die Nukleinsäure-Hybridisierungs-Tests ist die Tatsache, dass sich einzelne Nukleinsäurestränge komplementär aneinanderlagern, um stabile Doppelstrang-Komplexe zu bilden. Das AccuProbe[®]-System benutzt einsträngige DNA-Sonden, die komplementär zur ribosomalen RNA des Zielorganismus sind und zusätzlich ein Chemilumineszenz-Label tragen. Die ribosomale RNA bindet an die DNA-Sonde und bildet ein stabiles DNA:RNA-Hybrid. Mit dem Trennpuffer lassen sich dann hybridisierte von nicht-hybridisierten DNA-Sondenmolekülen trennen. Die Chemilumineszenz-markierten DNA:RNA-Hybride werden anschließend im

Luminometer (LEADER 50 oder PAL) gemessen und als relative Lichteinheiten (relative light units, RLU) angegeben. Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn ein Wert über dem Cutoff-Wert gemessen wird; liegt der Wert darunter, enthält die Probe keinen Organismus aus dem *M. tuberculosis*-Komplex.

Ausführung:

- a) Probenentnahme von Festmedien: Teile des Zellrasens wurden steril abgehoben. Probenentnahme aus Flüssigmedium: 1,5-3 ml des Mediums wurden bei 9.000-10.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- b) Das entnommene Probenmaterial wurde in Lysisröhrchen resuspendiert und gemischt.
- c) Die Lysisröhrchen (sie enthalten 100 µl Lysisreagens und Hybridisierungspuffer) wurden 15 min inkubiert und 10 min bei 95°C inkubiert.
- d) 100 µl der lysierten Proben wurden entnommen, in das Sondenröhrchen pipetiert und für 15 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Trennpuffer in die Sondenröhrchen pipetiert, diese wurden gemischt und für 15 min bei 60°C inkubiert.
- e) Im Luminometer wurde nach Abkühlen der Sondenröhrchen der RLU-Wert bestimmt. Beurteilung basierend auf einem Cutoff-Wert von 30.000 RLU:
 - Werte über 30.000 RLU entsprechen einem positiven Testergebnis.
 - Werte unter 20.000 RLU entsprechen einem negativen Testergebnis.
 - Bei Werten zwischen 20.000 und 29.999 RLU wurde der Test wiederholt

2.3.3.2 Biochemische Identifizierung von *M. tuberculosis* (DIN 58943, Teil 9)

Eine Möglichkeit der Differenzierung von *M. tuberculosis* und anderer Mykobakterienspezies beruht auf der Bestimmung ihrer biochemischen Leistungsfähigkeit.

Niacin-Test:

Prinzip: Alle Mykobakterien bilden Niacin. *M. tuberculosis* besitzt im Gegensatz zu anderen Mykobakterien kein Enzym, das Niacin zu Niacinribonucleotid umwandelt, sodass Niacin im Kulturmedium nachgewiesen werden kann.

Ausführung: Mehrere Kolonien einer 3 Wochen alten Kultur wurden in das Nährmedium (Lockemann-Lösung) überimpft und für 3-4 Wochen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml Kaliumcyanid-Lösung 1%ig und 0,5 ml Chloramin-T-Lösung 5%ig hinzugegeben. Ein positives Testergebnis (Gelbfärbung des Mediums nach 2-10 min) galt als Nachweis von Niacin. Blieb eine Gelbfärbung im Medium aus, wurde das Testergebnis als negativ gewertet.

Nitratreduktase-Test:

Prinzip: *M. tuberculosis* und einige andere Mykobakterien bilden das Enzym Nitratreduktase, das organisches Nitrat zu Nitrit reduziert. Mit Hilfe von Sulfanilsäure und N-Naphthyläthylendiamin kann Nitrit bei saurem pH-Wert nachgewiesen werden.

Ausführung: Mehrere Kolonien einer 3-5 Wochen alten Kultur wurden in ein steriles Zentrifugenröhrchen mit 0,5 ml steriler isotoner Kochsalzlösung (0,9%) und 1,5 ml Nitratpuffer übertragen und für einen Tag bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden jeweils einige Tropfen der Lösungen NIT 1 und NIT 2 zugegeben. Ein positives Testergebnis (Farbumschlag der Lösung von farblos zu rosa bis tiefrot nach 2-10 min) galt als Nachweis von Nitrit. Blieb ein Farbumschlag aus, wurde durch Zugabe von Zink zwischen im Nährmedium enthaltenem Nitrat und einer erfolgten Verstoffwechslung des Nitrats über Nitrit hinaus differenziert. Zink reduziert Nitrat zu Nitrit und führt somit ebenfalls zu einem Farbumschlag. In diesem Fall wurde der Test als negativ gewertet.

BSH-Resistenz:

Prinzip: BSH (Brenzschleimsäurehydrazid) verhindert in einer Konzentration von 1 mg/l im Nährmedium das Wachstum von *M. bovis*, *M. bovis* BCG und *M. africanum*. *M. tuberculosis* und andere Mykobakterien werden dagegen in ihrem Wachstum nicht behindert.

Ausführung: Die Löwenstein-Jensen-Nährmedien mit 1mg/l BSH wurden mit einem Tropfen der Bakteriensuspension mit einer Verdünnung von 10^{-2} aus dem Ansatz der Empfindlichkeitsprüfung (s.u.) beimpft und für 3-4 Wochen bei 37°C inkubiert. Eine BSH-Resistenz zeigte sich durch Wachstum der Mykobakterien auf dem Nährmedium. Blieb das Wachstum aus, wurde der isolierte Stamm als BSH-sensibel gewertet.

2.3.3.3 GenoType MTBC[®]-Test, Molekulargenetische Differenzierung mit PCR

Prinzip: Mykobakterien können auch molekulargenetisch differenziert werden. Der hier verwendete Test ermöglicht die genetische Differenzierung der dem *M. tuberculosis*-Komplex angehörenden Spezies *M. tuberculosis* / *M. africanum* II, *M. africanum* I, *M. microti*, *M. bovis* ssp. *bovis*, *M. bovis* BCG und *M. bovis* ssp. *caprae*. Der MTBC Genotype[®]-Assay ermöglicht eine sichere Speziesidentifizierung innerhalb des *M. tuberculosis*-Komplex (Richter et al. 2003).

Ausführung: Zunächst wurde die DNA aus Proben isoliert, amplifiziert und durch reverse Hybridisierung und eine anschließende Farbreaktion an den spezifischen Bindungsstellen auf dem Teststreifen sichtbar gemacht. Das auftretende Bandenmuster wurde den entsprechenden Spezies zugeordnet (Abbildung 2).

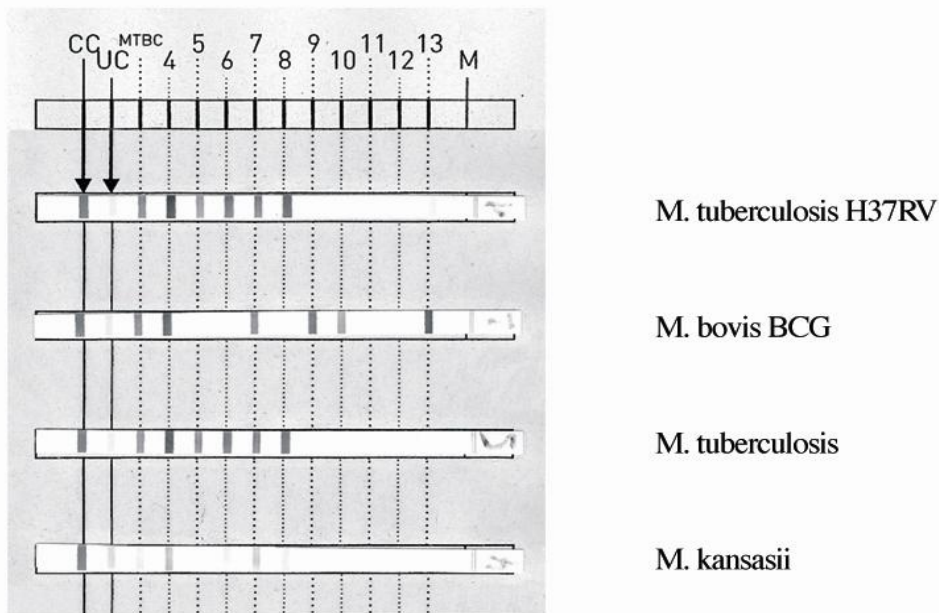


Abbildung 2: Bandenmuster des GenoType MTBC[®]-Test

Isolieren der Mykobakterien-DNA:

- Von einem bewachsenen Nährboden wurde eine Impföse voll Bakterien entnommen und in einem Eppendorf-Hütchen in 1 ml sterilem Aqua tridest. gelöst, 5 min bei 5000-6000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- Das Bakterienpellet wurde in 300 µl sterilem Aqua tridest. in einem Eppendorf-Hütchen suspendiert, für 20 min bei 95°C inkubiert und anschließend 15 min in einem Ultraschallbad inkubiert und 5 min zentrifugiert.

Amplifikation der Mykobakterien-DNA mittels PCR:

- 5 µl des Überstandes (isolierte DNA-Lösung) wurden mit 5 µl 10-fach Polymerase-Puffer, 1 µl MgCl₂-Lösung, 2 Units thermostabiler DNA-Polymerase und 3,5 µl sterilem Aqua tridest. in einem Eppendorf Hütchen mit Paraffinöl überschichtet.
- Die Probe wurde 5 min bei 95°C (1 Zyklus), 30 sec bei 95°C und 2 min bei 58°C (jeweils 10 Zyklen), 25 sec bei 95°C, 40 sec bei 53°C, 40 sec bei 70°C (jeweils 20 Zyklen) und 8 min bei 70°C (1 Zyklus) inkubiert.

Visualisierung der PCR-Produkte:

- 20 µl DNA-Amplifikat wurden mit 20 µl Denaturierungs-Reagens in die Inkubationswanne gegeben, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- 1 ml des erwärmten Hybridisierungspuffers wurde hinzugegeben und verteilt.

- c) Die Membranstreifen wurden in die Inkubationswanne gelegt, 30 min bei 50°C im Schüttelwasserbad inkubiert und der Hybridisierungspuffer verworfen.
- d) Die Membranstreifen wurden 15 min in 1 ml Waschlösung bei 50°C im Schüttelwasserbad inkubiert, 1 min in 1 ml Rinse-1-Lösung auf einem Horizontalschüttler gewaschen, in 1 ml Konjugat für 30 min auf dem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur inkubiert, zweimal in 1 ml Rinse-2-Lösung und anschließend einmal in 1 ml Aqua tridest. für jeweils 1 min auf dem Horizontalschüttler gewaschen.
- e) Die Membranstreifen wurden in 1 ml Substrat unter Lichtabschluss für 3-20 min inkubiert, bis Banden auf dem Membranstreifen sichtbar werden, anschließend wurden sie zweimal mit Aqua tridest. gewaschen und getrocknet.

Beurteilung:

- Mit Hilfe der im Testkit enthaltenen Schablone wurden die entstandenen Banden auf dem Teststreifen den *M. tuberculosis*-Komplex angehörenden Spezies zugeordnet.

Reinheitskontrolle: Die Bande der Universalkontrolle hybridisiert mit Amplifikaten anderer Mykobakterienspezies oder phylogenetischen grampositiven Bakterien mit hohem G+C-Anteil und dient als Vergleichswert für die Banden der spezifischen Gensonden. Diese können als positiv gewertet werden, wenn die Intensität der Banden die der Universalkontrolle überschreitet.

Qualitätskontrolle: Die Konjugatkontrolle dokumentiert die Effizienz der Konjugat- und Substratreaktionen und muss bei jedem Test positiv sein.

2.3.4 Identifizierung isolierter atypischer Mykobakterien-Stämme mit PCR

Die isolierten atypischen Mykobakterien wurden freundlicherweise von Dr. A. Roth (Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Labormedizin, Helios-Klinikum Emil von Behring, Waltherhöferstr. 11, 14165 Berlin, ehemals Lungenklinik Heckeshorn) mit Hilfe der 16S-23S rDNA PCR-RFLP Identifikation für Mykobakterien differenziert (Roth et. al. 2000).

2.3.5 Empfindlichkeitsprüfung der *M. tuberculosis*-Isolate

2.3.5.1 Empfindlichkeitsprüfung auf festen Nährmedien (DIN 58943-8)

Zur Beurteilung der Empfindlichkeit oder Resistenz eines *M. tuberculosis*-Isolates gegen Antibiotika wird das Wachstum einer definierten Anzahl an Bakterien (kritische Proportion) auf einem Kontrollmedium mit dem Wachstum in Gegenwart einer definierten antibiotischen Konzentration (kritische Konzentration) verglichen (Tabelle 6). Die kritische Konzentration ist die Konzentration eines Chemotherapeutikums im Kulturmedium, die bei Wachstum eine klinisch relevante Resistenz anzeigt.

Tabelle 6: Kritische Konzentrationen und kritische Proportionen der Antibiotika

Prüfsubstanz	Kritische Konzentration (mg/l)	Kritische Proportion (%)
INH	0,25	1
SM	4,0	1
EMB	1,0	1
RMP	32,0	1
PTH	16,0	10
CM	16,0	10
CSE	16,0	10

Ausführung:

- a) Mehrere Kolonien einer 3-5 Wochen bebrüteten Subkultur wurden entnommen, in ein leeres 10 ml-Zentrifugenröhrchen übertragen, mit einem sterilen Glasstab an der Röhrchenwand verrieben und tropfenweise mit 0,9% NaCl-Lösung suspendiert.
- b) Die Lösung wurde 10 min zum Sedimentieren größerer Bakterienagglomerate stehen gelassen und der Überstand tropfenweise in ein Reagenzglas mit 0,5-1 ml steriler 0,9% NaCl-Lösung übertragen bis sie den gleichen Trübungsgrad erreichte wie die Referenzsuspension (McFarland-Bariumsulfatsuspension).
- c) 0,5 ml der Bakteriensuspension wurden in ein mit 4,5 ml steriler 0,9% NaCl-Lösung gefülltes Zentrifugenröhrchen pipetiert, um eine Verdünnung von 10^{-1} herzustellen. Analog wurden Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-4} hergestellt.
- d) Die Testmedien der Medikamente INH, EMB, SM und RMP wurden mit jeweils einem Tropfen der Verdünnung 10^{-2} beimpft, Testmedien der Medikamente CM, CS und PTH mit jeweils einem Tropfen der Verdünnung 10^{-3} . Zur Wachstumskontrolle wurden jeweils ein Tropfen der Verdünnungen 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} auf Nährmedien übertragen. Alle Nährmedien wurden über Nacht schräg gelagert und anschließend 3-4 Wochen bei 37°C bebrütet.

Beurteilung:

- Ein Bakterienisolat ist sensibel (S), wenn auf dem Nährmedium der kritischen Konzentration eines Antibiotikums kein Wachstum erfolgt.
- Ein Bakterienisolat ist resistent (R), wenn auf dem Nährmedium der kritischen Konzentration ein gleiches oder stärkeres Wachstum als auf dem Kontrollmedium der kritischen Proportion dieses Antibiotikums zu beobachten ist.
- Wenn auf dem Nährmedium der kritischen Konzentration Wachstum erfolgt, jedoch weniger Kolonien als auf dem Kontrollmedium mit der kritischen Proportion dieses Antibiotikums, ist das Ergebnis nicht eindeutig. Die Prüfung sollte wiederholt werden.

Qualitätskontrolle: Der Nährboden der Verdünnung 10^{-2} muss dicht bewachsen sein, der Nährboden der Verdünnung 10^{-3} sollte mit einem aufgelockerten Bakterienrasen und der Nährboden der Verdünnung 10^{-4} mit 30-100 Kolonien bewachsen sein. Bei jedem Ansatz der Empfindlichkeitsprüfung wurden außerdem der H₃₇RV-Stamm und zwei Stämme mit bekanntem Resistenzmuster mitgeführt.

2.3.5.2 Empfindlichkeitsprüfung in flüssigen Nährmedien

Das flüssige Kulturmedium besteht aus einer modifizierten Middlebrook-7H9-Bouillonbasis, die durch Zusatz von BBL MGIT OADC[®] das Wachstum und den Nachweis von Mykobakterien ermöglicht. Für die Empfindlichkeitsprüfung wurden die im Test-Kit enthaltenen Fläschchen mit Antibiotika mit 4 ml Aqua tridest. versetzt, anschließend wurden jeweils 100 µl der Antibiotikalösungen in MGIT-Röhrchen übertragen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Konzentrationen der verwendeten Antibiotikalösungen

Antibiotikum	Konzentration nach Rekonstruktion	Konzentration im MGIT-Teströhrchen*
MGIT-INH	5 µg/ml	0,1 µg/ml
MGIT-RMP	50 µg/ml	1,0 µg/ml
MGIT-EMB	175 µg/ml	3,5 µg/ml
MGIT-SM	40 µg/ml	0,8 µg/ml

*äquivalent zu den von den CDC empfohlenen kritischen Arzneimittelkonzentrationen

Ausführung:

- a) Die MGIT[®]-Teströhrchen wurden 10 sec geschüttelt, dann wurde 1 ml aus dem bewachsenen MGIT[®]-Röhrchen in 4 ml sterile 0,9% NaCl-Lösung übertragen und diese gemischt.
- b) Die Wachstumskontrolle, ferner Teströhrchen mit den zu testenden Antibiotika und eine Blutplatte als Reinheitskontrolle wurden mit jeweils 0,5 ml der Gebrauchsverdünnung beimpft und bei 37°C bebrütet.

Beurteilung:

- Ein Bakterienisolat ist sensibel (S), wenn in den entsprechenden Medikamentenröhrchen innerhalb von 2 Wochen keine Fluoreszenz auftritt.
- Ein Bakterienisolat ist resistent (R), wenn in den entsprechenden Medikamentenröhrchen im angegebenen Zeitraum eine Fluoreszenz auftritt.

Qualitätskontrolle: Zur Qualitätssicherung wurden bei jedem Ansatz der Empfindlichkeitsprüfung der H₃₇RV-Stamm und zwei Stämme mit bekanntem Resistenzmuster mitgeführt.

Die Teströhrchen wurden ab dem dritten Tag nach dem Anlegen täglich unter einer UV-Lampe kontrolliert. Spätestens zwei Tage nach Auftreten der Fluoreszenz in der Wachstumskontrolle wurden die Medikamentenröhrchen beurteilt. Wenn bis zum 12. Tag nach Beimpfen keine Fluoreszenz in der Wachstumskontrolle auftrat, wurde der Versuchsansatz nicht bewertet und wiederholt. Die Blutplatten wurden zum Nachweis einer Kontamination auf Wachstum überprüft.

2.3.5.3 Pyrazinamidase-Reaktion

Prinzip: Das Enzym Pyrazinamidase hydrolysiert Pyrazinamid (PZA) zu Pyrazincarbonsäure. Durch Ammonium-EisenII-sulfat kann diese unter Bildung eines rosafarbenen EisenII-Komplexes (Chelat) nachgewiesen werden.

Ausführung: Mehrere Kolonien einer 3-5 Wochen alten Kultur wurden entnommen, in den Agar eingestochen und dieser für 6 Tage bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml Ammonium-Eisen-II-sulfat-Lösung auf den Agar getropft, der gesamte Ansatz für 4 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend bewertet.

Ein rosafarbenes Band an der Agaroberfläche entsprach einem Nachweis von PZA und somit einer Sensibilität des Stammes gegenüber Pyrazinamid, also einem positiven Testergebnis. Blieb die Farbveränderung aus, wurde der Stamm als resistent gegen Pyrazinamid gewertet.

2.3.6 Statistische Auswertung

Die Korrelation zwischen den Ergebnissen der Empfindlichkeitsprüfung der isolierten *M. tuberculosis*-Stämme und der zur Einteilung der Patienten in Gruppen verwendeten Daten wurden mit Hilfe des χ^2 -Tests und des exakten Fischer-Tests auf statistische Signifikanz überprüft. Dabei galt ein p-Wert von < 0.05 als statistisch signifikant und ein p-Wert von < 0.01 als statistisch hoch signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Umfang der Studie

Im angegebenen Zeitraum wurden 203 Sputumproben von 166 Patienten zur Diagnostik untersucht. Von 118 dieser Patienten konnten anamnestische Daten erhoben werden. Davon waren 63 Patienten mit Verdacht auf Tuberkulose zur Diagnosestellung, kostenlosen Therapie und zentralen Erfassung in die Chest Clinic überwiesen worden. Bei 55 Patienten erfolgten Therapiekontrollen unter der laufenden antituberkulösen Behandlung sowie Nachfolgeuntersuchungen nach abgeschlossener Therapie.

3.2 Mikroskopische Präparate

Insgesamt wurden 203 Präparate von Sputumproben nach Ziehl-Neelsen gefärbt. In 49 Präparaten (24,1%) konnten säurefeste Stäbchen nachgewiesen werden. Diese Präparate stammten von 38 (22,9%) der 166 Patienten. Auffällig war dabei eine große Zahl von Präparaten mit einem hohen Bakterienanteil, auch ohne vorherige Anreicherung durch Zentrifugation (Tabelle 8).

Tabelle 8: Quantitative Bewertung säurefester Stäbchen in den Sputumpräparaten (n =166)

	Säurefeste Stäbchen je Blickfelder (BF)					
	keine/ Präparat	1-3/ Präparat	4-10/ 100 BF	1-10/ 10 BF	1-10/ 1 BF	>10/ 1 BF
Anzahl	125	3	5	17	7	8

3.3 Mykobakterien-Kulturen

Nach Dekontamination wurden aus Sputumproben von 111 Patienten 132 Primärkulturen angelegt. Dabei zeigten 56 Kulturen ein Wachstum von Mykobakterien. Bezogen auf die 166 Patienten entspricht das 47 (28,3%) mykobakterienpositiven Patienten.

Im überwiegenden Teil der Fälle wurden zunächst mikroskopische Präparate angefertigt; nur wenn hierbei Mykobakterien nachzuweisen waren, wurde eine Kultur angelegt, um bei der begrenzten Anzahl von Nährmedien möglichst viele Isolate zu erhalten.

Bei 19 Sputumproben von 14 Patienten konnten wir in der Mikroskopie keine Mykobakterien nachweisen, in der Kultur zeigte sich jedoch Wachstum. Dies entspricht 29,2% der Patienten (mikroskopisch falsch negativ) und somit einer Sensitivität der Mikroskopie von 70,8%.

In Sputumproben von 5 Patienten bestand im mikroskopischen Präparat der Verdacht auf säurefeste Stäbchen, eine Anzucht gelang jedoch nicht. Hier kann es sich um unter der Therapie bereits abgetötete Mykobakterien oder um Artefakte gehandelt haben.

Bei fünf Proben, die säurefeste Stäbchen im mikroskopischen Präparat zeigten, wurde keine Kultur angelegt, da bereits eine Kultur dieser Patienten existierte.

3.4 Differenzierung der isolierten Mykobakterien

3.4.1 AccuProbe® MTBC Culture Identification Test

In der Differenzierung der isolierten Mykobakterien mit Hilfe des AccuProbe® MTBC Culture Identification Test zeigten 36 Isolate RLU-Werte über dem Cutoff-Wert von 30.000 und wurden somit dem *M. tuberculosis*-Komplex zugeordnet.

3.4.2 Biochemische Identifizierung von *M. tuberculosis*

Alle 36 von Patienten isolierten Stämme, die zuvor mit Hilfe des AccuProbe® MTBC Culture Identification Test dem *M. tuberculosis*-Komplex zugeordnet wurden, konnten in der weiteren biochemischen Differenzierung aufgrund des Nachweises von Niacin und Nitrit sowie der Resistenz gegen BSH als *M. tuberculosis* identifiziert werden.

3.4.3 GenoType® MTBC Differenzierungs Test

Zur Bestätigung der biochemischen Differenzierung wurde anschließend eine Untersuchung mit Hilfe des GenoType® MTBC Differenzierungs Tests vorgenommen. Alle 36 isolierten Stämme (21,7%) der 166 Patienten konnten auch in diesem Test eindeutig als *M. tuberculosis* identifiziert werden. Da von manchen Patienten mehrere Isolate gewonnen wurden, konnten wir insgesamt in 44 eingegangenen Sputumproben *M. tuberculosis* nachzuweisen.

3.4.4 Identifizierung atypischer Mykobakterien-Isolate

Die Identifizierung der atypischen Mykobakterien mit Hilfe der 16S-23S rDNA PCR-RFLP-Identifikation für Mykobakterien (Roth et al. 2000) ergab jeweils ein Isolat von *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. avium-intracellulare*, *M. abscessus* und zwei Isolate von *M. fortuitum*. In drei Proben war eine Mischung von mehreren atypischen Mykobakterien-Spezies enthalten, die nicht weiter sequenziert wurden. Außerdem waren drei Isolate atypischer Mykobakterien mit nicht mykobakteriellen Keimen kontaminiert und wurden keiner weiteren Differenzierung unterzogen. Bei einem Patienten, bei dem zwei Isolate aus zwei Sputumproben vorlagen, konnte ein Isolat als

M. tuberculosis identifiziert und ein anderes den atypischen Mykobakterien zugeordnet werden.

3.5 Empfindlichkeitsprüfung der *M. tuberculosis*-Stämme

Von den 36 *M. tuberculosis*-Isolaten waren 28 (77,8%) empfindlich gegenüber allen getesteten Antibiotika der ersten Wahl, 8 Isolate (22,2%, 95% Konfidenzintervall 8,3-36,1%) waren resistent (Tabelle 9). Bei 4 Patienten (11,1%, 95% Konfidenzintervall 0,6-21,6%) wiesen die Isolate eine einfache oder mehrfache Resistenz auf. Ebenfalls vier (11,1%, 95% Konfidenzintervall 0,6-21,6%) der 36 Isolate zeigten eine Multiresistenz. Bei einem bestand eine Resistenz gegen INH und RMP, bei zwei Isolaten gegen INH, RMP und EMB und bei einem gegen INH, RMP, EMB und PZA. Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung aller Isolate behandlungsnaiver und vorbehandelter Patienten.

Insgesamt zeigten sich bei den *M. tuberculosis*-Isolaten von 36 Patienten sechsmal (16,7%) eine Resistenz gegen INH, fünfmal (13,9%) gegen RMP, dreimal (8,3%) gegen EMB, einmal (2,8%) gegen SM und dreimal (8,3%) gegen PZA. Bei den getesteten Zweitrang-Medikamenten konnten bei zwei Patienten (5,6%) resistente *M. tuberculosis*-Stämme gegen CM, bei drei (8,3%) gegen CSE und keine resistenten Stämmen gegen PTH nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung der isolierten *M. tuberculosis*-Stämme gegenüber den auf Löwenstein-Jensen-Nährböden getesteten Tuberkulostatika stimmte mit den Ergebnissen in BBL MGIT[®]-Indikationsröhrchen überein (Tabelle 9).

Tabelle 9: Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung der *M. tuberculosis*-Isolate (Ergebnisse zu Isolaten vorbehandelter Patienten sind grau unterlegt)

Patient Nr. (Proben Nr.)	INH fest flüssig		RMP fest flüssig		EMB fest flüssig		SM fest flüssig		CM fest	CSE fest	PTH fest	PZA bioch.	Bewertung
1 (3)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	MDR (2 x R)
2 (4)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
3 (6)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
4 (9)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
5 (13)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
6 (14)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
7 (17)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
8 (18)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
9 (19)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
10 (21)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
11 (26)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
12 (32)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
13 (35)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
14 (38)	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	1 x R
15 (39)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
16 (43)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
17 (56)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
18 (65)	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	MDR (3 x R)
19 (67)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
20 (84)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
21 (86)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1 x R
22 (89)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	1 x R
23 (95)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
24 (106)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	1 x R
25 (108)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
26 (109)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	1 x R
27 (124)	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	3 x R
28 (131)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
29 (139)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
30 (140)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
31 (147)	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	MDR (3 x R)
32 (149)	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	1 x R
33 (169)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
34 (170)	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	MDR (5 x R)
35 (202)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
36 (203)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	1 x R

S: sensibel **R**: resistent MDR: Multiresistenz 1, 2, 3, 5 x R: ein-, zwei-, drei-, fünffache Resistenz

fest: feste Nährböden flüssig: flüssige Nährböden bioch.: biochemische Leistungsprüfung

3.6 Epidemiologie

Von den 36 Patienten, von denen *M. tuberculosis* angezüchtet werden konnte, hatten 25 Patienten (69,4%) nie zuvor antituberkulöse Medikamente eingenommen (behandlungsnaive Patienten). Elf Patienten (30,6%) hatten zu einem früheren Zeitpunkt bereits antituberkulöse Medikamente eingenommen (vorbehandelte Patienten). Bei den behandlungsnaiven Patienten konnte bei drei Isolaten (12%) eine Resistenz gegen Medikamente der ersten Wahl nachgewiesen werden. Bei den vorbehandelten Patienten zeigten sich dagegen bei fünf Isolaten eine Resistenz (45,5%) ($p=0,04$). Das Auftreten resistenter Isolate von *M. tuberculosis* war somit mit einer vorherigen Einnahme tuberkulostatischer Medikamente statistisch signifikant assoziiert (Tabelle 10).

Im Hinblick auf das Vorliegen multiresistenter *M. tuberculosis*-Isolate zeigten sich bei einem (4%) der 25 behandlungsnaiven Patienten, dagegen bei drei der elf vorbehandelten Patienten (27,3%) multiresistente Isolate ($p=0,044$). Auch das Auftreten einer Multiresistenz war also statistisch signifikant mit der vorherigen Einnahme tuberkulostatischer Medikamente assoziiert. In Tabelle 11 wurden zur Übersicht die Häufigkeit und prozentuale Verteilung der Resistenzen gegen Medikamente der ersten Wahl sowie ein- und mehrfachen Resistenzen der Isolate von behandlungsnaiven und vorbehandelten Patienten gegenübergestellt.

Tabelle 10: Korrelation zwischen den untersuchten Risikofaktoren und dem Auftreten einer Resistenz der *M. tuberculosis*-Isolate der Patienten

<u>Risikofaktor</u>	<u>Patienten mit resistenten Isolaten</u> (n = 8)	<u>Patienten mit empfindlichen Isolaten</u> (n = 28)	<u>p-Wert</u>
Vorbehandelt (n = 11)	5	6	0,040
Altersgruppe 30-39 Jahre (n = 13)	6	7	0,040
Minenarbeit (n = 6)	2	4	0,596
Tuberkulose in der Familie und Umgebung (n = 9)	2	7	1,000
Gefängnisaufenthalt (n=3)	1	2	0,541
Niedrige soziale Stellung (n = 11)	4	7	0,302
Geschlecht männlich (n = 26)	7	19	0,4

Tabelle 11: Resistenzen gegen Medikamente der ersten-Wahl bei den Isolaten
behandlungsnaiver und vorbehandelter Patienten

	INH -Res.	RMP -Res.	EMB -Res.	SM -Res.	PZA -Res.	MDR	Keine Res.	1 Med. -Res.	2 Med. -Res.	3 Med. -Res.	4 Med. -Res.
beh.naiv Pat. (n=25)	8% (2)	8% (2)	0	4% (1)	4% (1)	4% (1)	88% (22)	4% (1)	4% (1)	4% (1)	0
vorbehandelte Pat. (n=11)	36,4% (4)	27,3% (3)	27,3% (3)	0	18,2% (2)	27,3% (3)	54% (6)	18% (2)	0	18% (2)	9% (1)
Gesamt (n=36)	16,7% (6)	13,9% (5)	8,3% (3)	2,8% (1)	8,3% (3)	11,1% (4)	77% (28)	8,3% (3)	2,7% (1)	8,3% (3)	2,7% (1)

Keine Res. = Keine Resistenz ; 1, 2, 3, 4 Med. Res.= Resistenz gegen 1, 2, 3, 4 Medikamente;
beh.naiv. Pat. = behandlungsnaive Patienten

Zur Bestimmung des Einflusses des Patientenalters auf das Vorliegen von Resistenzen wurden die Patienten in Altersgruppen von 20 bis 29 Jahre, von 30 bis 39 Jahre, von 40 bis 49 Jahre und von 50 bis 59 Jahre eingeteilt. In die Altersgruppe zwischen 20 und 29 Jahren fielen elf Patienten (30,6%). Bei keinem dieser Patienten zeigten sich resistente *M. tuberculosis*-Isolate. In der Altersgruppe zwischen 30 und 39 Jahren waren 13 Patienten (36,1%), von denen zwei ein einfach resistentes und vier ein multiresistentes Isolat aufwiesen. Dies entspricht 50% der einfachen Resistenzen und 100% der multiresistenten *M. tuberculosis*-Isolate. In der Altersgruppe zwischen 40 und 49 Jahren waren neun Patienten (25%), von denen bei zwei ein einfach resistentes Isolat nachgewiesen wurde. Dies entspricht 50% der einfach resistenten Isolate. In der Altersgruppe zwischen 50 und 59 Jahren waren drei Patienten (8,3%), bei denen wir kein resistentes Isolat nachweisen konnten.

Zwischen dem Auftreten von Resistenzen (einfach, mehrfach und Multiresistenz) und der Zugehörigkeit der Patienten zu den Altersgruppen ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang für die Altersgruppe zwischen 30 und 39 Jahren ($p=0,04$) (Tabelle 10). Das Auftreten von resistenten und multiresistenten *M. tuberculosis*-Isolaten war somit in der Altersgruppe der 30 bis 39-jährigen Tuberkulosepatienten signifikant häufiger als in den anderen Altersgruppen.

Kein statistisch signifikantes Ergebnis ergab die Untersuchung zwischen dem Auftreten von Resistenzen und den übrigen Risikofaktoren: Minenarbeit, Tuberkulose in der Familie und Umgebung, Gefängnisaufenthalt, Geschlecht und soziale Stellung (Tabelle 10).

4 Diskussion

Die WHO hat die Tuberkulose 1993 zu einem weltweiten Gesundheits-Notfall erklärt. Es wurde geschätzt, dass zu diesem Zeitpunkt ein Drittel der Weltbevölkerung infiziert war und dass 7,5 Millionen Neuerkrankungen und 2,5 Millionen Todesfälle pro Jahr auftraten. Einer von vier Todesfällen Erwachsener an behandelbaren Erkrankungen in der Welt wurde durch die Tuberkulose verursacht (Raviglione et al. 1995). Dieses quantitative Problem wurde durch einen qualitativen Aspekt noch verschärft: die Ausbreitung multiresistenter *M. tuberculosis*-Stämme in allen Regionen der Welt (Espinal et al. 2001). Gegen diese Tendenz entwickelte die WHO 1994 das DOTS-Programm, die direkt überwachte Kurzzeit-Therapie (WHO 1994).

In dieser Studie wurde zum ersten Mal die Resistenz von *M. tuberculosis*-Isolaten aus Guyana gegenüber Tuberkulostatika untersucht. Obwohl die Anzahl der gewonnenen Isolate für diese Studie limitiert war, ergaben sich Hinweise auf einen wahrscheinlich ernstzunehmenden Anteil multiresistenter *M. tuberculosis*-Stämme in Guyana. Falls sich ein ähnlicher Anteil in größeren Studien bestätigen sollte, läge dieser höher als in den meisten anderen Ländern (Espinal et al. 2001, Zigniol et al. 2006).

4.1 Resistenz von *M. tuberculosis*

In der vorliegenden Studie ergab die Untersuchung der 36 *M. tuberculosis*-Isolate einen Anteil von 4% primärer Multiresistenz und 27,3% sekundärer Multiresistenz. Die WHO veröffentlicht regelmäßig Berichte zur weltweiten „Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance“ mit Angaben zur Inzidenz multiresistenter *M. tuberculosis*-Stämme. Auf Lateinamerika bezogen sinkt diese in Kuba, in der Dominikanischen Republik und in Argentinien steigt sie dagegen (De Kantor et al. 1998, WHO 2003). Ecuador hat zur Zeit die höchsten Resistenzraten von *M. tuberculosis* mit einem Anteil von 6,6% primärer Multiresistenz. Dies könnte auf den späten Beginn des DOTS-Programms in diesem Land zurückzuführen sein (Pelly et al. 2004). In einer Untersuchung aus den Jahren 1989 bis 1996 in zwei Kliniken, einer in der Hauptstadt Quito und einer in der entlegenen Provinz Pastaza, zeigten 8,7% der Isolate von 161 Patienten ohne vorherige antituberkulöse Behandlung eine Multiresistenz und 16,7% der 60 Patienten mit vorangegangener Behandlung (Mertz et al. 2000).

Betrachtet man die Resistenzen der 36 *M. tuberculosis*-Isolate unserer Studie im Einzelnen, kann man Resistenzen gegen alle von der WHO empfohlenen Erstrang-Medikamente feststellen. Die höchsten Resistenzraten zeigten sich gegenüber INH und RMP. Bei den von vorbehandelten Patienten isolierten *M. tuberculosis*-Stämmen bestanden signifikant höhere Resistenzraten als bei

den von behandlungsnaiven Patienten. Die geringste Zahl resistenter Isolate ergab sich bei Streptomycin, das in Guyana nur als Reservemedikament in der Therapie bei Patienten eingesetzt wurde, bei denen ein erster Therapieversuch erfolglos geblieben war.

4.1.1 Primäre Resistenzen

22 (88%) der Isolate von 25 behandlungsnaiven Patienten waren empfindlich auf alle Erstrang-Medikamente. Es zeigte sich bei zwei (8%) der Isolate eine einfache Resistenz (einmal gegen RMP und einmal gegen INH, PZA und SM) und bei einem (4%) eine Multiresistenz. Da diese Patienten zuvor keine tuberkulostatischen Medikamente eingenommen hatten, muss man von einer primären Resistenz ausgehen.

Espinal et al. (Espinal et al. 2001) stellten im Jahr 2001, dem Durchführungsjahr der vorliegenden Studie, für die WHO das Auftreten von Resistenz und Multiresistenz bei *M. tuberculosis* in 58 Regionen zusammen. Die Prävalenz einer primären Resistenz gegen ein Medikament lag zwischen 1,3% in der Tschechischen Republik und 17,9% in Sierra Leone. Estland hatte weltweit sowohl die höchste Prävalenz an Resistenz gegenüber vier Erstrang-Medikamenten (8,5%) als auch primär multiresistenter *M. tuberculosis*-Stämme (14,1%). Im regionalen Vergleich in Mittel- und Südamerika gibt die WHO Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 2002 für Kuba, El Salvador und Uruguay mit 0,3% die niedrigsten Raten an primärer Multiresistenz an. Es folgen Venezuela (0,5%) und Chile (0,7%). Die höchsten Raten primärer Multiresistenz wurden für Ecuador (6,6%), Peru (3%) und Puerto Rico (2%) beschrieben (WHO 2003). Trotz der niedrigen Fallzahlen unserer Studie wiesen die Ergebnisse auf wahrscheinlich hohe Resistenzraten bei behandlungsnaiven Patienten in Guyana, also auf die Übertragung resistenter und multiresistenter Stämme hin.

4.1.2 Sekundäre Resistenzen

Unter den elf Patienten, die trotz einer oder mehrerer vorheriger Therapien Tuberkulose hatten, konnten wir in unserer Studie bei fünf (46%) eine ein- oder mehrfache Resistenz (sekundäre Resistenz) nachweisen. Sechs der Isolate waren empfindlich auf alle getesteten Medikamente. Die häufigste der sekundären Resistenzen war mit vier (36,4%) diejenige gegen INH, die zweithäufigsten waren mit drei (27,3%) die Resistenz gegen RMP und EMB. Ebenfalls drei Isolate waren multiresistent (zwei Isolate gegen INH, RMP und EMB und ein Isolat gegen INH, RMP, EMB und PZA). Ein Therapieerfolg war 2001 in Guyana in solchen Fällen mit den vorhandenen Medikamenten praktisch ausgeschlossen. Bei erfolglosen Therapieversuchen wurde die tuberkulostatische Therapie durch Streptomycin erweitert. Dies war zum Zeitpunkt der

Untersuchung das einzig verfügbare Medikament, das im Sinne eines Zweitrang-Medikamentes eingesetzt wurde. Interessanterweise zeigte keines der Isolate vorbehandelter Patienten eine Resistenz gegenüber SM.

In der Übersichtsarbeit von Espinal et al. (Espinal et al. 2001) lagen die Resistenzraten gegen ein Medikament bei vorbehandelten Patienten zwischen 0% in Finnland und 93,8% in Uruguay, die Prävalenz an Multiresistenz bei bis zu 48,2% im Iran. Betrachtet man erneut den regionalen Vergleich, so wurde in Mittel- und Südamerika die geringste Prävalenz sekundärer Multiresistenz für Kuba mit 2,6% angegeben, gefolgt von Chile (4,8%) und Honduras (6,9%). Die höchste Rate erworbener Multiresistenz wurde für Puerto Rico mit 25% beschrieben, neben Ecuador (24,8%) und Venezuela (13,5%) (WHO 2003). In Peru, das viele Jahre den höchsten Anteil an resistenter Tuberkulose in Südamerika hatte, wurde eine sekundäre Multiresistenz für 12,3% der Isolate angegeben. Eine sekundäre Resistenz gegen INH zeigte sich dort bei 16,2%, gegen RMP bei 14,6%, gegen EMB bei 5,4% und gegen SM bei 12,7% der Patienten (Espinal et al. 2001).

Die Ergebnisse unserer Studie legen somit im regionalen Vergleich hohe sekundäre Resistenzraten nahe, die, wenn sie in nachfolgenden Studien bestätigt werden, auf Therapiefehler hinweisen (WHO 1997). Mehrere Studien haben gezeigt, dass in Lateinamerika Resistenz vor allem mit vorheriger antituberkulöser Therapie assoziiert ist (Ferdinand et al. 2003, Natal et al. 2003).

4.2 Faktoren, die die Epidemiologie der Tuberkulose in Guyana beeinflussen

Das Problem der Resistenz und Multiresistenz von *M. tuberculosis*-Isolaten betrifft, sofern unsere Daten sich in größeren Studien als repräsentativ erweisen, in Guyana beide Geschlechter und Angehörige aller ethnischen und sozialen Bevölkerungsgruppen. Kommen jedoch, bevor die Diagnose gestellt werden kann, finanzielle Anforderungen für die Patienten mit Tuberkulose-Verdacht hinzu (s.u.), kann der Beginn der Therapie insbesondere bei bedürftigen Patienten verzögert werden. Die Betroffenen bleiben dadurch länger kontagiös.

4.2.1 Alter der Patienten

In unserer Studie konnten wir eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Nachweis von Resistenz und Multiresistenz bei *M. tuberculosis*-Isolaten und der Altersgruppe der 30- bis 39-jährigen Patienten zeigen ($p=0,04$). Alle multiresistenten und 50% der resistenten Isolate wurden von diesen Patienten gewonnen. In einer brasilianischen Studie lag das durchschnittliche Alter der Patienten mit multiresistenten Isolaten ebenfalls bei 35 Jahren, in 74% handelte es sich um eine sekundäre Resistenz. Der größte Teil dieser Patienten hatte frühere Therapien

abgebrochen (De Melo et al. 2003). Auch Selig et al. (Selig et al. 2003) haben, neben unzureichender Fallfindung, abgebrochene Behandlungen bei jungen Erwachsenen als Hauptgrund für das Scheitern der Therapieprogramme beschrieben. Das junge Alter der Patienten mit multiresistenten Isolaten in unserer Studie ist somit möglicherweise durch eine verminderte Mitarbeit dieser Patientengruppe zu erklären. Sowohl eine ungenügende Teilnahme an der Diagnostik als auch das Abbrechen der Therapie könnten in einer unzureichenden Aufklärung der Patienten durch die Mitarbeiter des Gesundheitswesens begründet sein.

4.2.2 Vorherige antituberkulöse Therapie

Das Auftreten einer Resistenz ($p=0,04$) oder einer Multiresistenz ($p=0,044$) war statistisch signifikant mit einer vorangegangenen antituberkulösen Therapie assoziiert. Dies bestätigt, dass auch in Guyana die frühere Einnahme von antituberkulösen Medikamenten ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung resistenter und multiresistenter *M. tuberculosis*-Stämme bei Patienten ist. Dieser Zusammenhang konnte bereits für andere Regionen in Lateinamerika (Ferdinand et al. 2003, Natal et al. 2003), in Europa (Faustini et al. 2006), in Russland (Ruddy et al. 2005) und für die USA (Telzak et al. 1999, Clark et al. 2005, Granich et al. 2005) belegt werden.

4.3 Mögliche Gründe für die Verbreitung resistenter *M. tuberculosis*-Stämme

Ein Programm zur Bekämpfung der Tuberkulose muss alle Voraussetzungen des DOTS-Programms erfüllen (siehe 1.1.6.1 und 1.1.6.2), um die Entstehung von resistenten *M. tuberculosis*-Stämmen zu verhindern (Frieden et al. 1996, Enarson et al. 2000, Churchyard et al. 2000). Essentiell sind die primären Ziele: eine effektive Fallfindung von 70% und Heilung von 85% der sputumpositiven Neuerkrankten. Die kontinuierliche Verfügbarkeit der Medikamente, deren kostenlose Abgabe und die regelmäßige Einnahme müssen bis zum Abschluss der Therapie gewährleistet sein. In einer Studie über die Auswirkung des Managements von Kontroll-Programmen auf die Verbreitung multiresistenter Isolate konnte gezeigt werden, dass schlechtes Management die Entstehung und Verbreitung multiresistenter Stämme zur Folge hat (Laserson et al. 2000a). Eine hohe Zahl an primärer Resistenz in einer Population deutet auf Therapiefehler in der Vergangenheit und eine Übertragung resistenter Stämme. Eine hohe Zahl an sekundären Resistenzen, wie sie unsere Studie nahelegt, ist ein Hinweis auf eine aktuell unzureichende Umsetzung der Therapieprogramme und die Entstehung der Resistenz unter der Therapie (WHO 1997).

4.3.1 Ineffektive Fallfindung

Obwohl DOTS im Jahr 2001 in Guyana formal bereits etabliert war, ergaben sich erhebliche Differenzen zwischen den Richtlinien der WHO und den tatsächlichen Verhältnissen im Land. So wurden die Sputumproben unregelmäßig abgegeben. Nur von einem der 36 identifizierten Patienten gingen drei Sputumproben zur Untersuchung ein. Sechs Patienten gaben zwei und 29 Patienten nur eine Sputumprobe im Labor ab. Obwohl Mykobakterien überwiegend aus der ersten Probe nachgewiesen werden, verbessern zwei Proben die Fallfindungsrate um 7,4 - 30% (Urbanczik 1985, Ulukanligil et al. 2000, Yassin et al. 2003), wobei die Untersuchung von mehr als zwei Proben wohl keine wesentliche Verbesserung bringt (Urbanczik 1985, Craft et al. 2000, Crampin et al. 2001).

Da die mikroskopische Sputumuntersuchung nicht in allen Regionen Guyanas etabliert war, mussten die Patienten mit Krankheitsverdacht zur Diagnosestellung zum Teil erhebliche Distanzen überwinden, bevor eine Therapie eingeleitet werden konnte. Die Ausgabe der Medikamente fand an festen Besuchstagen in der Chest Clinic statt, außerdem in zwei weiteren Gesundheitsposten im Hinterland Guyanas. Die Anreise zu diesen Posten aus entlegenen Regionen im Regenwald ist beschwerlich und zeitaufwendig und selbst bei der Anreise aus Küstenregionen für die größtenteils arme Bevölkerung sehr teuer. Durch das Fehlen sozialer Sicherungssysteme bewirkt der Arbeitsausfall zudem für die Betroffenen jedes Mal zusätzliche Belastungen und auf lange Sicht eine Bedrohung der Existenzgrundlage. Auch wenn die Medikamente selbst kostenfrei sind, verzögern diese Faktoren die Diagnosestellung und machen die Einleitung und Aufrechterhaltung der Therapie unsicher, sind also epidemiologisch negative Faktoren. So konnten Allos et al. (Allos et al. 1996) nachweisen, dass die erschwerte Kontaktaufnahme der Patienten zu den Ärzten, also das verspätete Erkennen der Erkrankung und die verzögerte Einleitung einer Therapie, eine Verbreitung der Infektion begünstigen.

In unserer Studie konnten bei den nach Ziehl-Neelsen gefärbten Sputumpäparaten von 166 Patienten mit Tuberkuloseverdacht bei 38 Patienten (22,9%) säurefeste Stäbchen nachgewiesen werden. Auffällig war dabei der hohe Anteil mit einer besonders großen Anzahl von Mykobakterien im Präparat. Man geht davon aus, dass das Risiko, eine Tuberkulose zu entwickeln, neben dem Immunstatus mit der Länge der Exposition der betreffenden Person gegenüber offenen Tuberkulösen und der Enge des Kontaktes korreliert (Guwatudde et al. 2003). Der hohe Anteil an Patienten mit offener Tuberkulose und insbesondere die große Zahl an Mykobakterien im Sputum deuten auf eine zum Zeitpunkt der eingeleiteten Diagnostik bereits fortgeschrittene Erkrankung hin. Dadurch bestand eine relativ hohe Ansteckungsgefahr für

Kontaktpersonen, und aufgrund des späten Therapiebeginns nimmt auch die Gefährdung der Patienten selbst zu.

In Tabelle 3 sind Erfolgsquoten und die Abdeckung durch DOTS in Ländern Amerikas und der Karibik im Jahr 2001 dargestellt. Aus diesen Daten kann man erkennen, dass 2001 noch Handlungsbedarf in Guyana bestand. Mit 25% Abdeckung der Bevölkerung durch DOTS lag Guyana an drittletzter Position der insgesamt 44 Staaten. In der Fallfindung sputumpositiver Patienten durch DOTS hatte Guyana mit 11%, neben Surinam und Barbados, die niedrigste Rate aller 44 Staaten. Dabei war die Inzidenz der Tuberkulose in Surinam und Barbados deutlich niedriger als in Guyana. Vergleicht man die Inzidenzraten an Tuberkulose, liegt Guyana nach Haiti, Bolivien, Peru und Ecuador an fünfter Stelle der Länder Amerikas. Die anderen vier Länder erreichen jedoch deutlich höhere Fallfindungsraten als Guyana.

Für die Therapie neuer sputumpositiver Fälle unter DOTS wurde für Guyana eine, bei Zugrundelegen des zuvor Gesagten, fragliche Erfolgsrate von 90% angegeben. Mit diesem Wert würde das Land unter den fünf erfolgreichsten Ländern, über dem Mittelwert und sogar über den Erfolgsquoten der USA liegen. Interessanterweise wurde kürzlich für das Jahr 2006 für den Therapieerfolg bei neuen sputumpositiven Patienten nur eine Rate von 64% beschrieben (WHO TB Report 2009). In der Therapie der vorbehandelten Patienten wurde 2001 für Guyana nur ein durchschnittliches Ergebnis gemeldet. Dies ist ebenfalls ein Hinweis auf eine hohe Zahl sekundärer Resistenzen aufgrund aktueller Therapiefehler (WHO 1997).

4.3.2 Fehlende Umsetzung der direkt überwachten Medikamenteneinnahme

Im WHO Global TB Report für das Jahr 2002 (WHO TB Report 2004) ist angegeben, dass sowohl die Kurzzeit-Therapie als auch die direkt überwachte Medikamenteneinnahme und die Kontrolle des Therapieergebnisses zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit in allen Regionen Guyanas etabliert waren, die mikroskopische Untersuchung von Sputumproben und die Überwachung von Patienten mit Krankheitsverdacht jedoch nur in einigen Regionen.

Im Beobachtungszeitraum dieser Studie konnten wir eine direkte Überwachung der Medikamenteneinnahme nur in wenigen Fällen beobachten. Alle Patienten, bei denen säurefeste Stäbchen im Sputumpräparat nachgewiesen wurden, erhielten die von der WHO empfohlene Kurzzeit-Therapie, bestehend aus INH, RMP, EMB und PZA. Patienten mit Krankheitsverdacht, bei denen keine säurefesten Stäbchen im Sputum nachgewiesen wurden, die jedoch Kontakt zu Erkrankten oder einen länger als zwei Monate anhaltenden produktiven Husten hatten, wurden ebenfalls therapiert. Der überwiegende Teil der Patienten erhielt seine wöchentliche Medikamentenration, oder, im Falle einer längeren Anreise, die Medikation für einen Monat. Die

direkt überwachte Einnahme der Medikamente konnte dabei nicht erfolgen, auch nicht bei Patienten, bei denen bereits der klinische Verdacht auf eine Resistenzentwicklung bestand. Lediglich bei einigen Patienten, die Therapien in der Vergangenheit abgebrochen oder ohne Erfolg abgeschlossen hatten und aus Georgetown stammten, konnten wir eine direkt überwachte Medikamenteneinnahme beobachten. Somit wurde 2001 auch der wichtigste Bestandteil des DOTS-Programms (Frieden et al. 2007) in Guyana nicht erfüllt.

4.4 Strategien zur Verbesserung der Situation

Seit 2005 besteht eine Kooperation des Ministry of Health von Guyana mit der Canadian Society for International Health (CSIH). Es wird unter anderem versucht, die Fallfindung, die Umsetzung von DOTS und die Qualität der Labordiagnostik zu verbessern. Dafür wurden mittlerweile zusätzliche Mitarbeiter eingestellt, geschult und zwei weitere Labore im Land eingerichtet, die zur Diagnostik mikroskopische Sputumuntersuchungen durchführen. Außerdem erhielten DOTS-Mitarbeiter Motorräder, um ihre Mobilität zu verbessern (CSIH 2005). Eine zuverlässige Abdeckung wird aufgrund der Größe und Unwegsamkeit dieses spärlich besiedelten Landes jedoch nahezu unmöglich sein. Folgende Strategien könnten die Situation der Tuberkulosebekämpfung in Guyana weiter verbessern.

4.4.1 Verbesserte Diagnostik zur Fallfindung

Obwohl sich die Abdeckung des Landes durch DOTS seit 2001 nahezu verdreifacht hat, ist sie für das Jahr 2007 im TB Report 2009 immer noch mit nur 70% verzeichnet. Für die Fallfindungsrate der sputumpositiven Patienten unter DOTS liegt der Wert nahezu unverändert bei nur 39% (WHO TB Report 2009). Es gibt in DOTS jedoch bereits etablierte Konzepte, die eine Verbesserung der Fallfindungsrate bewirken könnten. In diesen Konzepten ist eine stärkere Einbindung von ausgewählten Personen in den Dorfgemeinschaften vorgesehen, um eine Früherkennung der Symptome und eine Sputumuntersuchung auch in abgelegenen Gebieten armer Länder zu ermöglichen. Im Rahmen von DOTS werden daher in den Gemeinden und Dorfgemeinschaften Fortbildungsprogramme zur Erkennung der typischen Symptome der Tuberkulose und zum Anfertigen von Sputumpräparaten angeboten, um so die Identifizierung von Verdachtsfällen und die Einleitung der Therapie zu beschleunigen (WHO DOTS/Community-DOTS). Diese waren zum Zeitpunkt unserer Studie nur in wenigen Regionen Guyanas etabliert und in hohem Maße vom Engagement der Dorfgemeinschaft und von ehrenamtlichen Mitarbeitern abhängig. Neben dem Ausbau der Gesundheitsposten im Land

sollte besonders die mikroskopische Diagnostik und Früherkennung der Tuberkulose auf Gemeindeebene durch Fortbildungsprogramme in entlegenen Regionen stärker gefördert werden.

4.4.2 Überwachung der Medikamenteneinnahme

Auch beim Heilungserfolg neuer sputumpositiver Patienten erreichte Guyana 2006 ein mit 64% nur unbefriedigendes Ergebnis (WHO TB Report 2009). Durch eine Optimierung der aktuellen Kontrollstrategien, mit einer konsequenten Umsetzung der Diagnostik- und Therapierichtlinien von DOTS sowie Monitoring der Therapieergebnisse könnte die Situation auch mit den vorhandenen Strukturen langfristig deutlich verbessert werden. Durch die frühe Einführung einer vorbildhaften, dem heutigen DOTS-Programm ähnlichen Bekämpfungsstrategie der Tuberkulose erreichte z.B. Peru bereits in den neunziger Jahren, vor der offiziellen Einführung von DOTS, eine stetige Abnahme der Inzidenz um durchschnittlich 5,8% pro Jahr (Suarez et al. 2001). Aufgrund eines gut etablierten Programms mit effektiver Fallfindung und Heilung Neuerkrankter gehört Peru heute nicht mehr zu den am stärksten durch die multiresistente Tuberkulose betroffenen Ländern (WHO Global TB Report 2003). Der Anteil an sekundärer Multiresistenz hat zwar in sieben Jahren von 43 auf 57% relativ zugenommen. Allerdings hat die Anzahl an Resistenzen insgesamt abgenommen, vor allem die Zahl an primärer Resistenz (Vasques-Campos et al. 2004).

Obwohl in den Richtlinien der WHO eigentlich die Überwachung der Medikamenteneinnahme durch Mitarbeiter des Gesundheitswesens vorgesehen ist, wurden auch alternative Konzepte erarbeitet. In einer Studie über gemeindebasierte DOTS-Strategien (Community-DOTS) in schwer zugänglichen Bergregionen in Nepal, in denen eine Überwachung durch Mitarbeiter des Gesundheitswesens nur sehr eingeschränkt möglich ist, wurde gezeigt, dass bei der Überwachung der Medikamenteneinnahme durch Familienmitglieder gleich gute Erfolgsraten der Therapie erreicht werden können wie unter der durch Mitarbeiter des Gesundheitswesens überwachten Therapie. Unter „Family member-DOTS“ wurden Heilungsraten von 89% erreicht, unter „Community-DOTS“ lagen diese bei 85%. Die Fallfindungsrate lag jedoch mit „Family member-DOTS“ nur bei 44% und mit „Community-DOTS“ bei 63% (Garner et al. 2006). Diese Ansätze könnten auch für Guyana neue Perspektiven in der Ergänzung des DOTS-Programms in abgelegenen Regionen ohne regelmäßige Beteiligung von Mitarbeitern des Gesundheitswesens darstellen.

4.4.3 Labore und Referenzlabor

In der Kooperation mit der CSIH wird momentan auch versucht, die Qualität der Labordiagnostik in Guyana zu verbessern. Nach umfangreichen Fortbildungen der Mitarbeiter und Modernisierung des Labors in Georgetown werden nun auch Mykobakterienkulturen angelegt. Mithilfe der Kulturen erfolgt in Guyana eine Kontrolle mikroskopischer Befunde, eine Differenzierung und eine Empfindlichkeitsprüfung der Isolate gegenüber INH. Weitere Empfindlichkeitsprüfungen werden in Referenzlaboren in der Karibik und in Kanada durchgeführt. Nach dem Bericht der CSIH arbeiten die Labore zuverlässig (CSIH 2005). Dies wäre ein bedeutender Schritt zur Verbesserung der Diagnostik- und Therapieoptionen, wenn zudem eine nachhaltige Ausbildung von lokalem Laborpersonal gelingt. Das Netzwerk zur Diagnostik der Tuberkulose muss schrittweise ausgebaut werden, um Empfindlichkeitsprüfungen gegen Erst- und Zweitrangmedikamente auch in Guyana zu ermöglichen.

In den letzten Jahren wurde außerdem ein neuer, viel versprechender Ansatz zum kulturellen Nachweis und der schnellen Empfindlichkeitsprüfung von *M. tuberculosis*-Stämmen entwickelt, der für ärmere Länder eine günstige Alternative in der Diagnostik bedeuten könnte. Mit einer in ersten Studien hohen Sensitivität erlaubt der MODS (Microscopic Observation Drug Susceptibility) Assay innerhalb von wenigen Tagen preisgünstig den Erregernachweis mit einer gleichzeitigen, zuverlässigen Empfindlichkeitsprüfung (Moore et al. 2006). Zudem sollten weitere Studien mit höheren Fallzahlen durchgeführt werden, um zuverlässige, international vergleichbare Daten über die Resistenzlage und -entwicklung von *M. tuberculosis* in Guyana zu erhalten.

4.4.4 Effektive Therapie mit Zweitrang-Medikamenten

Die Standard-Kurzzeittherapie kann Patienten mit multiresistenten Tuberkuloseerregern in den meisten Fällen nicht heilen (Farmer et al. 1997, Coninx et al. 1999, García-García et al. 2000). Die Erfolge der Behandlung von Tuberkulosepatienten mit multiresistenten Erregern unter DOTS lagen in Studien aus Indonesien und Taiwan über 50% (Hadiarto et al. 1996, Suo et al. 1996) und sogar über 80% in Hong Kong, Korea und der Türkei (Park et al. 1998, Yew et al. 2000, Tahaoglu et al. 2001). Allerdings wurden alle Patienten in speziellen Krankenhäusern behandelt. Unter ambulanten Bedingungen war dagegen die Behandlung von Patienten mit einer multiresistenten Tuberkulose in weniger als der Hälfte der Fälle erfolgreich (Kim et al. 2001, Narita et al. 2001, Suarez et al. 2002). Eine Ausnahme ist eine Studie von Mitnick et al. (Mitnick et al. 2003) aus Peru, in der die Effektivität einer gemeindebasierten DOTS-Therapie von Patienten, auch mit multiresistenten Erregern, gezeigt wurde. Die Heilungsrate lag bei 83%, und

die Kosten betragen nur 10% der Kosten einer vergleichbaren Therapie in Krankenhäusern. Im Falle einer Empfindlichkeit der isolierten Stämme war der Einsatz von EMB und PZA mit einem besseren Therapieergebnis assoziiert als in anderen Behandlungsregimen. EMB und PZA gehören zum Standardregime der WHO. In einer nachfolgenden Studie aus Peru konnte durch einen vermehrten Einsatz von Gemeinde-Krankenschwestern zur Überwachung der Therapie der Erfolg der nichtstationären Behandlung von Patienten mit multiresistenter Tuberkuloseerregern sogar noch gesteigert werden (Palacios et al. 2003).

Das DOTS-Plus Programm sieht für Patienten mit lange bestehender Erkrankung durch hoch resistente Stämme (Farmer et al. 2000 a, Farmer et al. 2000 b) eine Kontrolle der Therapie durch Sputumkulturen, eine Empfindlichkeitsprüfung der isolierten Stämme, den Einsatz von Zweitrang-Medikamenten und eine direkt überwachte Einnahme der individualisierten Medikamentenregime vor (Farmer et al. 1998). Durch die angestrebte Kostenreduktion vieler Zweitrang-Medikamente (WHO 2000) sollen die hohen Behandlungskosten der antibiogrammgerechten Therapie einer Tuberkulose mit multiresistenten Isolaten gesenkt werden. Diese Medikamente sollten für einen gezielten Einsatz in individualisierten Therapieregimen für einzelne Patienten in Guyana zur Verfügung stehen.

In der vorliegenden Studie zeigte keines der Isolate vorbehandelter Patienten eine Resistenz gegenüber SM, sodass man in Guyana einen verstärkten frühzeitigen Einsatz von SM als Kombinationsmedikament bei dem Verdacht auf Resistenzen erwägen sollte. Unter den getesteten Zweitrang-Medikamenten waren gegen PTH alle Isolate sensibel, gegen CS zeigten sich die höchsten Resistenzraten. PTH könnte somit ein geeignetes Reservemedikament für die Kombinationstherapie bei Patienten mit multiresistenten Isolaten sein.

Da eine effektive Therapie von Patienten mit multiresistenten Erregern bis zur Umsetzung der oben genannten Punkte in Guyana nicht möglich ist, sollten sich die Mitarbeiter des Gesundheitswesens insbesondere auf die Fallfindung und die Aufklärung der jungen, erstbehandelten Tuberkulose-Patienten konzentrieren, um einen erfolgreichen Abschluss der Therapie zu erreichen.

5 Zusammenfassung

Die Tuberkulose ist die häufigste chronische Infektionskrankheit und fordert jährlich fast 2 Millionen Todesfälle, obwohl sie durch den richtigen Einsatz von Antibiotika heilbar ist. Die Ausbreitung resistenter und multiresistenter, d.h., gleichzeitig gegen Isoniazid und Rifampicin resistenter *Mycobacterium tuberculosis*-Isolate, zählt heute zu den weltweit größten Herausforderungen des öffentlichen Gesundheitswesens. Die WHO versucht, mit Programmen, die zu einer ausreichenden Fallfindung führen und den Therapieerfolg durch direkte Beobachtung der Medikamenteneinnahme kontrollieren (directly-observed treatment, short course, DOTS), dieser Entwicklung entgegenzuwirken. Im Rahmen dieser Studie wurden zum ersten Mal epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen resistenter Tuberkuloseerreger in Guyana durchgeführt. Außerdem suchten wir nach Risikofaktoren für das Auftreten von Resistenzen.

Zwischen dem 1. Februar und 30. April 2001 wurden in der Chest Clinic der Hauptstadt Georgetown 203 Sputumproben von 166 Patienten gesammelt. Diese wurden nach Ziehl-Neelsen gefärbt und auf säurefeste Stäbchen untersucht. In 49 Präparaten von 38 Patienten konnten Mykobakterien nachgewiesen werden, zum Teil in relativ hoher Dichte. Es wurden außerdem 132 Kulturen von Proben von 111 Patienten angelegt. 56 dieser Kulturen (42,4%) zeigten Wachstum von Mykobakterien. 44 Isolate von 36 Patienten konnten durch Anwendung von Gensonden dem *M. tuberculosis*-Komplex zugeordnet werden. Sechs Isolate entsprachen atypischen Mykobakterien, drei einer Mischung mehrerer atypischer Mykobakterien und weitere drei waren mit nicht mykobakteriellen Keimen kontaminiert. In der biochemischen und molekularbiologischen Differenzierung konnten alle 44 Isolate aus dem *M. tuberculosis*-Komplex als *M. tuberculosis* identifiziert werden. Anschließend wurde auf festen und flüssigen Nährböden die Resistenz der *M. tuberculosis*-Isolate gegen Erst- und Zweitrang-Medikamente bestimmt. Hierbei zeigte sich bei acht (22,2%, 95% Konfidenzintervall 8,3-36,1%) der 36 Patientenisolate eine Resistenz gegen mindestens ein Medikament der ersten-Wahl und bei vier (11,1%, 95% Konfidenzintervall 0,6-21,6%) eine Multiresistenz. Insgesamt konnten gegen alle Erstang-Medikamente Resistenzen festgestellt werden. Am häufigsten war die Resistenz gegen Isoniazid (16,7%) und gegen Rifampicin (13,9%). Bei einem Isolat zeigte sich eine Resistenz gegen alle vier Erstang-Medikamente und bei drei Isolaten gegen jeweils drei Medikamente der ersten Wahl. Diese Daten legen, im internationalen Vergleich, relativ hohe Resistenzraten von *M. tuberculosis*-Stämmen in Guyana nahe.

Die Ergebnisse wurden außerdem hinsichtlich der anamnestischen Daten zur früheren Einnahme von Tuberkulostatika und weiterer möglicher Risikofaktoren für das Auftreten multiresistenter Isolate (Minenarbeit, Tuberkulose in der Familie oder Umgebung, Gefängnisaufenthalt, niedrige soziale Stellung und männliches Geschlecht) analysiert. Während 25 der 36 Patienten zuvor keine tuberkulostatischen Medikamente eingenommen hatten, hatten elf bereits einen oder mehrere Therapien ohne Erfolg abgeschlossen. Das Auftreten einer Resistenz bzw. einer Multiresistenz war statistisch signifikant mit der vorherigen Einnahme tuberkulostatischer Medikamente assoziiert ($p=0,04$ bzw. $p=0,044$). Außerdem bestand eine signifikante Assoziation mit der Altersgruppe der 30- bis 39-Jährigen ($p=0,04$).

Ein Grund für die wahrscheinlich hohe Prävalenz resistenter Tuberkuloseerreger in Guyana könnte in der mangelhaften Umsetzung des DOTS-Programms in diesem Land im Jahr 2001 liegen. So erfolgte nur unregelmäßig eine direkt überwachte Medikamenteneinnahme, und auch weitere primäre Ziele des DOTS-Programms, vor allem in der Fallfindung und Heilung Neuerkrankter, wurden nicht erfüllt. Für eine Verbesserung der Situation wäre eine konsequentere Umsetzung der Diagnostik- und Therapierichtlinien von DOTS, der weitere Ausbau des Gesundheitsnetzwerkes und die Etablierung eines Referenzlabors für weiterführenden Untersuchungen und zur Therapiesteuerung erforderlich. Erste Schritte in diese Richtung wurden in den letzten Jahren bereits umgesetzt.

6 Literatur

- Aerts D, Jobim R. The epidemiological profile of tuberculosis in southern Brazil in times of AIDS. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2004** Jun;8(6):785-91.
- Allos BM, Genshelmer KF, Bloch AB, et al. Management of an outbreak of tuberculosis in a small community. *Ann Intern Med.* **1996** Jul 15;125(2):114-7.
- ATS & CDC (American Thoracic Society and Centers of Disease Control). Treatment of Tuberculosis and tuberculosis Infection in adults and children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1994**, 149: 1359
- Auswärtiges Amt. Länderinformationen zu Guayana. Berlin: Auswärtiges Amt; **2007** (Accessed 05.01. 2007 at <http://www.auswaertiges-Amt.de/diplo/de/Laenderinformationen/Guyana.html>)
- Bayer R, Wilkinson D. Directly observed therapy for tuberculosis: history of an idea. *Lancet.* **1995** Jun 17;345(8964):1545-8.
- Bishai WR, Graham NM, Harrington S, et al. Molecular and geographic patterns of tuberculosis transmission after 15 years of directly observed therapy. *JAMA.* **1998** Nov 18;280(19):1679-84.
- Blank L. Global DOTS expansion plan. Geneva, Switzerland: World Health Organization; **2001**: WHO CDS STB 2001.11. (Accessed 05.01.2007 at http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_STB_2001.11.pdf)
- Barry R. Bloom and Christopher J. L. Murray. Tuberculosis: Commentary on a Reemergent Killer. *Science* 21 August **1992**: Vol. 257. no. 5073, pp. 1055 - 1064
- Bucher HC, Griffith LE, Guyatt GH, et al. Isoniazid prophylaxis for tuberculosis in HIV infection: a meta-analysis of randomized controlled trials. *AIDS.* **1999** Mar 11;13(4):501-7.
- Campos PE, Suarez PG, Sanchez J, et al. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in HIV-infected persons, Peru. *Emerg Infect Dis.* **2003** Dec;9(12):1571-8.
- CSIH (Canadian Society for International Health). Informal Summary of the Project's Contributions to the Guyanese National TB Programme, April **2005**. (Accessed 05.06.2009 at <http://www.csih.org/what/guyana/activities/TBsummary0405.html>)
- Cantwell MF, Binkin NJ. Tuberculosis in sub-Saharan Africa: a regional assessment of the impact of the human immunodeficiency virus and National Tuberculosis Control Program quality. *Tuber Lung Dis.* **1996** Jun;77(3):220-5.

- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Initial Therapy of tuberculosis in the era of multidrug resistance. Recommendations of the Advisory Council for the Elimination of tuberculosis. *M.M.W.R.* **1993**; 42 (RR-7): 1
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Primary multidrug-resistant tuberculosis-Ivanovo Oblast, Russia, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **1999** Aug 6;48(30):661-4.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with Extensive Resistance to Second-Line Drugs Worldwide, 2000-2004; *MMWR* **2006** (a)/ 55(11);301-305
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Notice to readers: Revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **2006** (b);55:1176.
- CIA (Central Intelligence Agency). The World Factbook: Guyana. USA, Central Intelligence Agency; 2007 (Accessed 05.01.2007 at <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/gy.html>)
- Chaulk CP, Moore-Rice K, Rizzo R, et al. Eleven years of community-based directly observed therapy for tuberculosis. *JAMA.* **1995** Sep 27;274(12):945-51.
- Chaulk CP, Kazandjian VA. Directly observed therapy for treatment completion of pulmonary tuberculosis: Consensus Statement of the Public Health Tuberculosis Guidelines Panel. *JAMA.* **1998** Mar 25;279(12):943-8.
- Chavez Pachas AM, Blank R, Smith Fawzi MC, et al. Identifying early treatment failure on category I therapy for pulmonary tuberculosis in Lima Ciudad, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis* **2004** Jan;8(1):52-8.
- Churchyard GJ, Corbett EL, Kleinschmidt I, et al. Drug-resistant tuberculosis in South African gold miners: incidence and associated factors. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2000** May;4(5):433-40.
- China Tuberculosis Control (CTC) Collaboration. Results of directly observed short-course chemotherapy in 112,842 Chinese patients with smear-positive tuberculosis. *Lancet.* **1996** Feb 10;347(8998):358-62.
- Clark CM, Li J, Driver CR, Munsiff SS. Risk factors for drug-resistant tuberculosis among non-US-born persons in New York City. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2005** Sep;9(9):964-9.
- Coninx R, Mathieu C, Debaker M, et al. First-Line tuberculosis therapy and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in prisons. *Lancet* **1999**; 353:969-73.

- Corbett EL, Watt CJ, Walker N, et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med.* **2003** May 12;163(9):1009-21.
- Craft DW, Jones MC, Blanchet CN, et al. Value of examining three acid-fast bacillus sputum smears for removal of patients suspected of having tuberculosis from the "airborne precautions" category. *J Clin Microbiol.* **2000** Nov;38(11):4285-7.
- Crampin AC, Floyd S, Mwaungulu F, et al. Comparison of two versus three smears in identifying culture-positive tuberculosis patients in a rural African setting with high HIV prevalence. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2001** Nov;5(11):994-9.
- Daley CL, Small PM, Schechter GF, et al. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *N Engl J Med.* **1992** Jan 23;326(4):231-5.
- Davies GR, Pillay M, Sturm AW, et al. Emergence of multidrug-resistant tuberculosis in a community-based directly observed treatment programme in rural South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis.* **1999** Sep;3(9):799-804.
- De Cock KM, Chaisson RE. Will DOTS do it? A reappraisal of tuberculosis control in countries with high rates of HIV infection. *Int J Tuberc Lung Dis.* **1999** Jun;3(6):457-65.
- De Kantor IN, Latini O, Barrera L. Resistance and multiresistance to antitubercular drugs in Argentina and in other Latin American countries. *Medicina (Bs Aires).* **1998**;58(2):202-8.
- De Melo FA, Afiune JB, Ide Neto J, et al. Epidemiological features of multidrug-resistant tuberculosis in a reference service in São Paulo city. *Rev Soc Bras Med Trop.* **2003** Jan-Feb;36(1):27-34. Epub 2003 Apr 22.
- Drobniewski F. Tuberculosis in prisons-forgotten plague. *Lancet.* **1995** Oct 7;346(8980):948-9.
- Dye C, Garnett GP, Sleeman K, et al. Prospects for worldwide tuberculosis control under the WHO DOTS strategy. Directly observed short-course therapy. *Lancet.* **1998** Dec 12;352(9144):1886-91.
- Dye C, Williams BG. Criteria for the control of drug-resistant tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000** Jul 5;97(14):8180-5.
- Dye C, Williams BG, Espinal M, et al. Erasing the World's slow stain: strategies to beat multi drug-resistant tuberculosis. *Science.* **2002**;295:2042-6.
- Enarson DA. Principles of IUATLD collaborative tuberculosis programmes. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis.* **1991** Dec;66(4):195-200.
- Espinal MA, Dye C, Raviglione M, et al. Rational 'DOTS plus' for the control of MDR-TB. *Int J Tuberc Lung Dis.* **1999** Jul;3(7):561-3.

- Espinal MA, Kim SJ, Suarez PG, et al. Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis: treatment outcomes in 6 countries. *JAMA*. **2000** May 17;283(19):2537-45.
- Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, et al. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *N Engl J Med*. **2001** Apr 26;344(17):1294-303.
- Farmer PE, Bayona J, Becerra M, et al. Poverty, inequality, and drug resistance: meeting community needs. In: Proceedings of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease North American Region Conference, Chicago, February 27–March 2, 1997:88-101.
- Farmer P, Kim JY. Community based approaches to the control of multidrug resistant tuberculosis: introducing "DOTS-plus". *BMJ*. **1998** Sep 5;317(7159):671-4.
- Farmer PE, Kim JY, Mitnick C, et al. Responding to outbreaks of MDRTB: introducing "DOTS-Plus." In: Reichman LB, Hershfield ES, eds. Tuberculosis: a comprehensive international approach. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2000:447-69.
- Farmer PE, Walton DA, Becerra MC. International tuberculosis control in the 21st century. In: Friedman LN, ed. Tuberculosis: current concepts and treatment. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2000:475-96.
- Faustini A, Hall AJ, Perucci CA. Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review. *Thorax*. **2006** Feb;61(2):158-63.
- Ferdinand S, Sola C, Verdol B, et al. Molecular characterization and drug resistance patterns of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in an AIDS counseling center in Port-au-Prince, Haiti: a 1-year study. *J Clin Microbiol*. **2003** Feb;41(2):694-702.
- Ferlinz R. Guidelines for chemotherapy of tuberculosis. German Central Committee for the Control of Tuberculosis. *Pneumologie*. **1995** Mar;49(3):217-25.
- Fox W, Mitchison DA. Short-course chemotherapy for pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. **1975** Mar;111(3):325-53.
- Frieden TR, Sbarbaro JA. Promoting adherence to treatment for tuberculosis: the importance of direct observation. *World Hosp Health Serv*. **2007**;43(2):30-3.
- Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, et al. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes. *JAMA*. **1996** Oct 16;276(15):1229-35.
- García-García ML, Ponce de León A, Jiménez-Corona ME, et al. Clinical consequences and transmissibility of drug-resistant tuberculosis in southern Mexico. *Arch Intern Med*. **2000** Mar 13;160(5):630-6.
- Garner P, Volmink J. Families help cure tuberculosis. *Lancet*. **2006** Mar 18;367(9514):878-9.

- Girardi E, Raviglione MC, Antonucci G, Godfrey-Faussett P, Ippolito G. Impact of the HIV epidemic on the spread of other diseases: the case of tuberculosis. *AIDS*. **2000**;14 Suppl 3:S47-56.
- Goble M, Iseman MD, Madsen LA, et al. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. *N Engl J Med*. **1993** Feb 25;328(8):527-32.
- Gordin F, Slutkin G. The validity of acid-fast smears in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Arch Pathol Lab Med*. **1990** Oct;114(10):1025-7.
- Granich RM, Oh P, Lewis B, et al. Multidrug resistance among persons with tuberculosis in California, 1994-2003. *JAMA*. **2005** Jun 8;293(22):2732-9.
- Grant AD, Djomand G, De Cock KM. Natural history and spectrum of disease in adults with HIV/AIDS in Africa. *AIDS*. **1997**;11 Suppl B:S43-54.
- Gupta R, Raviglione MC, Espinal MA. Should tuberculosis programmes invest in second-line treatments for multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)? *Int J Tuberc Lung Dis*. **2001** Dec;5(12):1078-9.
- Guwatudde D, Nakakeeto M, Jones-Lopez EC, et al. Tuberculosis in household contacts of infectious cases in Kampala, Uganda. *Am J Epidemiol*. **2003** Nov 1;158(9):887-98.
- Hadiarto M, Tjandra YA, Hudoyo A. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis in Indonesia. *Chemotherapy*. **1996**;42 Suppl 3:24-9.
- Heymann SJ. Modelling the efficacy of prophylactic and curative therapies for preventing the spread of tuberculosis in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. **1993** Jul-Aug;87(4):406-11.
- International Union against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD). Management of tuberculosis: a guide for low income countries, 5th edition. **2000**. (Accessed 07.09.2005 at http://www.iuatld.org/pdf/en/guides_publications/management_of_tb.pdf)
- Isaac-Renton JL, Puselja BB, Allen EA, et al. Microscopic evaluation of sputum specimens submitted for Mycobacterium tuberculosis culture. *Am J Clin Pathol*. **1985** Sep;84(3):361-3.
- Iseman MD, Cohn DL, Sbarbaro JA. Directly observed treatment of tuberculosis. We can't afford not to try it. *N Engl J Med*. **1993** Feb 25;328(8):576-8.
- Jancik E, Zelenka M, Tousek J, et al. Chemotherapy for Patients with Cultures resistant to Streptomycin, Isoniacid and PAS. *Tubercle*. **1963** Dec;44:443-5.
- Kenyon TA, Mwasekaga MJ, Huebner R, et al. Low levels of drug resistance amidst rapidly increasing tuberculosis and human immunodeficiency virus co-epidemics in Botswana. *Int J Tuberc Lung Dis*. **1999** Jan;3(1):4-11.

- Kim TC, Blackman RS, Heatwole KM, et al. Acid-fast bacilli in sputum smears of patients with pulmonary tuberculosis. Prevalence and significance of negative smears pretreatment and positive smears post-treatment. *Am Rev Respir Dis*. **1984** Feb;129(2):264-8.
- Kim HJ, Hong YP, Kim SJ, et al. Ambulatory treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis patients at a chest clinic. *Int J Tuberc Lung Dis*. **2001** Dec;5(12):1129-36.
- Kimerling ME, Kluge H, Vezhnina N, et al. Inadequacy of the current WHO re-treatment regimen in a central Siberian prison: treatment failure and MDR-TB. *Int J Tuberc Lung Dis*. **1999** May;3(5):451-3.
- Laserson KF, Osorio L, Sheppard JD, et al. Clinical and programmatic mismanagement rather than community outbreak as the cause of chronic, drug-resistant tuberculosis in Buenaventura, Colombia, 1998. *Int J Tuberc Lung Dis*. **2000** Jul;4(7):673-83.
- Mahler D. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland, 1997. (Accessed 09.7.2006 at http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_TB_2003.313_eng.pdf)
- McDonald LC, Archibald LK, Rheapumikankit S, et al. Unrecognised Mycobacterium tuberculosis bacteraemia among hospital inpatients in less developed countries. *Lancet*. **1999** Oct 2;354(9185):1159-63.
- Mertz BL, Douce RW, Brito N. Anti-tuberculosis drug resistance in two clinics in Ecuador. *Int J Tuberc Lung Dis*. **2000** Feb;4(2):115-7.
- Ministerio de Salud, Peru. Annual TB Report 2001. Lima, Peru: Ministerio de Salud; **2001**. (Accessed 05.08.2007 at http://www.minsa.gob.pe/portada/doc_consultas.htm)
- Ministry of Health (MOH), Guyana. Statistical Bulletin 2004. Georgetown, Guyana: Guyana Ministry of Health; **2005**. (Accessed 14.02.2006 at http://www.health.gov.gy/pub/moh_stats_bulletin_04.pdf)
- Mitnick C, Bayona J, Palacios E, et al. Community-based therapy for multidrug-resistant tuberculosis in Lima, Peru. *N Engl J Med*. **2003** Jan 9;348(2):119-28.
- Mohar A, Romo J, Salido F, Jessurun J, et al. The spectrum of clinical and pathological manifestations of AIDS in a consecutive series of autopsied patients in Mexico. *AIDS*. **1992** May;6(5):467-73.
- Molina Serpa I, López Pardo C, Alonso Hernández R. An ecologic study on tuberculosis in a Cuban municipality. *Cad Saude Publica*. **2003** Sep-Oct;19(5):1305-12. Epub 2003 Dec 2.
- Moore DA, Evans CA, Gilman RH, et al. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med*. **2006** Oct 12;355(15):1539-50.

- Moss AR, Alland D, Telzak E, et al. A city-wide outbreak of a multiple-drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* in New York. *Int J Tuberc Lung Dis.* **1997** Apr;1(2):115-21.
- Mukherjee JS, Rich ML, Socci AR, et al. Programmes and principles in treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Lancet.* **2004** Feb 7;363(9407):474-81.
- Mulenga EM, Miller HB, Sinkala T, et al. Silicosis and tuberculosis in Zambian miners. *Int J Occup Environ Health.* **2005** Jul-Sep;11(3):259-62.
- Myrvik QN, Leake ES, Groen MB. Mechanisms toxicity of tobercle bacilli im macrophages. in: Bendinelli, M., H. Friedmann (eds.): *Mycobacterium tuberculosis: interactions with the Immune System.* Plenum Press. New York, **1988**, 305-325.
- Narita M, Alonso P, Lauzardo M, et al. Treatment experience of multidrug-resistant tuberculosis in Florida, 1994-1997. *Chest.* **2001** Aug;120(2):343-8.
- Natal S, Valente JG, Sánchez AR, et al. Isoniazid and rifampicin resistance and prior treatment for tuberculosis. *Cad Saude Publica.* **2003** Sep-Oct;19(5):1277-81.
- Odhiambo JA, Borgdorff MW, Kiambih FM, et al. Tuberculosis and the HIV epidemic: increasing annual risk of tuberculous infection in Kenya, 1986-1996. *Am J Public Health.* **1999** Jul;89(7):1078-82.
- Orme IM, Collins FM. Adoptive protection of the *Mycobacterium tuberculosis*-infected lung. Dissociation between cells that passively transfer protective immunity and those that transfer delayed-type hypersensitivity to tuberculin. *Cell Immunol.* **1984** Mar;84(1):113-20.
- Orme IM, Andersen P, Boom WH. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* **1993** Jun;167(6):1481-97.
- Palacios E, Guerra D, Llaro K, et al. The role of the nurse in the community-based treatment of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). *Int J Tuberc Lung Dis.* **2003** Apr;7(4):343-6.
- Park SK, Kim CT, Song SD. Outcome of chemotherapy in 107 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. *Int J Tuberc Lung Dis.* **1998** Nov;2(11):877-84.
- Pelly T, Moore DA, Gilman R, et al. Recent tuberculosis advances in Latin America. *Curr Opin Infect Dis.* **2004** Oct;17(5):397-403.
- Portaels F, Rigouts L, Bastian I. Addressing multidrug-resistant tuberculosis in penitentiary hospitals and in the general population of the former Soviet Union. *Int J Tuberc Lung Dis.* **1999** Jul;3(7):582-8.

- Rana FS, Hawken MP, Mwachari C, et al. Autopsy study of HIV-1-positive and HIV-1-negative adult medical patients in Nairobi, Kenya. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **2000** May 1;24(1):23-9.
- Raviglione MC, Snider DE Jr, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA.* **1995** Jan 18;273(3):220-6.
- Raviglione MC, Dye C, Schmidt S, et al. Assessment of worldwide tuberculosis control. *Lancet.* **1997 (a)** Aug 30;350(9078):624-9.
- Raviglione MC, Harries AD, Msiska R, et al. Tuberculosis and HIV: current status in Africa. *AIDS.* **1997 (b)**;11 Suppl B:S115-23.
- Raviglione MC, Pio A. Evolution of WHO policies for tuberculosis control, 1948-2001. *Lancet.* **2002** Mar 2;359(9308):775-80.
- Richter E, Weizenegger M, Rüschi-Gerdes S, et al. Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* **2003** Jun;41(6):2672-5.
- Ridzon R, Kent JH, Valway S, et al. Outbreak of drug-resistant tuberculosis with second-generation transmission in a high school in California. *J Pediatr.* **1997** Dec;131(6):863-8.
- Ritacco V, Di Lonardo M, Reniero A, et al. Nosocomial spread of human immunodeficiency virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. *J Infect Dis.* **1997** Sep;176(3):637-42.
- Rom WN, Zhang Y. The rising tide of tuberculosis and the human host response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Lab Clin Med.* **1993** Jun;121(6):737-41.
- Roth A, Reischl U, Streubel A, et al. Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *J Clin Microbiol.* **2000** Mar;38(3):1094-104.
- Ruddy M, Balabanova Y, Graham C, et al. Rates of drug resistance and risk factor analysis in civilian and prison patients with tuberculosis in Samara Region, Russia. *Thorax.* **2005** Feb;60(2):130-5.
- Santo AH, Pinheiro CE, Jordani MS. Multiple-causes-of-death related to tuberculosis in the State of São Paulo, Brazil, 1998. *Rev Saude Publica.* **2003** Dec;37(6):714-21.
- Schaberg T, Forssbohm M, Hauer B, et al. Guidelines for drug treatment of tuberculosis in adults and childhood. *Pneumologie.* **2001** Nov;55(11):494-511.
- Selig L, Belo MT, Teixeira EG, et al. The study of tuberculosis-attributed deaths as a tool for disease control planning in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2003** Sep;7(9):855-9.

- Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* **1989** Mar 2;320(9):545-50.
- Shafer RW, Singh SP, Larkin C, et al. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in an immunocompetent patient. *Tuber Lung Dis.* **1995** Dec;76(6):575-7.
- Stern V. Problems in prisons worldwide, with a particular focus on Russia. *Ann N Y Acad Sci.* **2001** Dec;953:113-9.
- Styblo K. Recent advances in epidemiological research in tuberculosis. *Adv Tuberc Res.* **1980**;20:1-63.
- Suárez PG, Watt CJ, Alarcón E, et al. The dynamics of tuberculosis in response to 10 years of intensive control effort in Peru. *J Infect Dis.* **2001** Aug 15;184(4):473-8.
- Suárez PG, Floyd K, Portocarrero J, et al. Feasibility and cost-effectiveness of standardised second-line drug treatment for chronic tuberculosis patients: a national cohort study in Peru. *Lancet.* **2002** Jun 8;359(9322):1980-9.
- Suo J, Yu MC, Lee CN, et al. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis in Taiwan. *Chemotherapy.* **1996**;42 Suppl 3:20-3.
- Sutherland I. Recent studies in the epidemiology of tuberculosis, based on the risk of being infected with tubercle bacilli. *Adv Tuberc Res.* **1976**;19:1-63.
- Tahaoğlu K, Törün T, Sevim T, et al. The treatment of multidrug-resistant tuberculosis in Turkey. *N Engl J Med.* **2001** Jul 19;345(3):170-4.
- Teixeira L, Perkins MD, Johnson JL, et al. Infection and disease among household contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2001** Apr;5(4):321-8.
- Telzak EE, Chirgwin KD, Nelson ET, et al. Predictors for multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected patients and response to specific drug regimens. *Int J Tuberc Lung Dis.* **1999** Apr;3(4):337-43.
- Thongcharoen P, Vitayasai P, Vitayasai V, et al. Opportunistic infections in AIDS/HIV infected patients in Thailand. *Thai AIDS J.* **1992**;4:117-122.
- Tindó H, Cesar Cavalcante S, Werneck-Barroso E. Gender differences in tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2004** Mar;8(3):388-90.
- Timperi R, Han LL, Sloutsky A, et al. Drug resistance profiles of *Mycobacterium tuberculosis* isolates: five years' experience and insight into treatment strategies for MDR-TB in Lima, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2005** Feb;9(2):175-80.

- Ulukanligil M, Aslan G, Tasçi S. A comparative study on the different staining methods and number of specimens for the detection of acid fast bacilli. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **2000** Nov-Dec;95(6):855-8.
- UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS) 2004 Report on the global AIDS epidemic: Guyana. Geneva, Swizerland, **2005**. (Accessed 10.7.2006 at http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2005/2005_epiupdate_en.pdf)
- Urbanczik R. Present position of microscopy and of culture in diagnostic mycobacteriology. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*. **1985** Aug;260(1):81-7.
- Validum L. Malaria in Guyana. *Guyana Health Information Digest* **2000**;2:4-8.
- Vásquez-Campos L, Asencios-Solis L, Leo-Hurtado E, et al. Drug resistance trends among previously treated tuberculosis patients in a national registry in Peru, 1994-2001. *Int J Tuberc Lung Dis*. **2004** Apr;8(4):465-72.
- Vynnycky E, Fine PE. The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. *Epidemiol Infect*. **1997** Oct;119(2):183-201.
- Weis SE, Slocum PC, Blais FX, et al. The effect of directly observed therapy on the rates of drug resistance and relapse in tuberculosis. *N Engl J Med*. **1994** Apr 28;330(17):1179-84.
- Weyer K. Standardized management of MDR-TB in South Africa. Session on treatment of TB: new data from clinical trials and demonstratin projects. Seattle, WA: American Thoracic Society 99th International Conference, **2003**
- WHO (World Health Organization). Tuberculosis Programme Framework for effective Tuberculosis Control. Geneva, Switzerland: World Health Organization; **1994**: WHO TB 94.179. (Accessed 04.05.2006 at http://whqlibdoc.who.int/hq/1994/WHO_TB_94.179.pdf)
- WHO (World Health Organization). Anti-tuberculosis drug-resistance in the world, Report from the WHO/IUALTD Global Project on Anti-tuberculosis Drug resistance Surveillance. Geneva, Switzerland: World Health Organization; **1997**: WHO/TB/97.229: 118-9. (Accessed 22.05.2006 at http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/WHO_TB_97.229.pdf)
- WHO (World Health Organization). What is DOTS? A guide to understanding the WHO-recommended TB control strategy known as DOTS. Geneva, Switzerland: World Health Organization; **1999**. WHO/CDS/CPC/TB/99.270 (Accessed 29.05.2003 at http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_CDS_CPC_TB_99.270.pdf)

- WHO (World Health Organization). Guidelines for establishing DOTS-PLUS pilot projects for the management of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Geneva, Switzerland: World Health Organization; **2000**. WHO/CDS/TB/2000.279 Accessed 15.8.2006 at http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_CDS_TB_2000.279.pdf)
- WHO (World Health Organization). Global tuberculosis control. WHO Report 2001. Geneva, Switzerland: World Health Organization; **2001**. WHO/CDS/TB/2001.287 (Accessed 11.05.2002 at <http://www.emro.who.int/stb/media/pdf/GTBR2001woannexes.pdf>)
- WHO (World Health Organization). DOTS-Plus and the Green Light Committee. Geneva, Switzerland: World Health Organization; **2000**. WHO/CDS/TB/2000.283 (Accessed 16.05.2005 at http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_CDS_TB_2000.283.pdf)
- WHO (World Health Organization). An Expanded DOTS framework for effective tuberculosis control. Geneva, Switzerland: World Health Organization; **2002**. WHO/CDS/TB/2002.297 (Accessed 29.05.2006 at http://www.who.int/tb/publications/expanded_dots_framework/en/index.htm)
- WHO (World Health Organization). Community Contribution to TB Care: Practice and Policy. Geneva, Switzerland: World Health Organization; **2003**. WHO/CDS/TB/2003.312 (Accessed 08.03.2006 at http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_TB_2003.312.pdf)
- WHO (World Health Organization). Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2003. Geneva, Switzerland: World Health Organization; **2003**. WHO/CDS/TB/2003.316 (Accessed 27.03.2004 at http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_TB_2003.316.pdf)
- WHO (World Health Organization). Anti-tuberculosis drug resistance in the world: third global report. WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1999-2002. Geneva, Switzerland: World Health Organization; **2004**. WHO/HTM/TB/2004.343 (Accessed 02.09.2005 at http://www.who.int/tb/publications/who_htm_tb_2004_343/en/)
- WHO (World Health Organization). Global Tuberculosis Control - Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2006. Geneva, Switzerland: World Health Organization; **2006**. / HTM/TB/2006.362 (Accessed 13.11.2006 at http://www.who.int/tb/publications/global_report/2006/en/index.html)
- WHO (World Health Organization). Global Tuberculosis Control - Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2007. Geneva, Switzerland: World Health Organization; **2007**.

- WHO/HTM/TB/2007.376 (Accessed 03.07.2007 at http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007/en/index.html)
- WHO (World Health Organization). The Global MDR-TB and XDR-TB Response Plan 2007-2008. Geneva, Switzerland: World Health Organization; **2007**. WHO/HTM/TB/2007.387 (Accessed 27.03.2008 at http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_HTM_TB_2007.387_eng.pdf)
- WHO (World Health Organization). Global Tuberculosis Control - Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2009. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009. WHO/HTM/TB/2009.411(Accessed 27.07.2009 at http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html)
- Yassin MA, Cuevas LE. How many sputum smears are necessary for case finding in pulmonary tuberculosis? Trop Med Int Health. **2003** Oct;8(10):927-32.
- Yew WW, Chan CK, Chau CH, et al. Outcomes of patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis treated with ofloxacin/levofloxacin-containing regimens. Chest. **2000** Mar;117(3):744-51.
- Zirski M. Treatment of Patients with Cultures resistant to the primary Anti-Tuberculosis Drugs. Tubercle. **1964** Jun;45:96-100.
- Zignol M, Hosseini MS, Wright A, et al. Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis. J Infect Dis. **2006** Aug 15;194(4):479-85. Epub 2006 Jul 12.

Abkürzungen

Aqua dest. - Aqua destillata

Aqua tridest - .Aqua tridestillata

BCG - Bacille Calmette-Guérin

BSH - Brenzschleimsäurehydrazid

BSP - Bruttosozialprodukt

CDC - Centers of Disease Controll

CM - Capreomycin

CSE - Cycloserin

CSIH - Canadian Society for International Health

DNA - Desoxyribonukleinsäure

DOTS - directly-observed treatment, short course

EMB - Ethambutol

HIV - Humane Immunodeficiency Virus

IMH - Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité, Campus Benjamin Franklin

INH - Isoniazid

KG - Körpergewicht

MDR - multi-drug-resistance

MODS - Microscopic Observation Drug Susceptibility

NALC - N-Acetyl-L-Cystein

PACT - Polymyxin, Amphotericin, Trimethoprim, Azlocillin, Nalidixinsäure

PAS - Paraaminosalicylsäure

PCR - Polymerase-Kettenreaktion

PTH - Prothionamid

PZA - Pyrazinamid

RFLP - Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

RLU - relative Lichteinheiten

RMP - Rifampicin

RNA - Ribonukleinsäure

SM - Streptomycin

TB - Tuberkulose

WHO - Weltgesundheitsorganisation

XDR - extensively drug resistant

ZNS - Zentrales Nervensystem

Danksagung

Privat Dozent Doktor Ingo Günther danke ich dafür, dass er die wissenschaftliche Kooperation zwischen Berlin und Guyana ins Leben gerufen hat sowie für die stets hilfsbereite Unterstützung bei meiner Arbeit in Guyana.

Dem Verein der Freunde und Förderer des UKBF e.V. danke ich für den gewährten Reisekostenzuschuss.

Den Patienten sowie den Mitarbeitern des Ministry of Health Guyanas und der Chest Clinic in Georgetown danke ich dafür, dass sie mir ermöglicht habe diese Arbeit durchzuführen.

Meinen Freunden, meiner Mutter und meinem Vater danke ich für ihre Unterstützung, und für die Vermittlung der Grundlagen des wissenschaftlichen Denkens und Schreibens.

Insbesondere möchte ich Professor Ralf Ignatius danken, für die Überlassung des Themas, seine Geduld, seine wertvolle Kritik und die freundschaftliche Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Lebenslauf

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

Veröffentlichung

Menner N, Günther I, Orawa H, Roth A, Rambajan I, Wagner J, Hahn H, Persaud S, Ignatius R. High frequency of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Georgetown, Guyana. Trop Med Int Health. 2005 Dec;10(12):1215-8.

Erklärung

„Ich, Nikolai Menner erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Hohe Rate an multiresistenten Mycobacterium tuberculosis-Isolaten in Georgetown, Guyana 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 12.10.2009

Nikolai Menner