

1 Einleitung

Eine pulmonale Infektion mit „nichttuberkulösen“ Mykobakterien („atypischen“, „ubiquitären“, *Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis* – MOTT) ist eine seltene Erkrankung bei immunkompetenten Patienten. In den USA liegt die Inzidenz bei 1,8 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr [128], in der Schweiz (Kanton Zürich) bei 0,4 bis 0,9 [30]. Die Inzidenz in Deutschland ist nicht erfasst. Häufige Erreger sind *M. avium* complex, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. malmoense*; zu den seltenen Erregern zählen *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. celatum*, *M. asiaticum*, *M. shimodei*, *M. haemophilum*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* und *M. abscessus* u. a. Betroffen sind in der Regel Patienten ab dem 45. Lebensjahr mit prädisponierenden pulmonalen Vorerkrankungen. Die klinische Symptomatik entspricht der der Tuberkulose in abgemilderter Form: über mehrere Wochen anhaltender Husten mit Auswurf, subfebrile Temperaturen, Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust. Röntgenologisch werden Rundherde und kleinherdige Verschattungen überwiegend in den Lungenoberlappen nachgewiesen. Für die Diagnosesicherung ist der kulturelle Nachweis der „nichttuberkulösen“ Mykobakterien im Sputum oder Bronchialsekret notwendig. Die Identifizierung der Spezies und die Empfindlichkeitsprüfung sind wesentliche Voraussetzungen für eine gezielte Behandlung. Für die Therapie stehen die klassischen Antituberkulotika Rifampicin, Ethambutol, Isoniazid und Prothionamid, die Makrolide, wie Clarithromycin und Azithromycin, sowie die Chinolone wie Ciprofloxacin, Sparfloxacin und Moxifloxacin zur Verfügung. Wie bei der Tuberkulose versucht man, durch den Einsatz von Kombinationstherapien Resistenzenentwicklungen zu vermeiden und additive und synergistische Effekte zu nutzen. Bei Therapieversagen besteht bei lokalisierten Infektionen die Alternative eines chirurgischen Vorgehens.

Mehrere Faktoren erschweren die Behandlung der „nichttuberkulösen“ pulmonalen Mykobakteriose: die Multiresistenz einzelner Spezies, die Chronizität der Erkrankung, die Vorschädigung des Lungengewebes, die unzureichende Diffusion der antimykobakteriell wirksamen Substanzen in die infizierten Lungenabschnitte, die Unverträglichkeit einzelner Medikamente und die Compliance der Patienten bei ein- bis zweijähriger Behandlungsdauer. Therapieversagen und Rezidive werden bei bis zu 30% der behandelten Patienten beschrieben [22].

Ein besonderes Problem stellt die Vorhersagbarkeit der klinischen Wirksamkeit der einzelnen Substanzen und ihrer Kombinationen auf die einzelnen Mykobakterienspezies auf der Grundlage der Ergebnisse der *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfung dar. Während bei der Tuberkulose bei *In-vitro*-Empfindlichkeit des Erregers für die untersuchten Antituberkulotika, kontinuierlicher Medikamenteneinnahme und ausreichender Behandlungsdauer in der Regel ein Therapieerfolg erwartet werden kann, ist bei den „nichttuberkulösen“ Mykobakterien für viele der eingesetzten Substanzen die Korrelation zwischen den Ergebnissen der *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfung und den Behandlungsergebnissen nicht sicher. Die Diskussion um die wirksamste Kombination für die einzelnen Spezies ist daher noch längst nicht abgeschlossen.

Aufgrund der unterschiedlichen Resistenzspektren der einzelnen Mykobakterienspezies und der verschiedenen Wirkungsmechanismen der Medikamente muss diese Diskussion allerdings für die verschiedenen Spezies und Substanzen differenziert geführt werden. So kann z. B. bei der Therapie von pulmonalen Infektionen durch *M. avium* complex bei Nachweis von *In-vitro*-Empfindlichkeit für Clarithromycin mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Wirksamkeit dieser Substanz *in vivo* ausgegangen werden, bei *In-vitro*-Resistenz ist keine Wirkung zu

erwarten [126]. Ethambutol hingegen ist bei der Behandlung von *M.-avium*-Infektionen in Kombinationen mit Clarithromycin und Rifamycinen auch bei *In-vitro*-Resistenz der Monosubstanz *in vivo* in Kombinationen wirksam, da es unabhängig von der eigenen bakteriostatischen Wirkung durch Zellwandsynthesehemmung das Eindringen der kombinierten antimykobakteriell wirksamen Substanzen in die Mykobakterien begünstigt [31]. Während die prädiktive Bedeutung der *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfung für Rifampicin bei *M.-avium*-Infektionen unsicher ist [111], kann bei *M.-kansasii*-Infektionen bei Nachweis von *In-vitro*-Empfindlichkeit mit einer hohen Wirksamkeit von Rifampicin *in vivo* gerechnet werden [127]. Für die Rifamycine und Chinolone konnte bei verschiedenen Spezies gezeigt werden, dass sie in Kombinationen wirksam sein können, auch wenn bei der *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfung der Einzelsubstanzen Resistenz nachgewiesen wird [64; 78; 118].

Die klinische Relevanz der *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfung gilt als gesichert für Makrolide bei *M.-avium*-Infektionen und für Rifampicin bei *M.-kansasii*-Infektionen. Auch für Infektionen durch einzelne andere, aber nicht alle Spezies aus der Gruppe der langsam wachsenden Spezies (*M. malmoense*, *M. simiae*, *M. xenopi*, *M. szulgai* und *M. haemophilum*) konnte die prädiktive Bedeutung der *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfung für Makrolide, Ethambutol und Rifampicin gezeigt werden. Jedoch gerade für die schwerbehandelbaren Infektionen durch *M. avium* complex, *M. simiae* und *M. gordonae* ist die Vorhersagbarkeit des Behandlungsergebnisses auf der Grundlage der *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfung für die Rifamycine, Chinolone und die Substanzen der 2. Wahl unsicher [128].

Um den Vorhersagewert von *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfungen in Hinblick auf die klinische Wirksamkeit zu erhöhen, werden verschiedene Verfahren angewandt, die die Situation im infizierten Gewebe möglicherweise besser simulieren als die Empfindlichkeitsprüfung der Erreger gegenüber einzelnen Substanzen im Kulturmedium. So wird in Kombinationstestungen die synergistische, additive oder auch antagonistische Wirkung von Substanzkombinationen untersucht [14; 78]. Außerdem wurden Verfahren entwickelt, um in Kulturen von Makrophagen die intrazelluläre Wirkung von einzelnen Substanzen und Kombinationen auf die Erreger zu ermitteln – die extra- oder intrazelluläre Lagerung der „nichttuberkulösen“ Mykobakterien ist allerdings letztlich nicht sicher geklärt [86; 111]. Ein weiterer Ansatz ergibt sich aus Analogieschlüssen zu den Erkenntnissen, die sich für die meisten schnell wachsenden Bakterien durchgesetzt haben. So geht man auch bei den langsam wachsenden Bakterien davon aus, dass die klinische Wirksamkeit einer Substanz umso größer ist, je niedriger die minimale Hemmkonzentration (MHK) ausfällt und je höher die maximale Konzentration des Medikamentes (C_{max}) in dem voraussichtlich am meisten infizierten Kompartiment (Lunge oder Serum) ist. Heifets et al. [50] fanden bei disseminierten *M.-avium*-Infektionen bei AIDS-Patienten Hinweise dafür, dass für Clarithromycin bei niedrigeren MHKs eher mit einem Ansprechen gerechnet werden kann. Heginbothom konnte jedoch bei einer kleinen Fallzahl von Patienten mit pulmonalen „nichttuberkulösen“ Mykobakteriosen (*M. avium*, *M. xenopi*, *M. malmoense*) für die Substanzen Rifampicin, Ethambutol und Isoniazid keinen Zusammenhang zwischen der Höhe der minimalen Hemmkonzentrationen und Therapieversagen oder Rezidiven nachweisen [48]. Die genannten Verfahren sind keine Routine-Untersuchungen, sie werden nur bei speziellen Fragestellungen eingesetzt und in Studien auf ihre Relevanz für die klinische Praxis untersucht.

Die pulmologischen Fachgesellschaften der USA, American Thoracic Society (ATS) [128], und Großbritanniens, British Thoracic Society (BTS) [21], empfehlen derzeit aufgrund der Unklarheit über die prädiktive Bedeutung der *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfung bei vielen Substanzen für die meisten Spezies feste Therapiekombinationen, die sich in der Praxis bewährt haben. Diese gründen sich teils auf retrospektive, teils auf prospektive Studien mit relativ niedrigen Patientenzahlen [7; 8; 125]. Wegen der geringen Inzidenz der Erkrankung ist es außerordentlich schwierig, große randomisierte prospektive Untersuchungen durchzuführen. Die Empfehlungen der BTS für die Behandlung von pulmonalen Infektionen durch *M. avium*, *M. xenopi* und *M. malmoense* aus dem Jahr 2001 stützen sich allerdings auf die Ergebnisse einer multizentrischen, prospektiven, randomisierten Studie mit 223 Patienten, in der jedoch nur die Wirksamkeit der Substanzen Rifampicin, Ethambutol und Isoniazid untersucht wurde. Für die genannten Spezies und Substanzen wurde in dieser Untersuchung keine Korrelation zwischen den Ergebnissen der *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfung und den Behandlungsergebnissen gefunden [22]. Seitens der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie liegen keine Empfehlungen vor, und in den vergangenen 15 Jahren sind in Deutschland keine systematischen Auswertungen der Verläufe von pulmonalen Infektionen durch „nichttuberkulöse“ Mykobakterien durchgeführt worden.

Der klinische Nutzen von routinemäßig durchgeführten *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfungen bei „nichttuberkulösen“ Mykobakterien bleibt für viele Substanzen angesichts der geschilderten Unsicherheiten in Hinblick auf die Vorhersagbarkeit der Wirksamkeit *in vivo* umstritten. Beweise dafür oder dagegen im Sinne einer „evidence based medicine“ sind angesichts der geringen Inzidenz der Erkrankung und der oben genannten komplexen Faktoren, die den Krankheitsverlauf beeinflussen, nur schwer zu erbringen. Mit der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag zu der dargestellten Diskussion geliefert werden.

Da in der Lungenklinik Heckeshorn in Berlin-Zehlendorf bei allen klinisch relevanten pulmonalen Infektionen durch „nichttuberkulöse“ Mykobakterien *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfungen für die wichtigsten antimykobakteriell wirksamen Substanzen durchgeführt werden und die einzusetzenden Therapiekombinationen in enger Kooperation zwischen den Infektiologen und Mikrobiologen auf der Grundlage dieser Ergebnisse und der klinischen Determinanten der einzelnen Patienten ausgewählt werden, können die Krankheitsverläufe dieser Patienten in Hinblick auf die prädiktive Bedeutung der Empfindlichkeitsprüfung untersucht werden.

Es werden daher die Erfahrungen in der Therapie pulmonaler „nichttuberkulöser“ Mykobakteriosen, die im Zeitraum zwischen 1986 und 1998 in der Lungenklinik Heckeshorn diagnostiziert wurden, retrospektiv ausgewertet. Die Behandlungsergebnisse werden dargestellt und die Bedeutung der *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfung für die klinische Wirksamkeit einer Substanzkombination für die einzelnen Spezies und Substanzen differenziert diskutiert.

Trotz der schwierigen Beweislage soll herausgearbeitet werden, ob sich aufgrund unserer Untersuchungsergebnisse und vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur zumindest gut begründete Hinweise für den vermuteten Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfungen bei den verschiedenen „nichttuberkulösen“ Mykobakterienspezies und den Therapieerfolgen bzw. -versagen herstellen lassen.

2 Definitionen, Klinik, Diagnostik und Therapie

2.1 Eigenschaften und Stammbaum der „nichttuberkulösen“ Mykobakterien

Die Familie der Mycobacteriaceae besteht aus dem einzigen Genus Mycobacterium. Dazu gehören die sogenannten „Tuberkulosebakterien“ - *M. tuberculosis*, *M. africanum* und *M. bovis* -, die auch als *M. tuberculosis* complex bezeichnet werden sowie *M. leprae*, der Erreger der Lepra. Alle weitere Mykobakterien werden in der wissenschaftlichen Literatur unter dem Begriff „non-tuberculous“ mycobacteria (NTM), „nichttuberkulöse“ Mykobakterien, zusammengefasst. Im klinischen Alltag sind die ungenauen Sammelbezeichnungen „atypische“ oder „ubiquitäre“ Mykobakterien gebräuchlich. Mykobakterien sind gerade bis leicht gekrümmte, unbewegliche, aerobe Stäbchen von 0,2 - 0,6 x 1,0 - 10 µm Größe. Gemeinsames Merkmal der verschiedenen Spezies ist die Säurefestigkeit. Diese charakteristische Eigenschaft bezieht sich darauf, dass Mykobakterien im Unterschied zu den meisten Bakterien nach Anfärbung mit Karbolfuchsinlösung nach *Ziehl-Neelsen* durch ein 3%iges Salzsäure-Alkohol Gemisch nur schwer zu entfärben sind [72] [32]. Die Säurefestigkeit ist dem hohen Gehalt an Mykolsäuren, an langkettigen verzweigten Fettsäuren und anderen Zellwandlipiden zuzuschreiben. In der mykobakteriellen Zellwand sind die Lipide (z. B. Mykolsäure) mit darunter gelegenen Arabinogalaktan und Peptidoglykan verbunden. Dieser Aufbau ist für die geringe Zellwandpermeabilität und somit auch für die Unwirksamkeit der meisten Antibiotika bei diesen Organismen verantwortlich. Die komplizierten molekularen Bestandteile der Zellwand haben vielfältige Funktionen, u. a. beeinflussen sie die Virulenz der Mykobakterien, hemmen die Makrophagen- und Leukozyten-Wanderung und erleichtern das intrazelluläre Überleben durch Schutz gegen lysosomalen Abbau in den Makrophagen. Einige phenolische Glykolipide und Lipoarabinomannane sind artspezifisch und können daher zur serologischen Diagnostik herangezogen werden [65; 96; 105].

Zur sicheren Unterscheidung der Mykobakterien von nahe verwandten Genera – insbesondere *Nocardia*, *Corynebacterium* und *Rhodococcus* – reicht allerdings das Kriterium der Säurefestigkeit allein nicht aus. Die aktuell international anerkannten Minimalstandards für die taxonomische Einordnung zum Genus Mycobacterium fordern die Erfüllung der folgenden Kriterien [74]:

- a) Säurefestigkeit
- b) das Vorhandensein von Mykolsäuren mit 60 - 90 Kohlenstoffmolekülen, die durch Pyrolyse mit C₂₂ und C₂₆ Fettsäuremethylestern verbunden sind
- c) und eine molare Guanin + Cytosin Ratio der DNA zwischen 61 und 71%.

Die „nichttuberkulösen“ Mykobakterien unterscheiden sich von *M. tuberculosis* u. ä. und *M. leprae* durch ihr ubiquitäres Vorkommen in der Umwelt, ihre geringere Pathogenität für den Menschen und durch ihre weitgehende Resistenz gegenüber Antituberkulotika. Sie werden in die Gruppen der schnell und der langsam wachsenden Spezies unterteilt.

In Abbildung 1 ist ein aktueller phylogenetischer Baum der Mykobakterien dargestellt [122].

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Mykobakterien
(A) schnell wachsende Spezies

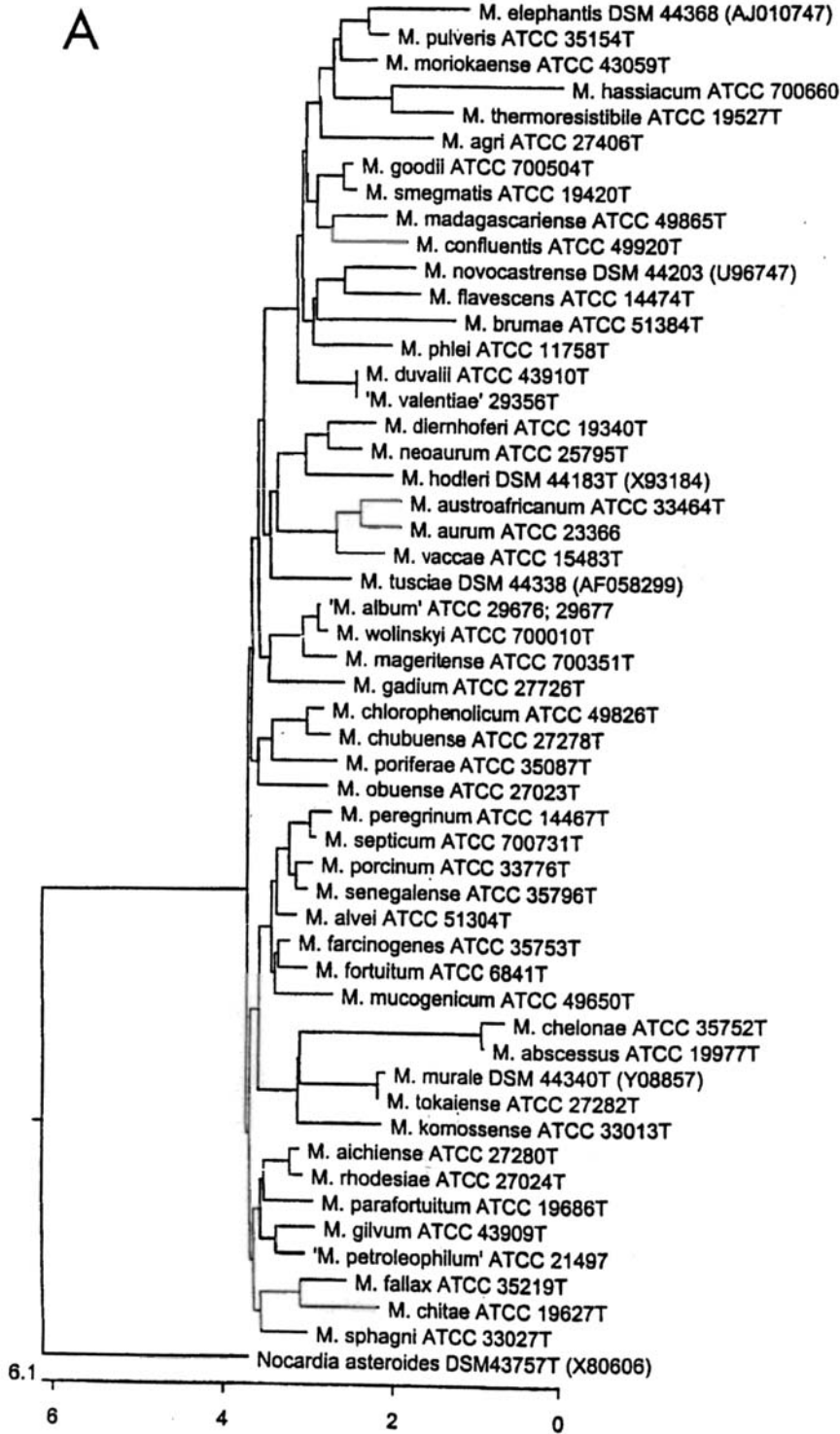
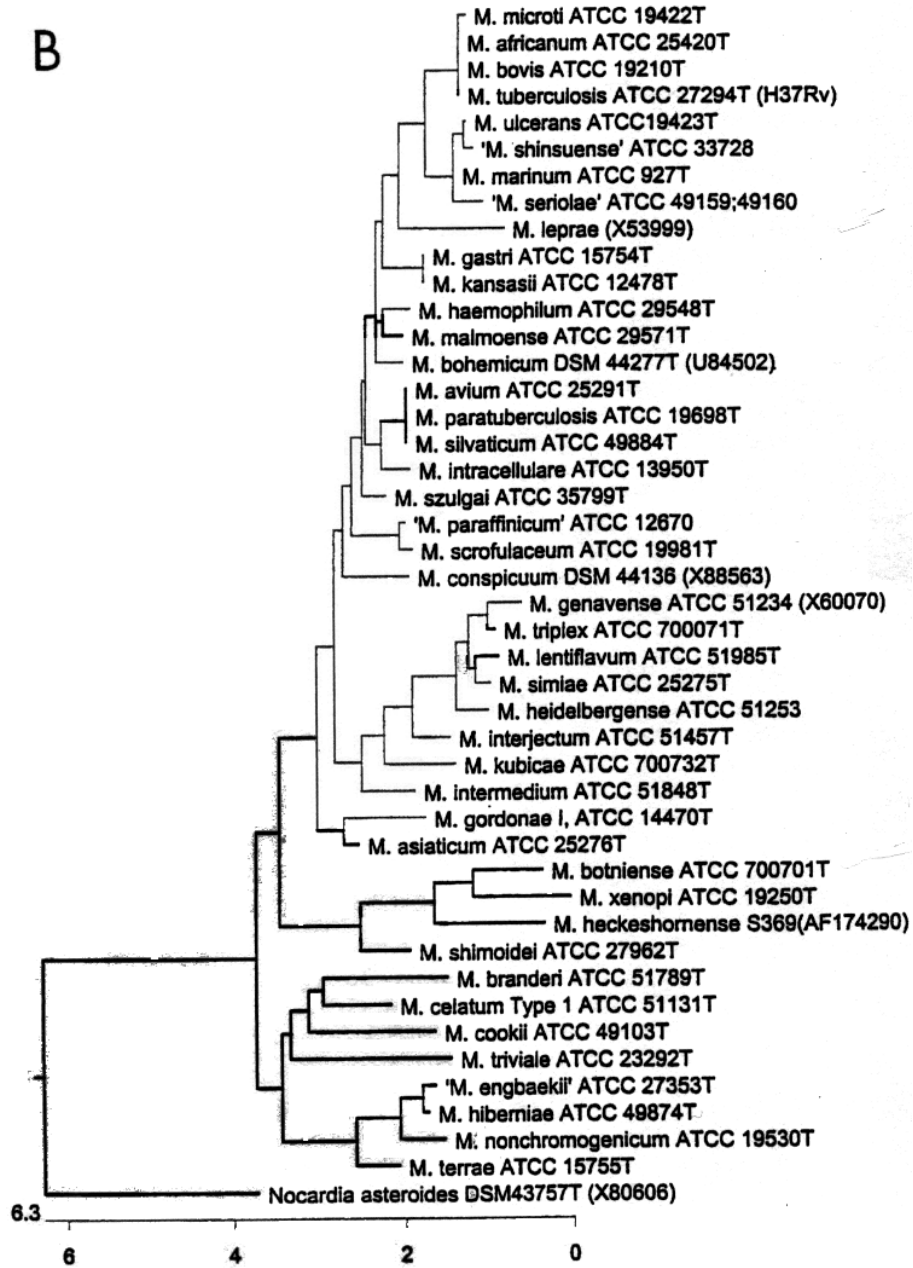


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Mykobakterien
(B) langsam wachsende Spezies



2.2 Historische Aspekte

„Atypische säurefeste Bakterien“ wurden bald nach der Entdeckung der Tuberkelbakterien durch Robert Koch 1882 beschrieben. Man fand sie im Wasser, in der Erde und bei Tieren mit Tuberkulose-ähnlichen granulomatösen Veränderungen. Auch in menschlichen Sekreten wurden sie bereits 1885 beschrieben [5]. Eine humanpathogene Relevanz konnte anfangs jedoch nicht nachgewiesen werden. Erst in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts verdichteten sich die Hinweise auf die Bedeutung der „atypischen säurefesten Bakterien“ als Erreger pulmonaler Infektionen [89].

Mit der Entwicklung der kulturellen Differenzierungsverfahren gelang es nach und nach, verschiedene säurefeste Bakterienspezies bei unterschiedlichen Krankheitsbildern zu differenzieren:

- bei Patienten mit „nichttuberkulösen“ chronischen pulmonalen Erkrankungen (heute bekannt als *M. avium*, *M. intracellulare* und *M. kansasii*) [18; 40; 80],
- bei Kindern mit cervicalen Lymphadenitiden (*M. scrofulaceum*) [75; 92],
- in lokalisierten Abszessen (*M. fortuitum-chelonae*) [46; 116],
- und in granulomatösen Hautentzündungen (Schwimmbad-Granulome) (*M. marinum*) [84].

1954 gelang es E. H. Runyon und Mitarbeitern mehrfach, die gleichen Mykobakterienspezies aus Sputumproben und reseziertem Lungengewebe von pulmonal erkrankten Patienten nachzuweisen und zu kultivieren. Die humanpathogene Relevanz einzelner Spezies wurde durch diese Untersuchungen bestätigt. Außerdem stellte Runyon erstmals eine Einteilung der verschiedenen Spezies nach mikrobiologischen Kriterien vor:

- | | |
|-------------|--|
| Gruppe I: | <i>langsam wachsend (3 - 4 Wochen)</i>
<i>photochrom</i> (im Dunkeln farblos, im Licht gelb gefärbt), |
| Gruppe II: | <i>langsam wachsend</i>
<i>skotochrom</i> (im Dunkeln gelb bis orange, im Licht gelb bis rot), |
| Gruppe III: | <i>langsam wachsend nonchromogen</i> (keine Färbung), |
| Gruppe IV | <i>schnell wachsend (<7 Tage)</i> [101; 117]. |

Die Unterscheidung der Mykobakterienspezies nach morphologischen Eigenschaften und Wachstumsgeschwindigkeiten hat nach wie vor Bedeutung für das diagnostische Procedere im mikrobiologischen Labor, die konventionelle Differenzierung mittels morphologischer und biochemischer Eigenschaften wird jedoch immer mehr durch die molekularbiologische Differenzierung mittels Sequenzierung der 16S rRNA (rDNA) ersetzt. Inzwischen sind über 90 Spezies differenziert (siehe Abbildung 1).

Das Spektrum der durch „nichttuberkulöse“ Mykobakterien verursachten Erkrankungen wurde 1979 in einer bedeutenden Übersichtsarbeit von Wolinsky [132] beschrieben, in der weltweit erschienene Berichte über die verschiedenen Manifestationsformen verarbeitet wurden. Neben der pulmonalen Tuberkulose-ähnlichen Erkrankung, Lymphadenitiden und granulomatösen Hautveränderungen und Abszessen werden Osteomyelitiden, Synovitiden, sowie Infektionen des Urogenitaltraktes aufgeführt. Erwähnenswert sind iatrogene Infektionen durch chirurgische Eingriffe, endoskopische Untersuchungen und Injektionen.

Im Laufe der 80er Jahre wuchs die klinische Bedeutung „nichttuberkulöser“ Mykobakterien als Erreger opportunistischer Infektionen bei AIDS-Patienten. Wegen der hohen Prävalenz der Mykobakteriosen bei AIDS-Patienten wurden die Forschungsbemühungen zur Verbesserung der Therapie intensiviert, und große klinische Studien konnten in kürzerer Zeit durchgeführt werden. Die Erfahrungen in der Therapie der Mykobakteriosen bei AIDS-Patienten fanden Eingang in die Therapie der pulmonalen Infektionen bei Immunkompetenten.

2.3 Epidemiologie der pulmonalen Mykobakteriosen

Die pulmonale Tuberkulose-ähnliche Erkrankung ist die häufigste lokalisierte Manifestationsform der Infektion durch „nichttuberkulöse“ Mykobakterien bei Immunkompetenten. Häufigster Erreger ist *M. avium-intracellulare*, gefolgt von *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. malmoense*; seltene Erreger sind *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. celatum*, *M. asiaticum*, *M. shimodei*, *M. haemophilum*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* und *M. abscessus*.

Die meisten NTM sind in der Erde und in natürlichen Wasservorkommen isoliert worden, *M. kansasii* und *M. xenopi* auch im Leitungswasser. Bei der pulmonalen Erkrankung werden die Erreger sehr wahrscheinlich aerogen übertragen, Transmission von Mensch zu Mensch ist eine Seltenheit. Nosokomiale Infektionen werden auf Erreger im Leitungswasser zurückgeführt [38; 134].

Die Inzidenz der pulmonalen Infektion liegt in den USA bei etwa 1,8 pro 100.000 Einwohner und Jahr. Regionale Unterschiede werden beschrieben. Für die Häufigkeit der pulmonalen Mykobakteriose in Deutschland liegen keine epidemiologischen Daten vor. Eine Schweizer Studie berichtet über eine Inzidenz von 0,4 bis 0,9 Mykobakteriosen pro 100.000 Einwohner in den Jahren 1983 - 1988 im Kanton Zürich [30; 68; 133].

Betroffen sind in der Regel Patienten ab dem 45. Lebensjahr mit prädisponierenden Erkrankungen: vorbestehenden Lungenerkrankungen wie Pneumokoniosen, postinfektiösen Veränderungen z. B. nach TBC, chronischer Bronchitis, Emphysem und Bronchiektasie oder systemischer Abwehrschwäche.

2.4 Klinik und diagnostische Kriterien

Das klinische Erscheinungsbild der pulmonalen Infektion durch „nichttuberkulöse“ Mykobakterien entspricht dem der Tuberkulose in abgemilderter Form. Die häufigsten Symptome sind Husten, subfebrile Temperaturen, Leistungsminderung und Gewichtsverlust. Klinisch-radiologisch werden nach Miller et al. [81] die pulmonalen „nichttuberkulösen“ Mykobakteriosen eingeteilt in einen (a) klassischen und (b) nicht-klassischen Typ, sowie (c) Infektionen bei gastroösophagealem Reflux. Die klassische Infektion (a) betrifft überwiegend Männer im 5. - 6. Lebensjahrzehnt mit oben aufgeführten Vorerkrankungen und ist radiologisch gekennzeichnet durch fibronoduläre apikale Verschattungen wie bei einer reaktivierten Tuberkulose. Kavernen werden in 80 - 95% der Fälle gefunden, bronchogene Streuung ist häufig und kann die ipsilaterale und kontralaterale Lunge betreffen. Die nicht-klassische Form (b) liegt meist bei älteren Frauen ohne prädisponierende Faktoren vor. Die Symptomatik ist diskreter, und röntgenologisch werden kleine disseminierte Rundherde und Bronchiektasen bevorzugt im Mittellappen und in der Lingula nachgewiesen.

Die computertomographisch dargestellten Noduli entsprechen epitheloidzelligen Granulomen, aus denen Mykobakterien – meist *M. avium* complex – kultiviert werden konnten. Die Entstehung der Bronchiektasen durch die Infektion wird diskutiert. Gastroösophageale Refluxerkrankungen prädisponieren für Infektionen durch die schnell wachsenden Mykobaktérienspezies, die das röntgenologische Bild einer disseminierten Aspirationspneumonie (c) verursachen [43; 91; 98; 114].

Bei Kindern ist die pulmonale Infektion selten. Das Krankheitsbild entspricht dem der primären Tuberkulose. Häufiger wird die hiläre Lymphadenitis mit Stenosierung des Bronchialsystems beschrieben [41; 71; 76].

Da „nichttuberkulöse“ Mykobakterien anders als *Mycobacterium tuberculosis* nicht obligat pathogen sind, müssen Kolonisation und Infektion unterschieden werden. Yamamoto und Mitarbeiter [139] stellten 1967 erstmals diagnostische Kriterien für eine pulmonale Infektion durch „nichttuberkulöse“ Mykobakterien auf. Diese wurden inzwischen mehrfach überarbeitet, zuletzt von Wallace und Mitarbeitern. Abbildung 2 zeigt die aktuellen klinischen, radiologischen und bakteriologischen Kriterien der American Thoracic Society [128].

Abbildung 2: Diagnostische Kriterien der American Thoracic Society für pulmonale Infektionen durch „nichttuberkulöse“ Mykobakterien

[128]

1. Klinische Kriterien

- A. „typische“ Symptome (Husten, AZ-Verschlechterung; Fieber, Gewichtsverlust u. ä.) bei Grunderkrankung: nur bei dokumentierter Verschlechterung
- B. Ausschluss anderer Erkrankungen

2. Radiologische Kriterien

- A. eine der folgenden Veränderungen im Röntgen-Thorax
 - Infiltrate (seit 2 oder mehr Monaten bestehend oder Progression)
 - Kavernen
 - multiple Fleckschatten
- B. eine der folgenden Veränderungen im HRCT (high-resolution computertomographie)
 - multiple kleine fleckige Verdichtungen
 - multifokale Bronchiektasen mit oder ohne kleine Fleckschatten

3. Bakteriologische Kriterien

- A. mindestens drei Sputum- oder BAL-Proben in einem Jahr, davon
 - drei positive Kulturen mit mikroskopisch negativem Ausstrich
oder
 - zwei positive Kulturen und ein mikroskopisch positiver Ausstrich
oder
- B. wenn nur eine BAL-Probe verfügbar ist und Sputum nicht gesammelt werden können
 - positive Kultur mit 2+, 3+, 4+ Wachstum¹
oder
 - positive Kultur und mikroskopisch 2+, 3+, 4+²
oder
- C. Biopsie
 - kultureller Nachweis aus bronchopulmonaler Gewebsbiopsie
oder
 - Histologisch Granulomatose und/oder säurefeste Stäbchen auf Lungenbiopsie mit einer oder mehreren positiven Kultur/en aus BAL oder Sputum
oder
 - kultureller Nachweis bei Biopsie aus extrapulmonalem Gewebe.

Für die Diagnose pulmonale Erkrankung müssen alle drei Kriterien – (1) klinisch, (2) radiologisch und (3) bakteriologisch – erfüllt sein.

¹ Wachstum: 2+: 100-200 Kolonien pro Probe 3+: 200-500 Kol. pro Probe 4+: 500 Kol. pro Probe

² Mikroskopie: 2+: 1-9 Stäbchen pro 10 Gesichtsfelder 3+: 1-9 Stäbchen pro 1 Gf. 4+: >9 Stäbchen pro 1 Gf.

2.5 Mikrobiologische Diagnostik und Empfindlichkeitsprüfung

Zur Diagnosestellung gehört neben der klinischen Symptomatik und den röntgenologischen Veränderungen der **mikroskopische Nachweis säurefester Stäbchen** und der **kulturelle Nachweis der „nichttuberkulösen“ Mykobakterien aus Sputum oder Bronchialsekret**. Das diagnostische Vorgehen sollte den Empfehlungen der Fachgruppe „Diagnostische Verfahren in der Mikrobiologie“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) „MIQ 5 / 1998: Tuberkulose und Mykobakteriose“ folgen [72].

Es sollte die Gewinnung von drei zu verschiedenen Zeiten gewonnenen Proben von Atemwegssekreten angestrebt werden. Zur Färbung des Präparates wird am häufigsten die Methode nach **Ziehl-Neelsen** angewandt (DIN 58 943) [33]. Die **fluoreszenzmikroskopische Untersuchung** der säurefesten Stäbchen ermöglicht eine morphologische und eine quantitative Beurteilung der Proben. Mikromorphologische Unterschiede gegenüber *M. tuberculosis* können erste Hinweise auf eine Infektion durch „nichttuberkulöse“ Mykobakterien ergeben, eine sichere Spezieszuordnung anhand von morphologischen Kriterien ist jedoch nicht möglich. Je höher die Keimdichte in mehreren Proben ist, desto wahrscheinlicher ist die Diagnose einer klinisch relevanten Infektion.

Die Kultur ist nach wie vor der „Goldstandard“ der Mykobakteriendiagnostik trotz der zunehmenden Bedeutung der molekularbiologischen Direktmethoden[72]. Verschiedene feste Kulturmedien auf Ei- oder Agarbasis, sowie flüssige Kulturmedien stehen zur Verfügung. Es sollten stets Kulturen auf zwei Fest- und in einem Flüssigmedium angelegt werden. Etabliert sind der Eiernährboden nach Löwenstein-Jensen (DIN 58 943) [33] und die Agarmedien 7 H10 und 7 H11 nach Middlebrook [23; 69]. Die derzeit empfindlichste Kultivierungsmethode ist die Kultur in flüssigen Kulturmedien. Das Wachstum der Mykobakterien wird durch Indikatorsysteme in der flüssigen Nährlösung angezeigt und ist im Durchschnitt 5 - 12 Tage früher erkennbar als auf den festen Kulturmedien. Als Standard gilt das 7 H12-Medium mit ¹⁴C-markierter Palmitinsäure nach *Middlebrook*, die einen radiometrischen Nachweis des Bakterienwachstums ermöglicht [32; 102]. Die Bebrütung der beimpften Medien sollte bei Verdacht auf „nichttuberkulöse“ Mykobakterien nicht nur bei 36 ± 1°C erfolgen, sondern auch bei 30°C und 42°C, da einzelne „nichttuberkulöse“ Mykobakterien ihr optimales Wachstumsverhalten in anderen Temperaturbereichen zeigen, z. B. *M. malmoense* bei 25 bis 32°C und *M. xenopi* bei 42°C. Die Beobachtung der Kulturen wird im Allgemeinen nach 8 Wochen abgeschlossen, bei einzelnen „nichttuberkulösen“ Mykobakterien wie z. B. *M. malmoense* wird eine Bebrütung von bis zu 12 Wochen empfohlen. Eine quantitative und morphologische Beurteilung der Kolonien ist nur auf den festen Kulturmedien möglich. Je häufiger die Mykobakterien wachsen und in je höherer Kolonienzahl, desto wahrscheinlicher ist eine manifeste Erkrankung. **Die Diagnose kann jedoch nur zusammen mit den klinischen und radiologischen Befunden gestellt werden.**

Zur **Identifizierung** der Mykobakterienspezies stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, die miteinander kombiniert werden sollten, um in kurzer Zeit zum richtigen Ergebnis zu kommen [72]. Mit Gensonden ist eine schnelle Unterscheidung zwischen *M. tuberculosis* und „nichttuberkulösen“ Mykobakterien möglich. Es werden auch Gensonden-Testkits für die Erkennung von *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* und *M. gordonae* angewendet. Bei klinischer Relevanz bedürfen diese Befunde der Bestätigung oder der weiteren Differenzierung durch konventionelle und / oder molekularbiologische Verfahren. In den meisten Fällen

ist es möglich, „nichttuberkulöse“ Mykobakterien anhand von Kolonienmorphologie, Wachstumsgeschwindigkeit, Pigmentbildung, Bestimmung der optimalen Wachstumsgeschwindigkeit und verschiedener biochemischer Tests zu differenzieren. Diese konventionelle Differenzierung ist jedoch aufwendig und dauert 3 - 6 Wochen. Ein schnelleres Verfahren ist die Identifizierung von Mykobakterien mit Hilfe der Sequenzierung. Sie beruht auf der Sequenzanalyse von Genabschnitten, die variabel zwischen den Arten, aber konstant innerhalb einer Art sind. Die bestuntersuchten Sequenzabschnitte sind zwei variable Regionen der ribosomalen 16S rDNS [70; 112; 119]. Eine Vereinfachung dieses Verfahrens wurde eingeführt mit der Bestimmung der Spacer Sequenzen 16S-23S rRNA [99]. Das Ergebnis dieser molekularbiologischen Untersuchung liegt in 2 - 3 Tagen vor. Da sich einige Mykobakterienspezies nur durch 1 - 2 Sequenzunterschiede differenzieren lassen, müssen zur Absicherung konventionelle Tests mitgeführt werden. Sowohl die konventionellen als auch die molekularbiologischen Untersuchungen sollten nur in spezialisierten Laboratorien durchgeführt werden, die über ausreichende Erfahrung verfügen.

Die **Empfindlichkeitsprüfung** nach der **konventionellen Proportionsmethode** auf den genannten festen Kulturmedien ist die anerkannte Standard- und Referenzmethode für langsam wachsende Mykobakterien vom *M. tuberculosis* complex [33; 59]. Für die „nichttuberkulösen“ Mykobakterien gibt es keine validierte Methode für die Empfindlichkeitsprüfung. Auf experimenteller Basis wird jedoch die Proportionsmethode verwendet. Das Prinzip der Proportionsmethode besteht darin, dass bestimmt wird, wie stark die Anzahl koloniebildender Einheiten auf einem Nährboden mit definierter Konzentration eines Antituberkulotikums („kritische Konzentration“) im Vergleich zum antituberkulotikumfreien Nährboden reduziert wird. Der Prozentsatz, ab dem der Stamm als resistent gilt, wird als „kritische Proportion“ bezeichnet. Ein schnelleres Verfahren (5 - 12 Tage früher) ist die Empfindlichkeitsprüfung in flüssigen 7H12 Kulturmedien (BACTEC 460 TB System) [33], das jedoch nicht für „nichttuberkulöse“ Mykobakterien validiert und nicht anwendbar ist. Für schnell wachsende Mykobakterien wird die Durchführung eines Bouillon-Mikroverdünnungstests empfohlen [23].

2.6 Therapie der pulmonalen Infektionen durch „nichttuberkulöse“ Mykobakterien

Die Therapie der „nichttuberkulösen“ Mykobakteriose wurde aus den Erfahrungen mit der Behandlung der klassischen Tuberkulose und der Lepra entwickelt. Auch bei diesen Spezies ist eine langfristige Kombinationsbehandlung zur Vermeidung von Resistenzentwicklungen erforderlich. Für die langsam wachsenden Spezies werden Dreifach- oder Vierfachkombinationen aus Antituberkulotika (Rifampicin/Rifabutin, Ethambutol, Isoniazid, Streptomycin) und modernen Makroliden (Clarithromycin und Azithromycin) eingesetzt. Medikamente der zweiten Wahl sind Chinolone (Ciprofloxacin, Sparfloxacin und Moxifloxacin), Prothionamid, Clofazimin, Terizidon und Amikacin.

Verschiedene Spezies lassen sich unterschiedlich gut behandeln. *M. kansasii* und *M. szulgai* z. B. sprechen in der Regel gut auf die Kombination Rifampicin, Ethambutol und Isoniazid an. *M. avium* complex, *M. simiae*, *M. chelonae* und *M. abscessus* sind meist multiresistent und gelten als schwer behandelbar. Die Einführung der modernen Makrolide (Clarithromycin, Azithromycin und Roxithromycin) brachte eine deutliche Verbesserung in der Therapie der schwer behandelbaren Mykobakteriosen. Kombinationen von einem Makrolid mit Ethambu-

tol, Rifampicin oder Rifabutin erweisen sich als eine vielversprechende Behandlungsoption für langsam wachsende Mykobakterien.

Bei den schnell wachsenden Spezies kommen neben den genannten Medikamenten auch Chinolonen, Tetrazyklinen, Cefoxitin und Imipenem zum Einsatz.

2.7 Problemstellungen

In der vorliegenden Arbeit werden die folgenden Problemstellungen bearbeitet:

1. Wie groß war die Inzidenz der „nichttuberkulösen“ Mykobakteriosen im Institut für Mikrobiologie und Immunologie der Lungenklinik Heckeshorn, Berlin-Zehlendorf, aufgeteilt nach den verschiedenen Spezies und Lokalisationen (pulmonale Erkrankungen, cervikale Lymphadenitiden, granulomatöse Hautentzündungen) im Zeitraum von 1986 bis 1998? (siehe Abschnitt 4.1 und 5.1)

2. Welche Charakteristika und klinischen Befunde finden sich bei pulmonalen Mykobakteriosen? (siehe Abschnitt 4.2 und 5.2)

3. Wie fallen die Ergebnisse der Mikroskopie, der Kultivierung und der *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfungen bei den verschiedenen „nichttuberkulösen“ Mykobakterienspezies aus? (siehe Abschnitt 4.3)

4. Wie wirkt sich die medikamentöse Therapie auf Sputumkonversion, röntgenologische Befunde und Rezidivraten aus? (siehe Abschnitt 4.4)
Wie sind die Ergebnisse chirurgischer Maßnahmen? (siehe Abschnitt 4.4.12 und Tabelle 25)

5. Kernfragestellung:

Gibt es bei den einzelnen Spezies einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfungen und dem Behandlungserfolg oder -versagen? (siehe Abschnitt 4.5 und 5.3)

6. Auf welche Ursachen können Therapieversagen zurückgeführt werden? (siehe Abschnitt 5.4)

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Nach Durchsicht des Laborbuches des Instituts für Mikrobiologie der Lungenklinik Heckeshorn von August 1986 bis Ende 1998, in dem alle Proben-Eingänge zur mykobakteriellen Identifizierung eingetragen werden, wurde bei Nachweis „nichttuberkulöser“ Mykobakterien (NTM) die klinische Relevanz des Befundes ermittelt. Berücksichtigung fanden Einsendungen von Sputum, Bronchialsekreten, Lungenresektaten und -biopaten aus der Lungenklinik Heckeshorn und von niedergelassenen Berliner Pulmologen, sowie Lymphknoten-Exstirpate und Probeexzisionen bei granulomatösen Hautveränderungen aus Berliner Kliniken und Praxen. Nicht berücksichtigt wurden Einsendungen von AIDS-Stationen und aus anderen Labors.

Bei mehrfachem Nachweis von „nichttuberkulösen“ Mykobakterien im Sputum und / oder Bronchialsekret und / oder erhöhten Koloniezahlen in den Kulturen, sowie bei NTM-Nachweis in Lungenresektaten wurde die Diagnose einer pulmonalen Infektion nach Durchsicht der Krankenakten der Lungenklinik bzw. der behandelnden Pulmologen anhand der aktuellen Diagnose-Kriterien der ATS [128] (siehe Abb. 2) überprüft. Dokumentiert wurden die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung, der biochemischen und – sofern diese durchgeführt wurde – der molekularbiologischen Identifizierung, prädisponierende Erkrankungen, klinische Symptome, radiologische Befunde, Therapie und Therapieergebnisse, sowie posttherapeutischer Verlauf.

Bei Nachweis von „nichttuberkulösen“ Mykobakterien in Lymphknotenresektaten und Abstrichen aus granulomatösen Hautveränderungen wurde die Häufigkeit der Lymphadenitiden und Schwimmbad- bzw. Aquarium-Granulome nach Erreger-Spezies aufgeschlüsselt dokumentiert.

3.2 Mikrobiologische Diagnostik

Bei Verdacht auf eine mykobakterielle Infektion wird in der Lungenklinik Heckeshorn die Gewinnung von mindestens 3 Sputumproben und / oder eines oder mehrerer Bronchialsekrete angestrebt. Bei Resektionen von unklaren Rundherden wird das Resektat zur mikrobiologischen Diagnostik eingesandt.

Es erfolgt eine **mikroskopische Untersuchung** des Präparates entweder mit der Hellfeldmikroskopie nach Anfärbung mit Karbolfuchsin nach *Ziehl-Neelsen* oder mit dem Fluoreszenzmikroskop nach Färbungen mit Auramin-Rhodamin (DIN 58 943) [33]. Die säurefesten Stäbchen werden morphologisch und quantitativ beurteilt. Der Nachweis von 3 oder weniger Stäbchen pro Ausstrich gilt als zweifelhaft bzw. kontrollbedürftig. 4 oder mehr Stäbchen pro Ausstrich gelten als relevante Befunde. Für eine semiquantitative Abstufung der Keimdichte wird das in Tabelle 1 dargestellte Bewertungsschema benutzt.

Tabelle 1: Bewertungsschema für mikroskopische Befunde

Bakteriendichte		Befundmitteilung
Lichtmikroskopie (etwa 1000x)	Fluoreszenzmikroskopie (etwa 450x)	
1-3 säurefeste Stäbchen/Ausstrich ^a	1-3 säurefeste Stäbchen/Ausstrich ^b	kontrollbedürftig
4-9 säurefeste Stäbchen/Ausstrich ^a	4-9 säurefeste Stäbchen/Ausstrich ^b	+
1-9/10 Gesichtsfelder	5-49/10 Gesichtsfelder	++
1-9/1 Gesichtsfeld	5-49/1 Gesichtsfeld	+++
≥ 10/1 Gesichtsfeld	≥ 50/1 Gesichtsfeld	++++

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

^b Das gesamte Präparat muss mikroskopiert werden

Die **Kultivierung** erfolgt auf festen Kulturmedien nach *Löwenstein-Jensen* (DIN 58 943, Teil 9) [33] und in flüssigen Kulturmedium nach *Middlebrook* [23; 69] (BACTEC[®] 460 TB-System). Zur semiquantitativen Bewertung der Kolonienzahl auf festen Kulturmedien dient folgendes Schema: (a) weniger als 50 Kolonien/Nährboden: aktuelle Zahl angeben, (b) 50-100 Kolonien: +, (c) 100-200 Kolonien: ++, (d) Bakterienrasen: +++ bis ++++ [106].

Das Spektrum der Substanzen, gegen die Empfindlichkeitsprüfungen vorgenommen wurden, wurde im Laufe der hier untersuchten 12 Jahre der Entwicklung neuer Medikamente angepasst. Insgesamt wurden Empfindlichkeitsprüfungen gegen folgende Substanzen durchgeführt: Clarithromycin, Rifampicin, Rifabutin, Ethambutol, Streptomycin, Isoniazid, Ciprofloxacin, Sparfloxacin, Prothionamid, Cycloserin, Clofazimin, Sulfamethoxazol, Amikacin, Pyrazinamid, PAS, Tetracyclin, Capreomycin und – bei den schnell wachsenden Spezies zusätzlich – gegen Gentamycin, Tobramycin, Cefoxitin und Imipenem.

Ein Stamm gilt als **empfindlich**, wenn auf dem Nährboden mit der kritischen Antituberkulotika-Konzentration kein Wachstum zu beobachten ist, als **grenzwertig sensibel**, wenn auf dem medikamentenhaltigen Kulturmedium bei „kritischer Konzentration“ Keime wachsen, aber weniger als es der kritischen Proportion für das getestete Antituberkulotikum entspricht, als **resistent**, wenn das Wachstum der „kritischen Proportion“ entspricht oder mehr als die „kritische Proportion“ der Keime wächst (DIN 58943, Teil 8) [33]. Die Empfindlichkeitsprüfung bei den schnell wachsenden Spezies für die Antibiotika Gentamycin, Tobramycin, Cefoxitin und Imipenem wird mit Bouillon-Mikroverdünnungstests durchgeführt [23].

Die **Identifizierung** erfolgte nach morphologischen und biochemischen Kriterien gemäß den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie [32], aktualisiert durch die Empfehlungen der Fachgruppe „Diagnostische Verfahren in der Mikrobiologie“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) „MIQ 5, 1998: Tuberkulose und Mykobakteriose“ [72]. Seit 1995 wurde die konventionelle Differenzierung – wenn erforderlich – durch die molekularbiologische Differenzierung mittels Sequenzierung der 16S rRNA (rDNA) überprüft oder ergänzt [70; 112]. Als vereinfachtes Verfahren wurde die Analyse der Spacer Sequenzen 16S-23 rRNA durchgeführt [99].

3.3 Klinisch-radiologische Einteilung

Eine standardisierte Einteilung der Ausdehnung und des Schweregrades der Erkrankung liegt in der internationalen Literatur nicht vor. Für diese Arbeit wurde hilfsweise die klinisch-radiologische Einteilung von Miller [81] modifiziert, um die Ausdehnung des radiologischen Befundes zu quantifizieren.

A Klassische Infektion

AI Infiltrate

AIa unilateral in 1-2 Segmenten

AIb uni- oder bilateral in > 2 Segmenten

AII Kavernen

AIIa mit Infiltraten in 1-2 Segmenten unilateral

AIIb mit Infiltraten in > 2 Segmenten uni- oder bilateral

AIIc Kavernen bilateral

B Nicht-klassische Infektion: multiple noduläre Infiltrate und Bronchiektasen

C Diseminierte Verschattungen, wie bei Aspirationspneumonie

(Patienten mit gastro-ösophagealem Reflux)

3.4 Behandlungsergebnis und Verlauf

Kriterien für einen Behandlungserfolg waren Sputumkonversion, klinische Besserung und röntgenologisch nachweisbare Remission des Befundes. Der Zeitpunkt der Sputumkonversion, klinische und radiologische Verlaufparameter wurden den Krankenakten der Lungenklinik bzw. den Unterlagen oder telefonischen Auskünften der niedergelassenen Pulmologen entnommen. Wenn nach Beginn der Therapie bei klinischer Besserung kein Sputum mehr zu gewinnen war und so keine Sputumkontrollen durchgeführt werden konnten, so wurde von einer Sputumkonversion innerhalb von 2 Monaten ausgegangen. Der Verlauf nach Therapie wurde durch erneute Durchsicht aller Laborunterlagen, sowie Rückfrage bei den niedergelassenen Pulmologen bis 9/2000 ermittelt. Als rezidivfreie Zeit wurde der Zeitraum vom Therapieende bis zum letzten ermittelbaren Arztkontakt gewertet.