

Aus dem Institut für Infektionsmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung eines immunhistologischen Nachweises von Mykobakterien  
in der mikrobiologischen Diagnostik

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Von  
Maja Reich  
aus Berlin

Gutachter:                   1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. H. Hahn  
                                  2. Prof. Dr. W. Solbach  
                                  3. Prof. Dr. R. Ignatius

Datum der Promotion: 19.11.2010

## Inhaltsverzeichnis

Inhalt	III
Häufig benutzte Abkürzungen	VI
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie der Tuberkulose .....	1
1.1.1 Reservoir und Infektionswege .....	2
1.1.2 Pathogenese .....	2
1.1.3 Klinik .....	4
1.1.4 Prävention und Bekämpfung .....	4
1.2 Diagnostik .....	4
1.2.1 Verfahren am Menschen .....	5
1.2.1.1 Tuberkulintest .....	5
1.2.1.2 Bildgebende Verfahren .....	5
1.2.2 Mikrobiologischer Nachweis von Mykobakterien .....	6
1.2.2.1 Die drei Stufen der mikrobiologischen Diagnostik .....	6
1.2.2.1.1 Probenmaterialien .....	6
1.2.2.2 Entwicklung der mikroskopischen Diagnostik der Tuberkulose .....	7
1.2.2.2.1 Ziehl-Neelsen (ZN)-Färbung .....	7
1.2.2.2.2 Immunhistochemische Färbung mit einem polyklonalen Antikörper gegen den <i>M.-tuberculosis-Komplex</i> .....	8
1.2.2.3 Nukleinsäureamplifikationstechniken .....	9
1.2.2.4 Kultureller Nachweis .....	9
1.2.2.5 Identifizierung von Mykobakterien .....	10
1.2.2.6 Empfindlichkeitsprüfung .....	11
1.4 Therapie .....	12
<b>2. Fragestellung der Arbeit</b> .....	<b>13</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
3.1 Materialien .....	15
3.1.1 Chemikalien und andere Substanzen .....	15

3.1.2 Geräte .....	17
3.2 Methoden.....	18
3.2.1 Vorbehandlung des Probenmaterials.....	18
3.2.2 Färbemethoden .....	19
3.2.2.1 Gram-Färbung .....	19
3.2.2.2 ZN-Färbung.....	20
3.2.2.3 Färbung des Materials mit pAbBCG.....	20
3.2.3 Kultur .....	22
3.2.4 PCR .....	22
3.2.5 BCG-Verdünnungsreihe.....	23
3.2.5.1 Herstellung der Verdünnungsreihe.....	23
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>24</b>
4.1 Auswahl der geeigneten Objektträger .....	24
4.2 Ermittlung der geeigneten Fixierung des Materials auf dem Objektträger.....	24
4.3 Überprüfung des Nachweises von BCG.....	25
4.4 Einfluss der Vorbereitung der Proben auf das Färbeverhalten .....	26
4.5 AK- Sensitivität.....	28
4.6 Kreuzreaktionen .....	29
4.7 Auswertung des Probenmaterials .....	37
4.7.1 BAL.....	38
4.7.2 Bronchialsekret.....	39
4.7.3 Trachealsekret .....	39
4.7.4 Magensaft .....	40
4.7.5 Sputum .....	40
4.7.6 Punktate.....	41
4.7.6.1 Pleurapunktat.....	41
4.7.6.2 Aszitespunktat .....	42
4.7.6.3 Sonstige Punktate .....	42
4.7.7 Abstrich.....	43
4.7.8 Liquor.....	43
4.7.9 Biopsien.....	44
4.7.9.1 Lymphknoten .....	44

4.7.9.2 Knochenmark-Punktion .....	44
4.7.9.3 Sonstige Biopsien.....	45
4.7.10 Sonstige PE .....	45
4.8 Zusammenfassende Beurteilung des Probenmaterials .....	46
4.9 Gegenüberstellungen der Sensitivität und Spezifität der beiden Färbemethoden bei der BAL.....	46
4.9.1 Sensitivität.....	47
4.9.2 Spezifität.....	47
4.9.3 Prädiktiver Wert .....	48
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>49</b>
5.1 Einleitung .....	49
5.2 Kritik der Methode .....	50
5.3 Diskussion der Ergebnisse und ihre Interpretation .....	50
5.3.1 Zur Sensitivität des Antikörpers.....	50
5.3.2 Zu den Kreuzreaktionen .....	51
5.3.3 Zur Auswahl des Probenmaterials.....	51
5.3.4 Zur Sensitivität, Spezifität und zum prädiktiven Wert anhand von BALs.....	52
5.3.5 Zum Aufwand der zu vergleichenden Färbemethoden .....	53
5.4 Interpretation der Ergebnisse im Kontext der Literatur .....	54
5.4.1 Immunhistochemische Färbung mit pAbBCG.....	54
5.4.2 Kaltfärbe-Technik (engl. cold-staining) bei ZN-Färbung.....	59
5.4.3 Fluoreszenzmikroskopie (FM)-Färbung .....	59
5.4.4 Nachweis von DNA/RNA mittels PCR .....	60
<b>6. Zusammenfassung und abschließende Würdigung .....</b>	<b>62</b>
<b>7. Literatur.....</b>	<b>64</b>
<b>Lebenslauf (Kurzfassung).....</b>	<b>72</b>

## Verzeichnis häufig benutzter Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
BAL	Bronchiallavage
BCG	<i>M. bovis</i> Bacillus Calmette-Guérin
DMF	Dimethylformamid
EMB	Ethambutol
INH	Isoniazid
LCR	Ligase chain reaction
NALC	N-Acetyl-L-Cystein
NAT	Nukleinsäureamplifikationstechnik
NZB	Nicht zu beurteilen
PACT	Polymyxin, Amphotericin, Carbenicillin, Trimethoprim
pAbBCG	Polyklonaler Antikörper gegen BCG eines Kaninchens
PCR	Polymerase chain reaction
PZA	Pyrazinamid
RMP	Rifampicin
SM	Streptomycin
TBS	Tris Buffered Saline
TMA	Transcription-mediated amplification
XDR	Resistenz gegen Isoniazid, Rifampicin, Fluorchinolone und weitere Reservemedikamente wie Amikacin, Kanamycin, Capreomycin
ZN	Ziehl-Neelsen

## 1. Einleitung

Seit der Entdeckung des Tuberkuloseerregers *Mycobacterium tuberculosis* durch Robert Koch sind rund 125 Jahre vergangen. An der Aktualität dieser Krankheit und der von ihr ausgehenden globalen Gefahr hat sich jedoch wenig geändert. Nach dem 2007 erschienenen WHO-Bericht *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing* erkrankten im Jahr 2005 weltweit fast neun Millionen Menschen neu an Tuberkulose, darunter knapp vier Millionen mit der hoch ansteckenden offenen Form. Zwar konnte erstmalig eine Stagnation der Neuinfektionen registriert werden, gleichzeitig aber stieg der Anteil der multiresistenten Erreger (Resistenz gegen Isoniazid und Rifampicin) und der XDR Erreger (zusätzlich auch gegen Fluorchinolone und weitere Reserve-Tuberkulosemedikamente wie Amikacin, Kanamycin, Capreomycin resistent) weiter an (1).

### 1.1 Epidemiologie der Tuberkulose

Etwa 1.6 Millionen Menschen sterben jährlich an der Tuberkulose, darunter 195.000 HIV-infizierte Patienten mit Tuberkulosekoinfektion. Die Tuberkulose ist weltweit die am häufigsten zum Tode führende Infektionskrankheit bei Jugendlichen und Erwachsenen und die führende Todesursache bei AIDS-Patienten.

Mehr als 80 % aller neu entdeckten Tuberkulosepatienten leben in Afrika, Südostasien und in der West-Pazifik-Region (2, 3, 4). Auch wenn die Zahl der Tuberkulosefälle in den Industrienationen eine eher rückläufige Tendenz aufweist, so wird dennoch befürchtet, dass die Zahl der Neuerkrankungen in diesen erstgenannten Gebieten weiter ansteigen wird (1). In Deutschland und anderen Industriestaaten waren Tuberkuloseerkrankungen durch die allgemeine Anhebung des Lebensstandards schon vor der Ära der Chemotherapie zurückgegangen. Seit den 50er Jahren hat sich dieser Trend kontinuierlich fortgesetzt. Im Jahre 2004 wurden in Deutschland nur noch 6.583 Tuberkulosefälle gemeldet, was einer Inzidenz von 8,0 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner entspricht. Im Jahr zuvor waren es noch 7.166 Fälle mit einer Inzidenz von 8,7.

Die vorliegenden Resistenzdaten bei neu entdeckten Fällen zeigen für Deutschland eine Zunahme der Stämme von Tuberkulosebakterien, die resistent gegen ein oder mehrere Antituberkulotika sind. So ist der Anteil von Erregern, die mindestens gegen eines der fünf

Standardmedikamente resistent sind, von 2001 bis 2004 von 11,1 % auf 13,9 % gestiegen. Auch der Anteil multiresistenter Erreger weist 2004 gegenüber dem Vorjahr eine steigende Tendenz auf (2,5 % gegenüber 2,1 %). Wie schon eingangs beschrieben, nimmt auch der Teil der XDR-Stämme zu (5).

Der Anstieg von Tuberkulosefällen und der wachsende Anteil von resistenten Erregern in den so genannten Neuen Unabhängigen Staaten (NUS = GUS + Baltische Staaten) der ehemaligen Sowjetunion könnte sich allerdings auch in Deutschland auswirken - aufgrund deren geographischer Nähe und der Einwanderung aus diesen Regionen.

Die Primärinfektion erfolgt in Ländern mit hoher Tuberkuloseinzidenz meist im frühen Kindesalter, in Ländern mit niedriger Inzidenz verschiebt sie sich immer mehr in das Erwachsenenalter (1).

#### 1.1.1 Reservoir und Infektionswege

Für *M. tuberculosis* und *M. africanum* sind Menschen das einzig relevante Reservoir, für *M. bovis* kommen Mensch und Rind sowie einige Wildtiere in Frage.

Die Ansteckung erfolgt meist über eine Tröpfcheninfektion, indem aerogen durch Husten, Sprechen oder Niesen von Erkrankten mit offener Tbc erregerrhaltige Aerosole freigesetzt und diese von Gesunden eingeatmet werden. Hierfür ist es erforderlich, dass der Träger der Erreger eine kontagiöse/offene Lungentuberkulose hat. [Ein Infektionsrisiko bei extrapulmonalen Tuberkulosen (Lymphknoten, Urogenitalsystem, Knochen, Gelenke, Verdauungsorgane) besteht nur, wenn der Krankheitsherd durch Fisteln einen Kontakt nach außen erhält.] Beengte und schlechte hygienische Verhältnisse leisten der Ausbreitung einer Infektion Vorschub.

#### 1.1.2 Pathogenese

Wurde der Erreger eingeatmet, setzt er sich in der Lunge fest und wird von ortsständigen Makrophagen aufgenommen. Innerhalb dieser Zellen kann sich *M. tuberculosis* erfolgreich der Abtötung und Zerstörung widersetzen, so dass die infizierten Makrophagen dem Erreger nunmehr als Wirtszellen dienen, anstatt den Infektionsherd zu säubern. Um zumindest die Ausbreitung der Mykobakterien zu verhindern, schotten sich die infizierten Makrophagen und

freien Mykobakterien von der Umgebung durch die Bildung einer bindegewebsartigen Wucherung (Granulom) ab. Im Granulom reagieren T-Zellen mit mykobakteriellem Antigen und aktivieren Makrophagen, wodurch letztere in die Lage versetzt werden, die von ihnen aufgenommenen Mykobakterien an der Vermehrung zu hindern oder gar abzutöten. Die Bildung eines intrapulmonalen Knotens mit leicht vergrößerten hilären Lymphknoten (evtl. mit Verkalkung) wird Primärkomplex (Ghonscher Primärkomplex) genannt. In das Infiltrat wandern Makrophagen ein und bilden Granulome, die nach außen durch einen Zellwall abgeschlossen werden und in ihrem Innern nekrotisieren können. Ein derartiger, glatt begrenzter Herd, als Tuberkulom bezeichnet, schrumpft zwar, bleibt aber meist im Röntgenbild erkennbar. Ein kleiner Teil der Mykobakterien kann über den befallenen Lymphknoten hinaus gelangen und primäre Streuherde bilden. In den meisten Fällen sind die Lungenoberfelder betroffen, da hier eine relative Überbelüftung im Vergleich zur Durchblutung herrscht und *M. tuberculosis*, das Sauerstoff benötigt, dort bessere Wachstumsbedingungen vorfindet als in den Unterlappen (6, 7, 8).

Die in den Nekroseherden ruhenden Bakterien überleben in der Narbe jahrzehntelang und sind reaktivierbar, was die Ansteckungsgefahr wieder akut werden lässt. Je größer das Tuberkulom, desto eher kommt es zu einer Reaktivierung. Umschließt ein exsudativer Herd einen Bronchus, erhält die Nekrose Anschluss an das Bronchialsystem und ihr Inhalt wird ausgehustet. In diesem Stadium der massiven Bakterienvermehrung und -versprühung besteht Ansteckungsgefahr durch Tröpfcheninfektion (9).

Immunologisch zeigt sich ein Zusammenspiel zwischen T-Zellen, Makrophagen und anderen Abwehrzellen, um die Vermehrung der Mykobakterien zu kontrollieren und ihre Ausbreitung durch Fokussierung auf das Granulom zu verhindern. Kann das Immunsystem die Erreger erfolgreich im Granulom eingrenzen, beschränken sich die Mykobakterien darauf, in den infizierten Makrophagen so lange zu persistieren, bis sich ihnen bei geschwächter Abwehrlage des Wirts die Möglichkeit bietet, sich erneut zu vermehren und im Körper auszubreiten (10, 11, 12, 13).

Ob der Infizierte an Tuberkulose nach der Infektion erkrankt, hängt ab von der Zahl und Virulenz der inhalierten Erreger sowie von der Disposition der infizierten Person. Bei intaktem Immunsystem beträgt beim Infizierten das Risiko, an Tuberkulose zu erkranken, ca. 10 % für die gesamte Lebensperiode, bei HIV-Infizierten steigt es um das 80-fache, bei AIDS-Patienten um das 170-fache (1).

### 1.1.3 Klinik

Werden die Erreger bei einer Infektion nicht - wie zuvor beschrieben - unter Kontrolle gehalten, kommt es zur Ausbreitung über den Primärkomplex hinaus. Diese kann lymphogen oder hämatogen in weitere Organe erfolgen. Je nach Abwehrlage erfolgt Granulombildung in den befallenen Organen. Ist die Abwehrlage wie bei AIDS-Patienten extrem geschwächt, kommt es zu einer hämatogenen Generalisation. Im Extremfall verläuft die Erkrankung foudroyant als „Landouzy-Sepsis“, bei der eine Granulombildung nicht mehr zustandekommt. Meist sind die Symptome uncharakteristisch (Einschränkung des Allgemeinbefindens, Gewichtsabnahme, nächtliches Schwitzen, Konzentrationsstörungen, Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Zeichen eines grippalen Infektes etc.) und entwickeln sich schleichend. Kinder sind in der Hälfte der Fälle asymptomatisch und fallen nur durch Gedeihstörungen auf. Bei schweren Verläufen zeigen sich Thoraxschmerzen, Atemnot, Husten mit blutigem Auswurf und hohes Fieber (13).

### 1.1.4 Prävention und Bekämpfung

Die wichtigste präventive Maßnahme zur Bekämpfung der Tuberkulose besteht in ihrer frühzeitigen Erkennung und Behandlung. Ebenso sollten Kontaktpersonen von Patienten mit einer kontagiösen Tuberkulose untersucht und gegebenenfalls prophylaktisch mit Antituberkulotika behandelt werden (13).

## 1.2 Diagnostik

Zur Diagnosestellung führen neben einer Infektionsanamnese

1. der Tuberkulintest,
2. das bildgebende Verfahren und
3. der mikrobiologische Nachweis.

Die Diagnose gilt als gesichert, wenn die Falldefinition des Robert Koch-Institutes erfüllt ist, das heißt, wenn neben den Symptomen einer Tuberkulose ein positiver kultureller Erregernachweis vorliegt (13).

## 1.2.1 Verfahren am Menschen

### 1.2.1.1 Tuberkulintest

Zum Nachweis einer Infektion durch einen Erreger aus dem *M.-tuberculosis-Komplex* ohne Erkrankung steht nur der Tuberkulintest zur Verfügung. Hierbei wird geprüft, ob spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegen *M. tuberculosis* vorliegen. Diese können auf Grund einer zurückliegenden oder aktuellen Infektion bzw. durch eine aktive Schutzimpfung mit BCG erworben worden sein. Darüber hinaus erschweren Kreuzreaktionen mit ubiquitär vorhandenen Mykobakterien die Interpretation der Befunde. Ein negativer Befund schließt eine Tuberkulose nicht aus, denn in der präallergischen Phase kann der Test noch negativ sein. Auch bei schwerem generalisiertem Verlauf wie bei der Miliartuberkulose ist der Test in etwa der Hälfte der Fälle negativ. Eine sichere Aussage, ob eine behandlungsbedürftige Erkrankung durch Infektion mit *M. tuberculosis* vorliegt, ist somit vor Ausbruch der Erkrankung nicht möglich (14, 15).

### 1.2.1.2 Bildgebende Verfahren

Die Röntgendiagnostik spielt in der Erkennung und Verlaufsbeurteilung der Lungentuberkulose als weiteres Nachweisverfahren eine wichtige Rolle. Zwar zeigt das radiologische Bild Veränderungen an, die von verschiedensten Krankheiten verursacht werden, es ist aber dennoch charakteristisch genug, um die Diagnose zu erhärten (16, 17, 18, 19).

In der akuten Krankheitsphase besteht der Primärkomplex (s. 1.1.2) aus einem unscharfen Verdichtungsherd durch die pneumonische Exsudation (Herd bei Erstinfektion) und einer hiluswärts gerichteten Streifenzeichnung durch die Lymphangitis. Dieser Herd kann überall in der Lunge auftreten, bei einer Reinfektion finden sich erneute Herde wegen besserer Wachstumsbedingungen in den besser belüfteten Abschnitten, also apikal. Hier heißt ein solcher Herd auch Simonscher Spitzenherd (20, 21).

Das radiologische Screening ist aber dennoch nur in Verbindung mit der Klinik und dem mikroskopischen Nachweis eindeutig aussagekräftig (22).

## 1.2.2 Mikrobiologischer Nachweis von Mykobakterien

Bei jedem anamnestischen, klinischen, röntgenologischen oder histologischen Verdacht auf eine Tuberkulose oder „atypische“ Mykobakteriose ist eine mikroskopische und kulturelle Untersuchung der entsprechenden Probenmaterialien in drei Stufen indiziert:

### 1.2.2.1 Die drei Stufen der mikrobiologischen Diagnostik

Stufe 1: besteht in Mikroskopie und Nukleinsäureamplifikationstechnik (NAT), wobei die NAT hier nur bei mikroskopisch negativen bzw. zweifelhaften Proben mit hohem Tuberkuloseverdacht oder bei mikroskopisch positiven AIDS-Patienten eingesetzt wird.

Stufe 2: besteht in Kulturverfahren und Differenzierung.

Stufe 3: sind die Identifizierung und Empfindlichkeitsprüfung.

Erst mit den Informationen aus allen drei Stufen wird eine gezielte Therapie der Tuberkulose möglich.

#### 1.2.2.1.1 Probenmaterialien

Der Erregernachweis erfolgt in der Regel aus Sputum, Bronchialsekret oder Trachealsekret, kann aber auch aus Magensaft, Urin, Pleuraexsudat, Liquor und anderen Punktionsproben oder aus Biopsaten geführt werden.

Für die Diagnostik der Lungentuberkulose ist die Untersuchung von Atemwegssekreten die angezeigte Variante. Patienten gelten als kontagiös, wenn im Sputum - nach Ziehl-Neelsen (ZN) oder der Auramin-Methode gefärbt - säurefeste Stäbchen mikroskopisch nachgewiesen werden. Allerdings ist das Ergebnis von der Erregerdichte im Material abhängig. Bei einer Erregerdichte von  $10^4$ /ml ist in nur 60 % der Präparate, bei einer Dichte von  $10^6$ /ml in nahezu allen Fällen mit einem positiven Ergebnis zu rechnen (5). Urin und Stuhlproben sollten nur in Ausnahmefällen - wie bei einem besonders begründeten Verdacht auf Tuberkulose - untersucht werden. Da in diesen Materialien häufiger „atypische“ Mykobakterien vorkommen, ist die Aussagekraft des Nachweises säurefester Stäbchen in diesen Proben für das Vorliegen einer Tuberkulose in der Regel gering.

Ein negativer mikroskopischer Befund spricht also nicht gegen eine aktive Tuberkulose, auch nicht gegen eine „offene Tuberkulose“. Ein mikroskopisch positiver Befund beweist andererseits auch nicht das Vorliegen einer Tuberkulose, da es zu Kreuzreaktionen mit anderen Erregern bei der Färbung kommen kann (12).

### 1.2.2.2 Entwicklung der mikroskopischen Diagnostik der Tuberkulose

#### 1.2.2.2.1 Ziehl-Neelsen (ZN)-Färbung

Seit sich F. Ziehl und F.C. Neelsen (23) die Säurefestigkeit der Mykobakterien in ihrer vor rund 120 Jahren erstmals beschriebenen Färbemethode zunutze machten, ist diese ZN-Färbung bis heute in der mykobakteriellen Diagnostik im Wesentlichen unverändert im Einsatz.

Als modifizierte Form ist auch die Auramin-Rhodamin Färbung im Einsatz, dabei wird ein fluoreszierender Farbstoff (Auramin) statt Fuchsin eingesetzt.

Der mit rund 60 % auffällig hohe Bestandteil an Lipiden in der Zellwand ist für viele Eigenschaften der Mykobakterien verantwortlich wie Virulenz, intrazelluläre Persistenz, Hydrophobizität, relative Undurchlässigkeit für viele Farbstoffe, Resistenz gegen Laugen und einfache Desinfektionsmittel sowie die in der Diagnostik genutzte Säurefestigkeit. Unter Säurefestigkeit versteht man die charakteristische Eigenschaft von Mykobakterien, einen einmal aufgenommenen Farbstoff trotz nachfolgender Säurebehandlung zu behalten.

Die ZN-Färbung weist einige Mängel auf. Sie färbt nicht alleine Mykobakterien, sondern auch Nocardien, Schistosomen und Cryptosporidien, Pilz- und Bakteriensporen sowie einzelne Spezies der Gattung Rhodokokkus und Korynebakterien (24, 25).

Ein weiteres Problem ist die Sensitivität. Eine Anzahl von mikrobiologischen und histopathologischen Proben, die in der Kultur und/oder PCR positiv auf Mykobakterien getestet werden, zeigen in der ZN-Färbung ein negatives Ergebnis (26). Grund hierfür ist die Abhängigkeit des Ergebnisses von der Keimdichte im Material. Für ein positives Ergebnis muss die minimale Erregerkonzentration ungefähr  $5 \times 10^4$ /ml betragen (27, 28). Bei einer Keimdichte von  $10^4$ /ml ist in nur 60 % der Präparate, bei einer Dichte von  $10^6$ /ml andererseits in nahezu allen Fällen mit einem positiven Ergebnis zu rechnen (5). Die Sensitivität der mikroskopischen Untersuchung beträgt je nach Charakteristik des untersuchten Patientenkollektivs und des Untersuchers 25 - 65 % (29).

#### 1.2.2.2.2 Immunhistochemische Färbung mit einem polyklonalen Antikörper gegen den *M.-tuberculosis-Komplex*

Ein weiteres Verfahren zum Nachweis von *M. tuberculosis* machten sich Wiley et al. (30) zunutze. Wiley hat ein gegen das *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin gerichtetes polyklonales Antiserum (pAbBCG) eines Kaninchens benutzt und dieses als Marker für den *M.-tuberculosis-Komplex* eingesetzt. Dadurch wurden in Gewebeschnitten nicht nur intakte Mykobakterien, sondern auch Teile und Überreste der Bakterien nachgewiesen. In einer Arbeit von Orrell et al. (31) wurde in Lungengewebeschnitten von tuberkulösen langzeitinfizierten Mäusen mittels pAbBCG der Befall mit *M. tuberculosis* nachgewiesen, wogegen die ZN-Färbung ein negatives Resultat ergab. Seiler et al. (12) vermuteten in diesem Zusammenhang, dass es bei Langzeitinfektionen zu einer Zellwandveränderung der Tuberkulosebakterien kommt und dadurch die Bakterien nicht mehr angefärbt werden können.

Von klinischer Relevanz ist dies deshalb, weil diese Tuberkulosebakterien weiterhin virulent sein könnten.

Auch bei der Färbung mit pAbBCG sind Kreuzreaktionen beschrieben, wie bei *M. leprae*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Rhodococcus equi*, *N. asteroides*, *Phycomyces spez.*, *Candida spez.* oder *Aspergillus fumigatus* (32, 33, 34, 35). Da der pAbBCG den *M.-tuberculosis-Komplex* markiert, werden neben *M. tuberculosis* auch *M. bovis*, *M. avium* und *M. paratuberculosis* angefärbt (33, 36).

Bei dieser Färbung wird, wie schon oben erwähnt, ein polyklonaler Antikörper von Kaninchen eingesetzt, der gegen *M. bovis* BCG gerichtet ist. Diese Probe, die nun - gekoppelt an den Mykobakterien-Komplex - den pAbBCG beinhaltet, wird mit einem weiteren Antikörper inkubiert. Hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper der Ziege, gekoppelt an alkalische Phosphatase (AP), der gegen die Antikörper des Kaninchens gerichtet ist. Um nicht gebundene Antikörper aus der Probe zu entfernen, wird mit einer mit Triethanolamin gepufferten Salzlösung nachgespült. Zuletzt wird die Probe mit einem dritten, erneut an AP gekoppelten monoklonalen Antikörper inkubiert, diesmal vom Esel gerichtet gegen die Ziege. Der durch diese Prozedur erhöhte AP-Gehalt wird durch den Einsatz von Naphtholphosphat und Neufuchsin als Substrat von AP sichtbar gemacht. Anschließend wird

noch mit Hämalaun gegengefärbt. Diese Färbemethode konnte sich bislang nur im Gebrauch mit Gewebeproben etablieren (30, 32, 37, 38, 39).

#### 1.2.2.3 Nukleinsäureamplifikationstechniken

Wesentliche Fortschritte wurden beim Direktnachweis von Mykobakterien im klinischen Untersuchungsmaterial erzielt.

Durch verschiedene Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) werden bestimmte spezifische Sequenzen der DNA oder der RNA *in vitro* vermehrt und anschließend mit geeigneten Methoden nachgewiesen. Der Nachweis betrifft hier nur einzelne Nukleinsäureabschnitte und nicht das gesamte Mykobakterium. Gängige Verfahren sind PCR (polymerase chain reaction), TMA (transcription-mediated amplification) und LCR (ligase chain reaction).

Neben der Schnelligkeit zeichnen sich die molekularen Techniken methodisch durch eine höhere Spezifität und gegenüber der Mikroskopie durch eine verbesserte Sensitivität aus. Diese Sensitivität liegt bei bakterienärmeren, mikroskopisch negativen Proben allerdings bei lediglich 60 - 80 % und ist somit noch nicht zufriedenstellend. Somit können auch negative NAT-Resultate eine Tuberkulose nicht sicher ausschließen. Auch als Therapiekontrolle eignen sich NAT nicht, da auch DNA oder RNA von nicht mehr lebensfähigen Bakterien nachgewiesen wird (9, 26, 40, 41, 42, 43, 44).

#### 1.2.2.4 Kultureller Nachweis

Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, wird von jeder Probe eine Kultur angelegt.

Als optimal für den kulturellen Nachweis haben sich die Dekontamination des Probenmaterials mit N-Acetyl-L-Cystein-NAOH - hierdurch wird die in jedem Präparat zu findende Begleitflora reduziert - und das Anlegen in Flüssig- und Festmedien erwiesen.

Durch die lange Generationszeit von Tuberkulosebakterien müssen eine Flüssigkultur bis zu sechs Wochen, eine Festkultur bis zu 10 Wochen bebrütet werden. Nach Anzüchtung liegt dann genügend Material vor, um die Kultur zu identifizieren (45).

### 1.2.2.5 Identifizierung von Mykobakterien

Bei jedem Nachweis säurefester Stäbchen muss für die klinische Relevanz des Befundes eine Speziesidentifizierung erfolgen, da es neben dem *M.-tuberculosis-Komplex* (*M. tuberculosis* einschließlich der Varianten *M. africanum*, *M. bovis* und BCG) noch mehr als 80 verschiedene „atypische“ Mykobakterien mit unterschiedlicher medizinischer und pathogener Bedeutung gibt. Vorrangig steht jedoch hier die Unterscheidung zwischen Tuberkulosebakterien und „atypischen“ Mykobakterien, die besonders schnell durch den Einsatz von kommerziell erhältlichen Gensonden erbracht werden kann. Ist die Gensonde für *M.-tuberculosis-Komplex* positiv, so muss im Routinelabor stets noch die Identifizierung der Tuberkulosebakterien mit konventionellen Mitteln erfolgen. Dies bedeutet bei einer bewachsenen Kultur:

1. ZN-Färbung, zum Nachweis, ob überhaupt Mykobakterien vorhanden sind;
2. DNS-Sonden, zur Unterscheidung zwischen Tuberkulosebakterien und „atypischen“ Mykobakterien;
3. Subkultur, falls auf eihaltigen Nährböden keine ausreichend bewachsene Kultur vorliegt;
4. Identifizierung von *M. tuberculosis* durch Beurteilung der Koloniemorphologie, Prüfung von Niacinbildung, Nitratreduktase und Pyrazinamidempfindlichkeit;
5. weitere Differenzierungstests, falls die Diagnose von *M. tuberculosis* durch Koloniemorphologie, Niacinbildung und Nitratreduktion nicht bestätigt werden kann, wie Tabelle 1 ausweist.

Tabelle 1: Differenzierung von Tuberkulosebakterien aufgrund biochemischer Merkmale, MiQ 5: Tuberkulose/ Mykobakteriose (5)

Spezies	Niacin-Test	Nitrat-Reduktion	O <sub>2</sub> -Bedarf Lebek-Agar <sup>c</sup>	Empfindlichkeit <sup>d</sup> gegen		
				BSH	Cycloserin <sup>g</sup>	Pyrazinamid <sup>g</sup>
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	Hoch	- (+) <sup>e</sup>	+	+
<i>M. bovis</i>	-	-	Niedrig	+ <sup>f</sup>	+	-
<i>M. bovis BCG</i>	-(+) <sup>b</sup>	-	Hoch	+	-	-
<i>M. africanum</i> <sup>a</sup>	+/-	+/-	Niedrig	+	+	+
<i>M. microti</i>	+/-	+/-	Niedrig	+	+	+

<sup>a</sup> Es sind verschiedene Typen von *M. africanum* beschrieben worden.

<sup>b</sup> Die meisten Stämme sind Niacin-negativ.

<sup>c</sup> Hoher Sauerstoffbedarf ist erkennbar am Oberflächenwachstum mit „Kletterphänomen“, niedriger Sauerstoffbedarf ist erkennbar am Wachstum der Bakterien in einer Tiefe von 10mm unter der Oberfläche.

<sup>d</sup> + = sensibel, entspricht = kein Wachstum

<sup>e</sup> Besonders bei Tuberkulosepatienten aus Südostasien werden Stämme von *M. tuberculosis* isoliert, die gegen Benzschleimsäurehydrazid (BSH) bzw. Thiophen-2-carbonsäurehydrazid (TCH) empfindlich sind. Weil sie sich sonst wie Stämme von *M. tuberculosis* verhalten, ist ihre Bezeichnung als *M. tuberculosis* gerechtfertigt.

<sup>f</sup> Die Prüfung der BSH/TCH-Empfindlichkeit bei INH-Resistenten *M. bovis*-Stämmen ist nicht möglich.

<sup>g</sup> Mittels Empfindlichkeitsprüfung zu ermitteln.

Dem einsendenden Arzt muss sofort das richtungweisende Differenzierungsergebnis mittels DNA-Sonde oder andere Schnellmethoden mitgeteilt werden. Es darf nicht gewartet werden, bis das Differenzierungsergebnis der konventionellen biochemischen Testung vorliegt, da diese wegen der Subkulturen zu viel Zeit beansprucht (5).

Zeigt sich die Gensonde für *M. tuberculosis* negativ, dann handelt es sich in der Regel um „atypische“ Mykobakterien, die ebenfalls zu identifizieren sind.

#### 1.2.2.6 Empfindlichkeitsprüfung

Es empfiehlt sich wegen der Zunahme der Resistenzlage gegen ein oder mehrere Antituberkulotika, bei jedem neu entdeckten Fall eine Empfindlichkeitsprüfung durchzuführen. Diese Prüfung sollte ebenso erfolgen, wenn zwei Monate nach Therapiebeginn noch Tuberkulosebakterien nachweisbar sind (5).

## 1.4 Therapie

Die Behandlung der Tuberkulose beruht auf einer Mehrfachkombination von Antituberkulotika und erstreckt sich über mehrere Monate. Gründe dafür sind die verhältnismäßig lange Generationszeit der Mykobakterien und die Gefahr einer raschen Resistenzentwicklung bei Monotherapie. Als Standard-Kurzzeittherapie wird bei der Lungentuberkulose folgende Chemotherapie über sechs Monate angesehen: In der Initialphase erfolgt über einen Zeitraum von zwei Monaten eine Kombinationstherapie (4er-Therapie) mit Rifampicin (RMP), Isoniazid (INH), Pyrazinamid (PZA) und Ethambutol (EMB) oder Streptomycin (SM). Anschließend werden in der Stabilisierungsphase für weitere vier Monate INH und RMP gegeben.

Im Kindesalter lässt sich während der Initialphase die Anzahl der Medikamente auf drei reduzieren (INH, RMP und PZA), soweit kein erhöhtes Risiko für eine Resistenz gegen Antituberkulotika besteht.

Die Kurzzeittherapie ist nur dann erfolgreich, wenn die Medikamente gut vertragen werden, keine Resistenzen vorliegen und eine gute Compliance des Patienten besteht.

Zeigt die Kultur erst später als nach drei Monaten nach Therapiebeginn ein negatives Ergebnis oder liegt ein ausgedehnter Befund vor, so verlängert sich die Initialtherapie auf weitere sechs Monate nach kultureller Negativierung. Eine längere Therapiedauer wird auch oft bei HIV-positiven Patienten empfohlen. Bei Behandlung der HIV-Erkrankung mit Proteinase-Inhibitoren oder nichtnukleosidischen Inhibitoren der reversen Transkriptase sollte wegen der vielen Wechselwirkungen mit RMP immer ein in der Therapie der HIV-Tuberkulosekoinfektion erfahrener Arzt hinzugezogen werden.

Liegt ein Stamm mit einer Multiresistenz vor, so wird nach Austestung aller zur Verfügung stehenden Medikamente und nach individuellem Resistenzmuster therapiert (13).

Entscheidend für eine effektive Tuberkulosebekämpfung sind die frühzeitige Erkennung und die konsequente Behandlung der Erkrankung, da gerade durch Abbruch der Therapie und Persistenz der Erreger die Zahl der resistenten Erreger steigt (1, 46, 47, 48).

## 2. Fragestellung der Arbeit

In der mikrobiologischen Diagnostik der Tuberkulose gilt die positive Kultur als endgültiger Beweis für das Vorliegen einer aktiven Erkrankung. Da die Auswertung einer Kultur jedoch bis zu zehn Wochen Zeit beanspruchen kann, ist eine Verdachtsdiagnose mittels Mikroskop von säurefesten Stäbchen für einen schnellen Therapiebeginn entscheidend.

Seit Beginn des 20. Jahrhunderts wird das Probenmaterial nach der ZN-Methode gefärbt.

Bisher hat sich - abgesehen von der modifizierten Form mit Auramin - noch keine neue Färbemethode etablieren können, obwohl gegen die ZN-Färbung zwei wesentliche Einwände vorzubringen sind:

- zu geringe Sensitivität, denn bei einer Keimdichte von  $10^4$ /ml werden nur 60 % der Proben als positiv erkannt, sowie
- niedrige Spezifität, denn auch Nocardien, Schistosomen und Kryptosporidien werden angefärbt.

Daher hat sich die vorliegende Arbeit zur Aufgabe gestellt, die Tauglichkeit einer Alternativmethode zur ZN-Färbung durch den Einsatz eines polyklonalen Antikörpers gegen den *M.-tuberculosis-Komplex* (pAbBCG) in der mikrobiologischen Diagnostik zu überprüfen.

Folgende Fragen stehen im Mittelpunkt dieser Untersuchung:

1. Welche Auswirkungen haben Materialauswahl und Materialbeschaffenheit auf den Erfolg der pAbBCG-Färbung?
2. Wie sensitiv und spezifisch ist die pAbBCG-Färbung unter Standardbedingungen und wie verhalten sich Sensitivität und Spezifität bei Materialien der Routinediagnostik?
3. Welche zusätzlichen Informationen liefert eine immunhistochemische Färbung mit pAbBCG für die mikrobiologische Diagnostik?

Die Fragestellung nach der Auswahl der geeigneten Materialien umfasst den Einsatz der geeigneten Objektträger, die richtige Art der Fixierung und die Überprüfung der zu verwendenden Proben.

Wie sensitiv die pAbBCG-Färbung zum Vergleich nach ZN ist, soll mittels einer Verdünnungsreihe gezeigt werden. Um die Spezifität der pAbBCG-Färbung zu ermitteln, sollen Standortflora und Erreger von Infektionen der oberen/unteren Atemwege auf ihre Kreuzreaktivität überprüft werden.

Die Antworten auf die drei Kernfragen sollen Aufschluss darüber geben, ob und unter welchen Bedingungen die pAbBCG-Färbung als Alternative zur ZN-Färbung in der mikrobiologischen Diagnostik in Frage kommen könnte.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien und andere Substanzen

- NALC - Methode
  - 4 %ige NaOH
  - 2,9 %ige Na<sub>3</sub> Citrat- Lösung
  - N-Acetyl-L-Cystein (NALC) (Firma: Sigma A-7250)
  - Aqua dest. steril (Aqua Spüllösung Delta Pharma)
  - PACT-Polymyxin, Amphotericin, Carbenicillin, Trimethoprim (Mycobacteria Selectatab (Kirchner), Mast Diagnostics)
  - NaCl (Kochsalz Spüllösung 0.9 % Delta Pharma)
  
- ZN-Färbung
  - Karbolfuchsinlösung (Merck)
  - 3 %iger NaCl-Alkohol
  - Methylenblau (Merck)
  
- Gram-Färbung
  - Victoriablaulösung (Merck)
  - Lugolsche Lösung (Merck)
  - Chinin-Alkohollösung
  - Fuchsinlösung (Merck)

- pAbBCG-Färbung
  - 0,2 M Tris-Puffer pH 9,0
  - 48,44g Tris [Trizam<sup>®</sup> Base] T-1503
  - Aqua dest. steril (Aqua Spüllösung Delta Pharma, Firma: Delta Pharma GmbH)
  - 10 %ige HCl (ca. 16ml)
- Neufuchsin
  - 3g Neufuchsin (Sigma N-0638)
  - 120ml Aqua dest. steril (Aqua Spüllösung Delta Pharma, Firma: Delta Pharma GmbH)
  - 30ml HCl conc.
  - TBS (Tris Buffered Saline, pH 8.0 ( Sigma T-6664 Lot 110K8210))
  - Levamisol 5g (Firma: Sigma L9756)
  - Naphtol AS-Biphosphat (Sodium Salt) 5g (Firma: Sigma N2250)
  - Dimethylformamid (DMF, Merck)
  - Haemalaun (Merck)
- Antikörper
  - Antibody rabbit anti BCG Ig-Fraktion (Code Nr. B0124, 2,0ml, Firma: Dako)
  - Antibody goat anti rabbit (Antibody Alk.Phos.AP goat anti rabbit IgG(H+L) MinX, Code Nr. 111-055-045, 1ml, Firma: Dianova)
  - Antibody donky anti goat (Antibody Alk.Phos.AP donky anti goat IgG(H+L) MinX, Code Nr. 705-055-147, 0,5ml, Firma: Dianova)
- *Mycobacterium bovis* BCG (Stamm Pasteur), TMC 1011, ursprünglich von Dr. R.J. North, Trudeau Institute (Saranac Lake, New York)
- Überziehen der Präparate mit Gelatine (Kaisers Glyceringelantine für die Mikroskopie, Code 1.09242.0100, 100g, Firma: Merck)
- Kulturmedien
  - Löwenstein-Jensen (BD)
  - Stonebrinck-Agar (BD)
  - BBL MGIT - Indikatorröhrchen (BD)

### - Patientenmaterialien

Es wurden 550 Proben von Patienten im Zeitraum Januar bis November 2002 im Mikrobiologischen Institut des Benjamin Franklin Klinikums auf Tuberkulose untersucht. Das mittlere Alter der beteiligten Patienten lag bei 57 Jahren +/- 16,89 Standardabweichung. Die Geschlechterverteilung Frauen zu Männern lag bei 113 zu 238. Um dem Datenschutz zu genügen, wurden die Patientennamen durch Nummern anonymisiert. Da von einigen Patienten mehrere Proben in dem genannten Zeitraum eingingen, übersteigt die Anzahl der Proben die der Patienten.

Die Proben verteilten sich wie folgt:

Bronchiallavage (BAL): 335 Proben; Sputum: 36; Pleurapunktat: 33; Magensaft: 30; Bronchialsekret: 22; Abstrich: 17; Trachealsekret: 12; sonstige Biopsie: 12 (es wurde keine genaue Zuordnung vermerkt); Lymphknoten: 9; Liquor: 9; sonstige Punktat: 8 (ohne genaue Zuordnung); Knochenmark-Punktat: 5; sonstige PE: 5(ohne genaue Zuordnung); Aszites: 4; Perikarderguss: 2 und je einmal Blasensekret, Wundsekret, Stimmlippe, Synovialflüssigkeit, Bürstensaummaterial, Drainageflüssigkeit, Ergusspunktat, Gewebe, Abszessflüssigkeit, Kniepunktat und Leberzylinder.

### 3.1.2 Geräte

- Coverplate Casette (# 7331017, Firma Shandon)
- Objektträger:
  - Normaler Glasobjektträger
  - Histobond Objektträger (75x25x1mm, Firma Superior Marienfeld)
  - Diagnostika Objektträger (75x25x1mm aus extra weißem Glas, weißer Mattrand, 3 Kammern Ø 14mm, schwarz, Firma Roth, Best.Nr. L196.1, stand. Ausführung Epoxy)
- Glasplättchen zum Eindeckeln
- Pipettenspitzen (Firma: Eppendorf)
- Mikroskop (für die Photographien: Leica DMLB Mikroskop (Firma: Leica), ausgerüstet mit einer Hitachi HV-C20A 3CCD Videokamera)
- Programme (zum Archivieren der Bilder: DISKUS Programm, Version 42 034 (Hilgers, Königswinter), zur Weiterverarbeitung: Power Point Software (Microsoft))

- Zentrifuge: Varifuge (Firma: Heraeus)
- Heizgerät

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Vorbehandlung des Probenmaterials

Alle verwendeten Proben wurden nach der NALC - Methode vorbehandelt. Dies reduziert in der Probe die schnell wachsende Begleitflora, verhindert in der anschließend angelegten Kultur ein Überwuchern der langsam wachsenden Mykobakterien und sichert in der Begutachtung deren Erkennung.

NALC-NaOH (N-Acetyl-L-Cystein-Natronlauge) wird aus 100ml 4 %iger NaOH, 100ml 2,9 %iger  $\text{Na}_3$  Citrat-Lösung und 1g N-Acetyl-L-Cystein (NALC) hergestellt und ergibt 200ml NALC-NaOH-Lösung. Bis zu 10ml Probenmaterial wird mit gleicher Menge NALC-NaOH-Lösung in ein 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben und gut verschlossen 5 - 20 sec lang mit einem Vortex-Gerät gemischt. Nach 20 min Einwirkzeit wird die Mischung mit Aqua dest. steril bis zur 40ml Marke aufgefüllt. Nach nochmaligem Vortexen wird die Mischung bei 4000g 20 - 25 min zentrifugiert. Der dann entstandene Überstand wird unter dem Abzug in einen Behälter mit Desinfektionsmittel abgegossen. Von dem Sediment werden zwei Tropfen auf einen Diagnostika Objektträger (für die ZN-Färbung) und je zwei Tropfen auf verschiedene Felder eines weiteren Diagnostika Objektträgers (für die pAbBCG-Färbung) gegeben und für 24 h bei 60 °C fixiert. Das restliche Sediment wird mit 1 - 2ml PACT-Lösung (Polymyxin, Amphotericin, Carbenicillin, Trimethoprim) resuspendiert und anschließend sofort auf PACT-Kulturmedien (Löwenstein-Jensen und Stonebrinck-Ager) und in BBL MGIT-Indikatorröhrchen (Flüssigmedium) verimpft. Soweit vorhanden, wird das restliche Sediment in 1,5ml Eppendorf-Tubes tiefgefroren.

### 3.2.2 Färbemethoden

Das Protokoll für die Gram- und ZN-Färbung wurde dem Institut für Infektionsmedizin der Charité, Campus Benjamin Franklin entnommen. Das Protokoll für die Färbung mit einem polyklonalen Antikörper basierte auf der Methode nach Wiley et al (30), welches leicht modifiziert auch im Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie Anwendung fand.

#### 3.2.2.1 Gram-Färbung

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität wurden ausgewählte Erreger zur besseren optischen Darstellung nach Gram- und nach pAbBCG-Protokoll gefärbt.

Bei der Gram-Färbung wird das Präparat - fixiert auf einem Diagnostika Objektträger - zuerst für 2 min in eine Victoriablauösung gegeben und anschließend mit Leitungswasser gespült. Nachdem das Präparat 2 min in einer Lugolschen Lösung verbracht hat, wird wieder mit Leitungswasser gespült, dann zur Differenzierung mit einer Chinin-Alkohollösung entfärbt. Nach wiederholter Spülung mit Leitungswasser wird 1 min mit einer Fuchsinlösung gegengefärbt. Abschließend wird nochmals mit Leitungswasser gespült.

Es wurden folgende Erreger auf ihre Kreuzreaktivität untersucht:

- *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*,
- *Haemophilus influenzae*,
- *Moraxella catarrhalis*,
- *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,
- *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium amycolatum*,
- *Neisseria gonorrhoeae*,
- *Escherichia coli*,
- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Proteus mirabilis*,
- *Enterococcus*,
- *Enterobacter cloacae*,
- *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*,
- *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*,
- *Serratia liquefaciens*,

- *Salmonella typhimurium*,
- *Stenotrophomonas maltophilia*,
- *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia paucivirans*, *Nocardia otitidiscaviarum*.

### 3.2.2.2 ZN-Färbung

Jede Probe, die in der mikrobiologischen Diagnostik einging, wird nach ZN und mit dem pAbBCG gefärbt.

Der Objektträger mit der Probe wird mit einer Karbolfuchsinlösung bedeckt und mit ruhiger Bunsenbrennerflamme erwärmt.

Nach ca. 5 min Abkühlzeit wird der Objektträger mit Leitungswasser abgespült und mit 3 %igem HCl-Alkohol entfärbt, bis keine Farbwolken mehr abgehen. Anschließend wird nochmals gut mit Leitungswasser abgespült.

Dann wird mit Methylenblau (nach Löffler) 30 - 60 sec gegengefärbt und wieder mit Leitungswasser abgespült. Der Objektträger wird luftgetrocknet und anschließend beurteilt.

### 3.2.2.3 Färbung des Materials mit pAbBCG

Das auf einem Objektträger fixierte Präparat wird zu Beginn mit 100µl TBS benetzt. Da in der Coverplate Cassette das TBS die Oberfläche des Präparates durch die herrschenden Kapillarkräfte durchläuft, kommt es nicht zu einer nennenswerten Verdünnung der nachfolgenden Lösungen – im Gegensatz zu der Verwendung eines Diagnostika Objektträgers, bei dem die jeweils verabreichten 100µl Lösung auf dem Präparat bleiben. Hier wird jeweils vor Verabreichen einer neuen Substanz die zuvor aufgetragene Substanz abgegossen.

Anschließend werden je 100µl des ersten Antikörpers (Kaninchen gegen BCG 1:100 mit TBS verdünnt) auf jeden Objektträger oder jedes benutzte Feld gegeben. Nach einstündiger Inkubation wird mit 100µl TBS gespült und der zweite Antikörper verabreicht, gekoppelt an AP (Ziege gegen Kaninchen wieder 1:100 mit TBS verdünnt). Nach 1 h Inkubationszeit wird auch jetzt mit 100µl TBS gespült und der dritte Antikörper, auch gekoppelt an AP (Esel gegen Ziege, 1:100 mit TBS verdünnt) verabreicht und nach 1 h erneut mit 100µl gespült. Die behandelten Objektträger werden nun in eine Küvette mit TBS gegeben.

In der Zwischenzeit wird die AP-Färbelösung wie folgt vorbereitet:

Für eine Küvette werden 250ml Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 9,0 in einen Erlenmeyerkolben gegeben und diese mit 0,0625g Levamisol vermischt, um die endogene AP Aktivität zu blocken. In einem kleinen Becherglas werden dann 750µl DMF mit 0,0625g Naphthol gemischt, 1 min stehen gelassen und anschließend in den Erlenmeyerkolben zugegeben. In einem Tube werden dann 1875µl Neufuchsin mit 1875µl Na-Nitrit vermischt und kurz vor der Färbung der Objektträger mit in den Erlenmeyerkolben gegeben. Die Färbelösung wird dann zügig in eine Küvette gegeben, die Objektträger hineingestellt und in eine Dunkelkammer gebracht, da diese Lösung bei Licht zerfällt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wird mit deionisiertem Wasser gespült und 3 min lang zur Kernfärbung mit Hämalaun gefärbt. Danach wird mit Wasser gut abgespült.

Die luftgetrockneten Objektträger werden mit Gelatine eingedeckelt, um zu verhindern, dass sich das Präparat nach Benetzen mit Öl ablöst.

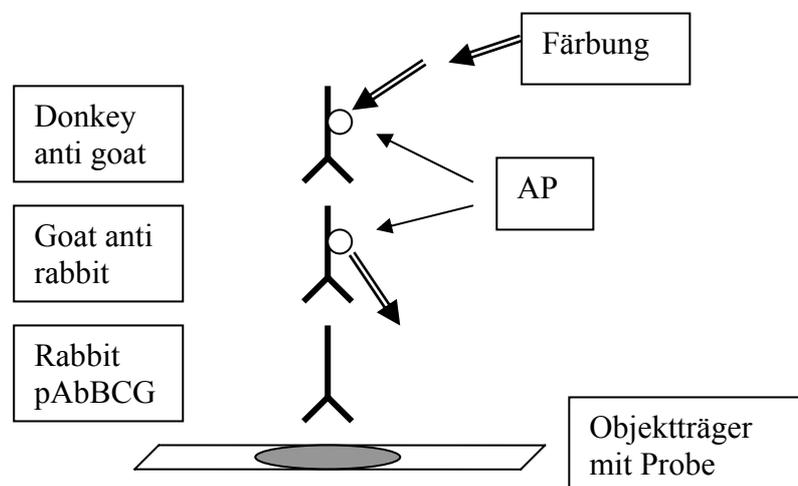


Abbildung 1: Schematische Darstellung einzelner an die Alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelter Antikörper in der pAbBCG-Färbung

### 3.2.3 Kultur

Die vorbehandelten Proben werden zur Kultivierung - wie oben unter „3.4 Vorbehandlung des Probenmaterials“ beschrieben - auf drei verschiedene Nährböden verimpft. Diese werden dann bei 37 °C und bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 70 % aufbewahrt. Die Flüssigkultur wird zweimal pro Woche, die Festkulturen ein- bis zweimal pro Woche beurteilt. Wenn mikroskopischer, PCR- und kultureller Befund übereinstimmen, wird der Befund nach der 10. Woche als Endbefund versandt. Kommt es zu Unstimmigkeiten, so wird nach 10 Wochen ein „vorläufiger“ oder „Zwischen-Befund“ und erst nach weiteren vier Wochen der Endbefund versandt. Es gilt weiterhin die Kultur als endgültiges Beurteilungskriterium.

### 3.2.4 PCR

Tabelle 2: BD-Kurzprotokoll für den ProbeTec TB Workflow

1.	Aufbereitung der Sedimentproben nach der NALC-OH - Methode in der Sicherheitswerkbank, in sehr dringenden Fällen wird die Probe direkt genommen und mit PACT versetzt.	
2.	Je Probe Zugabe von 100µl Puffer 2 (Lysis-Puffer)	
3.	Lyse der Probe bei 65 °C für 45 min	
4.	Je Probe Zugabe von 600µl Puffer 3 (Neutralisations-Puffer).	
	<b>Vorbereitung:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Erstellen des Plattenberichtes am ProbeTec</li> <li>• Vorbereitung der Primer- und Amplifikations-Schälchen</li> </ul>	<b>Aufbereitung der Qualitätskontrollen</b> Zugabe von 100µl Puffer 2 und 600µl Puffer 3 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gründlich vortexen (5 sec)</li> </ul>
5.	Transfer in Primer-Schälchen	
6.	Inkubation der Primer-Mikrotiterplatten für 20 min (max. 6 h) bei Raumtemperatur	
7.	10 min Inkubation der Primer- und Amplifikations-Mikrotiterplatten bei 72,5 °C	
8.	Probentransfer von Primer- in Amplifikationsschälchen und Versiegelung mit Klebefolie	
9.	Überführung der versiegelten Amplifikationsplatte in das ProbeTec (Amplifikation bei 54 °C)	

### 3.2.5 BCG-Verdünnungsreihe

Es werden 2ml BCG-North in 200ml Middlebrook Boullion + OADC mit 80µl Tween 20 (0,04 %) auf einem Schüttler mit 120 U/min bei 37 °C bebrütet. Sobald eine Trübung im Kolben zu erkennen ist, wird bei 3500 U/min bei 4 °C 20 min lang abzentrifugiert.

Nach Aliquotieren und Einfrieren der Probe wird durch Ausplattieren auf Middelbrook-Agar die Keimzahl überprüft.

#### 3.2.5.1 Herstellung der Verdünnungsreihe

In fünf 1,5ml Eppendorf-Gefäße werden 900µl TBS eingefüllt. In das erste Gefäß werden 100µl aus einer BCG-Lösung mit der Konzentration von  $10^6$  pro ml dazugegeben. Nach Vortexen dieser Lösung werden aus dem ersten Gefäß 100µl entnommen und in das zweite Gefäß überführt, dadurch erhält man eine Konzentration von  $10^5$ . Aus diesem werden dann nach Vortexen wiederum 100µl in das dritte Gefäß ( $10^4$ ) überführt bis zum fünften Gefäß ( $10^1$ ).

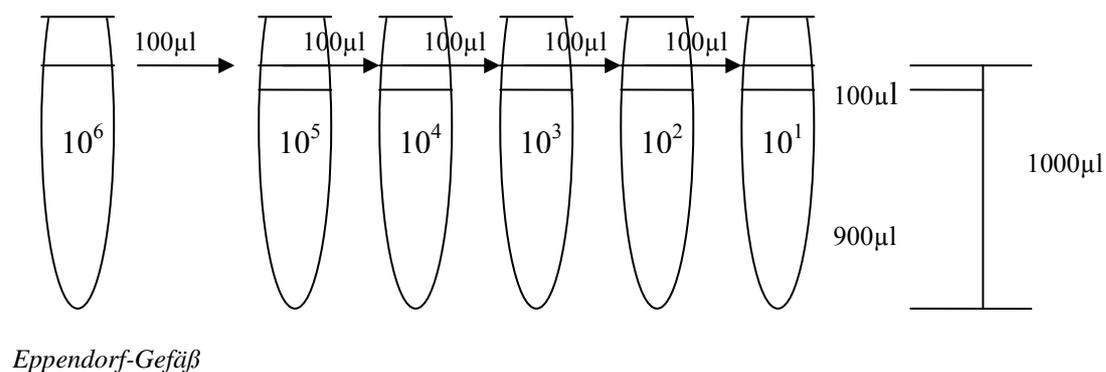


Abbildung 2: Schematischer Herstellungsablauf einer Verdünnungsreihe von *M. bovis* BCG

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Auswahl der geeigneten Objektträger

Bevor die eigentlichen Versuchsreihen gestartet werden konnten, mussten erst die geeigneten Objektträger ausgewählt werden.

Es wurden normale Glasobjektträger, Histobond Objektträger und Diagnostika Objektträger auf ihre Kompatibilität mit der Coverplate Cassette und mit der Haftung von Probenmaterial verglichen. Auf allen drei Sorten wurde eine Lösung mit  $10^6$  *M. bovis* BCG/ml aufgebracht und diese in die Coverplate Cassette eingespannt. Dann wurde nach Protokoll mit pAbBCG gefärbt und ausgewertet.

Sowohl bei den normalen Glasobjektträger sowie bei den Histobond Objektträger wurden durch die Sogkräfte der größte Teil der Proben weggespült. Die Diagnostika Objektträger haben sich in Verbindung mit der Coverplate Cassette als völlig ungeeignet gezeigt, da die Flüssigkeit wegen der dicken Beschichtung des Objektträgers den Trichter nicht verlassen und so die Probe nicht benetzen konnte.

Es wurde nun das Ergebnis mit einem normalen Glasobjektträger in der Coverplate Cassette und einem Diagnostika Objektträger mit einem stehenden Tropfen über dem Feld verglichen. Das Ergebnis zeigte einen klaren Vorteil für das Verfahren mit Diagnostika Objektträgern ohne Coverplate Cassette, da bei dieser Kombination am wenigsten Material verloren ging, während bei den normalen Glasobjektträgern und den Histobond Objektträgern ein Zerfließen des Präparates bei den in der Coverplate Cassette eingespannten Objektträgern zu beobachten war.

### 4.2 Ermittlung der geeigneten Fixierung des Materials auf dem Objektträger

Es wurden verschiedene Fixierungen mit nach pAbBCG-Protokoll zu färbenden Präparaten durchgeführt. Zuerst wurde das gleiche Verfahren wie bei der ZN-Färbung angewendet. Nach dem Aufbereiten der Probe und dem Aufbringen auf den Objektträgern wurde das Präparat für 4 h bei 50 °C und anschließend durch das dreimalige Ziehen durch die harte Bunsenbrennerflamme hitzefixiert. Bei der Fixierung durch den Bunsenbrenner zeigte sich, dass sich die Antikörper während der Färbung dann nicht mehr an dem Material binden

konnten, wenn das nach pAbBCG zu färbende Präparat zu lange in der Bunsenbrennerflamme erhitzt wurde.

Bei der ZN-Färbung blieb dieser Effekt auch bei einem versehentlichen Verbrennen aus.

Auf dem Diagnostika Objektträger zeigte sich dann ein durchaus vergleichbares Ergebnis zur ZN-Färbung, als das Präparat sehr zügig durch die Flamme gezogen wurde.

Um das Ergebnis zu verbessern, wurden Präparate mit einer  $10^6$  konzentrierten BCG-Lösung angesetzt und für jeweils 2, 4 und 72 h bei 50 °C im Brutschrank belassen. Anschließend wurden die Diagnostika Objektträger neunmal, dreimal und überhaupt nicht durch die Flamme gezogen.

Fazit: Je länger die Verweildauer im Brutschrank, umso besser die Fixierung. Der Gebrauch der Flamme hatte dagegen keinen nennenswerten Einfluss auf die Fixierqualität.

In einem weiteren Test wurde die Temperatur des Brutschranks von 50 auf 60 °C erhöht, was zu einer nochmaligen Ergebnisverbesserung führte.

Abschließend wurde versucht, das Material mit Methanol zu fixieren, was aber keine Ergebnisverbesserung erbrachte.

#### 4.3 Überprüfung des Nachweises von BCG

Es wurden *M. bovis* in einer Konzentration von  $10^6$ /ml auf Diagnostika Objektträger gegeben mit folgender pAbBCG Färbe-Anleitung:

- Erster Objektträger (mit BCG versehen) ohne Verwendung des ersten Antikörpers, rabbit anti BCG, weiter nach Protokoll;
- Zweiter Objektträger (mit BCG versehen) ohne Verwendung des zweiten Antikörpers, goat anti rabbit, weiter nach Protokoll;
- Dritter Objektträger (mit BCG versehen) ohne Verwendung des dritten Antikörpers, donkey anti goat, weiter nach Protokoll;
- Vierter Objektträger (mit BCG versehen) vollständig nach Protokoll;
- Fünfter Objektträger (ohne BCG versehen) vollständig nach Protokoll.

Fazit: Nur die Färbung nach dem kompletten Protokoll und nur der Objektträger mit BCG erbrachten eindeutige (Färb-)Ergebnisse.

#### 4.4 Einfluss der Vorbereitung der Proben auf das Färbeverhalten

Um den Einfluss des NALC-NaOH auf das Ergebnis der pAbBCG-Färbung zu ermitteln, wurden auf fünf Objektträger BCG-Proben aufgetragen und diese unterschiedlich lange mit NALC-NaOH versetzt:

Tabelle 3: Einwirkzeiten von NALC-NaOH auf BCG-Proben

1x BCG $10^5$ →	nicht mit NALC versetzt
1x BCG $10^5$ →	5 min mit NALC versetzt
1x BCG $10^5$ →	10 min mit NALC versetzt
1x BCG $10^5$ →	15 min mit NALC versetzt
1x BCG $10^5$ →	20 min mit NALC versetzt

Auf allen Objektträgern wurde folgende Einteilung vorgenommen:

1. Feld = BCG  $10^5$  ohne den 1. Antikörper der pAbBCG-Färbung,
2. Feld = BCG  $10^5$  mit allen Antikörpern der pAbBCG-Färbung,
3. Feld = BCG  $10^5$  mit allen Antikörpern der pAbBCG-Färbung und versetzt mit PACT.

Mit Hilfe des 3. Feldes soll gleichzeitig evaluiert werden, ob das Versetzen mit PACT das Färbeverhalten beeinflusst.

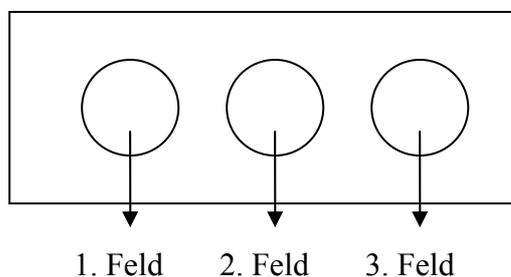


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Feldereinteilung auf einem Objektträger

Im Ergebnis konnte eine Dezimierung der Mykobakterien um 1 log-Stufe (Verringerung um ein Zehntel des Ausgangswertes) bei den mit NALC-NaOH versetzten Proben beobachtet werden. Hierbei war es unerheblich, wie lange die Proben dem NALC-NaOH ausgesetzt war. Das Versetzen mit PACT erbrachte hingegen keine Hinweise auf Unterschiede. Es wurden nochmals zum Vergleich zur ZN-Färbung Präparate angefertigt, welche mit/ohne NALC, mit/ohne PACT und mit Methanol fixierte Proben enthielten.

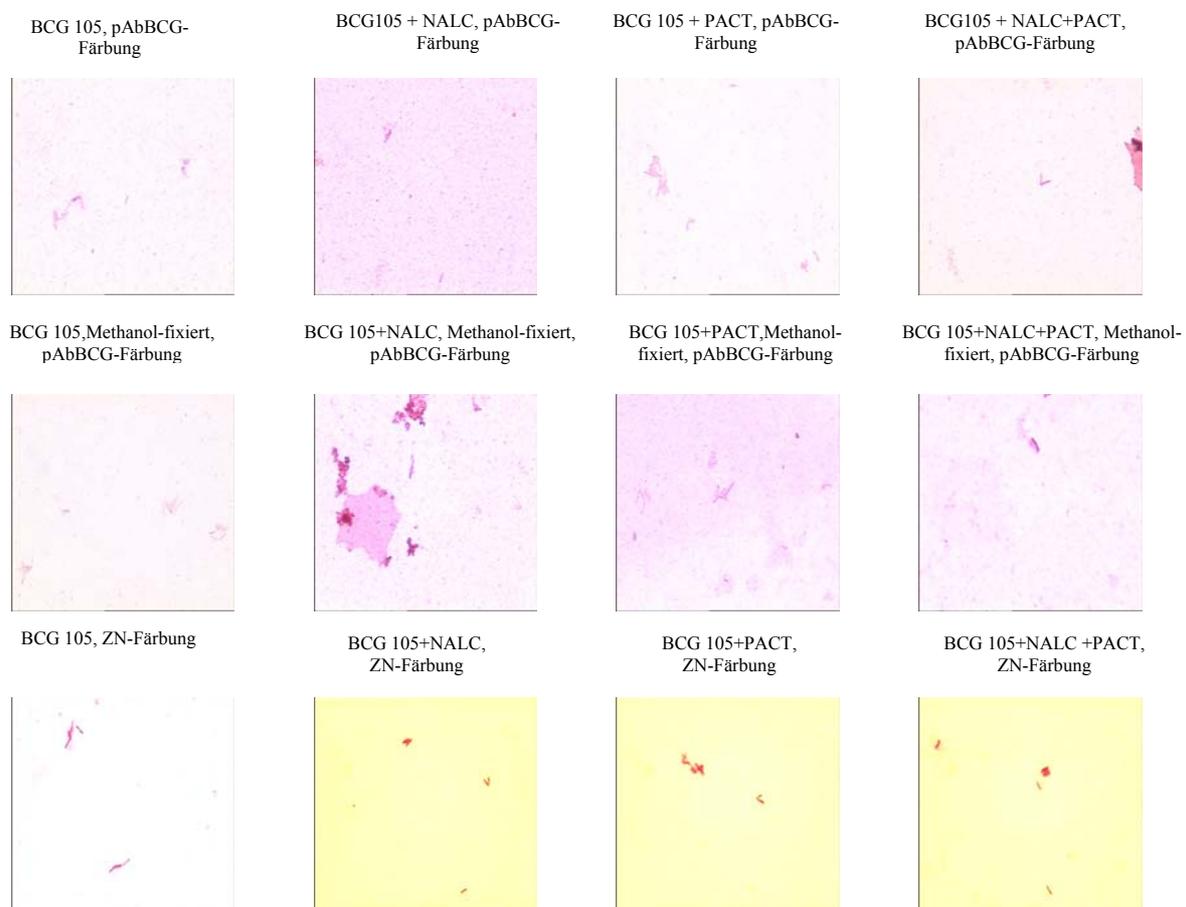


Abbildung 4: Übersicht der nach ZN-Färbung und nach pAbBCG-Protokoll angefertigten Präparate, die mit/ohne NALC, mit/ohne PACT und mit Methanol fixierte Proben enthielten

Auch bei der ZN-Färbung wurden die Mykobakterien um 1 log-Stufe vermindert.

Bei der pAbBCG-Färbung wurden die Ergebnisse bestätigt, doch fiel eine unspezifisch ins Rot gehende Färbung der mit NALC-NaOH versetzten Präparate auf.

#### 4.5 AK- Sensitivität

Nach Anlegen einer Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen mit BCG von  $10^6$  bis  $10^1$ /ml wurden Diagnostika Objektträger zur Färbung nach ZN und zur Färbung nach pAbBCG-Protokoll mit gleichem Material angelegt. Es zeigte sich, dass bei einer Verdünnung bis  $10^4$  die Bakterien bei der ZN-Färbung klar zu erkennen waren, bei weiterer Verdünnung jedoch nicht mehr angefärbt wurden. Die nach pAbBCG-Protokoll gefärbten Proben zeigten bei einer Verdünnung von  $10^1$  Mykobakterien.

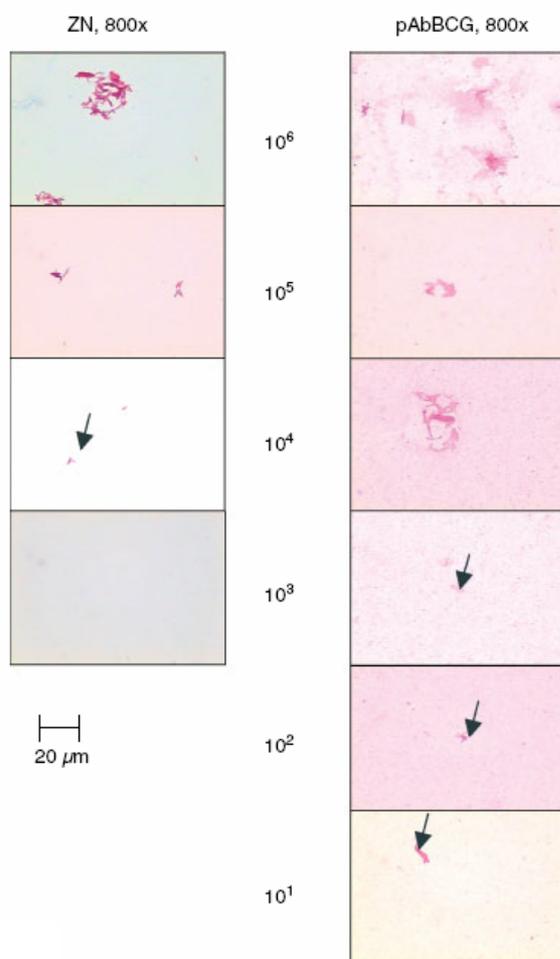


Abbildung 5: Vergleichende Darstellung einer BCG Verdünnungsreihe, gefärbt nach ZN und pAbBCG-Protokoll, entnommen aus: Ulrichs T, Lefmann M, Reich M et al.: Modified immunohistological staining allows detection of Ziel-Neelsen-negative *Mycobacterium tuberculosis* organisms and their precise localization in human tissue (49)

#### 4.6 Kreuzreaktionen

Folgende Erreger wurden auf Kreuzreaktivität bei der Färbung mit pAbBCG untersucht:

*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium amycolatum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Serratia liquefaciens*, *Salmonella typhimurium*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia paucivirans*, *Nocardia otitidiscaviarum*.

Tabelle 4: Ergebnisse der Kreuzreaktionen mit diversen Erregern bei Einsatz eines polyklonalen Antikörpers gegen *M. bovis* BCG vom Kaninchen, Gram- und pAbBCG-gefärbt

Oberer Respirationstrakt	Gattung	Spezies	Gram-Färbung	AbBCG-Färbung	Kommentar
	Streptokokkus	<i>S. pneumoniae</i>	positiv	positiv	Rotfärbung mit 1. AK, ohne 1. AK leichte Lilafärbung
	Streptokokkus	<i>S. pyogenes</i>	positiv	positiv	Rotfärbung mit und ohne 1. AK
	Staphylokokkus	<i>S. epidermidis</i>	positiv	negativ	
	Staphylokokkus	<i>S. aureus</i>	positiv	positiv	Rot-lila Färbung mit und ohne 1. AK
	Haemophilus	<i>H. influenzae</i>	negativ	negativ	
	Moraxella	<i>M. catarrhalis</i>	negativ	negativ	
	Corynebacterium	<i>C. diphtheriae</i>	positiv	positiv	
	Neisseria	<i>N. gonorrhoeae</i>	negativ	negativ	

Tabelle 4: Fortsetzung der Kreuzreaktionen

Unterer Respirationstrakt	Gattung	Spezies	Gram-Färbung	pAbBCG-Färbung	Kommentar
	Streptokokkus	<i>S. pneumoniae</i>	positiv	positiv	Rotfärbung mit 1. AK, ohne 1. AK leichte Lilafärbung
	Streptokokkus	<i>S. pyogenes</i>	positiv	positiv	Rotfärbung mit und ohne 1. AK
	Staphylokokkus	<i>S. aureus</i>	positiv	positiv	Rot-lila Färbung mit und ohne 1. AK
	Haemophilus	<i>H. influenzae</i>	negativ	negativ	
		<i>M. catarrhalis</i>	negativ	negativ	
	Legionella	<i>L. pneumophila</i>	negativ	negativ	
	Escherichia	<i>E. coli</i>	negativ	negativ	
	Pseudomonas	<i>P. aeruginosa</i>	negativ	negativ	
	Klebsiella	<i>K. pneumoniae</i>	negativ	negativ	
	Serratia	<i>S. liquefaciens</i>	negativ	negativ	
Andere	Proteus	<i>P. mirabilis</i>	negativ	negativ	
	Corynebacterium	<i>C. amycolatum</i>	positiv	positiv	
	Enterokokkus	<i>Enterococcus</i>	positiv	positiv	lila Farbgebung, bleibt mit und ohne 1. AK
	Enterobacter	<i>E. cloacae</i>	negativ	negativ	
	Klebsiella	<i>K. oxytoca</i>	negativ	negativ	
	Citrobacter	<i>C. freundii</i>	negativ	negativ	
	Citrobacter	<i>C. diversus</i>	negativ	negativ	
	Serratia	<i>S. liquefaciens</i>	negativ	negativ	
	Staphylokokkus	<i>S. epidermidis</i>	positiv	negativ	
	Nocardia	<i>N. paucivorans</i>	positiv	positiv	
	Nocardia	<i>N. brasiliensis</i>	positiv	positiv	
	Nocardia	<i>N. otitidiscaviarum</i>	positiv	positiv	
	Stenotrophomonas	<i>S. maltophilia</i>	negativ	negativ	
	Salmonella	<i>S. typhimurium</i>	positiv	negativ	

Kreuzreaktionen zeigten sich bei *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *Enterococcus*, *C. diphtheriae*, *C. amycolatum* und Nocardien. *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. aureus* und *Enterococcus* sind von der Morphologie her Kokken. *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *Enterococcus* blieben im Färbeverhalten mit und ohne den 1. AK bei einer roten bis rot-lila Färbung. *C. diphtheriae*, *C. amycolatum* und Nocardien stellen wegen der Ähnlichkeit der Morphologie - es sind alles Stäbchen - ein Problem bei der eindeutigen Differenzierung zu Mykobakterien dar.

Die folgende Abbildung zeigt Aufnahmen von den zur Überprüfung von Kreuzreaktionen genutzten Erregern mittels Gram- und pAbBCG-Färbung sowie einer Kontrollfärbung der pAbBCG-Färbung ohne 1. Antikörper:

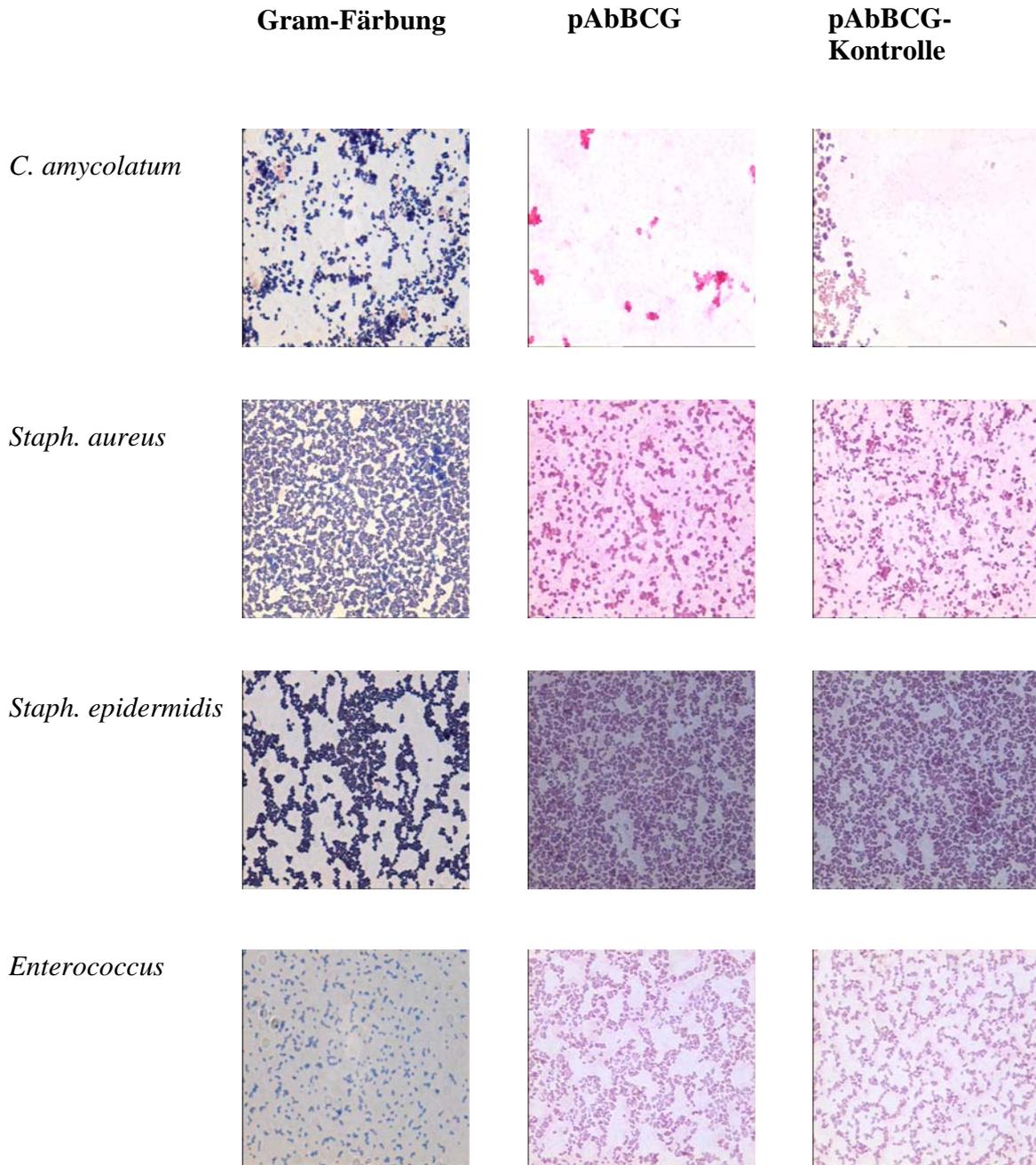


Abbildung 6: Aufnahmen von den zur Überprüfung von Kreuzreaktionen genutzten Erregern, Gram- und pAbBCG gefärbt, mit Kontroll-Färbung zur pAbBCG-Färbung ohne 1. Antikörper

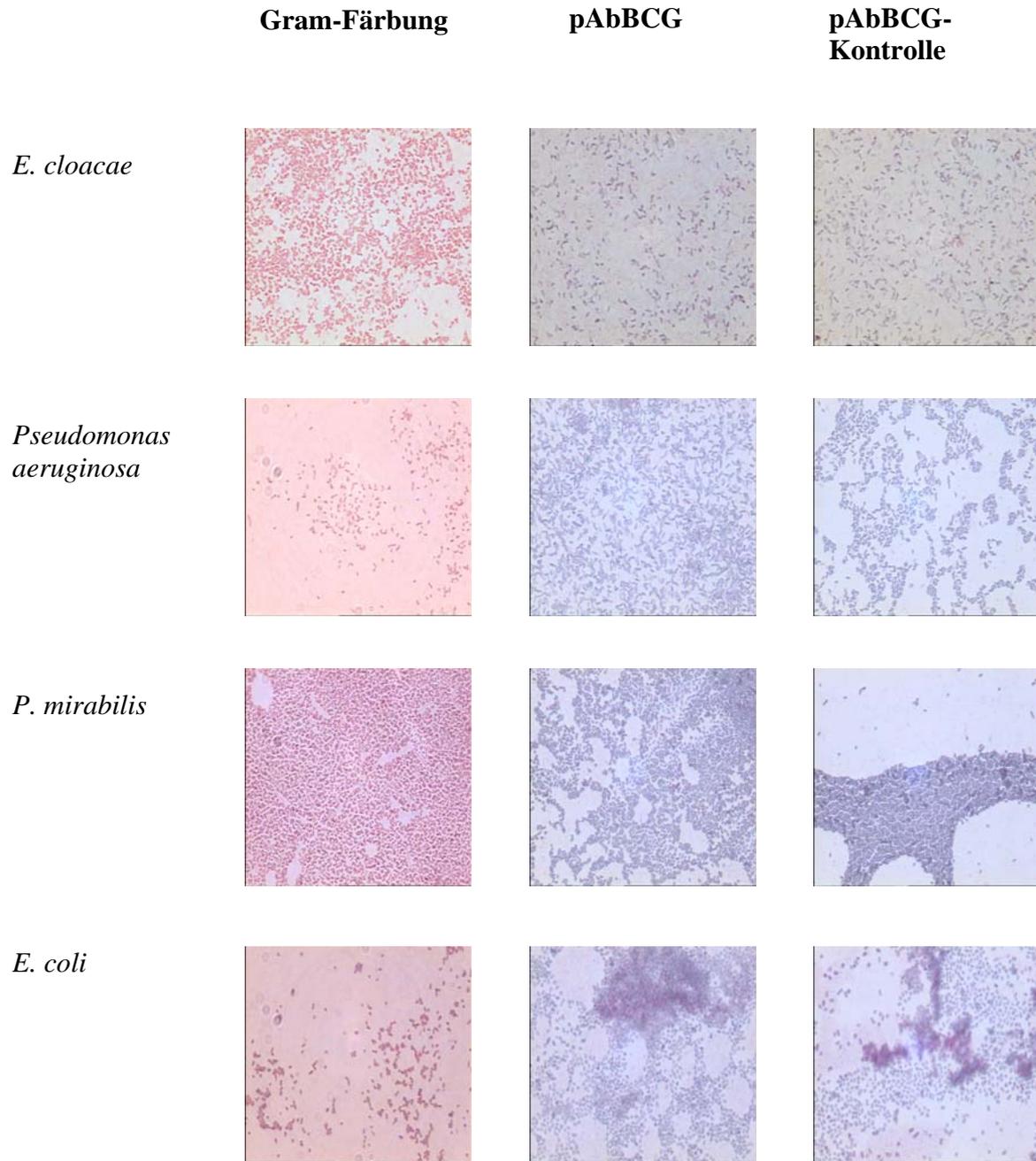


Abbildung 6: Fortsetzung der Aufnahmen von Kreuzreaktionen

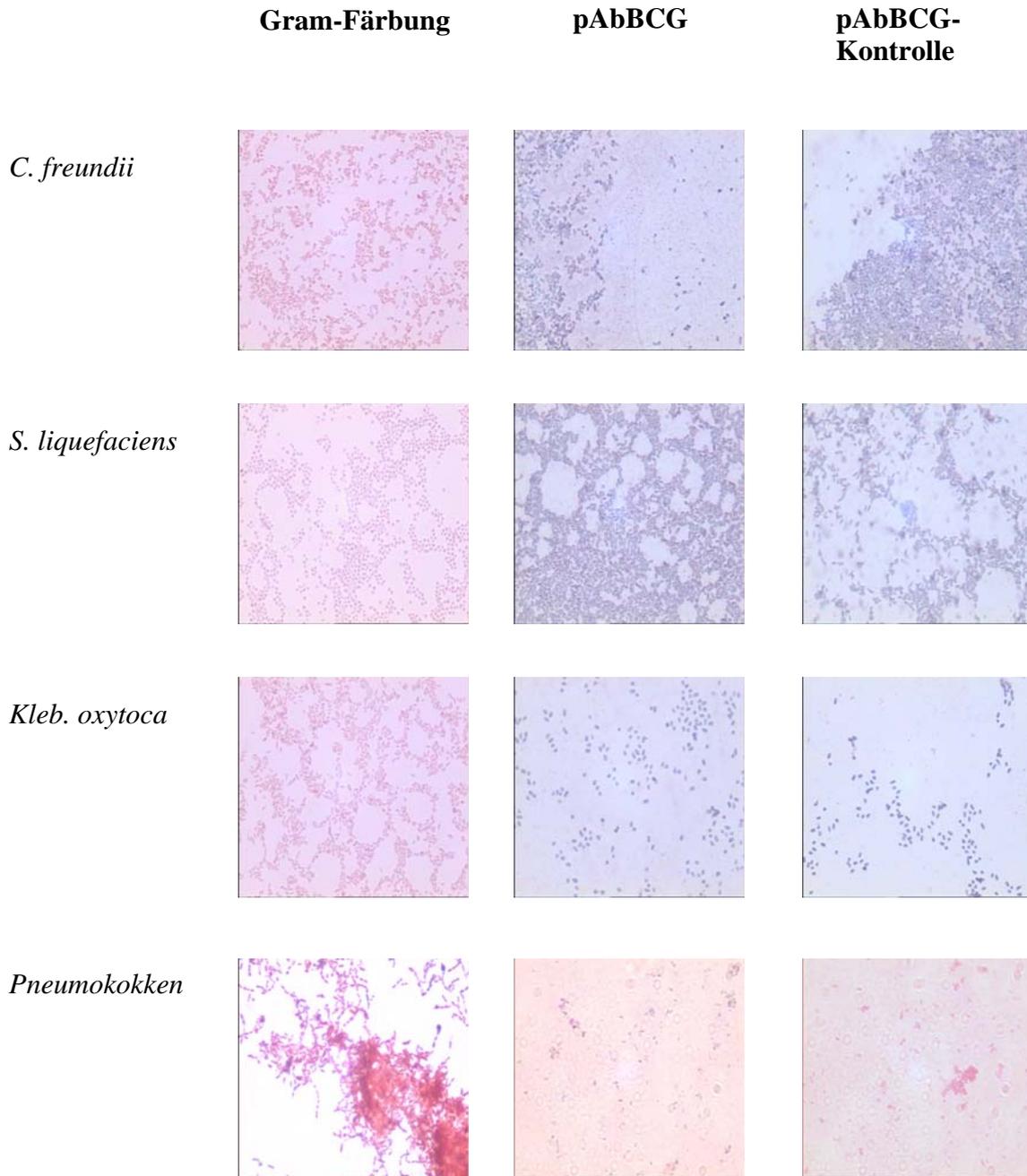


Abbildung 6: Fortsetzung der Aufnahmen von Kreuzreaktionen

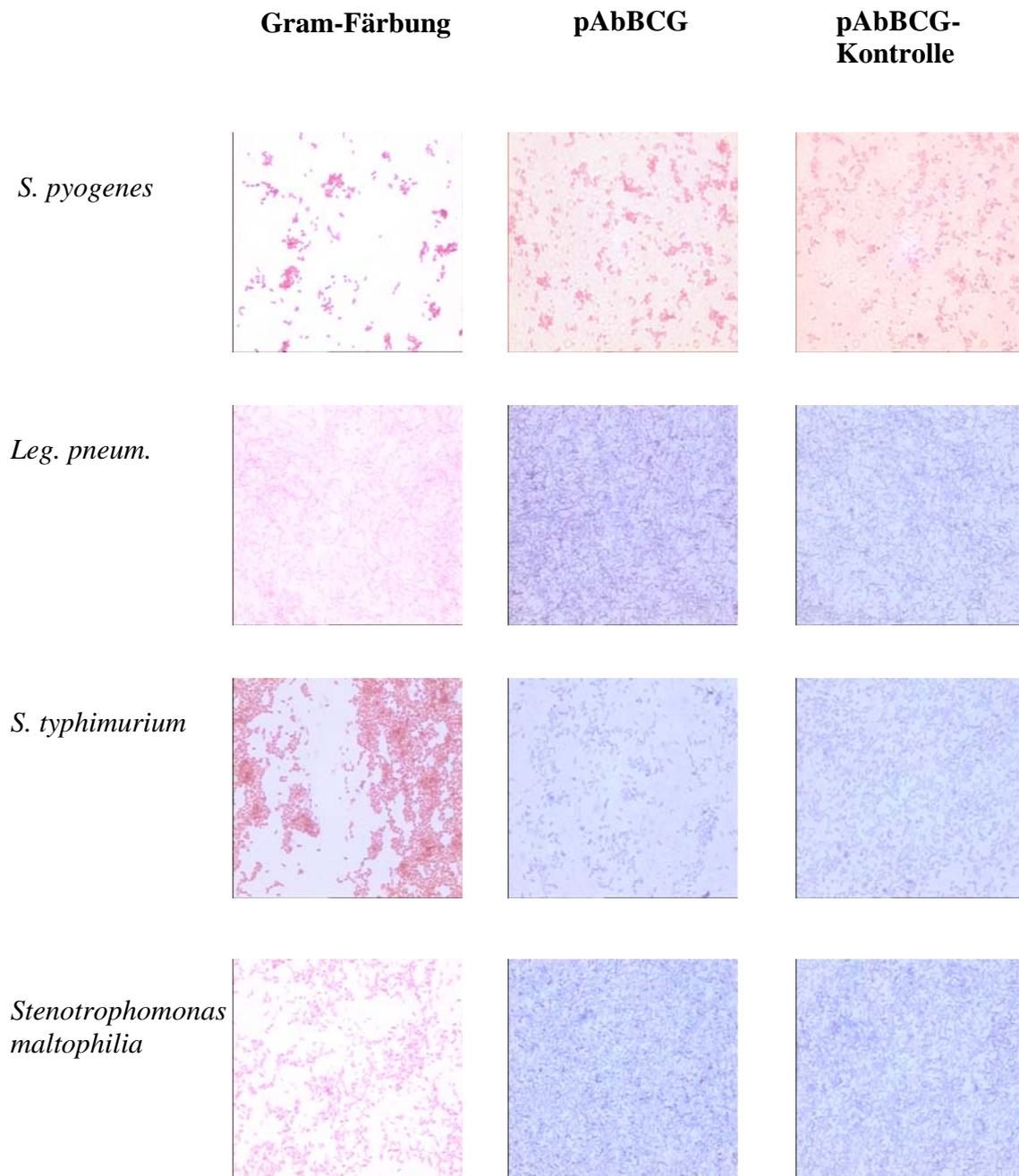


Abbildung 6: Fortsetzung der Aufnahmen von Kreuzreaktionen

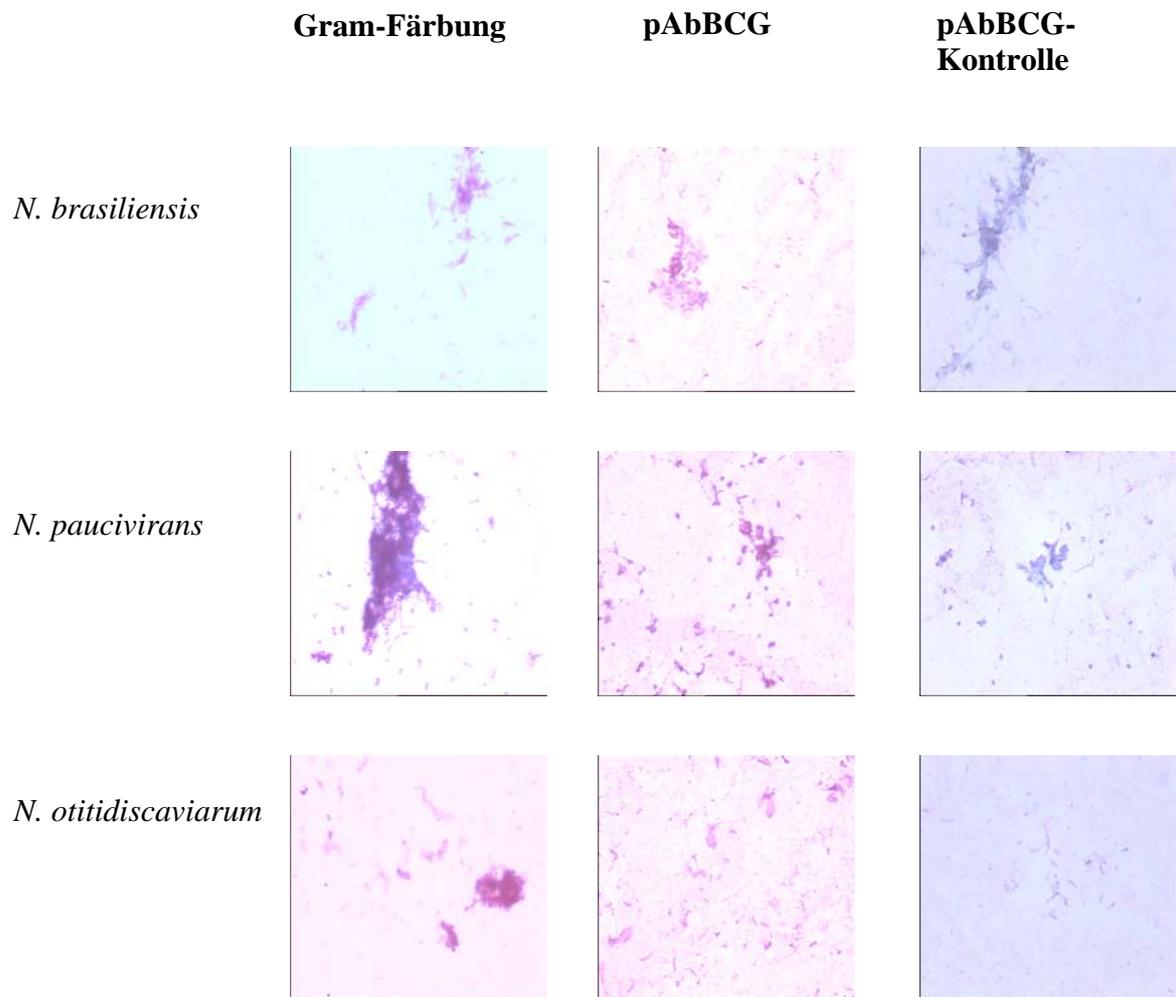


Abbildung 6: Fortsetzung der Aufnahmen von Kreuzreaktionen

#### 4.7 Auswertung des Probenmaterials

Zu Beginn wurden alle eingehenden Proben - bis auf Stuhl, Urin und Blut – bearbeitet, später dann vor allem BAL.

Mit der detaillierten Auflistung aller bearbeiteten Proben kann nachvollzogen werden,

- ob eine Probe in der ZN-Färbung positiv (p) oder negativ (n) beurteilt wurde – siehe Spalte mit „ZN“ in Überschrift,
- wie diese Probe bei der Färbung mit pAbBCG bewertet wurde – siehe Spalte „pAbBCG“ und
- wie diese Probe nach dem Goldstandard (Kultur) zu beurteilen gewesen wäre – siehe Spalte „neg. Kultur/Wochen“.

Die „10“ in der Spalte „neg. Kultur/Wochen“ bedeutet, dass nach 10 Wochen ein negativer Befund abgeschickt wurde. Kein Eintrag ist gleichbedeutend mit einer positiven Kultur.

Nicht jede Probe konnte eindeutig beurteilt werden, da durch ein übermäßiges Mitfärben des Hintergrundes keine Differenzierung möglich war. Dies wurde mit dem Kürzel „NZB“ (nicht zu beurteilen) vermerkt.

Eigentlich sollten bei den Proben auch die Ergebnisse der PCR mit einbezogen werden, dies war jedoch nicht realisierbar, da von den 550 untersuchten Proben nur 29 mittels PCR untersucht wurden. Von diesen 29 Proben wurden zwei wirklich negative als positiv erkannt und zwei wirklich positive als negativ.

Es folgt eine Auflistung der Proben, nach Material sortiert:

## 4.7.1 BAL

Die Verteilung der NZB-, Negativ- und Positiv-Proben nach Färbemethoden und Kultur stellt sich hier wie folgt dar:

Tabelle 5: Ergebnisübersicht nach Färbung von BAL

BAL			
	ZN	pAbBCG	Kultur
NZB	0	68	0
Negativ	332	252	325
Positiv	3	15	10

Aus der folgenden Tabelle lassen sich auch die fälschlich negativen und fälschlich positiven zusammenfassen, wobei bei der pAbBCG-Färbung die 68 NZB herausfallen.

Tabelle 6: Übersicht der falsch und richtig erkannten Ergebnisse nach Färbung von BAL

BAL		
	ZN	pAbBCG
richtig positive	2	6
falsch positive	1	9
Richtig negative	324	250
falsch negative	8	2

#### 4.7.2 Bronchialsekret

Die Verteilung der NZB-, Negativ- und Positiv-Proben nach Färbemethoden und Kultur stellt sich bei Bronchialsekret wie folgt dar:

Tabelle 7: Ergebnisübersicht nach Färbung von Bronchialsekret

Bronchialsekret			
	ZN	pAbBCG	Kultur
NZB	0	5	0
Negativ	22	17	22
Positiv	0	0	0

#### 4.7.3 Trachealsekret

Die Verteilung der NZB-, Negativ- und Positiv-Proben nach Färbemethoden und Kultur stellt sich bei Trachealsekret wie folgt dar:

Tabelle 8: Ergebnisübersicht nach Färbung von Trachealsekret

Trachealsekret			
	ZN	pAbBCG	Kultur
NZB	0	2	0
Negativ	12	9	12
Positiv	0	1	0

#### 4.7.4 Magensaft

Die Verteilung der NZB-, Negativ- und Positiv-Proben nach Färbemethoden und Kultur stellt sich bei Magensaft wie folgt dar:

Tabelle 9: Ergebnisübersicht nach Färbung von Magensaft

Magensaft			
	ZN	pAbBCG	Kultur
NZB	0	21	0
Negativ	28	8	28
Positiv	2	1	2

#### 4.7.5 Sputum

Die Verteilung der NZB-, Negativ- und Positiv-Proben nach Färbemethoden und Kultur stellt sich bei Sputum wie folgt dar:

Tabelle 10: Ergebnisübersicht nach Färbung von Sputum

Sputum			
	ZN	pAbBCG	Kultur
NZB	0	25	0
Negativ	27	9	24
Positiv	9	3	14

Um eine Ursache für die schlechte Beurteilung des Materials zu erörtern, wurde ein definitiv negatives Sputum mit allen Antikörpern einzeln gefärbt. Nur bei dem Einsatz mit dem pAbBCG kam es zu einer Rotfärbung unterschiedlicher Intensität aller Strukturen.

#### 4.7.6 Punktate

##### 4.7.6.1 Pleurapunktat

Die Verteilung der NZB-, Negativ- und Positiv-Proben nach Färbemethoden und Kultur stellt sich wie bei Pleurapunktaten folgt dar:

Tabelle 11: Ergebnisübersicht nach Färbung von Pleurapunktat

Pleurapunktat			
	ZN	pAbBCG	Kultur
NZB	0	20	0
Negativ	33	13	33
Positiv	0	0	0

#### 4.7.6.2 Aszitespunktat

Die Verteilung der NZB-, Negativ- und Positiv-Proben nach Färbemethoden und Kultur stellt sich bei Aszitespunktaten wie folgt dar:

Tabelle 12: Ergebnisübersicht nach Färbung von Aszites

Aszites			
	ZN	pAbBCG	Kultur
NZB	0	0	0
Negativ	4	4	4
Positiv	0	0	0

#### 4.7.6.3 Sonstige Punktate

Die Verteilung der NZB-, Negativ- und Positiv-Proben nach Färbemethoden und Kultur stellt sich bei sonstigen Punktaten wie folgt dar:

Tabelle 13: Ergebnisübersicht nach Färbung von sonstigen Punktaten

Punktat			
	ZN	pAbBCG	Kultur
NZB	0	3	0
Negativ	8	5	8
Positiv	0	0	0

#### 4.7.7 Abstrich

Die Verteilung der NZB-, Negativ- und Positiv-Proben nach Färbemethoden und Kultur stellt sich bei Abstrichen wie folgt dar:

Tabelle 14: Ergebnisübersicht nach Färbung von Abstrichen

Abstrich			
	ZN	pAbBCG	Kultur
NZB	0	4	0
Negativ	17	13	17
Positiv	0	0	0

#### 4.7.8 Liquor

Die Verteilung der NZB-, Negativ- und Positiv-Proben nach Färbemethoden und Kultur stellt sich bei Liquor wie folgt dar:

Tabelle 15: Ergebnisübersicht nach Färbung von Liquor

Liquor			
	ZN	pAbBCG	Kultur
NZB	0	0	0
Negativ	9	9	9
Positiv	0	0	0

## 4.7.9 Biopsien

### 4.7.9.1 Lymphknoten

Die Verteilung der NZB-, Negativ- und Positiv-Proben nach Färbemethoden und Kultur stellt sich bei Lymphknoten wie folgt dar:

Tabelle 16: Ergebnisübersicht nach Färbung von Lymphknoten

Lymphknoten			
	ZN	pAbBCG	Kultur
NZB	0	3	0
Negativ	9	6	6
Positiv	0	0	3

### 4.7.9.2 Knochenmark-Punktion

Die Verteilung der NZB-, Negativ- und Positiv-Proben nach Färbemethoden und Kultur stellt sich bei Knochenmark-Punktionen wie folgt dar:

Tabelle 17: Ergebnisübersicht nach Färbung von Knochenmark-Punktion

Knochenmark-Punktat			
	ZN	pAbBCG	Kultur
NZB	0	1	0
Negativ	5	4	5
Positiv	0	0	0

#### 4.7.9.3 Sonstige Biopsien

Die Verteilung der NZB-, Negativ- und Positiv-Proben nach Färbemethoden und Kultur stellt sich bei sonstigen Biopsien wie folgt dar:

Tabelle 18: Ergebnisübersicht nach Färbung von sonstigen Biopsien

Biopsie			
	ZN	pAbBCG	Kultur
NZB	0	4	0
Negativ	12	8	11
Positiv	0	0	1

#### 4.7.10 Sonstige PE

Die Verteilung der NZB-, Negativ- und Positiv-Proben nach Färbemethoden und Kultur stellt sich bei sonstigen PE wie folgt dar:

Tabelle 19: Ergebnisübersicht nach Färbung von sonstigen PE

PE			
	ZN	pAbBCG	Kultur
NZB	0	4	0
Negativ	5	1	5
Positiv	0	0	0

#### 4.8 Zusammenfassende Beurteilung des Probenmaterials

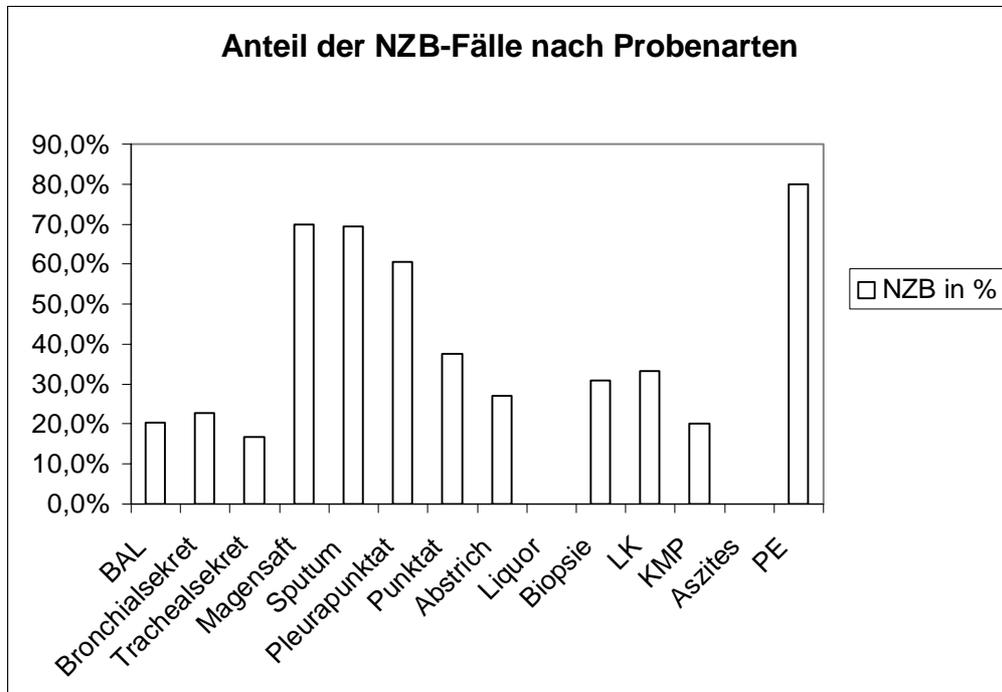


Abbildung 7: Diagramm der NZB-Fälle in Prozent aller Proben je Material nach Art der Materialien

Das obige Diagramm weist je nach Material erhebliche Schwankungen in den Größenordnungen der NZB-Proben auf:

- Bei Sputum und Magensaft lassen sich 25 und 21 (je 70 %) aller Proben wegen unspezifischer Hintergrundfärbung nicht beurteilen.
- Von den 5 PE-Proben waren 4 (80 %) nicht zu beurteilen.
- Dagegen ließen sich die Proben von Aszites (4) und Liquor (9) zu 100 % beurteilen.

#### 4.9 Gegenüberstellungen der Sensitivität und Spezifität der beiden Färbemethoden bei der BAL

Wie sich in den obigen Tabellen zeigt, eignet sich die Färbung mit dem pAbBCG vor allem bei der Verwendung von BAL. In den anderen Gruppen waren entweder zu wenig Proben eingegangen oder waren das Probenmaterial wegen unspezifischer Anfärbung nicht zu

beurteilen. Bei Sputum erwies sich die Färbemethode als völlig ungeeignet, bei anderen dickeren oder zäheren Materialien als nur eingeschränkt geeignet.

Aufgrund dieser Gegebenheiten wurden hauptsächlich BALs verwendet und die Sensitivität und Spezifität der Färbung mit pAbBCG mit der der ZN-Färbung verglichen.

#### 4.9.1 Sensitivität

Die Sensitivität lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Alle richtig positiv/krank in dem Test Erkannten}}{\text{Alle wirklich positiv/krank (hier: positive Kultur)}}$$

Bei den untersuchten 335 BALs gab es bei der ZN-Färbung 2 richtig positive erkannte Proben. In der Kultur waren 10 positiv. Daraus ergibt sich eine Sensitivität von  $2:10 = 0,2$ .

In Prozent angegeben bedeutet dies eine Sensitivität von 20 %.

Die Färbung mit pAbBCG brachte 6 richtig erkannte positive Proben. Damit erhält man eine Sensitivität von  $6:10 = 0,6$ . In Prozent angegeben bedeutet das eine Sensitivität von 60 %.

#### 4.9.2 Spezifität

Die Spezifität erhält man mit dieser Formel:

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Alle richtig negativ/gesund in dem Test Erkannten}}{\text{Alle wirklich negativ/gesund (hier: negative Kultur)}}$$

Bei den Untersuchten 335 BALs wurden durch die ZN-Färbung 324 der Proben als richtig negativ getestet, in der Kultur waren 325 negativ. Dies bedeutet:  $324:325 = 0,997$  und in Prozent umgerechnet eine Spezifität von 99,7 %.

In der pAbBCG-Färbung konnten von den eingegangenen 335 BALs 68 nicht beurteilt werden. Von den restlichen 267 beurteilbaren Proben erwiesen sich 250 als richtig negative getestet.

Von den 267 beurteilbaren Proben zeigten in der Kultur 259 kein Wachstum und waren damit negativ getestet.

Eingesetzt in die Formel ergibt dies  $250:259 = 0,965$  und in Prozent umgerechnet eine Spezifität von 96,5 %.

#### 4.9.3 Prädiktiver Wert

Anhand der als falsch positiv beurteilten Proben lässt sich der positiv prädiktive Wert (positiver Vorhersagewert) bestimmen.

$$\text{Positiv prädiktiver Wert} = \frac{\text{Alle richtig positiv im Test Erkannten}}{\text{Alle richtig positiv im Test Erkannten} + \text{alle falsch positiv im Test Erkannten}}$$

Für die ZN-Färbung beträgt der positiv prädiktive Wert  $2/3 = 0,67$ .

Für die pAbBCG-Färbung beträgt der positiv prädiktive Wert  $6/15 = 0,4$ .

Anhand der als falsch negativ beurteilten Proben lässt sich der negativ prädiktive Wert (positiver Vorhersagewert) bestimmen.

$$\text{Negativ prädiktiver Wert} = \frac{\text{Alle richtig negativ im Test Erkannten}}{\text{Alle richtig negativ im Test Erkannten} + \text{alle falsch negativ im Test Erkannten}}$$

Für die ZN-Färbung beträgt der negativ prädiktive Wert  $324/332 = 0,98$ .

Für die pAbBCG-Färbung beträgt der negativ prädiktive Wert  $250/252 = 0,99$ .

## 5. Diskussion

### 5.1 Einleitung

Tuberkulose ist bis in die heutige Zeit eine Herausforderung für Medizin und Gesellschaft. Betroffen sind vor allem Regionen, die überdurchschnittlich Armut, Hunger und Elend zu erleiden haben (50). Aber auch führende Industrienationen wie Deutschland, in denen die Inzidenz während der letzten Jahrzehnte kontinuierlich zurückging, befürchten durch die steigende Zahl von Tuberkuloseerkrankungen in ihren Nachbarländern und der generellen Zunahme resistenter Krankheitserreger erneut ein Anwachsen der Gefahrenlage, wie in Kapitel 1 ausgeführt.

Es fehlen nach wie vor schnelle und sichere Diagnoseverfahren, um eine Therapie zu einem möglichst frühen Zeitpunkt beginnen zu können. Die vorliegende Arbeit setzt im Bereich der mikroskopischen Tuberkulosedagnostik an und untersucht die Einsatzmöglichkeiten eines polyklonalen Antikörpers gegen den *M.-tuberculosis-Komplex*.

Den Weg zu diesem Diagnoseverfahren beschrieben bereits Wiley et al. (30), indem sie sich mit dem Einsatz eines polyklonalen Antikörpers gegen BCG (Bacillus Calmette-Guérin) auseinandersetzten. Die daraus entstandene Färbemethode wurde von verschiedenen Gruppen, unter anderen Seiler et al. (12), zur Darstellung von Mykobakterien eingesetzt. Hierbei wurde mit Gewebeschnitten gearbeitet und damit gute Ergebnisse erzielt.

Offen blieb bislang die Frage, ob diese Färbung auch in der mikrobiologischen Diagnostik einsetzbar ist, wie sich Sensitivität und Spezifität bei Materialien der Routinediagnostik verhalten und ob die Färbung zusätzliche Informationen im Bereich der Tuberkuloseerkrankung liefert.

Zur Klärung dieser Fragen verglich die vorliegende Arbeit die übliche Färbung nach ZN mit einer auf den Einsatz eines polyklonalen Antikörpers gegen BCG basierenden immunhistochemischen Färbemethode und überprüfte anschließend die Tauglichkeit dieser immunhistochemischen Färbemethode für die mikrobiologische Diagnostik.

## 5.2 Kritik der Methode

Zuerst sollten alle im Tuberkuloselabor eingegangenen Materialien nach der neuen pAbBCG-Färbemethode untersucht werden.

Bei den bisherigen Arbeiten mit den Gewebeschnitten wurden die Proben stets zwischen zwei Glaträgern eingespannt und durch Kapillarsog von den für die Färbung erforderlichen Substanzen durchflossen.

Bei den Arbeiten mit mikrobiologischen Proben zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit, dass die Proben durch die Kapillarkräfte von den Glaträgern abgewaschen wurden. Infolgedessen wurden die Proben auf den Diagnostika Objektträgern nach ausreichender Fixierung mittels eines stehenden Tropfens mit den für die Färbung erforderlichen Substanzen benetzt.

Eine Besonderheit ergab sich auch bei der Beurteilung der eingegangenen Proben. So erwiesen sich Sputum-Proben nur eingeschränkt beurteilbar, da die Färbung mit pAbBCG zu einer extremen Hintergrund-Kolorierung führte, was eine Beurteilung der einzelnen Strukturen im Sputum einschränkte. In der mikrobiologischen Diagnostik ist aber gerade die Untersuchung von Sputum von großer Relevanz, da sich dieses Material durch einfache und preiswerte Methoden gewinnen lässt und für eine erste Gefahreneinschätzung herangezogen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit die bei Gewebeschnitten erfolgreiche pAbBCG-Färbung nur eingeschränkt in der mikrobiologischen Diagnostik eingesetzt werden.

## 5.3 Diskussion der Ergebnisse und ihre Interpretation

### 5.3.1 Zur Sensitivität des Antikörpers

Die Verdünnungsreihe mit den BCG-Konzentrationen von  $10^6$  bis  $10^1$ /ml wurde auf Diagnostika Objektträgern zur Färbung nach ZN und zur Färbung nach pAbBCG-Protokoll mit gleichem Material angelegt.

Bei der ZN-Färbung zeigte sich, dass die Mykobakterien bei einer Verdünnung bis  $10^4$ /ml noch gut zu erkennen waren, bei weiterer Verdünnung jedoch nicht mehr angefärbt wurden.

Ein anderes Ergebnis erbrachte die Färbung nach pAbBCG-Protokoll. Diese Proben ließen Mykobakterien noch bei einer Verdünnung bis zu  $10^1$ /ml erkennen. Wiederholte Versuchsreihen bestätigten diese Aussage.

Im Ergebnis wies diese Arbeit nach, dass die pAbBCG-Färbung unter standardisierten Bedingungen und ohne Hintergrundfärbung eine um mehrere Log-Stufen höhere Sensitivität als die ZN-Färbung zeigt.

### 5.3.2 Zu den Kreuzreaktionen

Es wurden häufig im Respirationstrakt vorkommende Bakterien nach pAbBCG-Protokoll mit und ohne den 1. Antikörper (pAbBCG) gefärbt. Bei Verwendung mit pAbBCG zeigten sich echte Kreuzreaktionen unter den verwendeten Erregern nur bei *C. diphtheriae*, *C. amycolatum* und Nocardien. Eine Färbung mit und ohne 1. Antikörper konnte bei *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *Enterococcus* beobachtet werden.

Diese Arbeit zeigte auf, dass sich *C. diphtheriae*, *C. amycolatum* und Nocardien auf Grund ihrer Morphologie - es sind alles Stäbchen - nicht eindeutig von Mykobakterien unterscheiden ließen. Bei nahe beieinander liegenden Kokken war durch die eher schwammige pAbBCG-Färbung eine klare Unterscheidung zu den stäbchenförmigen Mykobakterien nicht immer gewährleistet.

Die vorliegende Arbeit lieferte aber auch den Hinweis, dass durch die beobachtete Kreuzreaktivität der Einsatz der pAbBCG-Färbung auch in Bereichen außerhalb der Mykobakterien-Diagnostik denkbar ist, in denen die oben genannten Erreger - wie beispielsweise in der Dermatologie - von besonderer Relevanz sind.

### 5.3.3 Zur Auswahl des Probenmaterials

Diese Arbeit lieferte Hinweise darauf, dass die pAbBCG-Färbung dann zu verwertbaren Resultaten führte, wenn die Proben möglichst dünnflüssig und transparent waren. Neben Liquor und Aszites erfüllte grundsätzlich auch die BALs diese Voraussetzungen. Bei den eingelieferten BALs zeigte sich aber tatsächlich eine nicht unerhebliche Einschränkung der Auswertbarkeit - 68 von 350 Proben und damit 19,4 % waren in der pAbBCG-Färbung nicht

zu beurteilen. Ursächlich könnte hierfür eine unsaubere Entnahme des Materials mit Verunreinigungen aus dem oberen Respirationstrakt sein.

Noch größere Schwierigkeiten ergaben sich in der vorliegenden Arbeit bei der Beurteilung der eingegangenen Sputum-Proben, von denen 70 % nicht verwertbar waren. Das Material erwies sich nach der üblichen Vorbehandlung für diese Färbung als nicht ausreichend transparent, außerdem wurden sämtliche vorhandenen Strukturen im Sputum - wahrscheinlich Epithelien, Bakterien oder Pilze - angefärbt. Enzyme könnten an der Hintergrundfärbung beteiligt gewesen sein. Dieser Frage wurde aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter nachgegangen.

Bei der Vorbereitung der Gewebeschnitte für die pAbBCG-Färbung ist eine Schichtdicke von max. 5 Mikrometer Standard. Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben ließ sich eine annähernd dünne Schichtdicke nicht realisieren. Dies könnte die Notwendigkeit einer ausreichenden Transparenz der Proben in der mikrobiologischen Diagnostik unterstreichen.

#### 5.3.4 Zur Sensitivität, Spezifität und zum prädiktiven Wert anhand von BALs

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bei den eingegangenen BALs für die unterschiedlichen Färbmethoden folgende Werte für Sensitivität und Spezifität ermittelt:

##### Sensitivität

- ZN:  $2/10 = 20 \%$
- pAbBCG:  $6/10 = 60 \%$

##### Spezifität

- ZN:  $324/325 = 99,7 \%$
- pAbBCG:  $250/259 = 96,7 \%$ .

Erneut erwies sich anhand der vorliegenden Arbeit die pAbBCG-Färbung gegenüber der herkömmlichen ZN-Färbung als sensitiver, während beide Färbemethoden hinsichtlich der Spezifität mit vergleichbar hohen Trefferquoten aufwarteten konnten. Allerdings deutet sich durch den in dieser Arbeit herausgefundenen positiv prädiktiven Wert eine besser verwertbare Aussage für die ZN-Färbung (0,67) als für die pAbBCG-Färbung (0,4) an. Hinsichtlich des negativ prädiktiven Wertes zeigen ZN-Färbung (0,98) und pAbBCG-Färbung (0,99) eine vergleichbar hohe Genauigkeit.

Durch die geringe Anzahl von auswertbaren positiven Proben können die oben genannten Ergebnisse als nur eingeschränkt repräsentativ gelten.

### 5.3.5 Zum Aufwand der zu vergleichenden Färbemethoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Proben für die ZN-Färbung

- ca. 70 min (NALC-Methode) vorbereitet, anschließend
- 24 h bei 60 °C hitzefixiert und abschließend nochmals
- 40 min bis zur Begutachtung gefärbt und luftgetrocknet.

Bei der pAbBCG-Färbung wurden die Proben ebenso

- ca. 70 min (NALC-Methode) vorbereitet, mussten dagegen
- 72 h bei 60 °C hitzefixiert werden und erforderten einen weiteren Zeitaufwand von
- 4 h, um für die Begutachtung gefärbt, luftgetrocknet und eingedeckelt zu werden.

Der zeitliche Aufwand lag somit bei der ZN-Färbung mit insgesamt 26 Stunden deutlich unter dem Niveau der Färbung mit pAbBCG, die knapp 80 Stunden Vorbereitungszeit beanspruchte.

Neben der geringeren Vorbereitungszeit sprach in der vorliegenden Arbeit auch das einfachere Handling für die ZN-Färbung (siehe Kapitel 3.2.2.2). Die pAbBCG-Färbung erschwerte durch die komplexeren Anforderungen wie das Aufbringen der Substanzen als „stehenden“ Tropfen oder die Notwendigkeit des wiederholten Abgießens die Entwicklung und Anwendung standardisierter Verfahren.

Für die Diskussion mit der zu dem behandelten Thema bereits veröffentlichten Literatur lassen sich die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit so zusammenfassen:

In der mikrobiologischen Diagnostik zeigte die pAbBCG-Färbung im Vergleich mit der ZN-Färbung

- eine bessere Sensitivität,
- Kreuzreaktionen mit im Respirationstrakt vorkommenden Erregern,
- eine eingeschränkte Verwendbarkeit bei den eingesetzten Proben und einen
- höheren Aufwand in der zeitlichen und praktischen Durchführung.

## 5.4 Interpretation der Ergebnisse im Kontext der Literatur

### 5.4.1 Immunhistochemische Färbung mit pAbBCG

Die Anfärbung von Tuberkulosebakterien mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen den *M. tuberculosis*-Komplex fand in einer Arbeit von Orrell et al. (31) Anwendung. Hier wurden Lungen von mit *M. tuberculosis* infizierten Mäusen nach 6-, 13- und 18-wöchiger Infektionsdauer entnommen. Nach Aufbereitung der Gewebe zu 4 Mikrometer dicken Schnitten wurden diese zur zytologischen Beurteilung mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) sowie zum Nachweis der säurefesten Stäbchen nach ZN gefärbt. Ein weiterer Schnitt aus der gleichen Region wurde dann immunhistochemisch mit einem vom Kaninchen stammenden polyklonalen Antikörper gegen BCG gefärbt, der mit einem Avidin-Biotin-Immunperoxidase Reagenz gekoppelt ist. In der zytologischen Begutachtung zeigten sich lockere epitheloidartige Granulome unterschiedlicher Größe und krankhaft verändertes Lungenparenchym.

Die immunhistochemische Färbung mit pAbBCG wurde auch in der Arbeit von Ridley und Ridley (51) eingesetzt. Dabei wurden 5 Mikrometer dicke Gewebeschnitte von 29 an Tuberkulose erkrankten Menschen verwendet.

In der Arbeit von Higuchi et al. (52) wurden bei Gewebeschnitten von BCG-infizierten Kaninchen neben dem pAbBCG-Serum auch Seren von Antikörpern gegen das Protein B, Polysaccharid I und Wachskomponente D von *M. tuberculosis* eingesetzt.

Für diese Arbeit ist eine Ergebnisauswertung der aufgeführten Literatur nach folgenden Stichpunkten relevant:

- Darstellung des Verteilungsmusters der säurefesten Bakterien in den untersuchten Schnitten durch ZN-Färbung:

In der Arbeit von Orrell et al. (31) hielten sich alle säurefesten Bakterien ausschließlich in den Granulomen auf.

- Aussehen und Auftreten der pAbBCG-Färbung in den untersuchten Schnitten im Vergleich mit der ZN-Färbung:

Die Immunperoxidase-Färbung zeigte sich bei Orrell et al. (31) ebenfalls ausschließlich in den Granulomen mit einer ähnlichen mikroanatomischen Verteilung wie bei den durch ZN-Färbung dargestellten säurefesten Bakterien. Der pAbBCG und der damit

verbundene Farbstoff schienen jedoch nur an der Oberfläche der Bakterien anzusetzen und drangen nicht in diese wie bei der ZN-Färbung ein. Zusätzlich wurden auch Partikel in der Umgebung der Bakterien gefärbt, die damit ebenso Angriffsstellen für den pAbBCG aufwiesen. Die Färbung wirkte eher körnig bis verwaschen und ließ sich auch an der Oberfläche der Makrophagen nachweisen.

Auch bei Ridley und Ridley (51) zeigte sich diese eher grobkörnige Färbung, die durch das Ansetzen an die Außenseite der Bakterien deren stäbchenförmige Struktur zeigte. Zusätzlich war auch hier ein eher diffus gefärbter Hof um die Bakterien zu erkennen. Auch bei Higuchi et al. (52) zeigte sich das oben beschriebene Aussehen und Verteilungsmuster.

In allen genannten Arbeiten mit der immunhistochemischen Färbung mit pAbBCG wurde auf die Übersichtlichkeit und gute Beurteilbarkeit durch die geringe Hintergrundfärbung hingewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde zwar die eher grobkörnige Färbung mit einem die Bakterien umgebenden Hof gerade in den Bildern zur Einzelfärbungen der Verdünnungsreihe (s. 4.5, auch in Vergleich mit der ZN-Färbung) betätigt, es zeigte sich aber bei den verwendeten Materialien zum Teil eine erhebliche Hintergrundfärbung. Ursache hierfür könnten vorhandene Enzyme oder aber die eingeschränkte Möglichkeit sein, die Proben dünn genug aufzutragen.

- Änderung während der Krankheitsdauer:

In Zusammenhang mit der Infektionsdauer zeigte sich bei Orrell et al. (31) in den untersuchten Schnitten eine Zunahme der Granulome in den untersuchten Bereichen. Die Anzahl sowie die Lokalisation der säurefesten Bakterien blieben in jedem Granulom dagegen konstant. Im Verlauf der Erkrankung nahm die Intensität der immunhistochemischen Färbung mit wachsender Bakterienzahl zu.

Bei Ridley und Ridley (51) wurde bei Schnitten mit niedriger Abwehrlage (viele granuläre Nekrosen, viele Bakterien) eine stärkere Färbung als in Schnitten mit hoher Resistenz beobachtet (nur vereinzelte Bakterien in fibrinös umgewandelten und verkäsenden Granulomen, die von aktivierten Makrophagen und Epitheloidzellen umgebenden sind).

Bei längerer Infektionsdauer zeigte sich auch bei Higuchi et al. (52) eine Zunahme der Umgebungsfärbung. So stützte diese Arbeit auch die These, es würde sich dabei um Partikel von den Mykobakterien handeln, da hier Antikörper gegen Bestandteile der

Bakterien eingesetzt wurden. Die Färbung könnte über die Lokalisation der Infektion hinaus auch über die Intensität der Auseinandersetzung der Bakterien mit dem Abwehrsystem (Makrophagen) Aufschluss geben – in diesem Fall durch eine vermehrte Umgebungsfärbung.

- Anfärbung von persistierenden Mykobakterien

In der Arbeit von Seiler et al. (12) wurde diese Färbung bei Gewebeschnitten mit 5 Mikrometer Dicke von langzeitinfizierten Mäusen und Menschen eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass der polyklonale Antikörper die Mykobakterien bzw. Teile davon anfärbte, bei denen die ZN-Färbung negative Resultate zeigte.

Möglich erscheinen hier Veränderungen der Zellwand, bei denen die ZN-Färbung nicht mehr wirksam ist. Dies könnte den Einsatz der ZN-Färbung bei chronischen Tuberkulosen einschränken, bei akuten Verläufen wie bei einer offenen Lungentuberkulose aber als weiterhin sinnvoll erscheinen lassen.

- Relevanz von persistierenden Mykobakterien

Mit der Virulenz persistierender Erreger setzten sich unter anderem Arbeiten von Balasubramanian et al. (20) sowie Ulrichs und Kaufmann (10, 11) auseinander. In diesem Zusammenhang wurde auf die interne Reinfektion bei geschwächter Immunlage durch Ausbreitung der Erreger aus dem Primärkomplex verwiesen. In einer Arbeit von Wayne (46) wurde zusätzlich auf die Einschränkung der Wirksamkeit von Antibiotika bei persistierenden Mykobakterien verwiesen

Die Übertragung von Bakterien bei Personen, die nach ZN-Färbung des Sputums ein negatives Resultat zeigten, dann aber in der Kultur positiv waren, wurde in der Arbeit von Behr et al. (53) behandelt. In dieser Arbeit wurde mittels DNA-Nachweis bewiesen, dass das übertragene Bakterium von dem vorher als negativ gesehenen Patienten stammte. Hier könnte man mit dem immunhistochemischen Nachweis durch pAbBCG eine bessere Detektion erreichen, wofür die in dieser Arbeit aufgezeigte höhere Sensitivität spricht.

- Kreuzreaktionen bei der pAbBCG Färbung

Kreuzreaktionen bei der pAbBCG-Färbung wurden bereits in diversen Arbeiten beschrieben. Wiley, Beck und Freeman (34) beobachteten Kreuzreaktionen mit *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spezie, *Candida albicans* sowie bei Kokzidiomykosen und Blastomykosen. Byrd et al. (39) setzten die Färbung zum Nachweis von *Sporothrix schenckii* ein. Bei Glover und Cockerell (35) wurde die Kreuzreaktion mit *Nocardia asteroides* gezeigt. Die Arbeit von Harboe et al. (36) zeigte die Kreuzreaktionen mit *Mycobacteria* spez., *Corynebacterium pyogenes* und *N. asteroides*. Geisel, Netter und Hermanns (33) zeigten Kreuzreaktionen neben den *Mycobacteria* spez. noch mit *Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi*, *Phycomyces* spez., *C. albicans* und *Aspergillus fumigatus*. Kutzner et al. (32) färbten bei ihrer Arbeit Gewebeschnitten von infektiösen Hauterkrankungen. Dabei wurde über Kreuzreaktionen sowohl mit Pilzen als auch mit einigen Bakterien (wie schon oben genannt) berichtet, darunter auch mit *M. leprae*. Keine Kreuzreaktionen zeigten sich mit Spirochäten, Protozoen oder Viren. Bei Kutzner et al. (32) wurde auch eine Kreuzreaktion mit *E. coli* beschrieben. Bei der Anfärbung wurde bei septischen Vasculitis und Ecthyma gangrenosum in beiden Geweben *E. coli* als Erreger durch die Kultur nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich keine Kreuzreaktion mit *E. coli*. Ursächlich hierfür könnte eine Veränderung des Erregers durch die Infektion oder das Anfärben anderer Strukturen in dieser Hautläsion sein.

In der Dermatologie wurde bereits mit der pAbBCG-Färbung der Nachweis von *M. leprae* (54, 55) in Fällen negativer ZN-Ergebnisse erbracht. Auch über den Nachweis einer Sporotrichiose (30) oder anderer Pilz- oder Bakterienerkrankungen (56) wurde bereits diskutiert.

In der hier vorliegenden Arbeit konnten die in der Literatur noch nicht beschriebenen Kreuzreaktionen mit *C. amycolatum*, *N. paucivirans*, *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* und *Enterococcus* gezeigt werden.

Damit könnte sich die pAbBCG-Färbung auch zum erweiterten Nachweis von Krankheitserregern außerhalb der Mykobakterien-Diagnostik eignen - wie beispielsweise in der Dermatologie bei Impetigo, Erysipel, phlegmonösen Hauterkrankungen und in der Nocardidiagnostik.

- Immunhistochemische Färbung bei der Liquordiagnostik

In Arbeiten von Sumi MG et al. (57) und Thwaites et al. (58) wurde der Einsatz von pAbBCG bei mikrobiologischen Liquor-Untersuchungen beschrieben. Es wurden die Proben von 22 Patienten mit klinisch gesicherter tuberkulösen Meningitis mittels ZN-Färbung, immunhistochemisch mit pAbBCG und kulturell untersucht.

Zytologisch zeigte sich bei 16 Proben eine Mischung aus Lymphozyten und Monozyten, bei 6 Proben nur vereinzelte Lymphozyten. Die darzustellenden Zellen zeigten in 15 % Degenerationen. Die ZN-Färbung zeigte kein positives Ergebnis.

In der pAbBCG-Färbung zeigten alle 16 Proben mit Monozyten eine positive Färbung, da die Makrophagen die Bakterien in der Akutphase phagozytierten und die Antigenkomponenten demonstrierten.

Zusätzlich zeigten sich aber auch außerhalb der Zellen Farbanhäufungen. Bei 6 Proben mit nur vereinzelten Lymphozyten, zeigte sich ein negativer Befund. Falsche positive Resultate zeigten sich in der Arbeit nicht.

In der Kultur konnten aus drei Proben *M. tuberculosis* angezüchtet werden, diese zeigten alle die an Monozyten gebundene positive Färbung mit pAbBCG. Als Kontrolle wurden Proben von 22 Patienten ohne tuberkulöse Meningitis wie vorher behandelt, hier zeigte sich - auch bei vorhandenen Monozyten - keine positive pAbBCG-Anfärbung.

In dieser Arbeit wurden mittels immunhistochemischer Färbung zwar keine intakten Mykobakterien nachgewiesen, allerdings Anteile, die zum Teil von den Makrophagen demonstriert wurden. Die einzelnen Farbhäufen außerhalb der Zellen könnten von den degenerierten Makrophagen stammen. Mittels der Färbung könnte eine Tuberkulose auch an Hand von Proben mit sehr geringer oder zum Teil schon eliminiertes Bakterienbesiedlung diagnostiziert werden. Der Austritt anfärbarer Komponenten aus geschädigten Zellen könnte jedoch bei weniger serösem Material zusätzlich zu einer verstärkten Hintergrundfärbung und einer eingeschränkten Beurteilbarkeit der Proben führen. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich Liquor wegen seiner Transparenz als gut für die pAbBCG-Färbung geeignet. Auf Grund der fehlenden positiven Proben mit Liquor wäre es nahe liegend gewesen, die vorhandenen negativen Liquor-Proben zu „spicken“, was aber unterblieb, da davon ausgegangen wurde, dass sich die gleichen Ergebnisse eingestellt hätten, wie sie bei den unter Standardbedingungen hergestellten Verdünnungsreihen erzielt wurden.

In allen bisher erwähnten Arbeiten wurde von einer besseren Sensitivität der pAbBCG-Färbung im Vergleich zur ZN-Färbung berichtet. Unter standardisierten Bedingungen konnte dies in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

#### 5.4.2 Kaltfärbe-Technik (engl. cold-staining) bei ZN-Färbung

In einer Arbeit von Allen (27) wurde der Einsatz der cold-staining Methode mit der in den Laboratorien üblich gebrauchten hot-staining Methode verglichen. Hier wurde das Präparat nicht mit heißem (hot-staining) Carbofuchsin, sondern mit Carbofuchsin bei Zimmertemperatur (cold-staining) gefärbt. Als Material wurden 122 Sputum-Proben genommen. Von diesen zeigten sich 16 sowohl in der Mikroskopie nach ZN-Färbung (hot-staining) wie auch in der Kultur positiv, in der cold-staining-Methode konnte von diesen 16 Proben nur eine als positiv erkannt werden. In einer Arbeit von Slosarek et al. (29) wurde neben der cold/hot-Färbung auch der Einfluss der Materialvorbereitung und Fixierung untersucht. 200 positive Sputum-Proben wurden in neun Laboratorien von jeweils acht verschiedenen Personen beurteilt. Die besten Ergebnisse zeigten sich bei dem Einsatz der auch in dieser Arbeit verwendeten Materialvorbereitung, Fixierung und hot-staining ZN-Färbung. Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit war allerdings, dass das gleiche Labor-Personal gleiche Präparate unterschiedlich beurteilte.

Eine mögliche Vereinfachung der Durchführung bei der ZN-Färbung konnte hier nicht gezeigt werden. Aber durch die Arbeit von Slosarek et al. (29) wurde deutlich, wie wichtig ein qualitativ hoher Ausbildungsstand des Labor-Personals und einheitliche Kriterien bei der Beurteilung von Proben sind.

#### 5.4.3 Fluoreszenzmikroskopie (FM)-Färbung

Ulukanligli et al. (59) untersuchten 465 eingegangene Proben von 295 unterschiedlichen Patienten, die sowohl nach ZN- wie auch nach Fluoreszenzmikroskopie (FM)-Technik gefärbt wurden. Bei 68 Patienten konnte *M. tuberculosis* in der Kultur nachgewiesen werden. Von den positiven Patienten wurden 46 in der ZN-Färbung, 58 in der FM-Färbung detektiert.

In dieser Arbeit erwies sich die FM-Färbung bei einer Bakteriendichte von weniger als 10/100 gesichteten Feldern als sensitiver als die ZN-Färbung, eine Unterscheidung, die bei einer Bakteriendichte ab 10/100 Feldern nicht mehr nachzuweisen war.

Eine Bestätigung dieser Untersuchungsergebnisse fanden sich auch in den Arbeiten von Ba und Rieder (60) sowie Githui et al. (61). Letztere wiesen keine absoluten Zahlen auf.

Auch in der Arbeit von Kumar et al. (62), bei der die FM-Färbung mit der ZN-Färbung in der zytologischen Diagnostik verglichen wurde, erwies sich - wie bei den vorherigen Arbeiten - die FM-Färbung bei geringer Bakteriendichte sensitiver als die ZN-Färbung.

Diese Arbeiten deuten an, dass sich der Einsatz der FM-Färbung besonders bei Proben empfehlen könnte, bei denen nur mit einer geringen Keimlast, aber einem positiven Ergebnis zu rechnen ist, wie dies bei HIV-Koinfizierten zu erwarten ist.

Die genannten Arbeiten ergaben auch Hinweise, dass der Einsatz der FM-Färbung die Diagnostik mit relativ geringem Kostenaufwand verbessern könnte. Dies wäre vor allem für Nationen und Organisationen von Bedeutung, die über nur geringe finanzielle Mittel für die mikrobiologische Diagnostik verfügen.

#### 5.4.4 Nachweis von DNA/RNA mittels PCR

Die PCR stützt sich, wie im Detail bereits erläutert, auf den DNA- oder RNA-Nachweis von *M. tuberculosis*. In der Arbeit von de Wit et al. (26) wurde die PCR mit dem herkömmlichen Nachweis (ZN-Färbung, Kultur) von Mykobakterien im Pleuraerguss verglichen. Es wurden Proben von 85 Personen mit Pleuraerguss durch Punktion des Pleuraergusses und durch eine Biopsie der Pleura entnommen. Diese Proben wurden auch histologisch untersucht. Von den 85 Personen wurden wegen einer nachgewiesenen Tuberkulose bereits 53 antibiotisch behandelt.

In den nach ZN gefärbten Präparaten konnten mikroskopisch keine säurefesten Stäbchen nachgewiesen werden.

Von den 53 Patienten konnten 28 mittels Kultur des Pleuraergusses, 38 durch positive Kultur der Biopsie und 41 mit Hilfe der histologischen Untersuchung der Biopsie als positiv erkannt werden.

Durch PCR konnten 43 der 53 positiven Patienten bestätigt werden. Weiterhin wurden sechs Patienten als positiv eingestuft, die nachweislich einen malignen Pleuraerguss hatten.

Bei der Untersuchung von Pleuraergüssen erwies sich in dieser Arbeit die PCR (43/53) als sensitiver als die Kultur (28/53) oder die ZN-Färbung (0/53). Da diese Patienten bereits mit Antibiotika anbehandelt wurden, könnten die negativen Resultate in der ZN-Färbung und Kultur an der veränderten Zellstruktur und den eingeschränkten Stoffwechselbedingungen für die Vermehrung liegen. Es wird möglicherweise kein Unterschied zwischen noch vermehrungsfähigen Bakterien und schon abgetöteten Erregern gemacht. Auch bei den falsch positiv erkannten Befunden könnte es sich um Proben von Patienten mit einer ausgeheilten Tuberkulose handeln.

Auch Arbeiten mit modifizierter PCR von Martines et al. (42) - hier wurde das MPB64 Fragment eingesetzt -, von Mulcahy et al. (41) - hier wurden zusätzlich zum IS6110 noch unterschiedlich lange Basenpaare eingesetzt - und von Kown et al. (43) - hier wurde zur Spezifizierung die PCR an zwei Stellen der DNA angesetzt - konnten das Problem des Nachweises toter Mykobakterien nicht beseitigen.

In der Arbeit von Hernandez-Pando et al. (40) wurde zur Darstellung der Lokalisation des Erregers eine *in situ* PCR angewendet. Bei der Beurteilung von Gewebeproben aus Lungenabschnitten zeigte sich die *in situ* PCR zur herkömmlichen PCR in Sensitivität und Spezifität vergleichbar, zusätzlich konnten positiven Strukturen zellulär lokalisiert werden. Eine Aussage zur Krankheitsaktivität konnte nicht erbracht werden.

Die hier genannten Untersuchungen weisen darauf hin, dass die PCR-Methode eine therapiebedürftige Tuberkulose nicht sicher genug identifiziert. Um jedoch klinisch und in der Mikroskopie nicht eindeutig beurteilbare Fälle zu sichern, erscheint die PCR durchaus als sinnvolle, allerdings auch kostenaufwendige Detektiermethode.

Nach wie vor kommt die ZN-Färbung als Standard in der mikrobiologischen Diagnostik der Tuberkulose zum Einsatz. Von ihr werden vor allem lebende Mykobakterien detektiert, soweit sie in ausreichender Population vorliegen. Die Färbung nach pAbBCG-Protokoll markiert nicht nur intakte Mykobakterien, sondern auch einzelne Teile, auch wenn diese in nur geringer Anzahl vorhanden sind. In der PCR werden Gen-Fragmente der Mykobakterien detektiert, wobei zwischen lebenden und bereits abgestorbenen Erregern nicht unterschieden wird. Eine Kombination der unterschiedlichen Färbemethoden mit ihren besonderen Eigenschaftender könnte Chancen bieten, den gesuchten Erreger schnell und effizient zu finden, um notwendige Therapien einleiten zu können.

## 6. Zusammenfassung und abschließende Würdigung

Die vorliegende Arbeit vergleicht die Färbemethode eines polyklonalen Antikörpers (pAbBCG) gegen den *M.-tuberculosis-Komplex* mit der herkömmlichen ZN-Färbung in der mikrobiologischen Diagnostik. Dabei wurden alle im Tuberkuloselabor des Mikrobiologischen Institutes des Benjamin Franklin Klinikums eingegangenen Proben nach ZN sowie nach pAbBCG-Protokoll gefärbt.

Folgende Fragen waren zu beantworten: 1. Welche Auswirkungen haben die Materialenauswahl und Materialienbeschaffenheit auf den Erfolg der pAbBCG-Färbung, 2. wie sensitiv und spezifisch ist die pAbBCG-Färbung unter Standardbedingungen, wie verhalten sich Sensitivität und Spezifität bei Materialien der Routinediagnostik und 3. welche zusätzlichen Informationen liefert eine immunhistochemische Färbung mit pAbBCG für die mikrobiologische Diagnostik.

Die wichtigen Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Methoden, die bei Gewebeschnitten zum Einsatz kommen, ließen sich nicht ohne weiteres bei Proben aus der Mikrobiologie einsetzen. So wurden die mikrobiologischen Materialien in diesem Versuchsaufbau durch die Wirkung der Kapillarkräfte von den Objektträgern abgewaschen. Es konnte gezeigt werden, dass sich dieses Problem umgehen lässt, wenn die Proben auf einem Glasobjektträger bei einer Temperatur von 60 °C für 72 h hitzefixiert und anschließend mit den benötigten Färbesubstanzen benetzt wurden. Herausgearbeitet wurde ebenso, dass die behandelte Probe eine möglichst hohe Dünnschichtigkeit und Transparenz aufweisen sollte, um die die Diagnostik beeinträchtigende Hintergrundfärbung einzuschränken. Als grundsätzlich geeignetes Probenmaterial für die pAbBCG-Färbung erwiesen sich BAL, Aszites und Liquor.
2. Unter Standardbedingungen zeigte sich eine um mehrere Log-Stufen erhöhte Sensitivität der pAbBCG-Färbung (Anfärbung bei einer Konzentration bis  $10^1$ /ml) gegenüber der ZN-Färbung (Anfärbung bei einer Konzentration bis  $10^4$ /ml). Die pAbBCG-Färbung zeigte Kreuzreaktionen bei *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus*, *C. diphtheriae*, *C. amycolatum* und Nocardien. Bei den Probematerialien aus der Routinediagnostik konnten nur die Ergebnisse der BAL ausgewertet werden. Hier zeigte sich eine Sensitivität bei der pAbBCG-Färbung von 6/10 versus der ZN-Färbung (2/10) und eine Spezifität bei der pAbBCG-Färbung von 250/267 versus der ZN-Färbung von 324/325.

Auch hier zeigte sich eine erhöhte Sensitivität der pAbBCG-Färbung. Die Spezifität war bei beiden Methoden ähnlich hoch.

3. Die immunhistochemische Färbung mit pAbBCG scheint zusätzliche Aussagen über die Aktivität der Tuberkulose möglich zu machen. Aufgrund des nur begrenzt verfügbaren positiven Probenmaterials ließ sich die Hypothese im Rahmen der mikrobiologischen Routineuntersuchungen nicht weiter untersuchen.

Die pAbBCG-Färbung eignete sich für Sputum nicht ohne weiteres.

Der Aufwand bei dieser Färbung ist deutlich höher als bei der ZN-Färbung.

Dafür zeigt die vorliegende Arbeit gangbare Wege auf, wie Routinematerial aus der mikrobiologischen Diagnostik aufzubereiten ist, um den Einsatz der sensitiveren pAbBCG-Färbung überhaupt zu ermöglichen. Auch die erforderlichen Eigenschaften des Routinematerials für diese Färbemethode konnte in dieser Arbeit definiert werden.

Ansatzweise ergab die vorliegende Arbeit, dass sich die pAbBCG-Färbung wegen ihrer erhöhten Sensitivität gegenüber der herkömmlichen ZN-Färbung für bestimmte Fragestellungen in der mikrobiologischen Routinediagnostik eignet. Dafür sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Lohnenswert erscheint eine Untersuchung, ob Sputum-Proben durch Hemmung der vorhandenen Enzyme derart aufbereitet werden können, dass sich die Hintergrundfärbung verringert und somit eine Beurteilung der Probe ermöglicht wird. Auch die Änderung der Färbung durch den Einsatz eines oligo- oder monoklonalen Antikörpers könnte eine differenziertere Anfärbung bewirken. Interessant erscheinen in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von Randhawa (63), der durch Einsatz monoklonaler Antikörper das Verteilungsmuster von spezifischen Leukozyten in tuberkulösen Granulomen darstellen konnte.

## 7. Literatur

1. Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. WHO Report 2007 WHO/HTM/TB/2007.376.
2. Kochi A: The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991;72:1-6.
3. Sudre P, ten Dam G, Kochi A: Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull World Health Organ* 1992;70:149-59.
4. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A: Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull World Health Organ* 1994;72:213-20.
5. K uchler R, Pfyffer GE, R usch-Gerdes S, et al.: MiQ 5: Qualit tsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, Tuberkulose/ Mykobakteriose. Gustav Fischer Stuttgart Jena L ubeck Ulm, 1998.
6. Buckner CB, Walker CW: Radiologic manifestations of adult tuberculosis. *J Thorac Imaging* 1990 Apr;5(2):28-37.
7. Woodring JH, Vandiviere HM, Fried AM, et al.: Update: the radiographic features of pulmonary tuberculosis. *AJR Am J Roentgenol* 1986 Mar;146(3):497-506.
8. McAdams HP, Erasmus J, Winter JA: Radiologic manifestations of pulmonary tuberculosis. *Radiol Clin North Am* 1995 Jul;33(4):655-78.
9. Geng E, Kreiswirth B, Burzynski J, et al.: Clinical and radiographic correlates of primary and reactivation tuberculosis: a molecular epidemiology study. *JAMA* 2005 Jun 8;293(22):2784-5.

10. Ulrichs T, Kaufmann SH: Mycobacterial persistence and immunity. *Frontiers of Bioscience* 2002;7:d458-69.
11. Ulrichs T, Kaufmann SH: Immunology of tuberculosis: impact on the development of novel vaccines. *Internist (Berl.)* 2003;44(11):1374-84.
12. Seiler P, Ulrichs T, Bandermann S, Pradl L, Jörg S, Krenn V, Morawietz L, Kaufmann SH, Aichele P: Cell-wall alternations as an attribute of *Mycobacterium tuberculosis* in latent infection. *J Inf Dis* 2003;188(9):1326-31.
13. Robert Koch Institut: Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte – Tuberkulose März 2002.  
[http://www.rki.de/cln\\_049/nn\\_274324/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Mbl\\_Tuberkulose.html](http://www.rki.de/cln_049/nn_274324/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Mbl_Tuberkulose.html)
14. Harada N: Characteristics of a diagnostic method for tuberculosis infection based on whole blood interferon-gamma assay. *Kekkaku* 2006 Nov;81(11):681-6.
15. Arend SM, Engelhard AC, Groot G, et al.: Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001 Nov;8(6):1089-96.
16. Andreu J, Caceres J, Pallisa E, Martinez-Rodriguez M: Radiological manifestations of pulmonary tuberculosis. *Eur J Radiol* 2004 Aug;51(2):139-49.
17. Thumerelle C, Pouessel G, Errera S, et al.: Radiologic manifestations of pulmonary tuberculosis. *Arch Pediatr* 2005 Aug;12 Suppl 2:S132-6.
18. Eisenhuber E, Mostbeck G, Bankier et al.: Radiologic diagnosis of lung tuberculosis. *Radiologe* 2007 May;47(5):393-400.

19. Martinez S, McAdams HP, Batchu CS: The many faces of pulmonary nontuberculous mycobacterial infection. *AJR Am J Roentgenol* 2007 Jul;189(1):177-86.
20. Balasubramanian V, Wiegeshaus EH, Taylor BT, Smith DW: Pathogenesis of tuberculosis: pathway to apical localization. *Tuber Lung Dis* 1994;75:168-178.
21. Dubovsky H: A historical basis for modern concepts of the pathogenesis of tuberculosis. *S Afr Med J* 1975;49:1105-1110.
22. Schoch OD, Rieder P, Tueller C, et al.: Diagnostic yield of sputum, induced sputum, and bronchoscopy after radiologic tuberculosis screening. *Am J Respir Crit Care Med* 2007 Jan 1;175(1):80-6.
23. Bishop PJ: The history of Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle* 1970;51:196-206.
24. Henriksen SA, Pohlenz JF: Staining of cryptosporidia by modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand* 1981;22:594-596.
25. Muller RL, Taylor MG: The specific differentiation of schistosome eggs by the Ziehl-Neelsen technique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972;66:18-19.
26. De Wit D, Maartens G, Steyn L: A comparative study of the polymerase chain reaction and conventional procedures for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Tuber Lung Dis* 1992;73:262-267.
27. Allen JL: A modified Ziehl-Neelsen stain for mycobacteria. *Med Lab Sci* 1992;49:99-102.
28. Marks J: Notes of the Ziehl-Neelsen staining of sputum. *Tubercle* 1974;55:241-44.

29. Slosarek MJ, Dondov J, Dabrowska LJ, Fiedler EJ, Jankova EJ, Kalfin EJ, Kaustova JJ, Mezensky LJ, Mysak JJ, Sapkadzijeve PJ, Wojciechowska EJ, Hyncica VJ: Comparison of microscopic positivity in smears from sputa stained according to Ziehl-Neelsen in different modifications. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1977;21(1):7-15.
30. Wiley EL, Mulholland TJ, Beck B, Tyndall JA, Freeman RG: Polyclonal antibodies raised against *Bacillus Calmette-Guérin*, *Mycobacterium Duvalii*, and *Mycobacterium Paratuberculosis* used to detect *Mycobacteria* in tissue with the use of immunohistochemical techniques. *Am J Clin Pathol* 1990;94:307-312.
31. Orrell JM, Brett SJ, Ivanyi J, Coghill G, Grant A, Beck JS: Measurement of the tissue distribution of immunoperoxidase staining with polyclonal anti-BCG serum in lung granulomata of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Pathology* 1991;164:41-45.
32. Kutzner H, Argenyi ZB, Requena L, Rütten A, Hügel H: A new application of BCG for rapid screening of various tissue microorganisms. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:56-60.
33. Geisel O, Netter F, Hermanns W: Specificity of the immunohistochemical demonstration of mycobacterial antigens. *Zentralbl Veterinarmed* 1994;41:548-553.
34. Wiley EL, Beck B, Freeman RG: Reactivity of fungal organisms in tissue sections using anti-mycobacteria antibodies. *J Cutan Pathol* 1991;18:204-209.
35. Glover RA, Cockerell CJ: Demonstration of *nocardia asteroides* in tissue using polyclonal anti-mycobacterial antibodies. *J Cutan Pathol* 1990;17: 294.
36. Harboe M, Mshana RN, Closs O, Kronvall G, Axelsen NH: Cross-reactions between mycobacteria. II. Crossed immunoelectrophoresis analysis of soluble antigens of BCG and comparison with other mycobacteria. *Scand J Immunol* 1979;9:115-24.

37. Bialek R, Ernst F, Dietz K, Najvar LK, Knobloch J, Graybill JR, Schaumburg-Lever G: Comparison of staining methods and a nested PCR assay to detect *Histoplasma capsulatum* in tissue sections. *Am J Clin Pathol* 2002;117:597-603.
38. Bonnenberger TE, Ihrke PJ, Naydan DK, Affolter VK: Rapid identification of tissue micro-organisms in skin biopsy specimens from domestic animals using polyclonal BCG antibody. *Veterinary Dermatology* 2001;12:41-47.
39. Byrd J, Mehregan DR, Mehregan DA: Utility of anti-bacillus Calmette-Guérin antibodies as a screen for organisms in sporotrichoid infections. *J Am Acad Dermatol* 2001;44:261-264.
40. Hernandez-Pando R, Jeyanathan M, Mengistu G, Aguilar D, Orozco H, Harboe M, Rook GA, Bjune G: Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet* 2000;356:2133-2138.
41. Mulcahy GM, Kaminski ZC, Albanese EA, Sood R: IS6110-based PCR methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1996;34(5):1348-1349.
42. Martins LC, Paschoal IA, Nowakonski A, Silva SA, Costa FF, Ward LS: Nested-PCR using MPB64 fragment improves the diagnosis of pleural and meningeal tuberculosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000;33(3):253-7.
43. Kown KS, Oh CK, Jang HS, Lee CW, Jun ES: Detection of mycobacterial DNA in cervical granulomatous lymphadenopathy from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by PCR. *J Dermatol* 2000;27:355-360.
44. Garg SK, Tiwari RP, Tiwari D, Singh R, Malhotra D, Ramnani VK, Prasad GBKS, Chandra R, Franziano M, Colizzi, Bisen PS: Diagnosis of Tuberculosis: Available Technologies, Limitations and Possibilities. *J Clin Lab Anal* 2003;17:155-163.

45. Scott CP, Dos Anjos Filho L, De Queiroz Mello FC, et al: Comparison of C(18)-carboxypropylbetaine and standard N-acetyl-L-cysteine-NaOH processing of respiratory specimens for increasing tuberculosis smear sensitivity in Brazil. *J Clin Microbiol* 2002 Sep;40(9):3219-22.
46. Wayne LG: Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:908-14.
47. Fine PE, Small PM: Exogenous reinfection in tuberculosis. *N Engl J Med* 1999;341:1226-27.
48. Van Rie A, Warren R, Richardson M, et al: Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* 1999;341:1174-79.
49. Ulrichs T, Lefmann M, Reich M, Morawietz L, Roth A, Brinkmann V, Kosmiadi GA, Seiler P, Aichele P, Hahn H, Krenn V, Göbel UB, Kaufmann SH: Modified immunohistological staining allows detection of Ziel-Neelsen-negative *Mycobacterium tuberculosis* organisms and their precise localization in human tissue. *J Pathol* 2005;205:633-640.
50. Murray JF: A century of tuberculosis. *Am J Resp Crit Care Med* 2004;169(11):1181-1186.
51. Ridley MJ, Ridley DS: Histochemical demonstration of mycobacterial antigen, specific antibody and complement in the lesions of tuberculosis. *Histochemical Journal* 1986;18:551-556.
52. Higuchi S, Moritaka S, Dannenberg AM Jr, et al.: Persistence of Protein, carbohydrate and wax components of tubercle bacilli in dermal BCG lesions. *Am Rev Respir Dis* 1981;123:397-401.

53. Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de Leon A, Daley CL, Small PM: Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 1999;353:444-449.
54. Schettini APM, Ferreira LC, Milagros R, Schettini MCA, Pennini SN, Rebello PB: Enhancement in the histological diagnosis of Leprosy in patients with only sensory loss by demonstration of Mycobacterial antigens using anti-BCG polyclonal antibodies. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2001;69:335-340.
55. Mshana RN, Humber DP, Harboe M, Belehu A: Demonstration of mycobacterial antigens in nerve biopsies from leprosy patients using peroxidase-antiperoxidase immunoenzyme technique. *Clin Immunol Immunopathol* 1983;29:359-368.
56. Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA: Cutaneous Malakoplakia: A report of two cases with the use of anti-BCG for the detection for micro-organisms. *J AM ACAD DERMATOL* 2000;43:351-354.
57. Sumi MG, Mathai A, Reuben S, Sarada C, Radhakrishan VV: Immunocytochemical method for early laboratory diagnosis of Tuberculous Meningitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:344-347.
58. Thwaites GE, Tran Thi Hong Chau, Farrar JJ: Improving the bacteriological diagnosis of Tuberculous Meningitis. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:378-379.
59. Ulukanligli M, Aslan G, Taci 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.
60. Ba F, Rieder HL: A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl-Neelsen technique in the examination of sputum for acid-fast bacilli. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999 Dec; 3(12):1101-5.

61. Githui W, Kitui F, Juma ES et al.: A comparative study on the reliability of the fluorescence microscopy and Ziehl-Neelsen method in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *East Afr Med J* 1993 May;70(5):253-4.
62. Kumar N, Tiwari MC, Verma K: AFB staining in cytodiagnosis of tuberculosis without classical features: a comparison of Ziehl-Neelsen and fluorescent methods. *Cytopathology* 1998;9:208-214.
63. Randhawa PS: Lymphocyte subset in granulomas of human tuberculosis: an in situ immunofluorescence study using monoclonal antibodies. *Pathology* 1990;22:153-155.

Lebenslauf

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

Lebenslauf

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

**Publikationsliste:**

Ulrichs T, Lefmann M, Reich M, Morawietz L, Roth A, Brinkmann V, Kosmiadi GA, Seiler P, Aichele P, Hahn H, Krenn V, Göbel UB, Kaufmann SH: Modified immunohistological staining allows detection of Ziel-Neelsen-negative *Mycobacterium tuberculosis* organisms and their precise localization in human tissue. J Pathol 2005;205:633-640.

## Erklärung

„Ich, Maja Reich, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung eines immunhistologischen Nachweises von Mykobakterien in der mikrobiologischen Diagnostik“ 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.“

Datum

19.11.2010

Unterschrift

## Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. H. Hahn, danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie seiner Unterstützung und seinen fachlichen Rat.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Timo Ulrichs für seine jederzeit gewährte Unterstützung und für seine konstruktive Kritik.

Bei den Medizinisch-technischen Assistentinnen Heike und Dagmar möchte ich mich für die Unterstützung und besonders freundliche Atmosphäre bei den Laborarbeiten bedanken.

Unverzichtbar für das Gelingen dieser Arbeit war die uneigennützig bereitgestellte phantastische Verköstigung (inkl. Kaffee und Ricard) eines abgeschotteten Arbeitszimmers durch meinen Onkel. All meine emotionalen Tiefen wurden stoisch ertragen und konstruktiv umgeleitet, die Höhen mit Freude mitgefeiert. Vielen Dank!

Dank auch meinem Ehemann und Sohn für ihr liebevolles Verständnis, die sich nun auf gemeinsame Urlaubstage freuen.

Zuletzt danke ich auch meinen Schwiegereltern, meinen Geschwistern, meinem Vater und natürlich meiner Mutter