

Aus der medizinischen Klinik und dem Institut für Laboratoriumsmedizin
der Asklepios Fachkliniken München Gauting

Chefarzt: Prof. Dr. K. Häußinger

**Schneller Nachweis von Mutationen im gyrA Gen von
Mycobacterium tuberculosis
mit Relevanz für die Entstehung von
Medikamentenresistenzen gegen Chinolone
mittels der Real-Time PCR auf dem LightCycler® System**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Andreas Färber

aus

München

Jahr

2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. K. Häußinger
Prof. Dr. H Rüssmann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. R. Kappler
Prof. Dr. J. Bogner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : Ein weltweiter medizinischer Notfall.....	6
1.2. Medikamentenresistenzen bei <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
1.3. Phänotypische Resistenztestung.....	10
1.4. Molekularbiologische Methoden zur Resistenzbestimmung.....	12
1.5. Die Bedeutung von Chinolonen und ihrer Resistenztestung	13
1.6. Zielsetzung: Etablierung einer schnellen Nachweismethode zur Vorhersage mykobakterieller Resistenzen gegen Chinolone mittels der Real-time PCR.....	16
2. Materialien und Methoden	20
2.1. Probengewinnung und Aufbereitung	20
2.1.1. Auswahl der <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Stämme	20
2.1.2. Spiken von Sputen	21
2.1.3. Anreicherung von Sputumproben mittels des NALC-Verfahrens	22
2.1.4. DNA-Isolierung	23
2.1.4.1. Mechanisch-enzymatische Lyse von Mykobakterien.....	23
2.1.4.2. DNA-Isolierung mittels Chelex100®	24
2.1.4.3. DNA-Aufreinigung mittels des High Pure PCR template preparation kit.....	25
2.1.4.4. DNA-Isolierung aus humanen Leukozyten	26
2.2. Mikroskopische Nachweisverfahren	27
2.2.1. Ziehl-Neelsen Färbung und Lichtmikroskopie.....	27
2.2.2. Auraminfärbung und Fluoreszenzmikroskopie.....	28
2.3. Kulturelle Nachweisverfahren	29
2.3.1. Kulturen auf Festmedien	29
2.3.2. Kulturen in Flüssigmedien.....	31
2.3.3. Resistenzbestimmung mittels der absoluten Konzentrationsmethode	31
2.4. Die Real-Time-Polymerasekettenreaktion mittels der gyrA PCR auf dem LightCycler® System	34
2.4.1. Auswahl der Sonden	34
2.4.2. Auswahl der Primer.....	36
2.4.3. Vorbereitungen.....	38
2.4.4. Testdurchführung	40
2.4.5. Testauswertung.....	42
2.5. Weitere Methoden der DNA-Analytik.....	42
2.5.1. Gelelektrophorese.....	42
2.5.2. Konventionelle Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR)	44
2.5.3. Sequenzierung	45
2.6. Molekulargenetische Untersuchungen: Fingerprinting mittels des IS6110 RFLP	47
2.6.1. Vorbereitungen.....	47
2.6.1.1. Herstellung des internen Markers	47

2.6.1.2.	Amplifikation von <i>M. bovis</i> für die Hybridisierungssonde.....	48
2.6.2.	Isolierung genomischer DNA	50
2.6.3.	Verdau mit der Restriktionsendonuklease Pvu II	51
2.6.4.	Gelelektrophoretische Auftrennung für Southern Blot	52
2.6.5.	Southern Blotting.....	53
2.6.6.	Hybridisierung	54
2.6.7.	Detektion und photochemische Auswertung.....	55
2.6.8.	Hybridisierung und Detektion des internen Standards	56
2.6.9.	Computergestützte Auswertung.....	56
2.7.	Chemikalien	58
3.	Ergebnisse.....	59
3.1.	Etablierung der Mutationsanalyse im <i>gyrA</i> Gen mittels der PCR auf dem LightCycler® System	59
3.1.1.	Optimierung der Amplifikationsbedingungen	60
3.1.2.	Optimierung der Schmelzkurven.....	63
3.1.2.1.	Asymmetrische PCR-Bedingungen	64
3.1.2.2.	Optimierung der Primerkonzentrationen	65
3.1.2.3.	Variation der Sonden: Detektion des Gegenstranges und Mismatches	66
3.1.2.4.	Einfluss der Schmelzgeschwindigkeit auf das Schmelzverhalten	69
3.1.3.	Erstellung eines Standardprotokolls zur Durchführung der <i>gyrA</i> PCR auf dem LightCycler® System.....	70
3.1.3.1.	Festlegung der Versuchsparameter der Real-Time PCR	70
3.1.3.2.	Probenvorbereitung.....	72
3.1.3.3.	Testdurchführung	73
3.1.3.4.	Auswertung	73
3.1.4.	Nachweis von Mutationen in der QRDR durch die Schmelzpunktanalyse	75
3.1.4.1.	Schmelzpunktprofil des Wildtyps der QRDR	75
3.1.4.2.	Schmelzpunktprofil der Mutationen Codon 90 (GCG → GTG).....	76
3.1.4.3.	Schmelzpunktprofil der Mutationen Codon 94 (GAC → GGC).....	77
3.1.4.4.	Reproduzierbarkeit spezifischer Schmelzpunkte im Intra- und Interassayvergleich	78
3.1.4.5.	Unspezifische Schmelzpunkte und Heteroresistenzen.....	81
3.2.	Bestimmung der Chinolonresistenz mit der PCR auf dem LightCycler® System	84
3.2.1.	Spezifität und analytische Sensitivität der <i>gyrA</i> auf dem LightCycler® System	84
3.2.2.	Speziesspezifität für den <i>M. tuberculosis</i> –Komplex	87
3.2.3.	Sensitivität (Nachweisgrenze) und Direktnachweis aus dem Sputum.....	90
3.3.	Molekulargenetische Charakterisierung chinolonresistenter Stämme.....	93
4.	Diskussion.....	95
4.1.	Etablierung einer Real-Time PCR basierend auf dem LightCycler® System zur Analyse resistenzvermittelnder Mutationen im <i>gyrA</i> Gen: Die <i>gyrA</i> PCR auf dem LightCycler® System	95
4.1.1.	Optimierung der Testdurchführung	95

4.1.2.	Testauswertung.....	96
4.2.	Gyrasemutationen in Stämmen des SRL Gauting.....	98
4.3.	Genotypischer Nachweis von Chinolonresistenzen mittels der Mutationsanalyse des gyrA-Gens	100
4.3.1.	Molekularbiologische Charakterisierung von chinolonresistenten und sensiblen Stämmen von Mycobacterium tuberculosis des SRL Gauting	100
4.3.2.	Zusammenfassung veröffentlichter Studien zu Gyrasemutationen in chinolonresistenten und chinolonsensiblen Stämmen.....	102
4.3.3.	Kritische Evaluation der phänotypischen und der genotypischen Resistenzbestimmung gegenüber Chinolonen bei Mycobacterium tuberculosis	106
4.3.3.1.	Genotypische Hinweise zur phänoypischen Grenzwertbestimmung	106
4.3.3.2.	Modelle der Resistenzentstehung.....	108
4.3.3.3.	Vor und Nachteile phäno- und genotypische Resistenztestung	111
4.4.	Implikationen für einen Direktnachweis von Resistenzen aus dem Sputum	113
4.5.	Bedeutung der schnellen Identifizierung von Medikamentenresistenzen für die Behandlung und die Kontrolle der Weiterverbreitung der Tuberkulose.....	115
5.	Zusammenfassung.....	119
	ANHANG	121
A	Stammsammlung	121
B	Konzept der gyrA PCR auf dem LightCycler® System	124
C	Standardprotokolle	126
D	Gyrasemutationen bei veröffentlichten klinischen Isolaten.....	132
E	Verteilung der gyrA Mutationen klinischer Isolate.....	133
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	134
	TABELLENVERZEICHNIS	135
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	136
	LITERATURVERZEICHNIS.....	137
	DANKSAGUNG	147

1. Einleitung

1.1. *Mycobacterium tuberculosis*: Ein weltweiter medizinischer Notfall

Die Tuberkulose gehört heute mit HIV/AIDS und Malaria weltweit zu den tödlichsten Infektionserkrankungen. Ungefähr jeder Dritte Bewohner der Erde ist mit dem Erreger infiziert, ungefähr jeder zehnte Infizierte wird an der Tuberkulose erkranken. Obwohl die Tuberkulose im Allgemeinen medikamentös gut heilbar ist, sterben an ihr jedes Jahr fast 2 Millionen Menschen (WHO 2005 (1)). Neben mangelnden Ressourcen und unzureichenden Behandlungsmethoden spielen dabei zunehmend auch Medikamentenresistenzen eine bedeutende Rolle. Die Weltgesundheitsorganisation hatte bezüglich der Tuberkulose 1993 und 1998 den weltweiten Notstand erklärt. Diese Einschätzung wurde 2005 durch aktuelle Deklarationen der afrikanischen (WHO 2005 (2)) und auch der europäischen (WHO 2005 (3)) Unterorganisationen erneut bekräftigt.

Das aufgrund seines Zellwandaufbaus zu den grampositiven Bakterien zählende *Mycobacterium tuberculosis* wurde 1882 von Robert Koch als Erreger der damals bezeichnender Weise auch weiße Pest genannten Tuberkulose identifiziert (Koch 1912 (Nachdruck 1968)). Obwohl Mykobakterien auch schon in ägyptischen Mumien nachgewiesen wurden (Zink, Sola et al. 2003), trat die Erkrankung lange Zeit wohl nur endemisch auf. Der Ursprung für die weltweite epidemische Ausbreitung der Tuberkulose ist vermutlich in den Großstädten Europas zur Zeit der industriellen Revolution zu suchen (Bates and Stead 1993). Sie wurde begünstigt durch die durch sozial- und gesellschaftspolitischen Veränderungen geschaffenen Rahmenbedingungen wie beengte Lebensverhältnisse, eine mangelhafte Ernährungsversorgung, eine erhöhte Migration sowie Koinfektionen wie z.B. HIV (Reichman 2000). Während zu Kochs Zeiten die Tuberkulose vor allem in industrialisierten Ländern eine besondere Rolle spielte (jeder vierte Todesfall in England wird Anfang des 19. Jahrhunderts der Tuberkulose zugeschrieben) und auch viele prominente Opfer wie z.B. Friedrich Schiller, Frederic Chopin oder Franz Kafka forderte (Konietzko 1996), erkranken heute vor allem Menschen in Entwicklungs- oder Schwellenländern (siehe Abbildung 1).

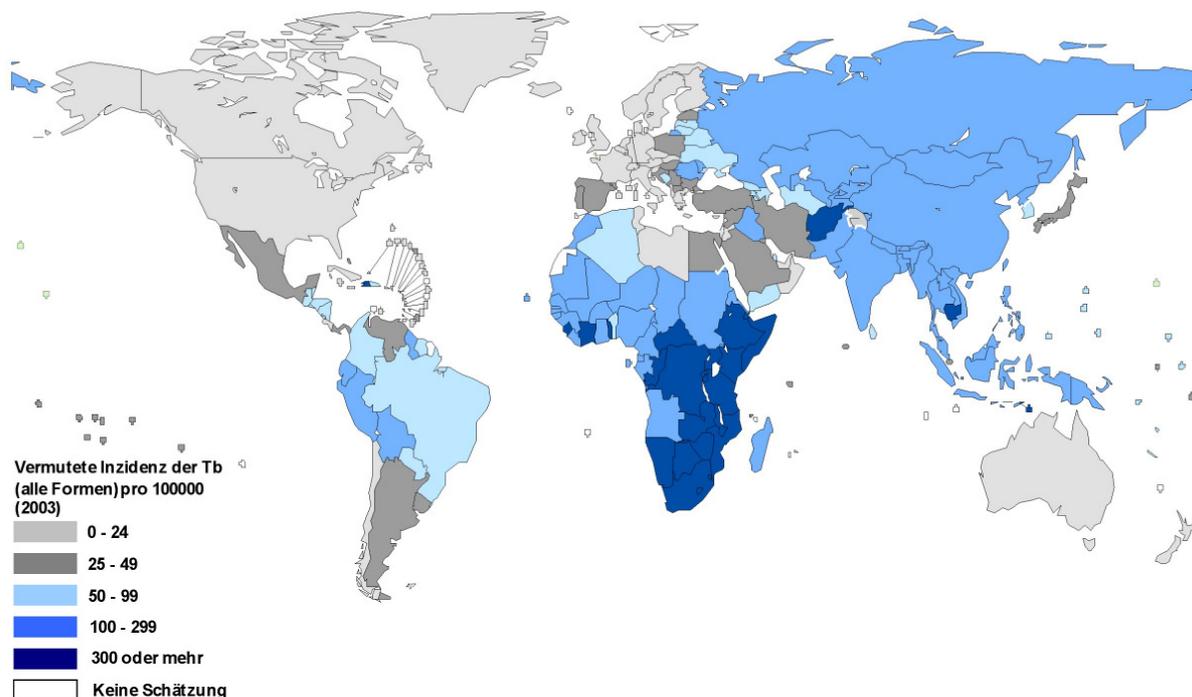


Abbildung 1: Geschätzte Inzidenz aller Formen der Tuberkulose 2003 (WHO 2005 (4))

Die Weltgesundheitsorganisation schätzt, dass 2003 weltweit ca. 8,8 Millionen Menschen neu an der Tuberkulose erkrankt sind. Dies entspricht einer Inzidenz von 140 Fällen pro 100000 Einwohner (WHO 2005 (4)). Dabei wird bei ca. 3,9 Millionen Fällen von einer sputum-smear positiven (sm+) Erkrankung ausgegangen. Dabei handelt es sich um Patienten in deren Sputumausstrich Mykobakterien mikroskopisch nachgewiesen werden konnten, in der Regel also schweren Lungentuberkulosen, die auch epidemiologisch für die Weiterverbreitung der Tuberkulose die entscheidende Rolle spielen. Im selben Report schätzte die WHO die Prävalenz aller Tuberkulosefälle auf 245 pro 100000 Einwohner, entsprechend 15,5 Millionen Erkrankten weltweit, die Mortalität auf 28 pro 100000 Einwohner. Hieraus errechnen sich für das Jahr 2003 weltweit 1,75 Millionen Todesopfer aufgrund dieser prinzipiell heilbaren Erkrankung, wobei es sich bei den Betroffenen zu 98% um junge Erwachsene in Entwicklungsländern handelt (WHO 2005 (1)).

Einen wesentlichen Bestandteil internationaler Konzepte der Tuberkulosekontrolle stellt die von der Weltgesundheitsorganisation und der UNION (IUATLD, International Union against Tuberculosis and Lung Diseases) entwickelte DOTS-Strategie (directly observed therapy, short course) dar (WHO/UNION 1994; WHO 1997). Diese als Gesamtkonzept zu verstehende Strategie beinhaltet neben der Behandlung mittels der direkt überwachten Einnahme von standardisierten

Medikamentenkombinationen beispielsweise unter anderem auch Aspekte des öffentlichen Gesundheitswesens (z.B. aktive Fallfindung) oder die Etablierung politisch vereinbarter Zielvorgaben.

Trotz zahlreicher regional und überregional sehr erfolgreicher Interventionen stieg die Inzidenz der Tuberkulose im letzten Jahrzehnt weltweit mit einem jährlichen Zuwachs von 1,0% – 1,6% kontinuierlich an (WHO 2005 (4)). Von manchen Autoren wird bis 2010 sogar eine Zunahme der Inzidenz auf weltweit 12 Millionen Neuerkrankte und der Mortalität auf weltweit 4 Millionen Tote befürchtet (Iseman 2000). Eine wesentliche Ursache für die weiter steigende Inzidenz der Tuberkulose ist dabei insbesondere in den Auswirkungen der AIDS-Pandemie zu suchen. So steigen die Erkrankungszahlen am stärksten in jenen Ländern Afrikas südlich der Sahara an, die auch die höchsten Infektionsraten mit dem HI-Virus aufweisen (Nunn, Williams et al. 2005). Dieser Entwicklung soll durch integrative Public Health Konzepte für beide Erkrankungen begegnet werden (Harries, Maher et al. 2004).

Außerhalb Afrikas stieg die Inzidenz der Tuberkulose in den letzten Jahren vor allem in Osteuropa, insbesondere in den Nachfolgestaaten der Sowjetunion (WHO 2005 (4)). Eine Koinfektion mit HIV liegt hier nur bei ca. 6% der TB-Fälle (südliches Afrika ca. 60%) vor (2003). Aufgrund der zuletzt stark steigenden Infektionsraten mit dem HI-Virus lässt sich aber für die nahe Zukunft eine weitere Verschärfung des Problems vermuten (Drobniewski, Atun et al. 2004). Der Grund für den starken bisherigen Anstieg der Inzidenz der Tuberkulose in Osteuropa kann dagegen in den veränderten sozioökonomischen Bedingungen und vor allem in der hohen Prävalenz von Medikamentenresistenzen gesehen werden, die auch für die vergleichsweise hohe Mortalität verantwortlich gemacht werden (Bonnet, Sizaire et al. 2005).

1.2. Medikamentenresistenzen bei *Mycobacterium tuberculosis*

Medikamentenresistenzen sind schon kurze Zeit nach der Einführung des Streptomycins [SM/S] (1944) als erstes antituberkulöses Medikament beobachtet worden (Medical Research Council 1948). Aufgrund der negativen Erfahrungen mit der Monotherapie wurden nach der Entdeckung weiterer antimykobakteriell wirksamer Antibiotika schnell Therapieschemata mit Medikamentenkombinationen entwickelt. Nach der Einführung der para-Aminosalicylsäure [PAS] 1948 folgten 1952 mit Isoniazid [INH/H], 1955 Pyrazinamid [PZA/Z], 1961 Ethambutol [EMB/E] und 1966 Rifampicin [RMP/RIF/R], die noch heute hauptsächlich verwendeten *First-*

Line Tuberkulostatika (Reichman 2000). Obwohl auch vorher nur selten durchgeführt, gilt die Monotherapie seit Ende der sechziger Jahre aufgrund der sehr häufigen Entstehung von Medikamentenresistenzen als obsolet. Eine Vierfachkombination gilt daher heute als internationaler Standard. Aufgrund der langen Latenzzeit bis zum Vorliegen eines Resistenzmusters oder aufgrund der fehlenden technischen oder finanziellen Ressourcen für die Bereitstellung der hierfür benötigten aufwendige Labordiagnostik erfolgt die Standardtherapie im Rahmen der DOTS-Strategie heute primär kalkuliert. Sie besteht bei einem neu erkrankten Patienten (so genannte Kategorie I) aus einer Initialphase (Intensive Phase), in der die Patienten für 2 Monate mit Rifampicin, Isoniazid, Pyrazinamid und Ethambutol (2 HRZE) behandelt werden, und einer viermonatigen Fortsetzungsphase (Continuation Phase) mit Rifampicin und Isoniazid (4 HR). Von diesem von der WHO und der UNION empfohlenen und weit verbreiteten Behandlungsschema existieren noch mehrere Variationen.

Die WHO veröffentlicht regelmäßig Berichte zur Verbreitung von Medikamentenresistenzen des *Mycobacterium tuberculosis* (WHO 2004). Besonderer Bedeutung kommen aufgrund der zuvor beschriebenen standardisierten Behandlungsstrategien insbesondere der MDR-Tuberkulose und der primären Medikamentenresistenz zu. Unter einer multiresistenten Tuberkulose (multi drug resistant tuberculosis, MDR-TB) versteht man Isolate mit Resistenzen gegen mindestens Isoniazid und Rifampicin, ein Resistenzmuster also, bei dem klassische Therapieschemata unter DOTS wahrscheinlich wirkungslos bleiben. Allgemein wird angenommen, dass Resistenzen meist durch inadäquate Therapie während der Behandlung entstehen (sekundäre Resistenz). Entgegen der verbreiteten Vermutung, dass resistente Mykobakterien aufgrund der Mutation wichtiger DNA-Abschnitte deutlich weniger virulent seien, wurde schon früh die Übertragung von medikamentenresistenten Stämmen beobachtet (Steiner, Rao et al. 1985). Klinisch führt dies zum Bild der primären Resistenz. Die primäre Multiresistenz spielt insbesondere aufgrund der heute weit verbreiteten, lediglich kalkulierten Therapieschemata ohne Resistenztestung eine wesentliche Rolle bei der Tuberkulosekontrolle. Im aktuellen WHO Report werden die 10 Länder bzw. Regionen mit einem Anteil von über 6,5% MDR-Fällen unter neu diagnostizierten Patienten besonders hervorgehoben (siehe Abbildung 2).

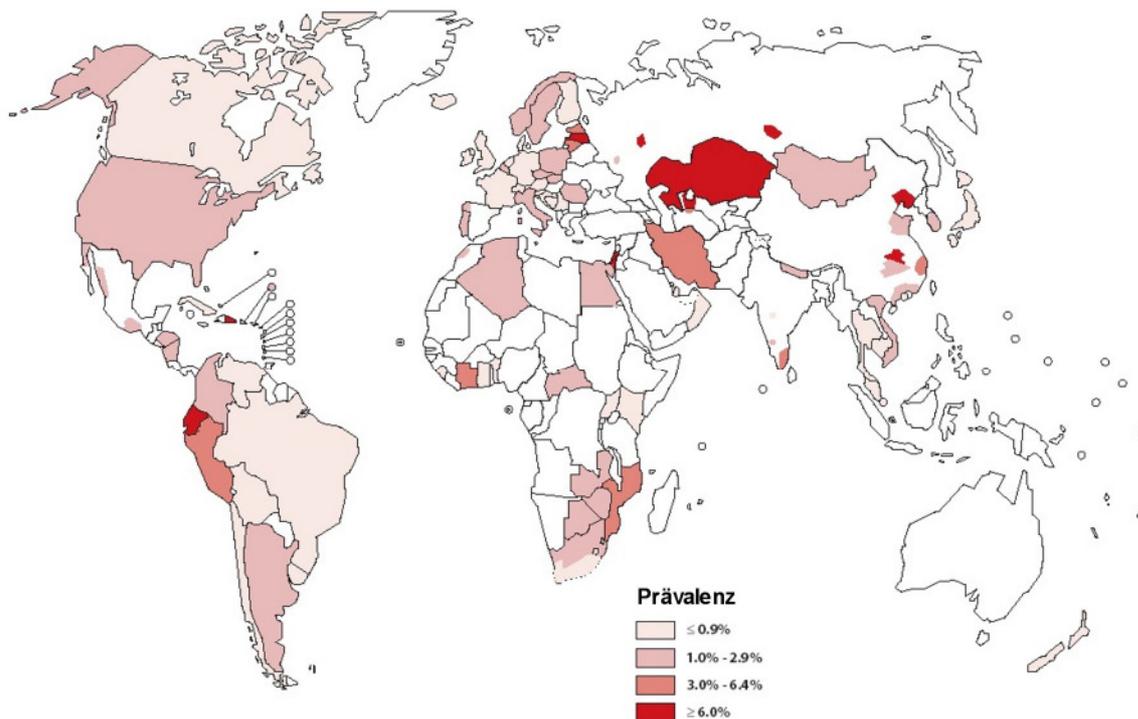


Abbildung 2: Prävalenz der MDR-TB unter neuen Fällen 1994 – 2002, (WHO 2004)

14,2% in Kasachstan (51/359) und Israel (36/253), 13,7% im Tomsk Oblast (Russland), 13,2% in Karakalpakistan (Usbekistan), 12,2% in Estland, 10,4 % in der Liaoning Provinz (China), 9,4% in Litauen, 9,3% in Lettland, 7,8% in der Henan Provinz (China) und 6,6% in Ecuador.

Die WHO schätzt, dass weltweit jedes Jahr ca. 425.000 Neuerkrankte (WHO 2005 (1)) mit einem primär multiresistenten Tuberkulosestamm infiziert sind und somit eine Heilung mit dem DOTS Standardregime nicht zu erwarten ist. Besorgniserregend erscheint hierbei vor allem die starke Zunahme der primären MDR-TB unter neuen Fällen in einigen Regionen, z.B. im Tomsk Oblast (Russland) von 6,5% (1998) auf 13,7% (2002). Eine besonders hohe Prävalenz der multiresistenten Tuberkulose findet sich vor allem bei osteuropäischen Gefängnisinsassen (Coninx, Pfyffer et al. 1998). Da die tuberkuloseerkrankten Insassen häufig nicht vollständig kuriert entlassen werden, tragen diese erheblich zu der Weiterverbreitung von Medikamentenresistenzen bei (Drobniewski, Balabanova et al. 2002).

1.3. Phänotypische Resistenztestung

Aufgrund der klinischen Erkenntnis der Resistenzentstehung wurden ab Mitte der fünfziger Jahre phänotypische Testverfahren für mykobakterielle Resistenzen auf medikamentenhaltigen Festmedien etabliert. Eingeleitet wurde diese Entwicklung durch die von Collins (Collins 1955) beschriebene *Disc Diffusion* Methode für

Streptomycin. Es folgten die *Resistance Ratio* Methode (Marks 1961), die Proportionsmethode (Canetti, Fox et al. 1969) und die Absolute Konzentrationsmethode (Meissner 1964) sowie radiometrische Methoden für Flüssigkulturen (Vincke, Yegers et al. 1982). Die regelmäßige Untersuchung von Medikamentenresistenzen wurde auch in den industrialisierten Ländern erst Anfang der achtziger Jahre eingeführt (Aitken, Sparks et al. 1984). Heute werden immer noch weniger als 5% der Erkrankten weltweit auf Resistenzen hin untersucht.

Resistenzen durch Mutationen entstehen mit einer niedrigen aber konstanten Rate in jeder Population von Mykobakterien (Collins, Grange et al. 1997). David (David 1970) bestimmte mittels der Fluktuationmethode die Wahrscheinlichkeit von Resistenz vermittelnden Mutationen. Für Isoniazid treten diese mit einer Wahrscheinlichkeit von $2,56 \times 10^{-8}$, für Rifampicin mit $2,25 \times 10^{-10}$ pro Generation auf. Dies bedeutet, dass ein isoniazidresistenter Klon unter 10^6 , ein rifampicinresistenter Klon unter 10^8 und ein gegen beide Medikamente resistenter Klon unter 10^{14} Bakterien spontan auftritt. Eine tuberkulöse Kaverne enthält ca. 10^7 – 10^9 Organismen, somit sind einige einfach resistente Klone in einem Patienten auch vor Beginn der Behandlung möglich, mehrfachresistente Stämme allerdings unwahrscheinlich. Die Entstehung von Multiresistenzen aufgrund der Selektion dieser immer resistenteren Klone insbesondere durch das Aufeinanderfolgen von direkten oder funktionellen (inadäquate Compliance, schlechte Medikamentenqualität u.s.w.) Monotherapien ist somit verständlich.

Da es aus oben genannten Gründen durchaus wahrscheinlich ist, vereinzelte resistente Klone ohne klinische Relevanz in Patientenisolaten zu finden, besteht die Zielsetzung von Testverfahren zur Resistenzbestimmung eher darin, „ob ein Isolat genauso wahrscheinlich auf ein Standardregime reagiert wie ein oder mehrere bekannte empfindliche Stämme“ (Collins, Grange et al. 1997). Canetti (Canetti, Fox et al. 1969) löste das Problem durch die Einführung der Proportionsmethode und evaluierte kritische Konzentrationen und kritische Proportionen für die heute üblichen First Line Medikamente anhand von klinisch empfindlichen bzw. resistenten Isolaten von Patienten unter Monotherapie.

Neuere Medikamente wie z.B. auch die Chinolone konnten aus ethischen Gründen nicht mehr unter Monotherapie evaluiert werden. Die Resistenztestung für diese Medikamente erfolgt daher meist anhand der Bestimmung der MHK (Minimale Hemm-Konzentration) mittels der absoluten Konzentrationsmethode. Hierbei gelten

jene Stämme als resistent, deren MHK's von der engen MHK-Verteilung von Wildstämmen ohne Exposition zu dem zu untersuchenden Medikament abweichen (Mitchison 2005).

1.4. Molekularbiologische Methoden zur Resistenzbestimmung

Schon wenige Jahre nach der Entdeckung der Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) durch Kary Mullis 1983 wurden die Möglichkeiten einer auf der Molekularbiologie basierenden Resistenztestung beim *Mycobacterium tuberculosis* theoretisch diskutiert (Shoemaker 1986). Ein entscheidender Vorteil liegt hierbei vor allem bei dem schnellen Vorliegen eines Ergebnisses. 1992 beschrieben Zhang et al. die häufig für die Isoniazidresistenz verantwortlichen Polymorphismen im *katG*-Gen, und somit die erste Zielsequenz für eine molekularbiologische Resistenztestung (Zhang, Heym et al. 1992). 1994 wurden im *inhA*-Gen weitere INH-resistenzvermittelnde Polymorphismen gefunden (Banerjee, Dubnau et al. 1994). Weltweit könnten durch Mutationsanalysen an diesen beiden Genabschnitten ca. 75 – 85% der phänotypisch isoniazidresistenten Stämme identifiziert werden, nur durch die Analyse der *katG* 315 Mutationen bereits ca. 50 – 60%. Weitere Mutationen mit allerdings quantitativ und qualitativ geringerer Bedeutung wurden in den Genen *KasA*, *oxyR*, *ahpC* und *furA* gefunden (Ramaswamy and Musser 1998).

Im Gegensatz zu diesem durch mehrere Gene beeinflussbaren Resistenzverhalten gegenüber Isoniazid finden sich bei ca. 96% (Wade and Zhang 2004) der phänotypisch rifampicinresistenten Stämme Mutationen in einem nur 81 Basenpaaren langen Genabschnitt des *rpoB*-Gens. Telenti et al. identifizierten 1993 diesen Genabschnitt (RRDR: Rifampicin resistance determining region) als den primären Locus der Rifampicinresistenzentstehung (Telenti, Imboden et al. 1993). Wohingegen zuvor Mutationsanalysen noch auf der aufwendigen Sequenzierung des jeweiligen Genabschnittes beruhten, stellte Telenti bereits bei dieser Erstbeschreibung der RRDR eine schnelle vereinfachte Analyse mittels der PCR-SSCP vor. Hierbei werden die Polymorphismen anhand der durch sie induzierten unterschiedlichen Konformationen der als Einzelstrang vorliegenden Genabschnitte mittels ihrer unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten in einem nicht denaturierenden Gel identifiziert (Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP). Zudem gelang der automatisierbare Nachweis der Mutationen aus Flüssigkulturen und auch direkt aus hochpositiven Sputumproben (Telenti, Imboden et al. 1993).

Aufgrund der therapeutischen Schlüsselstellung von Isoniazid und Rifampicin und aufgrund des hohen prädiktiven Wertes der *rpoB* Mutationen wurden in den Folgejahren zahlreiche weitere schnelle molekularbiologische Methoden der Resistenzbestimmung publiziert. Exemplarisch sei hier der Nachweis der KatG 315 Mutation aufgrund der RLFP (Nachamkin, Kang et al. 1997; Rinder, Feldmann et al. 1999) oder mittels einer Allel-spezifischen Multiplex-PCR (Mokrousov, Otten et al. 2002) erwähnt. Die Analyse des RRDR erfolgt aufgrund des längeren Genabschnitts meist durch die Hybridisierung von PCR-Produkten mit Oligonucleotiden. In Line-Probe-Assays werden nach der Amplifikation die PCR-Produkte an eine Membran gebunden und mit markierten Oligonuklotiden unter stringenten Bedingungen hybridisiert (Rossau, Traore et al. 1997; Marttila, Soini et al. 1998).

Torres et al. stellten 2000 erstmals ein Protokoll zur Analyse von *rpoB* und *katG* Mutationen mittels der Real-Time-PCR unter Benutzung des LightCycler® Systems und zweier Hybridisierungs sonden vor (Torres, Criado et al. 2000; Torres, Criado et al. 2003). Die mykobakterielle DNA kann dabei in einem Vorgang amplifiziert und mittels der Schmelzpunktanalyse nach Wildtyp und spezifischen Mutationen differenziert werden. Ebenfalls auf Real-Time-PCR Systemen basierend wurde zuletzt auch die Mutationsanalyse mit TaqMan® MGB-Sonden etabliert (Wada, Maeda et al. 2004; Espasa, Gonzalez-Martin et al. 2005).

Line-Probe-Assays zur Resistenzbestimmung werden inzwischen auch kommerziell vertrieben. Innogenetics (Gent, Belgien) veröffentlichte 1997 den InnoLipa® Rif.TB - Test (Artikelnummer 80663) zur Identifizierung wesentlicher Mutationen im *rpoB*-Gen. Mit dem von Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) seit 2004 vertriebenen GenoType® MTBDR (Bestellnummer 302/30296) können zusätzlich zu der Rifampicinresistenz durch Nachweis von Mutationen im *katG* Gen auch viele Isoniazidresistenzen nachgewiesen werden.

1.5. Die Bedeutung von Chinolonen und ihrer Resistenztestung

In Zeiten zunehmender Medikamentenresistenzen von *Mycobacterium tuberculosis* und aufgrund des wachsenden Bewusstseins über deren Bedrohlichkeit erfahren Chinolone wegen ihrer herausragenden Rolle unter den *Second Line* Medikamenten eine stark zunehmende Aufmerksamkeit. Chinolone werden aufgrund ihres Zielmoleküls Gyrase auch Gyrasehemmer genannt. Die Gyrase (Topoisomerase II) setzt sich als Tetramer aus je zwei der von den Genen *gyrA* und *gyrB* codierten

Polypeptiden zusammen. Die Gyrase beseitigt vor der Replikation das *Supercoiling* der zirkulären bakteriellen DNA durch die Induktion eines vorübergehenden Doppelstrangbruches. Zudem inhibieren Chinolone auch die von den Genen *parC* und *parE* codierte Topoisomerase IV. Diese beseitigt im Gegensatz zur Gyrase nach der Replikation durch einen Einzelstrangbruch ein vorliegendes *Supercoiling* und ermöglicht so die Trennung der Chromosome (Bearden and Danziger 2001). Obwohl bereits 1998 das komplett sequenzierte Genom von *Mycobacterium tuberculosis* veröffentlicht wurde (Cole, Brosch et al. 1998), konnte bisher ein Korrelat zu den Genen *parC* und *ParE* nicht identifiziert werden. Die Existenz der Topoisomerase VI gilt in Mykobakterien daher als fraglich (Onodera, Tanaka et al. 2001).

Die tuberkulostatische Wirksamkeit der Chinolone wurde 1984 zuerst für Ofloxacin schon in dessen Entwicklungsphase *in vitro* demonstriert (Tsukamura, Mizuno et al. 1984) und im Folgejahr für die therapeutische Anwendung evaluiert (Tsukamura, Nakamura et al. 1985). Ciprofloxacin wird seit dessen Markteinführung 1986 für die Tuberkulosebehandlung genutzt (Thomas, Naumann et al. 1986; Bergstermann and Ruchardt 1997). Für das seit 1999 vertrieben Moxifloxacin wurde frühzeitig eine tuberkulostatische Wirksamkeit nachgewiesen (Woodcock, Andrews et al. 1997), es besitzt unter den zugelassenen Chinolonen die höchste Effektivität gegen Mykobakterien (Ginsburg, Grosset et al. 2003). Diese entspricht in Tiermodellen in etwa dem des Isoniazids (Alvarez-Freites, Carter et al. 2002).

Die Vorteile der Chinolone liegen neben ihrer weitgehend guten Verträglichkeit auch unter Langzeittherapie in ihre vorteilhaften pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Parametern. Sie verfügen über eine hohe orale Bioverfügbarkeit, Blutspiegel (C_{max}) erreichen das 2- (Ciprofloxacin 250 mg) bis 9-fache (Moxifloxacin 400 mg) der jeweiligen MHK. Chinolone besitzen zudem eine ausgezeichnete Gewebepenetration und akkumulieren in Makrophagen (Mor, Vanderkolk et al. 1994). Gyrasehemmer besitzen außerdem eine gute bakterizide Wirkung. Von therapeutischem Interesse ist insbesondere die hohe frühe bakterizide Wirksamkeit (EBA, early bactericidal activity) von Moxifloxacin, die in Tiermodellen der von INH entsprach (Ji, Lounis et al. 1998) und in einer kleinen randomisierten Studie am Menschen diese sogar übertraf (Pletz, De Roux et al. 2004). Zudem zeigte Moxifloxacin im Tierversuch auch eine sterilisierende, d.h. eine auf sich nicht replizierende Bakterien wirkende Komponente (Lounis, Bentoucha et al. 2001).

Medikamentenresistenzen von *Mycobacterium tuberculosis* gegen Chinolone wurden schon kurz nach deren Einführung klinisch beobachtet (Rastogi, Ross et al. 1992). Die Entwicklung einer Ciprofloxacinresistenz wurde bei einem zuvor sensiblen Stamm schon nach 13 Tagen Monotherapie beschrieben (Ginsburg, Woolwine et al. 2003). Abgesehen von solchen „akzidentellen“ Fällen wird eine Monotherapie aus ethischen Gründen heute nicht mehr durchgeführt. Eine Bestimmung kritischer Konzentrationen bzw. Proportionen analog zu den Versuchen Canettis (s.o.) ist für die Chinolone dementsprechend nicht erfolgt. Gemäß der bakteriologischen Definition von Resistenz nach Mitchison (s.o.) wurden für die einzelnen Chinolone mittlere Hemmkonzentrationen (MHK's) bestimmt. Für Wildtypstämme von *Mycobacterium tuberculosis* wurden vor allem für Ciprofloxacin in zahlreichen Veröffentlichungen stark abweichende MHK's publiziert, die Spannweite reicht von 0,6 µg/ml (Karak and De 1995) bis 4,3 µg/ml (Gorzynski, Gutman et al. 1989). Die Weltgesundheitsorganisation empfiehlt in ihrer Richtlinie zur Empfindlichkeitstestung von *Second-Line* Medikamenten für die Diskriminierung resistenter Stämme die Testung des Wachstums auf einer Löwenstein-Jensen Festkultur mit 2 µg/ml Ciprofloxacin im Medium. Als resistent gelten alle Stämme, die weniger als 1% Wachstum im Vergleich zum medikamentenfreien Nährboden zeigen, also Stämme mit einer MHK > 2µg/ml. Die MHK für Wildtypstämme von *Mycobacterium tuberculosis* für Moxifloxacin wird in der Literatur relativ konstant mit 0,5 µg/ml angegeben (Jacobs 1999; Bryskier and Lowther 2002). Eine Richtlinie der WHO oder der UNION besteht bisher noch nicht.

Mutationen im *gyrA*-Gen wurden Anfang der achtziger Jahre zuerst für *Escherichia coli* als Grund für die Resistenzentstehung gegen Chinolone beschrieben (Hooper, Wolfson et al. 1986). Analog zur RRDR im *rpoB*-Gen wurde auch im *gyrA*-Gen als Hotspot für resistenzvermittelnde Mutationen ein ebenfalls artübergreifend hochkonservierter Genabschnitt identifiziert und als QRDR (Quinolone resistance determining region) definiert (Piddock 1999). Später wurden weitere die MHK beeinflussende Mutationen in den Genen *gyrB*, *parC*, *parE*, *lfrA* und einigen andern Genen entdeckt.

1994 wurden die Gyrasegene von *Mycobacterium tuberculosis* sequenziert und die ersten klinischen Isolate mit Mutationen identifiziert. Aktuellen Reviews zu Folge können Gyrasemutationen in 42-85% (Ginsburg, Grosset et al. 2003), bzw. ~100% (Victor, van Helden et al. 2002) der resistenten Isolate gefunden werden.

1.6. Zielsetzung: Etablierung einer schnellen Nachweismethode zur Vorhersage mykobakterieller Resistenzen gegen Chinolone mittels der Real-time PCR

Den Kern der vorliegenden Arbeit stellt die Etablierung eines neuen molekularbiologischen Nachweises von Chinolonresistenzen mittels der Real-time PCR unter Benutzung des LightCycler® System dar. Die PCR auf dem LightCycler® System wurde schon für die schnelle Detektion Resistenz vermittelnder Mutationen im *rpoB* und dem *katG* Gen etabliert (Torres, Cirado et al. 2001). Die Etablierung dieser Technik für die schnelle Identifizierung von Chinolonresistenzen erschien aus mehrerer Hinsicht sinnvoll: Zum einen stand für diese Medikamentengruppe noch keine vereinfachte und für die Laborroutine automatisierbare Technologie zur Verfügung. Zudem wird ähnlich der Rifampicinresistenz vom *rpoB* der Großteil der Chinolonresistenzen von einem einzigen Gen, dem *gyrA*-Gen, kodiert. Dabei fanden sich alle bis dahin identifizierten resistenzvermittelnden Mutationen in einem sehr kurzen Genabschnitt von nur 25 Basenpaaren, der mit einer einzigen Sensorsonde abgedeckt werden konnte. Zum anderen gewinnen die Gyrasehemmer in den letzten Jahren immer schneller an Bedeutung. Dies liegt einerseits an der zunehmenden Bedeutung der MDR-TB, bei der Chinolone meist das Kernelement der mehrere Medikamente umfassende Therapiestrategie darstellen. Andererseits gibt es auf Grund der ausgeprägten frühen bakteriziden Wirkung der neusten Chinolonklasse Hoffnungen, durch ihre Einführung auch in die Standardtherapie die Therapieeffizienz zu erhöhen und die Behandlungsdauer verkürzen zu können.

Eine weitere Zielsetzung war es, den Nachweis ausreichend sensitiv auch direkt von positiven Sputumproben durchzuführen, um Patienten schnellstmöglich einer effizienten Therapie zuführen zu können. Diese Zielsetzung sollte schon beim Design des Testverfahrens mit berücksichtigt werden.

Das LightCycler® System vereint die Vorteile einer Rapid Cycle PCR mit denen der kontinuierlichen parallelen Fluoreszenzmessung (Wittwer, Ririe et al. 1997). Unter Rapid Cycle PCR versteht man eine DNA-Amplifikation mittels einer Polymerasekettenreaktion mit sehr kurzen Zyklen von ca. 20-60 Sekunden (Wittwer, Reed et al. 1994). Hierfür werden wie im LightCycler® System häufig Kapillaren verwendet, die aufgrund des Verhältnisses von großer Oberfläche zu kleinem Volumen schnelle Temperaturveränderungen durch Heiß- beziehungsweise Kaltluft

ermöglichen (Wittwer 2001). Die simultane Fluoreszenzmessung ermöglicht die Analyse der PCR-Produkte schon während der Amplifikation, daher spricht man von Real-Time PCR. Die Markierung der DNA kann sequenzspezifisch durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe erfolgen (z.B. SYBR Green I) oder sequenzspezifisch durch Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden. Die Real-Time PCR ermöglicht während der Amplifikation durch Vergleiche mit externen Standards die Quantifizierung der Ausgangsmenge an Kopien des Genabschnitts der durch die Primer amplifiziert wird. Zudem können durch die Schmelzpunktanalysen sequenzspezifische Informationen über das PCR-Produkt gewonnen werden. Die Schmelzpunktanalyse mit „*Hybridization Probes*“ ermöglicht sogar die Identifizierung von Punktmutationen, bzw. SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms* (Lay and Wittwer 1997). Bei *Hybridization Probes* handelt es sich um ein zusammengehöriges Paar von kurzen mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Oligonukleotiden, einer so genannten Ankersonde und einer Sensorsonde (siehe Abbildung 3)

Das Detektionsprinzip der *Hybridization Probes* basiert auf einem Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). Die mit Fluoreszein markierte Ankersonde überträgt als Donor nach Anregung durch die Lichtquelle mittels Resonanz ihre Energie auf den Akzeptor, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff, z.B. LCRed640, markierte Sensorsonde. Dieser wiederum emittiert nach dieser Anregung Lichtquanten mit einer spezifischen Wellenlänge, die vom Photometer des LightCycler® Systems detektiert werden kann. Entscheidend ist dabei, dass der FRET nur bis zu einer bestimmten räumlichen Nähe zwischen Donor und Akzeptor von ca. 50 Å stattfindet. Anker und Sensor werden daher so konzipiert, dass sie spezifisch nur an zwei nur durch 1 – 5 Basen getrennte Genabschnitte binden. Werden diese Sonden gleichzeitig an das Amplifikat gebunden wird dementsprechend ein detektierbares Signal emittiert, liegen eine oder beide Sonden nur in Lösung bzw. unspezifisch hybridisiert vor, ist der durchschnittliche Abstand zwischen den *Hybridization Probes* zu groß, um ein signifikantes Signal auszusenden.

Zur Identifizierung von SNPs wird direkt nach der Amplifikation in derselben Prozedur eine Schmelzkurve erstellt. Dabei wird die Temperatur kontinuierlich langsam gesteigert und die Abnahme der Fluoreszenz bestimmt. Die Schmelzkurve besitzt meist einen sigmoiden Verlauf. Der Schmelzpunkt markiert die Temperatur,

an dem diese Kurve am steilsten abfällt, d.h. die Sonden am schnellsten dissoziieren. Leitet man die bei der Erstellung der Schmelzkurve ermittelte Fluoreszenz nach der Zeit ab (dF/dt), entspricht der Schmelzpunkt dem Scheitelpunkt der so errechneten Kurve.

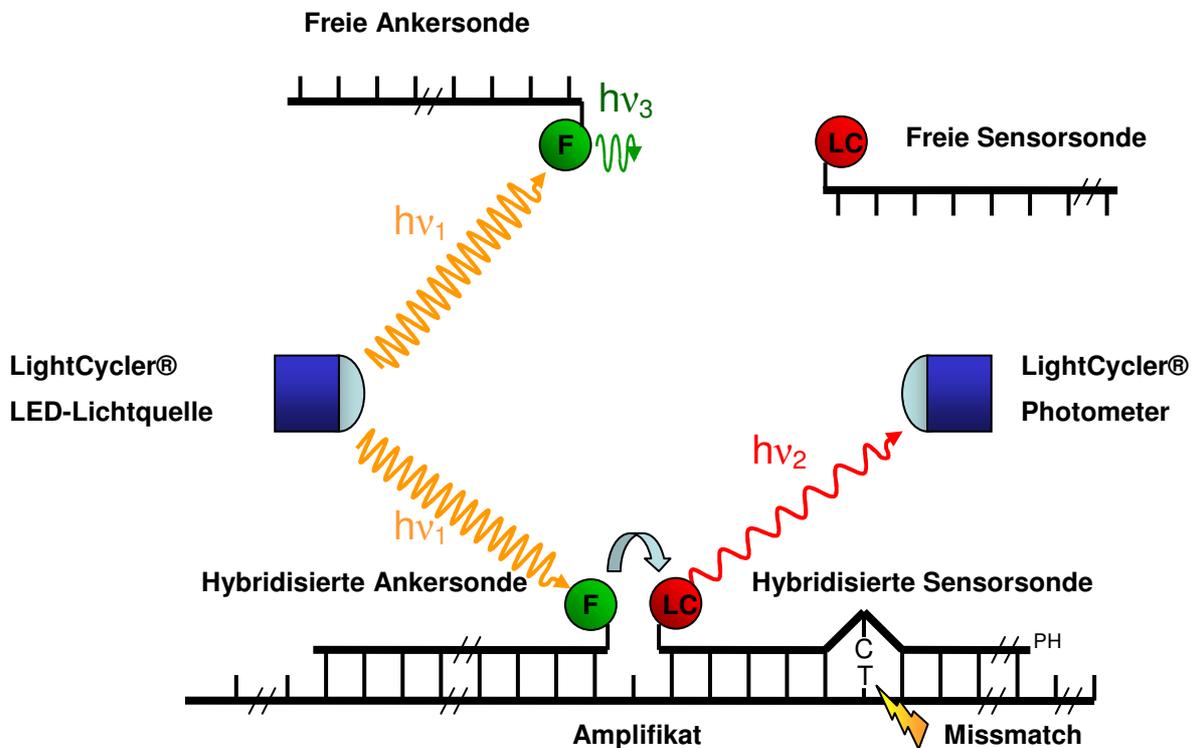


Abbildung 3: Wirkungsweise von *Hybridization Probes*

Durch die Abstrahlung ($h\nu_1$) der LightCycler® Lichtquelle wird das mit der Ankersonde verbundene Fluoreszenz (F) angeregt. Durch Resonanz vermittelt kann die daraus resultierende Positionenergie der Elektronen auf nahe liegende Elektronen anderer Moleküle übertragen werden (blauer Pfeil). Der mit der Sensorsonde gekoppelte Farbstoff LCRed₆₄₀ (LC) kann auf diese Weise angeregt werden und emittiert daraufhin Lichtquanten einer spezifischen Wellenlänge ($h\nu_2$), die vom LightCycler® Photometer bestimmt werden können. Dieser so genannte FRET (Fluoreszenz Resonance Energy Transfer) findet signifikant nur bei räumlicher Nähe zwischen dem Donor Fluoreszenz und dem Akzeptor LCRed₆₄₀ statt. Diese ist nur gewährleistet, wenn beide *Hybridization Probes* an das Amplifikat binden (unten) nicht aber, wenn sie sich frei in Lösung befinden (oben); in diesem Fall wird die Energie als Fluoreszenz freigesetzt ($h\nu_3$). Ein Missmatch der Sonden mit dem Amplifikat beeinflusst die Stabilität der Hybridisierung und bedingt deren Dissoziation mit dem PCR-Produkt bei niedrigeren Temperaturen. Damit die Sensorsonde nicht als Primer für die Polymerase wirken kann, wird das 3'-Ende phosphoryliert (PH).

Beim Design von *Hybridization Probes* wird im Allgemeinen darauf geachtet, dass der Schmelzpunkt der Ankersonde möglichst nicht durch unter ihr liegende Polymorphismen beeinflusst werden kann und dass dieser höher liegt als der

Schmelzpunkt der Sensorsonde, unter der die interessierenden Mutationen liegen. Da die durch den FRET vermittelte Fluoreszenz nur dann emittiert wird, wenn beide Sonden mit dem PCR-Produkt hybridisiert sind, wird so bei der Schmelzpunktanalyse die Dissoziation der Sensorsonde von dem Amplifikat ermittelt.

Der Schmelzpunkt einer Sensorsonde ist abhängig von der Stabilität seiner Bindung an das PCR-Produkt. Diese wird unter anderem von der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Basen bestimmt. Ein Mismatch, also die fehlende Kompatibilität einer Base mit ihrem zugehörigen Partner, bewirkt daher eine schwächere Bindung zwischen Sensorsonde und Amplifikat, die auch durch daraus entstehende strukturelle und elektrostatische Sekundäreffekte noch weitergehend beeinflusst werden kann. Im Allgemeinen beträgt der Abstand zwischen dem Schmelzpunkt des Wildtyps (Total Match) und der Mutation (Mismatch) ca. 5°C. Da dabei aber auch die Position des Missmatches in der Sensorsonde sowie die Nachbarbasen eine Rolle spielen, können mittels der Schmelzpunktbestimmung sogar unterschiedliche Mutationen voneinander abgegrenzt werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Probengewinnung und Aufbereitung

2.1.1. Auswahl der *Mycobacterium tuberculosis* Stämme

Im Rahmen der Tätigkeit als supranationales Referenzlabor der WHO werden vom Kuratorium Tuberkulose in der Welt e.V. seit 1990 alle im Institut für Laboratoriumsmedizin der Asklepios Fachkliniken München-Gauting (vormals LVA) als resistent getesteten Stämme von *Mycobacterium tuberculosis* in einer Stammsammlung archiviert. Die Stämme wurden zur Lagerung in Magermilch (ab 1998) oder Sauton-Medium (bis 1998) bei -20°C eingefroren, die Resistenzdaten dokumentiert. Die Festkulturen der Resistenztestung werden zudem für 1 Jahr aufbewahrt.

Chinolonresistenzen werden nur auf Anfrage bzw. bei Bedarf bestimmt, so dass nur von wenigen Stämmen Resistenzdaten zu den Gyrasehemmern vorliegen. Insgesamt konnten bis zum 1.6.2004 19 Stämme mit einer MHK von mindestens 4 µg/ml für Ciprofloxacin bzw. von mindestens 2 µg/ml für Moxifloxacin identifiziert werden. Von diesen 19 Stämmen wurden Subkulturen angelegt; 16 Stämme wurden hierzu wieder aufgetaut, von den restlichen 3 Stämmen konnten Subkulturen von der Resistenzkultur des Routinebetriebes angelegt werden. Vier der in Sauton eingefrorenen Stämme konnten nicht wieder kultiviert werden. Für alle aufgetauten Stämme wurde die Resistenztestung wiederholt, allerdings wiesen drei Stämme bei der Nachtestung der Ciprofloxacinresistenz nur noch eine MHK < 4 µg/ml. Diese Stämme wurden daher als kulturell sensitiv gewertet.

Insgesamt standen daher 12 von Patientenproben kultivierte resistente Stämme zur Verfügung. Zudem wies der Beijing-Stamm der Präsenzstammsammlung eine Chinolonresistenz auf, so dass zusammen 13 Stämme für die Evaluierung der gyrA PCR auf dem LightCycler® System herangezogen werden konnten.

Des Weiteren wurden für die Evaluierung 31 sensible Stämme ausgewählt, die eine niedrigere MHK aufgewiesen haben. 13 dieser Stämme wurden hierfür extra aufgetaut, 18 entstammten dem Routinebetrieb. Als Positivkontrolle für den Wildtyp des *Mycobacterium tuberculosis* dienten Subkulturen des Referenzstamms H37Rv der Präsenzstammsammlung. Zur Bestimmung der Speziesspezifität wurden insgesamt 23 mykobakterielle Referenzstämme aus der Präsenzstammsammlung

analysiert. Sämtliche in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme sind tabellarisch in Anhang A zusammengefasst.

2.1.2. Spiken von Sputen

Wesentliches Ziel bei der Etablierung des Testverfahrens war die Möglichkeit des molekularbiologischen Direktnachweises von Resistenzen aus dem Sputum. Glücklicherweise sind Chinolonresistenzen bei *M. tub.* in Deutschland noch selten. Um daher Sputumproben von mit einem ciprofloxacinresistenten Stamm infizierten Patienten zu simulieren wurden AFB-negative Sputen mit definierten Mengen an Mykobakterien beimpft (Spiken). Um anhand von möglichst heterogenen Sputumproben auch Interaktionen wie z.B. die Inhibition der PCR oder unspezifische Amplifikationen nachweisen zu können, wurden für jede Versuchsreihe Sputen von jeweils 8 Patienten gepoolt. Die Patientensputen wurden von stationären Patienten der pneumologischen Stationen der Asklepios-Fachkliniken München-Gauting gesammelt. Die bisher nach eigener Auskunft nicht an Tuberkulose erkrankten Patienten wurden über den Zweck des Versuches informiert und bestätigten schriftlich ihr Einverständnis.

Geräte

- Sicherheitswerkbank Klasse II (BDK)
- Vortex (VortexGenie2™, Bender & Hobein)
- AR-Glasperlen Ø 5mm
- Sicherheitsbrenner (FlammyS, Schütt)

Lösungen

- McFarland Standard (bioMerieux Kat.Nr. 69280)
- Steriles 0,9% NaCl

Methode

Die Arbeiten erfolgen in einer Sicherheitswerkbank. Die frischen Sputen von je 8 Patienten werden in einem 50 ml Reaktionsgefäß zusammengeführt, ca. 15 Glasperlen hinzu gegeben und dicht verschlossen. Sie werden dann für 10 min durch abwechselndes kräftiges Schütteln von Hand und mit dem Vortex gemischt. Mit einer Spritze mit dicker Nadel können dann je 1,8 ml eines möglichst homogenen Sammelsputums in neue Reaktionsgefäße aliquotiert werden. Von den zum Spiken vorgesehenen Mykobakterienkulturen wird analog zum Vorgehen bei der phänotypischen Resistenztestung (siehe Kapitel 2.3.3) eine auf die Trübung eines McFarland 1 Standards angegliche Stammlösung präpariert (K0). Von dieser

Bakteriensuspension werden serielle 1:10 Verdünnungen hergestellt (K1 – K3). Die jeweiligen Versuchsproben wurden entsprechende der Tabelle 1 zusammenpipetiert. Abschließend werden die Proben noch einmal durch abwechselndes kräftiges Schütteln von Hand und mit dem Vortex vermengt. Die gespikten Sammelsputen werden sofort durch Anreicherung (siehe Kapitel 2.1.3) weiterverarbeitet.

Negativkontrolle	V0	+ 200 µl NaCl
Versuchsproben zur Sensitivitäts- bestimmung	V1	+ 200 µl K0 von H37Rv
	V2	+ 200 µl K1 von H37Rv
	V3	+ 200 µl K2 von H37Rv
	V4	+ 200 µl K3 von H37Rv
Versuchsproben zum Nachweis von Heteroresistenzen	V.a	+ 200 µl K1 von H37Rv
	V.b	+ 140 µl K1 von H37Rv + 60 µl K1 von Stamm Nr.1 (70:30)
	V.c	+ 100 µl K1 von H37Rv + 100 µl K1 von Stamm Nr. 1 (50:50)
	V.d	+ 60 µl K1 von H37Rv + 140 µl K1 von Stamm Nr. 1 (30:70)
	V.e	+ 20 µl K1 von H37Rv + 200 µl K1 von Stamm Nr. 1 (10:90)
	V.f	+ 200 µl K1 von Stamm Nr. 1

Tabelle 1: Pipetierschema für das Spiken von 1,8 ml Sammelsputum

2.1.3. Anreicherung von Sputumproben mittels des NALC-Verfahrens

Die Aufbereitung von Sputumproben mittels der NALC-Methode dient zum einem der Verflüssigung des oft zähen Sputums (Bruch von Disulfidbrücken durch N-Acetyl-L-Cystein) und zum anderen der Dekontamination der Begleitflora (alkalische Lyse von nichtsäurefesten Bakterien) sowie der Konzentration durch Zentrifugation. Die Anreicherung mittels der NALC-Methode erfolgte analog der DIN 58943-3.

Geräte

- Sicherheitswerkbank Klasse II (BDK)
- Zentrifuge (Rotanta 96RC, Hettich)
- Vortex (VortexGenie2™)
- Routierer (Reax2, Heidolph)

Lösungen

- 4% NaOH (40 g NaOH auf 1000 ml Aqua dest., autoklaviert)
- 2,9% Na-Citrat (29 g Na-Citrat x 2H₂O auf 1000 ml Aqua dest., autoklaviert)
- TB-Puffer (11,64 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O + 9,26 g KH₂PO₄ auf 2000 ml Aqua dest., pH 6.8, zweifach autoklaviert)
- NALC-NaOH-Lösung (50 ml 4% NaOH + 50 ml 2,9% Na-Citrat + 0,5 g N-Acetyl-L-Cystein)

Methode

Das Anreichern erfolgt in einer Sicherheitswerkbank. Das anzureichernde Sputum (max. 10 ml) wird in einem Zentrifugenröhrchen mit der gleichen Menge NALC-NaOH-Lösung aufgefüllt und nach kurzem Vortexen für 20 min im Routierer vermischt und so homogenisiert und dekontaminiert. Anschließend werden die Röhrchen mit TB-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und für 20 min bei 14°C mit 4170 U/min (3700 g) zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, das Sediment in 1 ml TB Puffer resuspendiert, kurz durch Vortexen gemischt und sofort weiterverarbeitet.

2.1.4. DNA-Isolierung

Primär wurde die Proben-DNA von Festkulturen gewonnen. Hierbei wurde die Effektivität verschiedener DNA-Isolierungsmethoden evaluiert. Die DNA-Aufreinigung mittels des Roche High Pure PCR template preparation Kits nach mechanisch-enzymatischer Lyse wurde auch an die DNA-Präparation direkt aus dem Sputum adaptiert.

2.1.4.1. Mechanisch-enzymatische Lyse von Mykobakterien

Die einfachste Präparation von DNA aus Mykobakterien beruht auf der mechanisch-biochemischen Lyse der Bakterien. Die physikalische Zerstörung der mykobakteriellen Zellwände wird hierbei durch die Enzym Proteinase K und Lysozym unterstützt. Die DNA wird so lediglich freigesetzt, dabei aber weder konzentriert noch von möglichen Inhibitoren der PCR befreit.

Geräte

- Sicherheitswerkbank Klasse II (BDK)
- Zentrifuge (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf)
- Vortex (VortexGenie2™, Bender & Hobein)
- Sicherheitsbrenner (FlammyS, Schütt)
- Heizblock (SK1101D, PeqLab)
- Kalibrierte Impföse (10 µl)

Materialien

- Lysozym (10 mg/ml in Aqua dest.)
- Proteinase K (10 mg/ml in Aqua dest.)

Lösungen

- 1x TE-Puffer (100 mM Tris/HCL, pH 8.0 + 10 mM EDTA in Aqua dest.)

Methode

Die Mykobakterien werden in der Sicherheitswerkbank von einem frisch bewachsenen Löwenstein-Jensen-Medium mit einer abgeflamnten 10 µl fassenden Impföse abgeerntet und in 100 µl in dicht verschraubbaren Reaktionsgefäßen vorgelegten 1x TE-Puffer aufgenommen. Die Bakterien werden dann bei 80 °C im Hitzeblock für 20 min inaktiviert. Zum weiteren Zellwandverdau werden die abgekühlten Proben anschließend mit 20 µl Lysozym (10 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraufhin 40 µl Proteinase K (10 mg/ml) hinzupipetieren und 10 min bei 72°C inkubieren. Abschließend werden die Proben bei 12 000 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

2.1.4.2. DNA-Isolierung mittels Chelex100®

In bereits veröffentlichten Protokollen (Torres, Criado et al. 2000) zur genotypischen Resistenzbestimmung von Mykobakterien (für Rifampicin und Isoniazid) mittels der Real-Time PCR unter Verwendung des LightCycler® Systems wurde die DNA-Isolierung mittels Chelex100® beschrieben. Die Funktion von Chelex100® beruht auf der alkalischen Lyse der Mykobakterien (10% Lösung mit pH10-11), der Denaturierung der freigesetzten DNA und der Chelatbildung mit eventuell inhibierend wirkenden Metalionen (Walsh, Metzger et al. 1991).

Geräte

- Sicherheitswerkbank Klasse II (BDK)
- Zentrifuge (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf)
- Wasserbad (Schüttelwasserbad GFL 1083, GFL)
- Vortex (VortexGenie2™, Bender & Hobein)
- Sicherheitsbrenner (FlammyS, Schütt)
- Kalibrierte Impföse (10 µl)

Materialien

- Chelex100® (Bio-Rad, Kat-Nr. 14221253)

Methode

Die Mykobakterien werden wie oben mit einer Impföse von Festkulturen abgeerntet und in 100 µl Aqua dest. beimpft. Die Bakteriensuspension wird dann mit 100 µl 10% Chelex100® in Aqua dest. durch Vortexen gründlich vermischt und im Wasserbad bei 45°C für 45 min inkubiert. Anschließend wird der Ansatz bei 100°C für 5 min gekocht und bei 12 000 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand kann direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

2.1.4.3. DNA-Aufreinigung mittels des High Pure PCR template preparation kit

Durch mechanisch-biochemische Lyse gewonnene DNA kann mittels des High Pure PCR template preparation kit aufgereinigt und konzentriert werden. Hierbei wird die DNA spezifisch an den Glasfaserfilter der High Pure Säulen gebunden und durch mehrmaliges Waschen von anderen störenden zellulären Fragmenten sowie durch einen speziellen „inhibitor removal buffer“ von weiteren Inhibitoren getrennt.

Die DNA-Aufreinigung mittels des High Pure Kits wurde neben der DNA-Gewinnung von Festkulturen auch bei der DNA-Extraktion aus angereicherten Sputumproben angewendet. Die Aufreinigung erfolgte nach einem adaptierten Protokoll analog eines von Leppmeier und Reischl veröffentlichten Protokolls (Leppmeier).

Geräte

- Sicherheitswerkbank Klasse II (BDK)
- Zentrifuge (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf)
- Vortex (VortexGenie2™, Bender & Hobein)
- Sicherheitsbrenner (FlammyS, Schütt)
- Heizblock (SK1101D, PeqLab)
- Wasserbad (Schüttelwasserbad GFL 1083, GFL)
- Gefrierschrank (-40 °C, HeraFreeze, Heraeus)

Materialien

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Kat.Nr. 1 796 828)
- Isopropanol
- Äthanol absolut (Präparation des Waschpuffers des Roche Kits)
- 1x PBS (10,2 g Salz auf 1000 ml Aqua dest., pH 7,2, Euroimmun Kat. Nr. ZF 1100-1000)

Methode

Die Arbeiten werden in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Erfolgt die Präparation von Festkulturen, werden die Mykobakterien wie oben abgeerntet und in 200 µl in dicht verschraubbaren Reaktionsgefäßen vorgelegten 1x PBS aufgenommen. Erfolgt die Präparation aus Sputumproben werden 100 µl

dekontaminierten Sputums (siehe Kapitel 2.1.3) in Reaktionsgefäße überführt und bei 12 000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen und mittels Vortex gemischt. Zu der Bakteriensuspension werden dann 200 µl Binding Buffer und 40 µl Proteinase K-Lösung pipetiert. Für 10 min bei 72°C inkubieren. Die Proben werden nun für 5 min im Wasserbad gekocht und anschließend bei -40 °C für 15 min tiefgefroren. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Abschließend die nun weitgehend lysierten Bakteriensuspensionen noch einmal für 5 min kochen. Die abgekühlten Proben werden nun bei 12 000 g für 1 min zentrifugiert. Anschließend werden 100 µl Isopropanol hinzugefügt und die Probe mittels Vortex gemischt. Die gesamte Probe in das obere Reservoir der zusammengesetzten High Pure Säule pipetieren und für 1 min bei 4 500 g zentrifugieren. Der Durchfluß und das Sammelgefäß werden verworfen und dieses durch ein neues ersetzt. 500 µl Inhibitor *Removal Buffer* in das obere Reservoir pipetieren und für 1 min bei 4500 g zentrifugieren. Das Sammelgefäß wieder erneuern und 500 µl *Wash Buffer* in das obere Reservoir pipetieren und für 1 min bei 4500 g zentrifugieren. Der Waschschrift wird einmal wiederholt. Den Durchfluß verwerfen und den Filter zum Trocknen kurz (10 sec) bei 12000g zentrifugieren. Die Filter werden mit einem sauberen Reaktionsgefäß kombiniert. 200 µl des bei 70 °C vorgewärmten *Elution Buffers* in das obere Reservoir pipetieren und für 1 min bei 4500 g zentrifugieren. Das Eluat kann direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

2.1.4.4. DNA-Isolierung aus humanen Leukozyten

Humane DNA stellt beim Direktnachweis von mykobakterieller DNA direkt aus dem Sputum den definiertesten Nukleinsäurepool dar, von dem Beeinflussungen der Spezifität, oder - bedingt durch den Primerverbrauch bei unspezifischer Amplifikation - auch der Sensitivität erwartet werden können. Um Interaktionen auszuschließen wurde die Spezifität der Primer der neu etablierten *gyrA* Real-Time PCR direkt mit hochkonzentrierten DNA Präparationen aus humanen Leukozyten evaluiert. Die weißen Blutkörperchen wurden nach einem abgewandelten Protokoll der Dextran-sedimentation (Quiagen 2001) aufbereitet. Dabei wurde das Dextran durch die ebenfalls hochmolekulare Hydroxyäthylstärke (HAES) ersetzt. Nach der Sedimentation mittels dieser modifizierten Methode konnten aus dem fast vollständig von Erythrozyten und Hämoglobin (PCR-Inhibition aufgrund des darin enthaltenen

Eisens möglich) befreiten Überstand ca. 60 % der Leukozyten wieder gewonnen werden.

Geräte

- Zentrifuge (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf)
- Vortex (VortexGenie2™, Bender & Hobein)
- Heizblock (SK1101D, PeqLab)

Materialien

- HAES steril 10% 200/0,5(Fresenius Kat.Nr. 0606161/80)
- Citratblut (Gerinnungsröhrchen)

Lösungen

- Waschpuffer (10 mM Tris/HCl pH7,5 in Aqua dest. + 1%Triton X 100)
- 1x PBS (10,2 g Salz auf 1000 ml Aqua dest., pH 7,2, Euroimmun Kat. Nr. ZF 1100-1000)

Methode

Die Leukozyten werden aus frisch gewonnenem Citratblut gewonnen. Auf 5 ml Vollblut 600 µl HAES-steril 10% pipetieren und mischen. Das Gemisch aufrecht bei 37 °C für 45 min stehen lassen. Dabei sedimentieren aufgrund der unterschiedlichen spezifischen Dichten die Erythrozyten am schnellsten und werden so durch eine weiße Grenzschicht, dem so genannten Buffy Coat vom Überstand getrennt. Die Leukozyten befinden sich zusammen mit den Thrombozyten nun in dieser Grenzschicht und im Überstand. Beides wird vorsichtig abgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 12000g für 10 min zentrifugiert. Den Überstand verwerfen, das Pellet in 500 µl Waschpuffer wieder aufnehmen und erneut für 10 min zentrifugieren. Dieser Waschvorgang wird zweimal wiederholt, bis das Pellet weiß ist. Abschließend wird das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen und die DNA wie in Kapitel 2.1.4.3 beschrieben mittels der High Pure Säulen aufgereinigt und weiterverwendet.

2.2. Mikroskopische Nachweisverfahren

2.2.1. Ziehl-Neelsen Färbung und Lichtmikroskopie

Mykobakterien gehören zu den so genannten säurefesten Bakterien. Dieses spezifische Färbeverhalten beruht auf dem Zellwandaufbau der Mykobakterien und dem durch die Mycolsäuren bedingten hohen Lipidgehalt. Die Säurefestigkeit wurde schon 1883 von Paul Ehrlich während seiner Anstellung im Institut von Robert Koch

beschrieben. Säurefeste Bakterien können nach einer Färbung mit Arylmethanfarbstoffen wie Carbofuchsin nicht einfach durch Waschen mit verdünnten Säuren entfärbt werden und heben sich so nach einer Gegenfärbung gut ab. Unter den vielen Modifikationen setzte sich die Ziel-Neelsen Färbung durch (Bishop and Neumann 1970). Weiter vereinfacht wurde dieses Verfahren durch die hier angewendete Tan-Thiam-Hok Methode.

Die Färbung wurde analog DIN 58943-32 durchgeführt.

Geräte

- Lichtmikroskop (Carl Zeiss)
- Färbebank (Eigenbau)
- Sicherheitsbrenner (FlammyS, Schütt)

Materialien

- Kinyoun-Lösung (BKK-F) (biomerieux, Kat. Nr. 55 521)
- Gabelle-Lösung (BKG-F) (biomerieux, Kat. Nr. 55 531)

Methode

Angereichertes Material wird mit einem Wattestäbchen auf einen mit Alkohol gereinigten Objektträger verstrichen, luftgetrocknet und durch dreimaliges Ziehen des Objektträgers durch die Flamme eines Sicherheitsbrenners hitzefixiert. In einer Färbebank werden die Objektträger dann für 3 min mit frisch gefilterter Kinyoun-Lösung überschichtet. Nach gründlichem Spülen mit destilliertem Wasser erfolgt die simultane Entfärbung und Gegenfärbung, indem die Objektträger für 1 min mit der Gabelle-Lösung überschichtet werden. Abschließend wird das Präparat noch einmal gründlich gespült.

Die Proben werden nach der Färbung durch Begutachtung von mindestens 100 Blickfeldern unter dem Lichtmikroskop mit 1000-facher Vergrößerung analysiert.

2.2.2. Auraminfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

Die Färbemethode mit Auramin basiert auf den gleichen Prinzipien wie die Ziel-Neelsen Färbung, das Auramin ersetzt hierbei das Carbofuchsin. Die Anfärbung der säurefesten Stäbchen ist dabei prägnanter und besser vom Hintergrund abgehoben, so dass diese Technik von der WHO (Collins, Grange et al. 1997) vor allem für Labore mit hohem Durchsatz empfohlen wird. Die Färbung erfolgte auch hier analog zur DIN.

Geräte

- Fluoreszenzmikroskop (Axiolab, Zeiss)
- Färbekbank (Eigenbau)
- Sicherheitsbrenner (FlammyS, Schütt)

Lösungen

- Auraminstammlösung (3,2 g Auramin in 100 ml Phenol liquidum)
- Auramingebrauchslösung (50 ml Auraminstammlösung auf 1000 ml auf 50 °C vorgewärmtes Aqua dest.)
- Saure Alkohollösung (500 ml Äthanol 96% + 20 ml konzentrierte HCL 25% + 20 g NaCl)
- Eisengalluslösung (500 ml Eisengallustinte auf 4500 ml Aqua dest. + 25 ml Phenol liquidum)

Methode

Die hitzefixierten Objektträger werden für 20 min mit frisch gefilterter Auraminlösung überschichtet. Mit der sauren Alkohollösung entfärben und diese für 2 min auf dem Objektträger belassen, anschließend gründlich mit Aqua dest. spülen. Die Gegenfärbung erfolgt für eine Minute mit der Eisengalluslösung, abschließend noch einmal gründlich Aqua dest. spülen und trocknen.

Die Proben werden nach der Färbung durch Begutachtung von mindestens 100 Blickfeldern unter dem Fluoreszenzmikroskop mit 500-facher Vergrößerung analysiert.

2.3. Kulturelle Nachweisverfahren

2.3.1. Kulturen auf Festmedien

Neben der Mikroskopie beruht die bakteriologische Diagnostik von Mykobakterien vor allem auf kulturellen Verfahren. Neben der reinen Detektion von Mykobakterien erlauben diese auch eine Beurteilung ihrer Vitalität und ihres Resistenzverhaltens gegenüber Medikamenten sowie ihre Identifizierung. Weltweit am gebräuchlichsten sind Festkulturen auf Löwenstein-Jensen-Nährböden (LJ). Alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden primär auf diesen Nährböden subkultiviert. Zudem wurden zur Bestimmung der Sensitivität und des Zeitaufwands molekularbiologischer Methoden im Vergleich zu Festkulturen „Primärkulturen“ von gespikten Sputumproben angelegt.

Geräte

- Sicherheitswerkbank Klasse II (BDK)
- Brutraum 37 °C (Spezialanfertigung)
- Autoklave (Aigner/München)
- Lagervorrichtung zum Einsatz im Wasserbad (Eigenbau, Neigung 10°)
- Sicherheitsbrenner (FlammyS, Schütt)
- Wasserbad (Schüttelwasserbad GFL 1083, GFL)
- Magnetrührer (IKA Combimag RCH)

Materialien

- AR-Glasperlen Ø 5mm
- Löwenstein-Jensen mit Glycerin und PACT-Fertigkulturröhrchen (heipha Diagnostika Kat.Nr 500r)
- TB-Medium nach Löwenstein-Jensen (Basis) (Merck Kat.Nr. 105400)
- Eier aus antibiotikafreier Aufzucht
- Glycerin
- Kulturröhrchen (17mm x 170 mm)

Methode

Die Primärkulturen wurden gemäß der Laborroutine in der Sicherheitswerkbank auf kommerziell vertriebenen LJ-Kulturröhrchen angelegt. Hierzu wird ein steriler Wattetupfer mit angereichertem Probenmaterial getränkt und auf dem Nährboden ausgestrichen. Für Subkulturen wurden selbst gekochte Medien verwendet. Zum Anlegen von Subkulturen von Festkulturen werden die Bakterien mit einem mit NaCl getränkten Wattetupfer oder mit einer abgeflamten Öse von der Primärkultur gewonnen. Zur Rekonstitution von in Magermilch oder Sauton weggefrorenen Stämmen werden diese nach dem Auftauen gemischt und mit einer Spritze auf die LJ-Medien überführt. Anschließend werden die Kulturen bei 37 °C bebrütet und das Wachstum regelmäßig überprüft.

Für die Herstellung der selbst hergestellten LJ-Medien werden ca. 30 Eier unter sterilen Bedingungen (abseifen, reinigen mit 70% Alkohol und anschließend abflammen) in eine 3-Liter-Steilbrustflasche mit Glasperlen gegeben und diese sterile Eimasse durch kräftiges Schütteln homogenisiert. 37,5 g TB-Medium (Basis von Merck) und 12 ml Glycerin werden in 440 ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert. Die noch warme Lösung durch Schütteln immer wieder vermischen und abkühlen lassen, dann 1000 ml sterile Eimasse zugeben. Je 7 ml des fertige LJ-Mediums in sterile Kulturröhrchen abfüllen und verschließen. Die Röhrchen in Schräglage in ein vorgeheiztes Wasserbad geben und das Medium für 50 min bei 85 °C koagulieren lassen. Anschließend werden die Röhrchen noch bei geschlossenem Deckel für

weitere 30 min im Wasserbad belassen. Die fertigen Röhren sollten vor der Lagerung bei 4 - 8 °C über Nacht bei Raumtemperatur vollständig abkühlen werden.

2.3.2. Kulturen in Flüssigmedien

Um die bakteriologische Diagnostik von Mykobakterien zu beschleunigen wurden schon in den siebziger Jahren Kulturverfahren für Flüssigmedien entwickelt (Reichman 2000). Grundlage für den Zeitgewinn ist hierbei überwiegend die schnellere und auch automatisierbare Detektion des Wachstums aufgrund unterschiedlicher mykobakterieller Stoffwechselfvorgänge. Für den Vergleich molekularbiologischer Methoden mit modernen Flüssigkulturmethoden wurde das Bactec MGIT 960 System von Becton Dickinson verwendet. Der Nachweis von Mykobakterien erfolgt hier anhand der fluoreszenzvermittelten Detektion des Sauerstoffverbrauchs der Bakterien.

Geräte

- Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson)
- Sicherheitswerkbank Klasse II (BDK)
- Sicherheitsbrenner (FlammyS, Schütt)

Materialien

- Bactec MGIT 960 Supplement Kit [PANTA] (Becton Dickinson, Kat. Nr. 245124)
- 7 ml BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tubes (Becton Dickinson, Kat. Nr. 245122)

Methode

Die Beimpfung erfolgte entsprechend den Vorgaben des Herstellers in einer Sicherheitswerkbank. Hierzu werden die MGIT-Röhren zuerst gemäß des Protokolls des Herstellers mit 0,8 ml PANTA (Antibiotikamischung) / ODAC (Wachstumssupplement) und nach kurzem mischen dann mit 500 µl angereichertem Probenmaterial (siehe Kapitel 2.1.3) beimpft. Die Proben werden bis zum Nachweis von Mykobakterien im Bactec MGIT 960 bebrütet, bzw. nach acht Wochen als negativ bewertet.

2.3.3. Resistenzbestimmung mittels der absoluten Konzentrationsmethode

Kulturverfahren gelten weiterhin als Goldstandard der Resistenzbestimmung. International werden vier Verfahren empfohlen (WHO 2003): „proportion method, absolute concentration method“ und die „resistance ratio method“ für Festkulturen sowie BACTEC® für Flüssigkulturen. Während für die *First-Line* Medikamente und

viele Ausweichpräparate in den sechziger Jahren in Studien (Canetti, Fox et al. 1969) zur Resistenzentstehung unter Monotherapie Grenzwerte für die klinische Resistenz von Mykobakterien erstellt werden konnten, ist dies aus ethischen Gründen (Monotherapie!) für die später entwickelten Chinolone nicht mehr möglich. Daher wird bei der Resistenzbestimmung von Ciprofloxacin und Moxifloxacin im Allgemeinen deren minimale Hemmkonzentration (MHK) mittels der absoluten Konzentrationsmethode, bzw. durch eine Adaptation der Proportionsmethode auf LJ-Medien bestimmt. Die Resistenztestung für Chinolone im Flüssigkulturverfahren wurde bisher noch nicht abschließend evaluiert

Geräte

- Sicherheitswerkbank Klasse II (BDK)
- Brutraum 37 °C (Spezialanfertigung)
- Sicherheitsbrenner (FlammyS, Schütt)
- Geräte für die Herstellung von Nährböden (siehe 2.3.1)
- Kalibrierte Impföse (10 µl)
- Homogenisator (Neolab, Kat. Nr. E-6963)

Materialien

- Löwenstein-Jensen-Nährmedium (siehe 2.3.1)
- Ciprofloxacin-HCl (Bayer, Mat. Nr. 11939800, Ch. Nr. BXR2RFT)
- Moxifloxacin-HCl (Bayer, Mat. Nr. 05520223, Ch. Nr. BX10US1)
- Kulturröhrchen (17mm x 170 mm)
- Sterile NaCl 0,9%
- McFarland Standard Nr. 1 (bioMerieux, Kat. Nr. 7090R)

Lösungen

- Ciprofloxacinlösung I (42,4 mg Ciprofloxacin in 8 ml sterilem Aqua dest.)
- Ciprofloxacinlösung II (2 ml Ciprofloxacinlösung I in 98 ml sterilem Aqua dest.)
- Moxifloxacinlösung I (16,64 mg Moxifloxacin in 4 ml sterilem Aqua dest.)
- Moxifloxacinlösung II (2 ml Moxifloxacinlösung I in 98 ml sterilem Aqua dest.)
- Moxifloxacinlösung III (5 ml Moxifloxacinlösung II in 75 ml sterilem Aqua dest.)

Methode

Das flüssige Löwenstein-Jensen-Nährmedium wird analog zu Kapitel 2.3.1 vorbereitet. Die Stammlösungen für die medikamentenhaltigen Nährböden werden gemäß dem Pipetierschema der Tabelle 2 hergestellt. Die Röhrchen werden beschriftet und wie oben beschrieben befüllt und weiterverarbeitet.

Ciprofloxacin				
Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	4	2	1	0,5
LJ-Nährmedium	180 ml	180 ml	180 ml	180 ml
Steriles Aqua dest.	12 ml	16 ml	18 ml	19 ml
Ciprofloxacinlösung II	8 ml	4 ml	2 ml	1 ml

Moxifloxacin							
Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13
LJ-Nährmedium	90 ml	90 ml	90 ml	90 ml	90 ml	90 ml	90 ml
Steriles Aqua dest.	-	5 ml	7,5 ml	8,75ml	-	5 ml	7,5 ml
Moxifloxacinlösung II	10 ml	5 ml	2,5 ml	1,25ml	-	-	-
Moxifloxacinlösung III	-	-	-	-	10 ml	5 ml	2,5 ml

Tabelle 2: Pipetierschema für die Herstellung von Stammlösungen für medikamentenhaltige Nährböden

Von den zu untersuchenden Stämmen werden unter sterilen Bedingungen in der Sicherheitswerkbank Stammlösungen mit definierter Bakteriendichte angelegt. Hierzu werden 2 ml steriles NaCl in einem sterilen Röhrchen vorgelegt. Ein Teil davon wird in einen Homogenisator überführt. Eine abgeflamnte Impföse wird mit einem repräsentativen Inokulum von unterschiedlichen Kolonien des zu untersuchenden Stammes gut gefüllt. Mit dem Inokulum wird daraufhin das NaCl im Homogenisator beimpft. Durch gleichmäßige Auf- und Abbewegungen der Pistille wird eine homogene Bakteriensuspension hergestellt und diese wieder in das Röhrchen mit dem restlichen NaCl überführt. Durch langsames Hinzufügen von sterilem NaCl wird die Trübung dieser Suspension auf die Trübung des McFarland Standards Nr. 1 eingestellt und so die erste Stammlösung (K0) hergestellt. Bei dieser Dichte finden sich ca. 10^8 Kolonien bildende Einheiten (KBE) pro ml der Suspension (Heifets, Simon et al. 2005). Durch serielle 1:10 Verdünnungen (nach gutem Mischen 0,1 ml vorhergehende Stammlösung in ein neues Röhrchen mit 0,9 ml sterilem NaCl pipetieren) werden die Suspensionen K1, K2 und K3 hergestellt.

Zum Beimpfen der Löwenstein-Jensen Medien wird je eine bikonvex mit der jeweiligen Stammlösung gefüllte Eichimpföse (kalibriert auf 10 μl Füllvolumen) über den ganzen Nährboden verteilt. Die oben beschriebenen medikamentenhaltigen LJ-Medien werden mit der K1 beimpft. Zudem werden mit den Stammlösungen K1 bis K3 drei medikamentenfreie Kontrollen angelegt. Die Resistenzkulturen werden bei 37°C für 28 Tage bebrütet. Zum Ablesezeitpunkt sollten auf der K3 mindestens 20

Einzelkolonien gewachsen, diese aber noch nicht zu einem aufgelockerten Bakterienrasen konfluiert sein. Die Verdünnungsreihe der Stammlösungen sollte anhand der Dichte der Bewachung der Kontrollen K1, K2 und K3 nachvollziehbar sein. Beim Ablesen der Resistenzen wird die MHK angegeben, also jene Konzentration, bei der keine Kolonien mehr zu beobachten sind.

2.4. Die Real-Time-Polymerasekettenreaktion mittels der gyrA PCR auf dem LightCycler® System

Die Konzeption und die Etablierung einer gyrA Real-Time PCR unter Nutzung des LightCycler® Systems stellen den Kern dieser Arbeit dar. Das Testprinzip des LightCyclers® wurde in der Einleitung erläutert (siehe Kapitel 1.6). Das Vorgehen bei der Konzeption und das endgültige Protokoll für die Testdurchführung werden in diesem Kapitel besprochen. Die im Verlauf der Etablierung vorgenommenen Variationen und deren Ergebnisse, die zur Erstellung dieses Protokolls beitrugen, finden sich im Ergebnisteil (siehe Kapitel 3.1).

2.4.1. Auswahl der Sonden

Für das Design des Testverfahrens wurde zuerst eine Literaturrecherche durchgeführt, um alle beschriebenen Polymorphismen im gyrA-Gen zu identifizieren. Grundlage hierfür bildeten die Reviews von Ramaswamy und Musser (1998) sowie von Piddock (1999). Zudem wurde die PubMed-Datenbank nach den Stichworten „resistance“ und „gyrA“ durchsucht. Alle so identifizierten Polymorphismen und resistenzvermittelnden Mutationen wurden tabellarisch zusammengefasst (siehe Anhang D). Anhand des veröffentlichten kompletten Genoms des *Mycobacterium tuberculosis* (Cole, Brosch et al. 1998) wurde eine schematische Darstellung des gyrA-Gens erstellt. Die Lokalisation des identifizierten Polymorphismus von *Mycobacterium tuberculosis* ohne Resistenzvermittlung wurde mit einem grünen Pfeil, die von resistenzvermittelnden Mutationen von *Mycobacterium tuberculosis* mit roten Pfeilen markiert. Zudem wurden die dem Tuberkulosegenom entsprechenden Positionen anderer Spezies mit einem violetten Pfeil markiert, an denen bei diesen Mutationen eine Resistenz bewirken können (siehe Abbildung 4).

Alle bisher beschriebenen Mutationen bei *Mycobacterium tuberculosis* sind in einem Genabschnitt von 21 Basen (bp_{M. tub.} 262 – 282; Codon_{M. tub.} 88 - 94) lokalisiert. Sie entsprechen im Wesentlichen den Positionen, die auch bei anderen Spezies

Resistenz vermitteln. Im Codon 95 (bp_{*M. tub*} 284) existiert ein häufig anzutreffender Polymorphismus, der keinen Einfluss auf die Chinolonresistenz besitzt.

Bei der Konzeption einer auf die Identifizierung von Polymorphismen oder Mutationen optimierten PCR auf dem LightCycler® System mit Hybridisierungssonden sind mehrere Parameter zu beachten (Meuer, Wittwer et al. 2001). Idealerweise hybridisiert die Ankersonde in einem Genabschnitt, in dem keine Polymorphismen erwartet werden und besitzt einen höheren Schmelzpunkt als die Sensorsonde. Damit wird weitgehend sichergestellt, dass Veränderungen des Schmelzpunktes Variationen unter der Sensorsonde zugeordnet werden können. Um einen ausreichenden FRET zu gewährleisten sollte der Abstand zwischen der Ankersonde und der Sensorsonde 1-5 Basen betragen. Prinzipiell sind für saubere Schmelzkurven und größere ΔT_m 's GC-reiche Sequenzen nach Möglichkeit zu meiden. Die untersuchten Polymorphismen sollten nicht näher als 3 Basen von einem der beiden Enden der Sensorsonde entfernt liegen.

Die Positionierung der Sensorsonde (bp 261 – 283, 23mer, errechneter T_m 73,92 °C) wird weitgehend durch die Lokalisierung der Polymorphismen bestimmt. Da der Polymorphismus des Codons 95 keine Resistenz vermittelt, soll er von der Sensorsonde ausgespart bleiben und gibt so deren 3' Ende (bp 283) vor. Der geringe Abstand (2 - 5 Basenpaare) der Mutationen des Codons 94 vom 3' Ende der Sensorsonde und die daher vermuteten geringen ΔT_m 's zum Wildtyp müssen in Kauf genommen werden. Da alle relevanten Mutationen mit einem Test, bzw. mit einer Sensorsonde identifiziert werden sollen, wird die Position des 5' Endes der Sensorsonde (bp 261) durch die Mutation Gly88→Cys (GGC→TGC) bestimmt. Der ebenfalls geringe Abstand des Polymorphismus zum 5' Ende wird bei dieser seltenen Mutation akzeptiert um die Sensorsonde nicht zu lang werden zu lassen.

Die Positionierung der Ankersonde (bp 233 – 259, 26mer, errechneter T_m 75,83 °C) ergibt sich aus dem gewählten Abstand von einer Base zu der Sensorsonde und der benötigten Länge, um einen um 2°C höheren Schmelzpunkt zu besitzen, als die Sensorsonde.

Aufgrund der eingeschränkten Möglichkeiten bei der Positionierung des Sensors kann auch der hohe GC-Gehalt der Sonden nicht vermieden werden. Er spiegelt zudem den charakteristischen hohen GC-Gehalt des gesamten Genoms des *Mycobacterium tuberculosis* wieder.

Im Verlauf der Etablierung wurde die Sensorsonde mehrfach modifiziert um eine größtmögliche Robustheit und Aussagekraft des Testsystems zu erreichen. Alle verwendeten Sonden sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

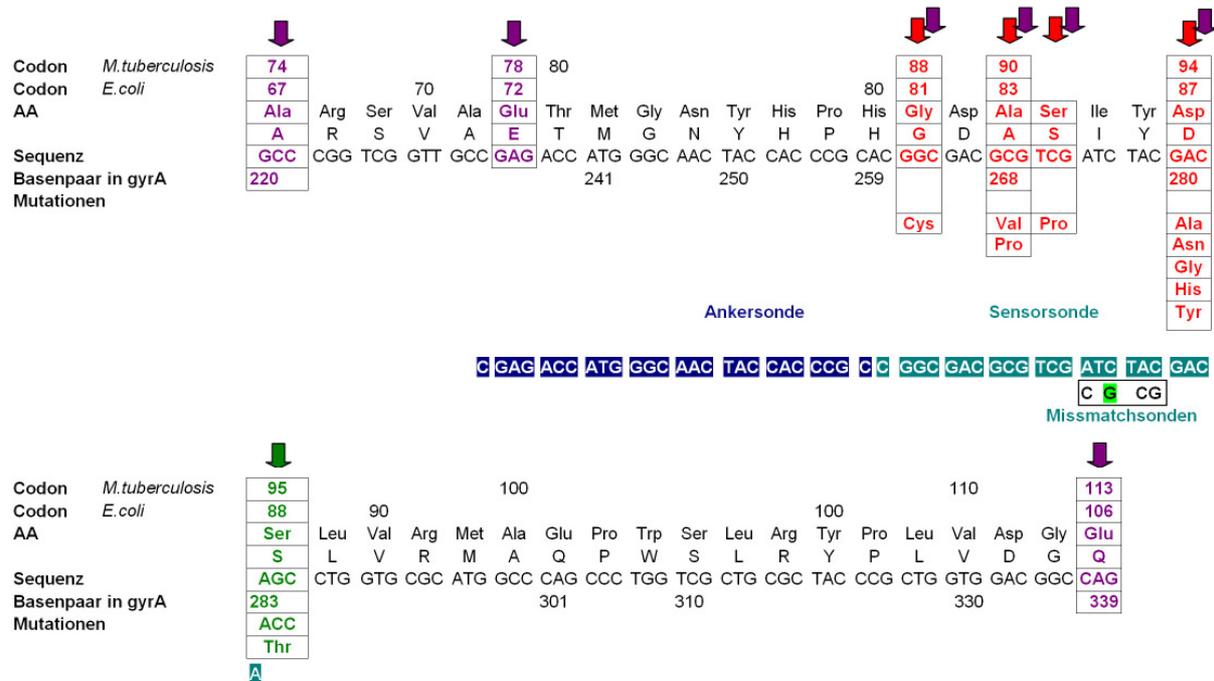


Abbildung 4: Konzeption der gyrA PCR unter Verwendung des LightCycler® Systems

Schema der QRDR (Quinolone resistance determining region). Die Sensorsonde deckt alle bisher identifizierten resistenzvermittelnden Mutationen (rote Markierung) ab und spart den keine Resistenz bewirkenden Polymorphismus des Codons 95 (grüne Markierung) aus. Der Basenaustausch der Missmatchsonde 2581 ist hellgrün markiert. Resistenzvermittelnde Mutationen anderer Bakterienspezies sind lila markiert.

Die Sonden wurden bei der Firma TibMolBiol (Berlin, Deutschland) zur Synthese in Auftrag gegeben. Das lyophilisierte Produkt wurde in sterilem Aqua dest. gelöst und Vorratslösungen von 10 µl mit einer Konzentration von 20 µM bei -20 °C eingefroren.

2.4.2. Auswahl der Primer

Bei der Konzeption der Real-Time PCR wurde besonderer Wert auf eine hohe Spezifität des Testverfahrens für den *Mycobacterium tuberculosis* - Komplex gelegt. Da mit der gyrA Real-Time PCR auch eine Bestimmung direkt aus dem Sputum ermöglicht werden sollte, wurde insbesondere darauf geachtet, dass von den Primern in dieser Matrix erwartete nicht-tuberkulöse Genfragmente nicht amplifiziert werden. Hierzu zählt insbesondere humane DNA aber auch diejenige von Bakterien,

die in der Rachenflora oder in respiratorischen Proben vorkommen können. Zudem müssen die Primer so gewählt werden, dass sie nicht untereinander oder mit den Sonden relevant hybridisieren können.

Aus diesen Gründen wurden für die spezifische Amplifikation der QRDR des *Mycobacterium tuberculosis* - Komplexes mittels der Real-Time PCR und den Gebrauch mit *Hybridization Probes* neue Primer konzipiert. Die ausgewählten Primer wurde mit Hilfe des BlastN, Version 2.2.13 (Altschul, Madden et al. 1997), mit den Sequenzen der Nucleotide Datenbank des NCBI (National Centre of Biotechnology Information) verglichen. Ziel war es, unter den 20 ersten Treffern keine humanen oder relevanten bakteriellen DNA-Homologien zu finden. Der kleinste *E-Value* einer DNA, die nicht dem *M. tub.* - Komplex zugeordnet werden konnte, sollte minimal 5 betragen. Auf diese Weise können höhergradige Homologien mit anderen veröffentlichten Sequenzen ausgeschlossen werden. Zudem wurden mögliche Hybridisierungen der Primer und der Sonden mittels des Tm-Utility's (V1.5 von Idaho Technology) überprüft. Mit dieser Software kann über die Abschätzung der Schmelzpunkte möglicher unspezifischen Hybridisierungen deren Relevanz bestimmt werden. Die Primer sind ebenfalls in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Name	Position (bp _{gyrA})	Sequenz (5' – 3')	n _{Base}	Tm
gyrAp – f	175 - 193	atg ttc gat tcc ggc ttc c	20	57,8 °C
gyrAp – r	398 – 380 (AS)	cgg gct tcg gtg tac ctc a	16	56,7 °C
gyrAs – A	233 – 259	cga gac cat ggg caa cta cca ccc gc-FL	26	73,1 °C
gyrAs – AG	259 – 233 (AS)	LCRed640-gcg ggt ggt agt tgc cca tgg tct cg-ph	26	73,1 °C
gyrAs – S	261 – 283	LCRed640-cgg cga cgc gtc gat cta cga ca-ph	23	70,9 °C
gyrAs – SG	283 – 261 (AS)	tgt cgt aga tcg acg cgt cgc cg-FL	23	70,9 °C
gyrAs – SM79	261 – 283	LCRed640-cgg cga cgc gtc gct cta cga ca-ph	23	73,5 °C
gyrAs – SM81	261 – 283	LCRed640-cgg cga cgc gtc gat gta cga ca-ph	23	71,9 °C
gyrAs – SM83	261 – 283	LCRed640-cgg cga cgc gtc gat ctc cga ca-ph	23	74,4 °C
gyrAs – SM84	261 – 283	LCRed640-cgg cga cgc gtc gat cta gga ca-ph	23	70,1 °C

Tabelle 3: Verwendete Primer und Sonden der gyrA Real-Time PCR

Die Positionsangaben analog Nucleotide Accession Code: NC_000962 . Tm-Angaben beziehen sich auf die Angaben des Herstellers und gelten für den *Full Match* (Methode TibMolBiol)

Die Primer wurden ebenfalls bei der Firma TibMolBiol (Berlin, Deutschland) zur Synthese in Auftrag gegeben. Das lyophilisierte Produkt wurde in sterilem Aqua dest. gelöst und Vorratslösungen von 40 µl mit einer Konzentration von 50 µM bei -20 °C eingefroren.

2.4.3. Vorbereitungen

Als Untersuchungsmaterial für die *gyrA* PCR unter Verwendung des LightCycler® Systems dienten Mykobakterien von Primärkulturen und dekontaminierte Sputumproben, die teilweise mit Mykobakterien versehen wurden. 200 µl Untersuchungsmaterial wurden mit dem High Pure PCR template preparation Kit von Roche aufgereinigt und in den Versuchen primär unverdünnt eingesetzt. Die Probenvorbereitung wird in Abbildung 5 noch einmal schematisch zusammengefasst.

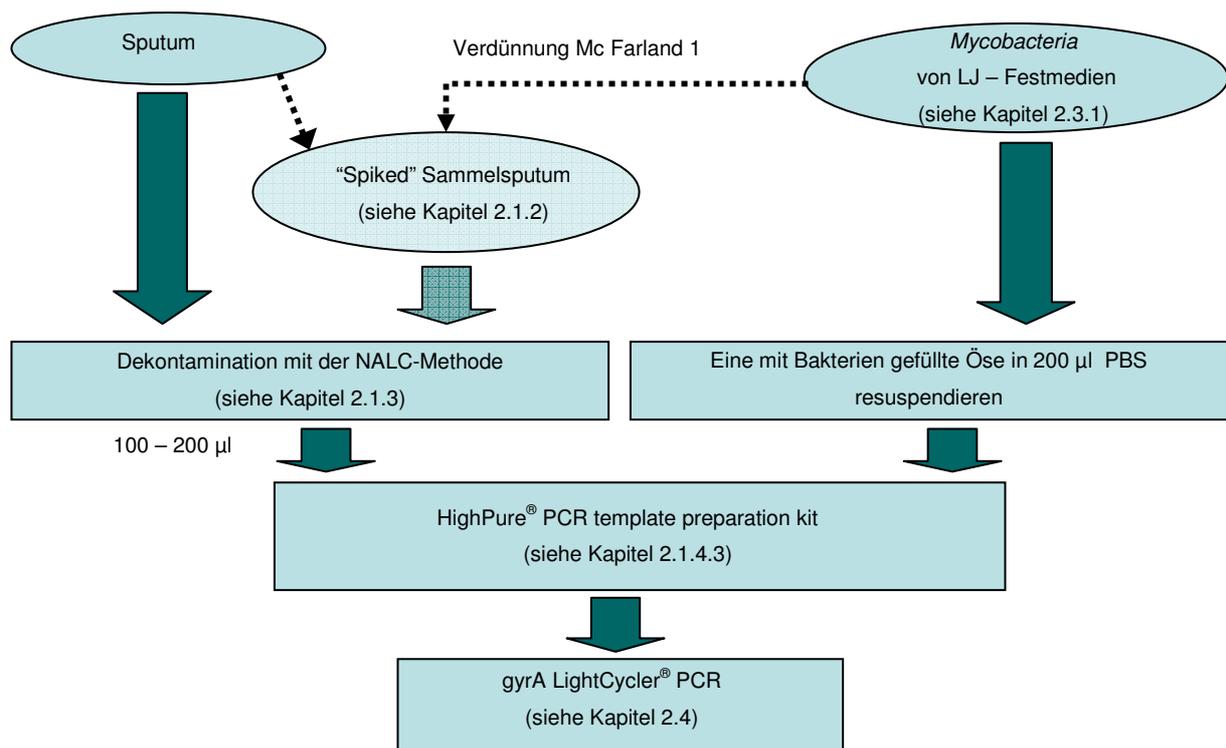


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Probenvorbereitung

Alle Vorbereitungen finden in einem prä-PCR Raum statt, das heißt räumlich getrennt vom LightCycler® Instrument und dem post-PCR Bereich, in dem weitergehende Versuche wie z.B. die Gelelektrophorese durchgeführt wurden. Auch bei der Lagerung wird auf eine strikte Trennung zwischen Untersuchungsmaterial, Primern, Sonden usw. einerseits und den PCR-Produkten andererseits geachtet. Die Testvorbereitung und –durchführung erfolgt analog des *Instruction Manual* der

LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes. Alle weitergehenden Vorschriften der Bedienungsanleitung werden beachtet.

Geräte

- Zentrifuge (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf)
- LightCycler Centrifuge Adapters (Roche, Kat. Nr. 1 909 312)

Materialien

- LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche, Kat. Nr. 2 239 272)
- Chlorbleichlauge

Methode

Der Arbeitsbereich und die Zentrifugenadapter werden mit Chlorbleichlauge gründlich gereinigt. Der Mastermix wird auf Eis angesetzt. Die Sonden und die Primer sowie die Bestandteile des Roche-Kits werden aufgetaut. Sonden bzw. die Sonden enthaltenden Ansätze sollten möglichst kurz dem Licht ausgesetzt werden um ein Ausbleichen Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Die Vorratslösungen werden mit dem Aqua dest. des Kits auf die Gebrauchskonzentrationen verdünnt. Sonden werden mit einer Konzentration von 5 μM (10 μl einer 20 μM - Lösung +30 μl H_2O), Primer in einer Konzentration von 10 μM (40 μl einer 50 μM -Lösung +160 μl H_2O) in den Mastermix eingesetzt. 60 μl LightCycler FastStart Reaction Mix Hybridization Probes (Reaktionsgefäß 1b) werden zu dem LightCycler FastStart Enzym (Reaktionsgefäß 1a) pipetiert, vorsichtig mit der Pipette gemischt und als FastStart DNA Master Hybridization Probes (Reaktionsgefäß 1) markiert.

Für die Berechnung des Mastermix wurde die Excel-Datei Standardtestdurchführung benutzt (siehe Anhang B). Während der Etablierung haben sich folgende Konzentrationen als optimal herausgestellt (angegeben sind die Endkonzentrationen des vollständigen Testansatzes): MgCl_2 4 mM, forward Primer (gyrAp – f) 0,2 μM , reverse Primer (gyrAp – r) 0,8 μM , Sonden je 0,2 μM . Der Mastermix wird dementsprechend in der durch die Tabelle 4 vorgegebene Reihenfolge und den angegebenen Volumen zusammenpipetiert und vorsichtig gemischt.

Mastermixbestandteil	Volumen (1x)	Volumen (35x)	Endkonzentration
Steriles H ₂ O, PCR-grade (Reaktionsgefäß 3)	7 µl	245 µl	
MgCl ₂ Stock solution (Reaktionsgefäß 2)	2,4 µl	84 µl	4 mM
LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes (Reaktionsgefäß 1)	2 µl	70 µl	1x
gyrAp – f	0,4 µl	14 µl	0,2 µM
gyrAp – r	1,6 µl	56 µl	0,8 µM
gyrAs – A	0,8 µl	28 µl	0,2 µM
gyrAs – SM81	0,8 µl	28 µl	0,2 µM
Endvolumen	15 µl	525 µl	

Tabelle 4: Mastermix der gyrA PCR unter Verwendung der LightCycler® Systems

Zusammensetzung des Mastermix bei 5 µl Probenvolumen für einen Test (1x) und ein vollbesetztes Karussell mit Reserve (35x) nach der Optimierung.

2.4.4. Testdurchführung

Geräte

- LightCycler® Instrument (Roche, Kat. Nr. 2 011 468)
- LightCycler® Capillaries (Roche, Kat. Nr. 1 909 339)
- LightCycler® Centrifuge Adapters (Roche, Kat. Nr. 1 909 312)
- LightCycler® Software Version 3.5
- Zentrifuge (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf)

Methode

Die Zentrifugenadapter werden im mitgelieferten Kühlblock bei 8°C vorgekühlt, die benötigte Anzahl Kapillaren in den Adaptern platziert und in das obere Reservoir je 15 µl des angesetzten Mastermixes pipetiert. Je 5 µl der aufgereinigt DNA des Untersuchungsmaterials werden hinzugeben und mit der Pipette vorsichtig gemischt. Als Standard für den Wildtyp (ptc, positive template control / Positivkontrolle) wurden Präparationen des Referenzstamms H37Rv verwendet. Als Positivkontrollen für Mutationen Ala90→Val und Asp94→Gly wurden Präparationen der Stämme 1 und 2 benutzt (siehe Anhang A). Als Negativkontrolle (ntc, negative template control) wurde steriles Aqua dest. zugegeben. Alle Kontrollen sollten zumindest in Duplikaten bei jedem Test analysiert werden. Abschließend werden die Kapillaren mit dem mitgelieferten Stopfen verschlossen. Die Adapter mit den Kapillaren werden in der Zentrifuge platziert und sehr kurz bei 700 x g anzentrifugiert um das gesamte Testvolumen am Fuß der Kapillare zu sammeln.

1. Denaturierung / Enzymaktivierung			
Cycle Programm Data	Wert		
Cycles:	1		
Analysis mode:	none		
Temperature Targets	Segment 1		
Target Temperature (°C)	95		
Incubation time (min:s)	10.0		
Temperature Transition Rate (°C/min)	20.0		
Acquisition Mode	none		
2. Amplifikation			
Cycle Programm Data	Wert		
Cycles:	45		
Analysis mode:	Quantification		
Temperature Targets	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Target Temperature (°C)	95	55	72
Incubation time (s)	0	10	10
Temperature Transition Rate (°C/s)	20.0	20.0	20.0
Acquisition Mode	none	single	none
3. Schmelzkurve			
Cycle Programm Data	Wert		
Cycles:	1		
Analysis mode:	Melting Curve		
Temperature Targets	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Target Temperature (°C)	95	50	95
Incubation time (s)	30	120	0
Temperature Transition Rate (°C/s)	20.0	20.0	0.15
Acquisition Mode	none	none	cont.
4. Kühlung			
Cycle Programm Data	Wert		
Cycles:	1		
Analysis mode:	none		
Temperature Targets	Segment 1		
Target Temperature (°C)	40		
Incubation time (min:s)	01:00		
Temperature Transition Rate (°C/s)	20.0		
Acquisition Mode	none		
Fluorescence	F2/Back-F1		

Tabelle 5: Parameter bei der Durchführung der gyrA PCR unter Verwendung des LightCycler® Systems

Die Kapillaren werden dann im Rotor des LightCycler® Instruments platziert. Für die Analyse wird das Programm mit den in Tabelle 5 aufgelisteten Parametern gewählt

und daraufhin der Lauf gestartet. Nach dem Lauf können die PCR Produkte in den Kapillaren bei -20°C für die spätere Weiterverarbeitung eingefroren werden.

2.4.5. Testauswertung

Die Fluoreszenzbestimmung für die Testauswertung erfolgt auf Kanal F2/Back-F1. Für die Bestimmung der *crossing points* wurde das 2. Segment (*Amplifikation*) mit dem Programmabschnitt *Quantifikation* analysiert. Die Berechnung erfolgte anhand des *Second Derivative Maximum*. Für die Bestimmung der Schmelzpunkte wurde das 3. Segment (*Melting*) mit dem Programmabschnitt *Melting curve* analysiert. Dabei wurde der digitale Filter aktiviert, die Kurven wurden aber nicht geglättet ($^{\circ}\text{C}$ to Average 6,4) Die Berechnung erfolgte anhand der polynomialen Kalkulationsmethode. Die automatisierte *Peak Area Analyse* wurde mittels des *weighted fit* durchgeführt. Bei stark asymmetrischen Ableitungen bzw. bei Überlagerung durch Artefakte (siehe Kapitel 3) erfolgt die manuelle Bestimmung des Schmelzpunktes (Extra: Manual Tm).

2.5. Weitere Methoden der DNA-Analytik

2.5.1. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe und gestattet so die Identifizierung spezifischer Amplifikate. Die Auftrennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der negativ geladenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrer Ladung, ihrer Größe, der Porengröße der Trägermatrix und der Stärke des angelegten elektrischen Feldes. Als Laufmatrix dient ein Agarosegel, wobei man die Porengröße nach dem Auspolymerisieren durch Variation der Konzentration der Agarose beeinflussen kann. Engere Porengrößen bei hochprozentigeren Agarosegelen ermöglichen eine schärfere Auftrennung kleinerer Moleküle. Unter UV-Licht lassen sich die Banden durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid sichtbar machen. Der Vergleich mit einem Standard gestattet neben der Bewertung der Größe auch die Abschätzung der vorhandenen DNA-Menge.

Geräte

- Mikrowelle (Siemens HF0614)
- Gelelektrophoresevorrichtung (Hybaid)
- Netzgerät (Delta electronic)

- UV-Transluminator, 254 nm Wellenlänge(Fluo_Link, TFL-20M)
- Kamera (Polaroid)
- Zentrifuge (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf)
- Vortex (VortexGenie2™, Bender & Hobein)

Materialien

- DNA-Größenstandard/DNA molecular weight marker XIII (Roche, Kat. Nr. 1721925)
- Ethidiumbromidlösung (Promega/USA, Kat. Nr. H5041)

Lösungen

- 10 x TBE (89 mM TrisHCl + 89 mM Borsäure + 2,5 mM EDTA in Aqua dest., pH 8,2)
- 5 x Samplepuffer (50% Glycerol + 50 mM Tris/HCl pH 7,5 + 5mM EDTA + 0,005 Bromphenolblau in Aqua dest.)
- 3 % Agaroselösung (750 mg Agarose mit 1x TBE auf 25 ml auffüllen)
- 70% Alkohol

Methode

Ethidiumbromid gilt als potentiell kanzerogen. Neben besonderer Sorgfalt bei der Arbeit wird daher die Benutzung von Einmalhandschuhen aus Nitrile empfohlen. Die 3 % Agaroselösung wird in einer Mikrowelle bei 600 W ca. 5 min gekocht, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hat. Nach Abkühlung auf 55 – 60 °C wird 1 µl Ethidiumbromid zugegeben und untergemischt. Das noch flüssige Gel wird in die gereinigte Gelelektrophoresevorrichtung gegossen und die Kämme werden in den vorgesehenen Aussparungen platziert. Nach dem vollständigen Auspolymisieren des Gels nach ca. 20 min werden die Kämme entfernt und das Gel in die Kammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer (1 x TBE) gefüllt. Als Proben dienen - neben Amplifikaten der konventionellen PCR - auch jene der PCR mittels des LightCycler® Systems. Hierzu werden die Kapillaren vorsichtig kopfüber in 1,5 ml Reaktionsgefäßen platziert und kurz anzentrifugiert (10 s). Dabei ist darauf zu achten, dass Crosskontaminationen vermieden werden. Falls nötig können anschließend mehrere Kapillaren mit dem gleichen Amplifikat gepoolt werden. Je 2 µl eines 5 x Samplebuffer und 2 µl Proben-DNA werden in 6 µl 1 x TBE pipetiert und gemischt. Bei einer vermuteten niedrigen DNA- Konzentration werden 2 µl des 5 x Samplebuffer direkt in 8 µl Proben-DNA pipetiert. Die Probenansätze werden vollständig in die durch die Kämme entstandenen Geltaschen pipetiert. Die DNA Fragmente werden dann bei 100 V für 20 min aufgetrennt. Anschließend wird das Gel auf dem UV Transluminator platziert und bewertet sowie zur Dokumentation mit einer Polaroidkamera abfotografiert.

2.5.2. Konventionelle Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Im Rahmen der Evaluierung der neu konzipierten Primer wurde deren Funktionsweise auch durch konventionelle PCR-Verfahren untersucht. Zudem diente diese Methode zur Absicherung negativer Proben der PCR unter Verwendung des LightCycler® Systems ohne sichtbare Amplifikate in der Gelelektrophorese um Real-Time PCR-spezifische Inhibitionen auszuschließen. Das Funktionsprinzip der Amplifikation entspricht bei konventionellen PCR-Verfahren dem der Real-Time PCR, sie benötigen aber mehr Zeit, da nur langsamere Temperaturwechsel möglich sind. Zudem kann die Amplifikation nicht simultan detektiert werden, dafür sind störende Interaktionen aufgrund der fehlenden Hybridisierungs sonden unwahrscheinlicher. Der Nachweis der Amplifikate erfolgt dementsprechend erst nach der PCR z.B. mittels Elektrophorese.

Geräte

- Thermocycler 2400 (Perkin Elmer)
- Zentrifuge (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf)

Materialien

- Taq-Polymerase (5U/μl) (Promega, Kat. Nr. M1861)
- 10 x PCR Puffer / Taq Polymerase 10x Reaction Buffer without MgCl (Promega, Kat. Nr. M1901)
- Magnesiumlösung (25 mM aus Roche LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Kit)
- dNTP-Mischung (1:1:1:1) entspricht 25 mM je dNTP (Peqlab, Kat. Nr. 20-2010)
- forward Primer: gyrAp – f (10μM)
- reverse Primer: gyrAp – r (10μM)

Methode

Der Mastermix (für alle Proben und Reserve) für die gyrA-PCR wird in einem abgetrennten Prä-PCR Raum auf Eis zusammenpipetiert. Hierzu wird die entsprechende Menge Aqua dest. in einem Reaktionsgefäß vorgelegt (57,5 μl auf 100 μl Endvolumen pro Probe + Reserve). Anschließend werden der 10 x PCR Puffer (10 μl / 100μl), das Magnesium (Endkonzentration 4mM: 16 μl / 100 ml), die dNTP-Mischung (Endkonzentration 250μM je dNTP: 1μl / 100μl), der forward Primer (Endkonzentration 0,5μM: 5μl / 100μl), der reverse Primer (Endkonzentration 0,5 μM: 5μl / 100μl) und die Taq-Polymerase (2,5 U pro Probe: 0,5μl / 100μl) dazu pipetiert und kurz durch Vortexen gemischt. Je 95 μl des Mastermix pro Probe werden in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt, 5 μl aufbereitete Proben-DNA

hinzugegeben und die Probe kurz gemischt. Die Reaktionsansätze werden in einem getrennten Amplifikationsraum in den Thermocycler eingesetzt und die PCR unter folgenden Amplifikationsparametern gestartet: Enzymaktivierung (10 min bei 95 °C) + 45 x [Denaturierung (30 s bei 95 °C) + Annealing (30 s bei 57 °C) + Elongation (45 s bei 72 °C)] + Endelongation (7 min bei 72 °C) + Cooling (∞ bei 4 °C).

Nach Abschluss der PCR werden die Amplifikate (Länge des *gyrA*-Produkts 224 bp) per Gelelektrophorese in einem post-PCR Raum kontrolliert.

2.5.3. Sequenzierung

Die Sequenzierung ermöglicht die Analyse der spezifischen Abfolge der Basen eines DNA-Fragments und somit die genaue Identifikation der Mutation, die für die Resistenzentstehung verantwortlich sein könnte. Sequenziert wurde das *gyrA* Gen aller hochresistenter *Mycobacterium tuberculosis* Stämme (Anhang A: Gruppe A) sowie aufgrund unspezifischer Amplifikate (s.u.) die Referenzstämme *Mycobacterium hassiacum* und *Mycobacterium smegmatis*.

Durch Firmen kommerziell angebotene Sequenzierungen mit modernen vollautomatisierten Kapillarsequenziergeräten bieten für die meisten Einrichtungen ein kosteneffizientere und meist qualitativ hochwertigere Alternative zu hauseigenen Lösungen. Die Amplifikate der PCR mittels des LightCycler® Systems wurden daher an die Firma Sequiserve (Sequiserve) geschickt und dort mit dem ABI Prism 3730 Kapillarsequenziergerät analysiert. Diese Sequenziertechnik beruht auf einer Modifikation der Kettenabbruch-Synthese nach Sanger (Sanger, Nicklen et al. 1977). Hierbei werden analog zur PCR ausgehend von einem Primer komplementäre DNA-Stränge synthetisiert, die Elongation aber bei Einbau von spezifisch mit Fluochromen gefärbten Didesoxynukleotiden abgebrochen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der so gewonnenen unterschiedlich langen Fragmente nach der Größe in einer Kapillare kann die Sequenz nun aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenz der Didesoxynukleotide automatisiert abgelesen werden. Aufgrund dieses Verfahrens müssen die Amplifikate der Real-time-PCR vor der Sequenzierung gründlich von Primern und den fluochrommarkierten Hybridisierungssonden gereinigt werden. Hierzu wurde das High Pure PCR Product Purification Kit verwendet, wobei nur größere DNA Fragmente (>100 bp) an die Glasfasern des Filters binden, wohingegen Primer und Hybridisierungssonden vor der Elution der DNA durch mehrere Waschschriffe ausgewaschen werden.

Geräte

- Heizblock (SK1101D, PeqLab, Deutschland)
- Zentrifuge (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf, Deutschland)
- Vortex (VortexGenie2™, Bender & Hobein, Schweiz)
- ABI Prism 3730 Kapillarsequenziergerät (Sequenzierung extern durch Sequiserve)

Materialien

- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Kat. Nr. 1 732 668)
- Isopropanol
- Äthanol absolut (Präparation des Waschpuffers des Roche Kits)

Methode

Für die Sequenzierung des *gyrA*-Gens wurden von dem zu untersuchenden Stamm jeweils 3 Amplifikate der nach dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführten PCR unter Verwendung des LightCycler® Systems gepoolt. Hierzu werden die Kapillaren erst vorsichtig einzeln kopfüber in 1,5ml Reaktionsgefäße gegeben und für wenige Sekunden anzentrifugiert. Die Amplifikate werden anschließend in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt (ca. 60 µl), die Lösung mit Aqua dest. auf 100µl aufgefüllt und durch vortexen gründlich gemischt.

Anschließend werden 500 µl Bindepuffer zu der Probe pipetiert und alles gut gemischt. Daraufhin wird die gesamte Probe in das obere Reservoir der zusammengesetzten High Pure – Säule pipetiert und für 1 min bei 4500 g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und das Sammelgefäß wieder mit dem Filtergefäß kombiniert. 500 µl Waschpuffer werden in das obere Reservoir pipetiert, die Säule für 1 min bei 4500 g zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen. Der Waschschrift wird einmal wiederholt. Der Filter wird anschließend mit einem sauberen Reaktionsgefäß kombiniert. 50 µl des Elutionspuffers werden in das obere Reservoir pipetiert und die Säule erneut für 1 min bei 4500 g zentrifugiert. Das Eluat enthält nun die gereinigten Amplifikate.

Vor dem Versenden wurden die Reaktionsgefäßen mit den gereinigten Amplifikaten bei geöffnetem Deckel zum Exsikkieren in den Heizblock (60°C) gestellt. Zusammen mit den Amplifikaten wurde auch der forward und der backward Primer (Konzentration 10 pmol/µl) an Sequiserve geschickt, um gegebenenfalls auch den Gegenstrang sequenzieren zu können (Bestätigung der Heteroresistenzen der Stämme 17 und 37).

2.6. Molekulargenetische Untersuchungen: Fingerprinting mittels des IS6110 RFLP

Um die genetische Varianz der resistenten Stämme zu überprüfen, wurden molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt. In der epidemiologischen Forschung hat sich in den letzten Jahren als verlässlichste und gebräuchlichste Methode für Typisierung des *Mycobacterium tuberculosis* das Fingerprinting mittels des IS6110 RFLP bewährt (van Soolingen, de Haas et al. 1993). Das IS6110-Element ist ein repetitives DNA-Element, das in einer oder mehreren Kopien an variablen Stellen des Genoms eingebaut sein kann und somit die charakteristische Identifizierung mykobakterieller Klone ermöglicht sowie deren Verwandtschaftsbeziehungen aufdecken kann. Das Element enthält eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym PvuII. Nach dem Verdau der genomischen DNA mit dieser Endonuklease können die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet werden (Southern Blot). Nach Hybridisierung mit einer markierten Sonde kann dann das aufgrund des Verdau entstanden charakteristische Profil, der Fingerabdruck (Fingerprinting) des Klons enzymatisch-photochemisch visualisiert werden. Die Normierung durch einen mitbestimmten internen Marker ermöglicht mittels einer computergestützten Auswertung den Vergleich mit Stämmen interner und internationaler Datenbanken. Dieses Verfahren soll hier in sich abgeschlossen dargestellt werden. Die Arbeitsanweisungen folgen den für die Fingerprintingstudie der EU verwendeten Manual (van Soolingen, de Haas et al.).

2.6.1. Vorbereitungen

2.6.1.1. Herstellung des internen Markers

Geräte

- Inkubator/Brutraum (37 °C) (Spezialanfertigung)
- Zentrifuge (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf)
- Vortex (VortexGenie2™, Bender & Hobein)
- Tiefkühltruhe (-20 °C) (Bauknecht GMS 2511)

Materialien

- Supercoiled DNA-Ladder (SCL, Gibco BRL, Kat. Nr. 15622-012)
- PhiX174-HaeIII (DNA Molecular Weight Marker IX, Roche, Kat. Nr.1 449 460)
- Restriktionsendonuklease Pvu II (Roche, Kat.Nr. 642690)

- Digestionspuffer Pvull (SuRE/Cut Buffer M, Roche Kat. Nr. 1417983)

Lösungen

- 10 mM TrisHCl (in Aqua dest./ pH 7,5 mit HCl eingestellt)
- 1x TE-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 8.0 + 10mM EDTA in Aqua dest.)
- Äthanol 96%
- 5 M NaCl (in Aqua dest.)
- Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (im Verhältnis 25:24:1)

Methode

Zur Analyse von RFLP-Mustern aus unterschiedlichen Versuchen oder anhand internationaler Datenbanken wird für jede einzelne zu untersuchenden Probe ein interner Standard benötigt. Hierzu dient die Mischung des kommerziellen Markers PhiX147-HaeIII und einer Pvull verdauten „*Supercoiled* DNA ladder“. Der Verdau muss vor dem Versuch vorbereitet werden: Zur Extraktion der DNA werden in einem Reaktionsgefäß 50 µl SCL, 150 µl 10 mM Tris, 25 µl 5 M NaCl und 500 µl absolute Äthanol vorgelegt, die Lösung wird dann für 30 min auf -20 °C gekühlt, um die Nukleinsäuren zu präzipitieren. Anschließend werden die Präzipitate durch Zentrifugation für 15 min bei 12000 g gesammelt und nach dem Absaugen des Überstandes an der Luft getrocknet. Die Präzipitate werden daraufhin in 58 µl TE gelöst, 5 µl Pvull und 7 µl Digestionspuffer werden hinzu pipetiert und die DNA über Nacht bei 37°C verdaut. Am nächsten Tagen werden zu dem Verdau 330 µl 10 mM Tris und 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol hinzu gegeben. Die Probe wird für 5 min gemischt und dann bei 1200g für 15 s zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 1 ml absolutes Äthanol hinzugeben und die DNA für 30 min bei -20°C belassen um eine Präzipitation zu erreichen. Die Proben werden erneut zentrifugiert (15 min bei 12000 g), der Überstand verworfen und die Präzipitate getrocknet. Diese werden dann in 40 µl 10 mM TrisHCl gelöst (ergibt ca. 250 ng restriktionsverdaute SCL/µl) und aliquotiert eingefroren. PhiX174-HaeIII ist gebrauchsfertig. Beide Anteile des internen Standards werden direkt zum Samplepuffer der Elektrophorese gegeben (siehe Kapitel 2.6.4)

2.6.1.2. Amplifikation von M. bovis für die Hybridisierungssonde

Die Detektion der mykobakteriellen DNA Fragmente nach dem Southern Blot erfolgt über die Hybridisierung mit einem mit Peroxidase markierten Amplifikats des IS6110 von *Mycobacterium bovis*. Als Ausgangsmaterial dient eine DNA-Aufreinigung mittels des High Pure PCR template preparation kit (Kapitel 2.1.4.3) vom BCG Stamm der

Stammsammlung. Die Amplifikation erfolgt gemäß der oben beschriebenen konventionellen PCR mit den unten aufgelisteten Primern

Geräte

- Thermocycler 9600 (Perkin Elmer Cetus)
- weitere Geräte s.o.

Materialien

- Taq-Polymerase (5U/μl) (Promega, Kat. Nr. M1861)
- 10 x PCR Puffer / Taq Polymerase 10x Reaction Buffer without MgCl (Promega, Kat. Nr. M1901)
- Magnesiumlösung (25 mM aus Roche LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Kit)
- dNTP-Mischung (1:1:1:1) entspricht 25 mM je dNTP (Peqlab, Kat. Nr. 20-2010)
- forward Primer: INS-1 (0,8 μM)
5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3'
- reverse Primer: INS-2 (0,8 μM)
5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-3'

Methode

Das Zusammenpipetieren des Mastermixes für die IS6110-PCR erfolgt analog zu den Angaben in Kapitel 2.5.2: 70ml Aqua dest. werden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend werden 10 x PCR Puffer (10 μl / 100μl), Magnesium (Endkonzentration 2mM: 8 μl / 100 ml), dNTP-Mischung (Endkonzentration 20 pM je dNTP: 0,8 μl / 100μl), forward Primer INS 1 (Endkonzentration 4 nM: 0,5μl / 100μl), reverse Primer INS 2 (Endkonzentration 4 nM: 0,5μl / 100μl) und die Taq-Polymerase (2,5 U pro Probe: 0,5μl / 100μl) dazupipetiert. Die Probe wird kurz durch Vortexen gemischt. Zu den 97,5 μl Mastermix werden 2,5 μl Proben-DNA (BCG-DNA Aufbereitung analog Kapitel 2.1.4.3) hinzugegeben, daraufhin wird die Probe abschließend kurz gemischt.

Für die IS6110 PCR gelten folgende Amplifikationsparameter: Enzymaktivierung (3 min bei 96°C) + 30 x [Denaturierung (30 s bei 96°C) + Anealing (30 s bei 65°C) + Elongation (45 s bei 72°C)] + Endelongation (7 min bei 72 °C) + Cooling (∞ bei 4°C). Nach Abschluss der PCR erfolgt die Kontrolle der Menge und der Reinheit des Amplifikats (Länge des IS6110-Produkts 245 bp) durch die Gelelektrophorese. Bei ausreichendem und spezifischem Amplifikat wird dieses wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben mittels des High Pure PCR Product Purification Kits vor der Markierung

mit Peroxidase (s.u.) aufreinigen und abschließend die Nukleinsäurekonzentration nach erneuter Elektrophorese anhand des Vergleiches mit Standards abschätzen.

2.6.2. Isolierung genomischer DNA

Geräte

- Sicherheitswerkbank Klasse II (BDK)
- Sicherheitsbrenner (FlammyS, Schütt)
- Eichimpföse (10 µl)
- Brutraum 37 °C (Spezialanfertigung)
- Vortex (VortexGenie2™, Bender & Hobein)
- Tiefkühltruhe (-20 °C) (Bauknecht GMS 2511)
- Zentrifuge (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf)
- Heizblock (SK1101D, PeqLab)
- Inkubator (65 °C)
- Geräte für die Gelelektrophorese (s.o.)

Lösungen

- 1x TE-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 8.0 + 10mM EDTA in Aqua dest.)
- Lysozym (10 mg/ml in Aqua dest.)
- 10% SDS (10 mg SDS in 100 ml Aqua dest.)
- Proteinase K (10 mg/ml in Aqua dest.)
- 10% SDS / Proteinase K Mix (70µl 10% SDS + 5 µl Proteinase K)
- 5M NaCl in Aqua dest.
- CTAB/NaCl Lösung (4,1g NaCl + 10 g CTAB auf 100 ml Aqua dest.)
- Chloroform/Isoamylalkohol (24 Volumeneinheiten Chloroform auf 1 Volumeneinheit Isoamylalkohol)
- 70% Ethanol
- Lösungen der Gelelektrophorese (s.o.)

Methode

2-3 Ösen Bakterien werden in der Sicherheitswerkbank von einem frisch bewachsenen Löwenstein-Jensen-Medium mit einer abgeflammt Impföse abgeerntet und in 400 µl in dicht verschraubbaren Reaktionsgefäßen vorgelegten 1x TE-Puffer aufgenommen. Die Bakterien werden bei 80 °C im Heizblock für 20 min abgetötet. Zum weiteren Zellwandverdau werden die Proben nach dem Abkühlen mit 20 µl Lysozym (10 mg/ml) versetzt und nach kurzem mischen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zu den lysierten Proben 75 µl 10% SDS / Proteinase K Mix pipetieren und für 10 min im Heizblock bei 65 °C inkubieren. Zu der Zellsuspension 100µl 5 M NaCl und 100 µl auf 65°C vorgewärmte CTAB/NaCl Lösung geben und vorsichtig mischen bis es milchig weiß wird. Erneut für 10 min bei 65°C inkubieren.

Zur DNA-Präparierung werden 750 µl Chloroform/Isoamylalkohol hinzu gegeben, die Proben vorsichtig gemischt und bei 12000g für 5 min. zentrifugiert. Der wässrige

Überstand wird in Schritten a 180 µl vorsichtig vollständig abpipetiert und in frische Reaktionsgefäße überführt. Zur Fällung der Nukleinsäuren werden 450 µl Isopropanol zugegeben. Beim Durchmischen durch vorsichtiges Schütteln wird auf die Größe der Präzipitate geachtet. Die Proben werden für 30 min auf -20°C abgekühlt. Anschließend werden sie erneut bei 12000g für 15 min zentrifugiert und den Überstand bis auf 20 µl über dem Pellet entfernt.

Auf das Pellet werden 500 µl kaltes 70% Ethanol pipetiert und die Proben mehrmals über Kopf geschüttelt; anschließend werden die Proben für 5 min bei 12000g zentrifugiert. Den Überstand wird bis auf 20 µl verworfen. Die Proben werden ein zweites Mal bei 12000g für 1 min zentrifugiert, dann werden sämtliche Ethanolreste unter Erhalt des Zellpellets abpipetiert. Zur vollständigen Trocknung wird das Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur für 1h offen stehen gelassen.

Anschließend wird das Pellet je nach geschätztem DNA-Gehalt in 20 – 80 µl 1x TE-Puffer aufgenommen und zur vollständigen Lösung für 1h bei 37°C inkubiert. Abschließend wird der DNA – Gehalt kontrolliert und die Konzentration mittels Elektrophorese in einem 1% Agarosegel (s.o) abgeschätzt. Hierfür wird 1 µl Probe in 9 µl 1x sample-Puffer aufgenommen und in die Geltaschen geladen. Das Gel für wird für 15 min bei 100 V laufen gelassen. Die DNA-Konzentration wird unter UV-Licht durch Vergleich mit bekannten Standards beurteilt. Durchschnittlich sollten 0,25 – 2,5 µg DNA pro µl vorhanden sein.

2.6.3. Verdau mit der Restriktionsendonuklease Pvu II

Geräte

- Brutraum 37°C (Spezialanfertigung)
- Vortex (VortexGenie2™, Bender & Hobein, Schweiz)
- Zentrifuge (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf, Deutschland)
- Geräte für die Gelelektrophorese (s.o.)

Materialien

- Restriktionsendonuklease Pvu II (Roche Kat.Nr. 642690)
- Digestionspuffer PvuII (SuRE/Cut Buffer M, Roche Kat. Nr. 1417983)

Lösungen

- 5 x Samplepuffer (50% Glycerol + 50 mM Tris/HCl pH 7,5 + 5mM EDTA + 0,005 Bromphenolblau in Aqua dest.)
- 5x Samplepuffer mit internem Standard (99 µl 5x Samplepuffer + 0,5 µl Phix 174/HaeIII + 0,8µl supercoiled DNA ladder Pvu II)
- Lösungen der Gelelektrophorese (s.o.)

Method

Für den Verdau werden 4,5 µg DNA pro Probe benötigt. Je nach dem zuvor mittels Elektrophorese bestimmten DNA-Gehalt 2 – 16 µl Aqua dest. vorlegen, 2 µl 10 x Digestionspuffer und 1 µl Pvu II nacheinander hinzupipetieren und schließlich die benötigte Menge an Proben-DNA (1 - 15 µl) hinzugeben. Den Ansatz wird dann kurz bei 1200g an zentrifugiert und für 1h bei 37°C inkubiert.

Nach dem Verdau erfolgt eine erneute Abschätzung der DNA-Menge mittels Gelelektrophorese in einem 1% Agarose-Gel. Hierzu werden zu den 20 µl Probe 5 µl 5x Samplepuffer mit internem Standard pipetiert. Nach mischen und kurzem an zentrifugieren je 5 µl in die Geltaschen füllen und für 20 min bei 100V /28 mA laufen lassen. Die Beurteilung der DNA-Konzentration erfolgt unter UV-Licht durch Vergleich mit bekannten Standards.

2.6.4. Gelelektrophoretische Auftrennung für Southern Blot

Geräte

- Elektrophoreseapparatur (SubCell® GT, Biorad)
- Stromversorgung (Consort E143, Consort)

Materialien

- Referenzstandard Mt. 14323
- PhiX174-HaeIII 0,25 µg/ml (DNA Molecular Weight Marker IX, Roche, Kat. Nr. 1 449 460)
- Lambda-HindIII 250 µg/ml (DNA Molecular Weight Marker II, Roche, Kat. Nr. 1 236 250)

Lösungen

- 5 x Samplepuffer (50% Glycerol + 50 mM Tris/HCl pH 7,5 + 5mM EDTA + 0,005 Bromphenolblau in Aqua dest.)
- 1x TE-Puffer (100 mM Tris/HCL, pH 8.0 + 10mM EDTA in Aqua dest.)
- Lambda-HindIII Vorverdünnung 1:1000 in TE
- Lambda HindIII/Phix 174 – HaeIII Mix (32 µl Lambda-HindIII Vorverdünnung [entspricht einer Endkonzentration von 40 ng/µl] + 40 µl PhiX-HaeII [entspricht einer Endkonzentration von 50 ng/µl] + 88 µl 1 x TE + 40 µl 5 x DNA Samplepuffer)
- 0,8 % Agarosegel für große Gelkammer (1,2 g Agarose in 150 ml frisch autoklavierten TBE-Puffer s.o.)
- 10 x TBE (89 mM TrisHCl + 89 mM Borsäure + 2,5 mM EDTA in Aqua dest., pH 8,2)

Methode

Ein 0,8 % Agarosegel wird in der Mikrowelle vollkommen geschmolzen und auf 60°C abgekühlt. 7,5 µl Ethidiumbromid werden zugeben, alles wird gut gemischt und das Gel in die Gelkammer gegossen. Die Kämme werden daraufhin einsetzt und das Gel für mindestens 30 min polymerisiert. In die erste Geltasche werden 5 µl lamnda Hind III/Phix 174 – Hae III Mix (Größenstandard für die Elektrophorese) pipetiert. Die weiteren Geltaschen werden mit einer möglichst gleichen Menge (ca. 2 µg) an verdauter mykobakterieller DNA beladen. Dafür werden in die zweite und die letzte Geltasche die entsprechende Menge an verdauten Referenzstandard (Mt. 14323), in die dazwischenlegenden freien Slots je nach der anschließend an die Digestion bestimmten DNA-Konzentration 2 – 18 µl der verdauten Proben pipetiert. Reste der Proben werden für die Herstellung des Markingmix aufgehoben (s.u.).

Die Proben werden bei 70 - 80 V für 5 min in das Gel einlaufen gelassen und dann über Nacht bei 30 V die DNA-Fragmente aufgetrennt. Die vorderste Bande des Größenstandards (Slot 1) sollte zum Abschluss ca. 10 cm weit gewandert sein.

2.6.5. Southern Blotting

Geräte

- Blottingapparatur (Biometra)
- Vakuumpumpe (PM 12617-86, Biometra)
- UV-Transluminator, 254 nm Wellenlänge(Fluo_Link, TFL-20M)

Materialien

- Hybond-Nitrocellulosemembran-N+ (Amerham Bioscience, Kat. Nr. PRN203B)
- Watmann-Filterpapier 3MM CHR (Whatmann Kat. Nr. 3030.690)

Lösungen

- Marking Mix (10 Volumen Reste der verdauten Proben [siehe Kapitel 2.6.4] + 1Volumen DNA des Referenzstammes Mt. 14323 [siehe Kapitel 2.6.1.2] + 2 Volumen NaOH, vortexen und über Nacht bei 4°C inkubieren)
- 0,8% Agarosegel (1,2 g Agarose in 150 ml TBE-Puffer)
- 1 M HCl (85,5 ml konzentrierte Salzsäure 37% in 914,5 ml Aqua dest.)
- 4 M NaOH (in Aqua dest.)
- 10 x SSPE (0,1 M Natriumhydrogenphosphat + 1,8 M NaCl + 10 mM EDTA in Aqua dest., pH 7.4, autoklaviert)
- 20 x SSC (3 M NaCl + 0,3 M Natriumcitrat in Aqua dest.)

Methode

Die Nitrocellulosemembran wird auf die Größe des Blottinggeles zugeschnitten, die Ränder mit Marking-Mix markiert und die Membran abschließend mit Aqua bidest.

gewässert. Auf der Blotting-Apparatur (ohne Deckel) wird zuerst ein mit Aqua bidest. durchtränktes Watman-Filterpapier platziert, dann die Membran ohne Luftblasen darauf gelegt. Eine zugeschnittene Gummimaske wird so über der Membran platziert, dass deren Ränder abgedeckt bleiben. Das Gel wird für 5min mit UV-Licht bestrahlt und anschließend luftblasenfrei auf die Blotting-Konstruktion gelegt. Dabei sollte die erste Spur auf der Maske liegen, da der Größenstandard nicht mitgeblottet wird. Die übrigen Geltaschen werden mit 7 µl Marking Mix beladen. Sämtliche Slots und die Gelränder werden mit 0,8% Agarosegel luftdicht verschlossen. Zum Blotten wird der Deckel dicht aufgesetzt und mit Klammern fixiert. Dann wird ein Vakuum angeschlossen (80 mbar). In die sich im Gel bildenden Vertiefung werden 85 µl 0,25M HCl gegeben und nach 15 min wieder abgesaugt. Anschließend wird auf die gleiche Weise das Gel für weitere 15 min mit 85µl 0,4M NaOH gewässert und abschließend vorsichtig mit Zellstoff trocken getupft. 100ml 10x SSPE werden dann für 1h in die Vertiefung gegeben um die DNA-Fragmente auf die Nitrocellulosemembran zu blotten.

Nach dem Blotten wird die Membran für 2 min auf ein mit 0,4M NaOH gesättigtes Whatmann 3MM Filterpapier gelegt und abschließend in 5 x SSC gespült.

2.6.6. Hybridisierung

Geräte

- Hybridisationsofen (Mini Oven MK II, Hybaid)
- Vortex (VortexGenie2™, Bender & Hobein)
- Zentrifuge (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf)
- Thermocycler 2400 (Perkin Elmer)

Materialien

- ECL™ Kit (ECL™ Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System, Amersham Bioscience Kat. Nr. RPN 300000LI/AC)
- Amplifikat von *M. bovis* (siehe 2.6.1.2)

Lösungen

- Waschpuffer (360 g Urea + 4 g SDS + 25 ml 20 x SSC [s.o.] auf 1000 ml Aqua dest.)
- 2 x SSC (s.o.)

Methode

Die Hybridisierung der Membran erfolgt mit 100 ng peroxidasemarkierten Amplifikaten von *M. bovis*. Zum Markieren mit Peroxidase werden 10 µl Amplifikat

(10ng/ μ l in Aqua dest.) im Thermocycler für 5 min bei 99°C denaturiert, direkt darauf für 1 min auf Eis herabgekühlt und kurz anzentrifugiert. Anschließend wird die Sonde mit 10 μ l DNA Markierungs-Reagenz gemischt und zur Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen Enzym und Einzelstrang-DNA 10 μ l Glutaraldehyd (beide Reagenzien aus dem ECL Kit) hinzupipetiert und kurz durch Vortexen gemischt. Nach kurzem Anzentrifugieren bei 12000g werden die Proben für 10 min bei 37°C inkubiert.

Die geblottete Membran wird mit 10 ml Hybridisationspuffer (ECL Kit gemäß Anweisung) in einer Rollflasche für 15 min bei 42°C im Hybridisationssofen vorhybridisiert. Die gelabelte Hybridisierungsprobe wird dann, ohne die Membran zu berühren, in den Hybridisationspuffer pipettiert und bei 6 rpm über Nacht bei 42 °C inkubiert.

Nach der Hybridisierung wird der Hybridisierungspuffer verworfen und die Membran in der Rollflasche 2-mal mit je 50 ml vorgewärmten Waschpuffer im Hybridisationsofen bei 42°C für jeweils 20 min gewaschen. Anschließend wird die Membran in einer Schale 2-mal für jeweils 5 min in frischem 2 x SSC geschwenkt.

2.6.7. Detektion und photochemische Auswertung

Geräte

- Filmkassette (X-omatic Casette, Kodak, Kat. Nr. KP 105766)
- Folienschweißgerät (Polystar-601 M, Rische & Herfurth)
- Dokumentfolien (Herlitz)

Materialien

- ECL Kit (s.o.)
- Film (Hyperfilm™ ECL, Amersham Biosciences, Kat. Nr. RPN3103K)
- Entwickler: Kodak RP X-OMAT Developer and Replenisher (Kodak, Kat. Nr. 523 9322)
- Fixierer: Kodak RP X-OMAT Fixer and Replenisher (Kodak, Kat. Nr. 522 4381)

Methode

Die über die Sonden-DNA an die Proben-DNA gebundenen *Horseradish-Peroxidase* ermöglicht nun die Visualisierung des RFLP-Musters auf Filmen. Das in den Detektionsreagenzien enthaltene Luminol setzt bei der Umsetzung durch die Peroxidase Lichtquanten frei, die photochemisch den Film an den entsprechenden Stellen schwärzen.

5 ml der im Verhältnis 1:1 gemischten Detektionreagenzien 1 und 2 des ECL Kits werden für 1 min gleichmäßig und blasenfrei über der leicht getrockneten und in ein Folie gelegten Membran verteilt. Anschließend werden die überschüssigen Reagenzien aus der Folie herausgestrichen und die Membran dann in der Folie einschweißt. In einer Dunkelkammer wird die eingeschweißte Folie zusammen mit einem Film in eine Filmkassette gelegt. Um alle Banden scharf und doch ausreichend deutlich darstellen zu können ist meist die Belichtung mehrere Filme mit unterschiedlichen Belichtungszeiten nötig (ca. 2 min bis 1 h). Der belichtete Film wird dann für 45 s im Entwickler geschwenkt, kurz gewässert und für 1 min im Fixierer fixiert und abschließend erneut gewässert und dann getrocknet.

2.6.8. Hybridisierung und Detektion des internen Standards

Geräte und Materialien

- Supercoiled DNA-Ladder (SCL,
- PhiX174-HaeIII
- s.o.

Lösungen

- Strip-Puffer (5 ml 20 x SSC [s.o.] + 10 ml 10 % SDS [s.o.] in 985 ml Aqua dest.)
- s.o.

Methode

Nach der ersten Hybridisierung mit der mykobakterienspezifischen Sonde muss die Membran ein zweites Mal mit einer Sonde für den internen Standard hybridisiert werden. Hierzu wird die Membran zuerst in einer Schale für 30 min bei 65 °C in vorgewärmten Strip-puffer gewässert, um die Sonde abzuwaschen. Dadurch wird die Membran von der Peroxidaseaktivität durch die erste Hybridisierung befreit. Als Sonde für den internen Standard werden 0,5µl ungespaltene supercoiled DNA und 0,5µl PhiX174-HaeIII in 9 µl Aqua dest. verdünnt und wie oben beschrieben markiert. Die Hybridisierung und die Detektion erfolgt analog zur ersten Hybridisierung.

2.6.9. Computergestützte Auswertung

Software / Hardware

- GelCompar® Version 2.5 (Applied Math, Gent, Belgium)
- Scanner PowerLook 1000 (Umax)

Method

Aufgrund des verwendeten internen Standards können RFLP-Mustern aus unterschiedlichen Versuchen untereinander oder mit Mustern aus internationalen Datenbanken verglichen werden. Zu diesem Zwecke wurden die Filme mit 200 dpi eingescannt und nach einem standardisierten Vorgehen mit der GelCompar® Software analysiert. Die Banden des RFLP Musters jeder Spur werden markiert und diese mit dem Muster des nach der zweiten Hybridisierung belichteten Filmes mit dem internen Standard gelinkt und so dass eine präzise relative Größenbestimmung möglich ist. Für die gewichtete Analyse wurde der Dice-Koeffizient verwendet und eine Abweichung der Bandenposition von 1% toleriert sowie die Optimization auf 1% gesetzt. Die Dendrogramme wurden mit der entsprechenden Funktion der Software erstellt.

IS6110 RFLP-Muster ermöglichen eingeschränkt auch die genotypische Zuordnung von Stämmen zur Beijing-Familie (Kremer, Glynn et al. 2004). Hierzu wurden die Stämme einzeln mittels des Similarity Tools der GelCompar® Software und unter Nutzung der oben beschriebenen Toleranzen und Koeffizienten mit den beschriebenen 19 Referenzstämmen verglichen. Als Grenzwert für die Definition eines Beijingstammes gilt hier eine mindestens 75% Ähnlichkeit des Fingerprintingmusters mit einem der Referenzstämme.

2.7. Chemikalien

- Agarose (NuSieve®GTG®, FMC BioProducts, Kat. Nr. 50082)
- Aqua ad injectabilia, H₂O (Braun Melsungen AG, ZI. Nr 6724123.00.00)
- Aqua dest., H₂O PCR Grade (Kit-Bestandteil)
- Aqua dest./bidest., doppeldestilliert, eigene Herstellung
- Auramin (Merck, Kat. Nr. 1.01301.0050)
- Borsäure, H₃BO₃ (Roth Kat. Nr. 6943.1)
- Bromphenolblau (Merck, Kat.Nr. 1.08122.0005)
- Chelex 100 (Bio-Rad, Kat. Nr. 14221253)
- Chloroform, CHCl₃ (Merck, Kat. Nr. 1.59129)
- CTAB (N-cetyl-N,N,N,-trimethylammoniumbromid), C₁₉H₄₂BrN (Roth Kat. Nr. 9161)
- di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Na₂HPO₄ x 2 H₂O (Merck, Kat. Nr. 106580)
- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), C₁₀H₁₆N₂O₈ (Roth Kat. Nr. 80401)
- Eisengallustinte, blau (Pelikan, Kat.Nr. 301 135)
- Ethanol 70% (Hausapotheker)
- Ethanol 96% (Merck, Kat. Nr. 1.59010.0500; Hausapotheker)
- Ethidiumbromid (Promega/USA, Kat. Nr. H5041)
- Glycerin (Caleo/Caesar&Lorenz, Art.Nr. 7245)
- Isoamylalkohol, C₆H₁₂O (Merck, Kat. Nr. 1.00979.1000)
- Isopropanol, CH₃CH(OH)CH₃ (2-Propanol, Merck, Kat. Nr. 1.59191.0500)
- Isotonische Natriumchlorid-Lösung, NaCl 0,9% (DeltaSelect, ZI. Nr. 1299.99.99)
- Kaliumdihydrogenphosphat, KH₂PO₄ (Merck, Kat. Nr.104873)
- Lysozym (Merck, Kat.Nr. 1.05281.0001)
- N-acetyl-L-Cystein (Merck, Kat. Nr. 101301)
- Natriumchlorid pro analysi, NaCl (Merck 1.06404.100)
- Natriumcitrat (tri-Natriumcitrat-dihydrat), C₆H₅Na₃O₇ x 2 H₂O (Merck, Kat. Nr. 1.06448)
- Natriumhydroxid, NaOH (Merck, Kat. Nr. 1.06462)
- di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat, Na₂HPO₄ x 12 H₂O (Merck, Kat. Nr. 1.06579)
- Phenol /Phenolum liquefactum (Hausapotheker)
- Proteinase K (Roche, Kat. Nr. 03115801001)
- Salzsäure, konzentriert 25% (Merck, Kat.Nr. 1.00312.2500)
- Salzsäure, konzentriert 37% (Merck, Kat.Nr. 1.00317.1000)
- SDS ultra pure, C₁₂H₂₅NaO₄S (Roth, Kat. Nr. 2326.1)
- Tris (Tris-(hydroxymethyl) aminomethane), C₄H₁₁NO₃ (Roth, Kat. Nr. 4855.3)
- Triton X 100, C₃₄H₆₂O₁₁ (Roth, Kat. Nr. 6683)
- Urea, CH₄N₂O (Sigma, El. Nr. 200-315-5)

Hausapotheker: Johannesapotheker, Industriestraße 51, 82194 Gröbenzell

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung der Mutationsanalyse im gyrA Gen mittels der PCR auf dem LightCycler® System

Die Etablierung einer gyrA PCR unter Verwendung des LightCycler® Systems zur Bestimmung von Chinolonresistenzen beim *Mycobacterium tuberculosis* - Komplex stellt das Ziel der vorliegenden Arbeit dar. Die Mutationsanalyse mittels dieser Real-time-PCR beruht auf der Amplifikation eines Abschnitts der QRDR (Quinolone resistance determining region) durch eine PCR. Durch die Bestimmung des Schmelzpunktes von an das Amplifikat gebundenen Hybridisierungs sonden werden die Mutationen identifiziert. Ziele der Etablierung ist es, diejenigen Versuchsbedingungen zu identifizieren, bei denen einerseits ein sauberes Abschmelzen der Sonden die reproduzierbare Ermittlung eines Schmelzpunktes ermöglicht und andererseits eine möglichst spezifische und effektive Amplifikation sichergestellt wird.

Für die Amplifikation wurden die Primer gyrAp – f und gyrAp - r konzipiert (siehe Kapitel 2.4.2). Deren Auswahl erfolgte anhand von Vergleichen mit Sequenzen der Nucleotide – Datenbank des NCBI, um eine hohe Spezifität zu gewährleisten, und mit Hilfe des Programms TM-Utility um Hybridisierungen zwischen den Primern und den Sonden auszuschließen. Primär wurde die optimalen Bedingungen für die Amplifikation des 224 Basenpaare großen PCR-Produkts etabliert (siehe Kapitel 3.1.1).

Für die Schmelzpunktanalyse wurden mit Hilfe des TM-Utility's die Hybridisierungssonden gyrAs – A und gyrAs – S konzipiert (siehe Kapitel 2.4.1). Um ein sauberes Abschmelzen dieser Sonden und reproduzierbare Schmelzpunkte zu gewährleisten wurden erneut verschiedene Versuchsparameter variiert (siehe Kapitel 3.1.2).

Aufgrund dieser Versuche wurde die Etablierung mit der Mismatchsonde gyrAs – SM81 als Ersatz für die Sonde gyrAs – S abgeschlossen. Hierbei wurden die bei der Optimierung der Amplifikation und der Schmelzkurven identifizierten optimalen Versuchsbedingungen noch einmal direkt mit der Mismatchsonde gyrAs – SM81 evaluiert und Standardprotokolle für die Testdurchführung und die Testauswertung erstellt (siehe Kapitel 3.1.3).

Die Lage der Sonden und Primer ist noch einmal schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

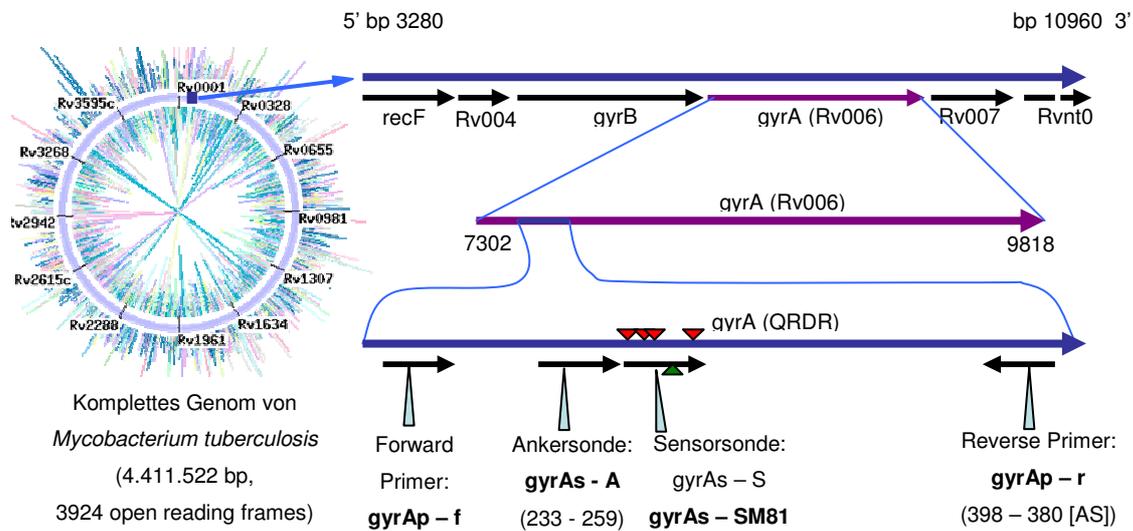


Abbildung 6: Lokalisierung der Sonden und Primer der gyrA Real-Time-PCR

Dargestellt ist die Lokalisation des umgebenden Genabschnitts im gesamten Genom von *Mykobacterium tuberculosis* (Positionsangaben bezogen aus Gesamtgenom), die Lokalisation des QRDR im gyrA Gen und die Lokalisation der Sonden und der Primer (Positionsangaben bezogen auf den Open Reading Frame des gyra-Gens). Die roten Pfeile markieren die Position der resistenzvermittelnden Mutationen, der grüne Pfeil die Position des Mismatches der Sonde gyrAs - SM81 (siehe Kapitel 2.4).

3.1.1. Optimierung der Amplifikationsbedingungen

Die Hauptanforderung an die Amplifikation ist die möglichst spezifische und effektive Vervielfältigung des zu untersuchenden Genabschnittes. Die wesentlichen Einflussfaktoren hierauf sind die Ausgangsmenge der Sequenz im Untersuchungsmaterial, dessen Salzkonzentrationen (insbesondere die Konzentration an Magnesiumionen), die Konzentration und das Verhältnis der Primer sowie die Annealing und die Extension – Temperatur.

Zur Bestimmung der optimalen Magnesiumkonzentration wurde diese von 2 mM bis 5 mM variiert und die Amplifikation einer Positivkontrolle (DNA - Präparation von einer Festkultur H37Rv) analysiert. Bei einer Magnesiumkonzentration von 2 mM kam es nur zu einer unzureichenden Amplifikation (Crossing Point: 33,01). Bei steigender Magnesiumkonzentration zeigten sich zunehmend niedrigere Crossing Points (24,44 für c Mg⁺⁺ 3 mM, 22,28 für c Mg⁺⁺ 4 mM und 19,82 für c Mg⁺⁺ 5 mM) und somit bessere Amplifikationsbedingungen (siehe Abbildung 7). Hohe

Magnesiumkonzentrationen erhöhen die Wahrscheinlichkeit von unspezifischen Bindungen. Dies beeinflusst die Spezifität des gesamten Testverfahrens, führt aber aufgrund der unspezifischen Bindungen der Sonden auch zu deren unsauberem Abschmelzen. Aufgrund der ausgewählten hochspezifischen Primern und Sonden können etwas unspezifischere Amplifikationsbedingungen akzeptiert werden. Eine Magnesiumkonzentration von 5mM hatte allerdings schon einen negativen Einfluss auf das Schmelzverhalten der Sonden und wurde daher als ungeeignet verworfen. Die Festlegung auf eine Magnesiumkonzentration von 4 mM erscheint als Kompromiss zwischen optimaler Amplifikation, ausreichender Spezifität und sauberem Abschmelzen der Sonden sinnvoll.

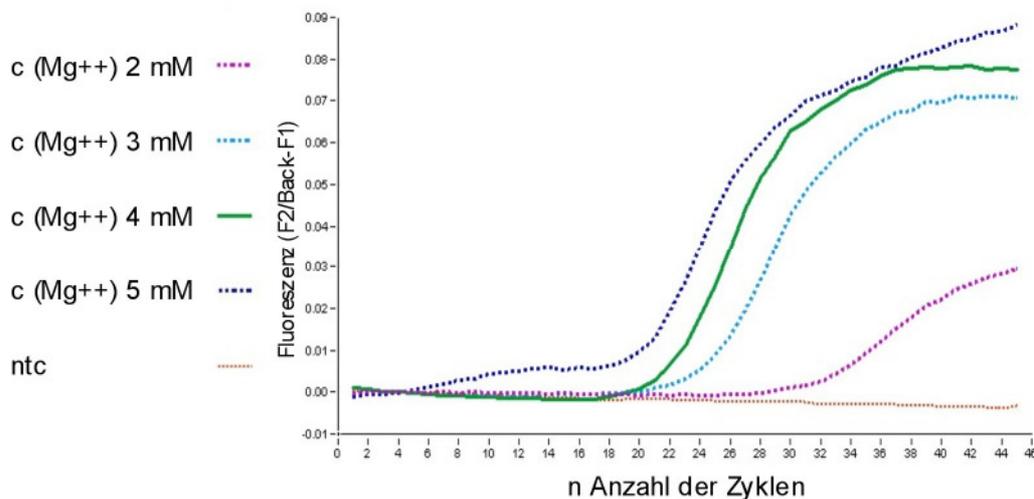


Abbildung 7: Amplifikation bei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen

Mit dem Analysemodul Quantifikation der LightCycler® Software wird die Amplifikation eines Positivstandards (H37Rv) bei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen (2 mM – 5 mM) überprüft. Bei einer Magnesiumkonzentration von 4 mM zeigte sich neben einer guten Amplifikation auch ein günstiges Schmelzverhalten..

Primer werden bei jedem PCR – Zyklus verbraucht. Eine zu niedrige Konzentration der Primer begrenzt somit die Amplifikation. Zu hohe Konzentrationen führen eventuell zu unspezifischen Bindungen und behindern so das saubere Abschmelzen der Sonden (siehe Kapitel 3.1.2.2).

Bei einer asymmetrischen PCR werden die Primer in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Dadurch wird die Amplifikation des Stranges bevorzugt, dessen Synthese von dem höher konzentrierten Primer initiiert wird. Im Rahmen der Etablierung wurden zur Verbesserung der Schmelzkurven auch asymmetrische

PCR-Bedingungen untersucht (siehe Kapitel 3.1.2.1). Die Amplifikation wird durch asymmetrische PCR-Bedingungen insofern eingeschränkt, dass anschließend an eine erste Phase mit einer exponentiellen Vervielfältigung der Sequenz nach dem Verbrauch des niedriger konzentrierten Primers die Amplifikation nur noch linear weiter verläuft (siehe Abbildung 8).

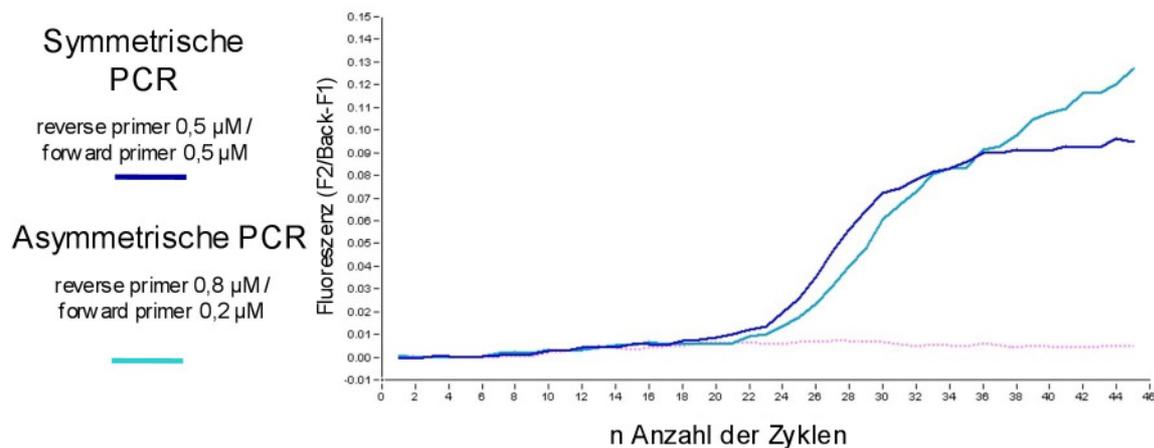


Abbildung 8: Amplifikation unter asymmetrischen Bedingungen

Anhand des Analysemodul Quantifikation der LightCycler® Software werden die Auswirkungen symmetrischer ($\text{gyrAp} - f 0,5 \mu\text{M} / \text{gyrAp} - r 0,5\mu\text{M}$) und asymmetrischer PCR-Bedingungen ($\text{gyrAp} - f 0,2 \mu\text{M} / \text{gyrAp} - r 0,8\mu\text{M}$) auf die Amplifikation einer Positivkontrolle (H37Rv) miteinander verglichen. Unter symmetrischen Bedingungen verläuft die Amplifikation exponentiell bis sie nach Verbrauch des Großteils der Primer ausläuft. Unter asymmetrischen Bedingungen folgt einer exponentiellen Phase analog zu der symmetrischen PCR eine Phase der linearen Vervielfältigung des durch die Asymmetrie bevorzugten Stranges. Da durch die *Hybridization Probes* nur der von dem bevorzugten Primer amplifizierte Gegenstrang detektiert wird, kann dabei bei höherer Zykluszahl eine höhere Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Die Amplifikation lässt sich auch durch die Wahl der Temperaturen und der Zeiten der PCR beeinflussen. Die Annealing- und Extension- Temperaturen wurden mit 55 °C und 72 °C analog zu den Empfehlungen festgelegt (Roche Molecular Biochemicals: LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes – Produktbeschreibung). Eine Erhöhung der Annealingtemperatur auf 60 °C auf Grund des hohen GC-Gehaltes entsprechend der Formel $t_{\text{annealing}} = 30 + 0,5 * (\text{primer GC}\%)$ (Brown RA 1998) zeigte keine wesentlichen Unterschiede in der Amplifikation und dem Schmelzverhalten.

3.1.2. Optimierung der Schmelzkurven

Erste Schmelzpunktanalysen unter Standardbedingungen mit dem ursprünglich konzipierten *gyrA* Sensor ergaben ein für die Mutationsanalyse ungeeignetes Abschmelzprofil. Vor dem noch erkennbaren spezifischen Peak für den WT bei ca. 73 °C (theoretischer Schmelzpunkt der Sensorsonde nach TmUtility V. 1.5 von Idaho Technology 73,9 °C) zeigte sich eine inhomogene Schulter (Abbildung 9). Auf Grund Ihrer im Intra- und Interassay-Vergleich sehr variablen Form wurden sie als ein unspezifisches Artefakt gewertet. Die Ausprägung des Artefakts zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Art der Probenvorbereitung, den Salzkonzentrationen, der Konzentration der DNA im Untersuchungsmaterial sowie der Sonden und Primer als auch deren Verhältnis zueinander.

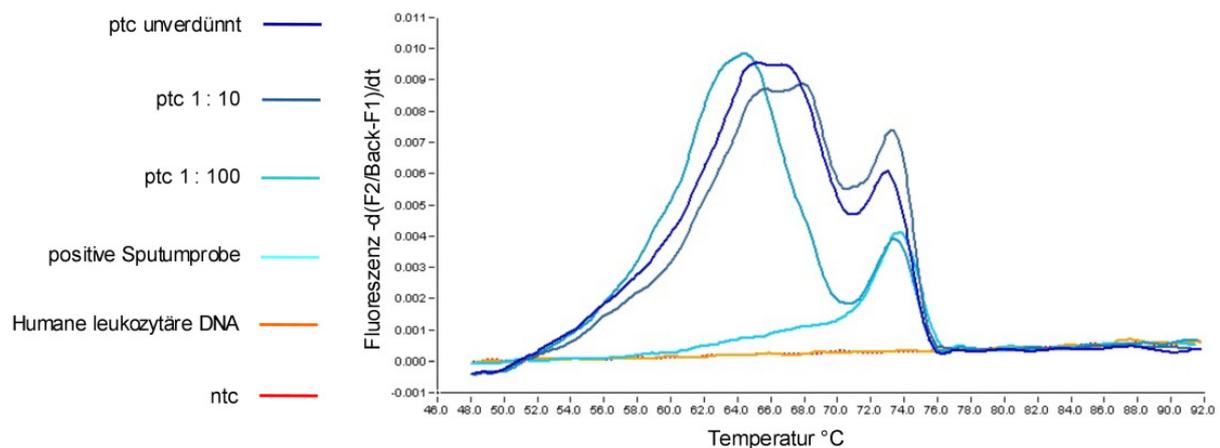


Abbildung 9: Schmelzpunktanalyse mittels des ursprünglichen *gyrA* Sensors

Mit dem Analysemodul *Melting Curves* der LightCycler® Software werden die Schmelzkurven von Verdünnungen einer Positivkontrolle (H37Rv) sowie die von einer mit Mykobakterien versetzten Sputumprobe und von humaner leukozytärer DNA dargestellt. Die PCR erfolgte unter symmetrischen Amplifikationsbedingungen und einer Magnesiumkonzentration von 4mM. Bei der Ableitung der Schmelzkurven nach der Zeit (Fluoreszenz $-d[F2/Back-F1]/dt$) findet sich ein *Peak* bei 73,3 °C und somit nahe des erwarteten Schmelzpunktes. Diesem ist aber in deutlicher Abhängigkeit von der Konzentration und der Zusammensetzung der eingesetzten DNA eine inhomogene Schulter vorgelagert, die als unspezifisches Artefakt gewertet wurde. Für die Mutationsanalyse mittels eines *Tm-Shifts* stellt ein sauberes und schnelles Abschmelzen der Sonden von dem zu detektierenden DNA-Einzelstrangstrang eine Grundvoraussetzung dar.

Solche Artefakte können mit unspezifischen Bindungen der Sonden untereinander sowie an die Primer oder den Gegenstrang erklärt werden. Gängige Konzepte zum Beheben dieser Artefakte sind die Durchführung des Testes unter asymmetrischen Bedingungen, um die Amplifikation der zu detektierende Sequenz gegenüber dem

Gegenstrang zu favorisieren, die Optimierung der Konzentrationen der Primer um kompetitive Effekte zu minimieren, sowie die Variation der Sonden.

3.1.2.1. Asymmetrische PCR-Bedingungen

Unter asymmetrische PCR-Bedingungen versteht man die Bevorzugung der Amplifikation eines Stranges gegenüber seinem Gegenstrang (siehe auch 3.1.1). Zur Verbesserung von Schmelzkurven wird jener Strang favorisiert mit dem die Sonden hybridisieren sollen. Dies erreicht man beim hier angewandten Design durch die Erhöhung der Konzentration an reverse Primer, da die Sonden zur Hybridisation mit dem Gegenstrang des *gyrA*-Gens konzipiert wurden, welcher von dem reverse Primer amplifiziert wird.

Um die anderen Parameter sicher konstant zu halten (insbesondere Salz- und Sonden- und Probenkonzentrationen) wurde die Gesamtkonzentration der Primer bei 1 μM belassen und nur das Verhältnis der Primer zueinander variiert. Einem auf Endkonzentrationen verdünntem und in Aliquots aufgeteilten Mastermix ohne Primer wurden dementsprechend forward und reverse Primer in den Verhältnissen 50%/50% (symmetrische PCR), 40%/60%, 30%/70% und 20%/80% zugesetzt. Eine 30%/70% Asymmetrie entspricht bei einer Gesamtprimerkonzentration von 1 μM z.B. eine Endkonzentration von 0,3 μM forward Primer und 0,7 μM reverse Primer in der in die PCR eingesetzten Probe.

Wie in Abbildung 10 demonstriert, verringert sich der Effekt einer unspezifischen Schulterbildung unter zunehmender Asymmetrie und der spezifische Schmelzpunkt der *Hybridization Probes* wird klarer abgrenzbar. Auch unter einer 20%/80% Asymmetrie zeigte sich eine noch ausreichend gute Amplifikation (siehe Abbildung 8).

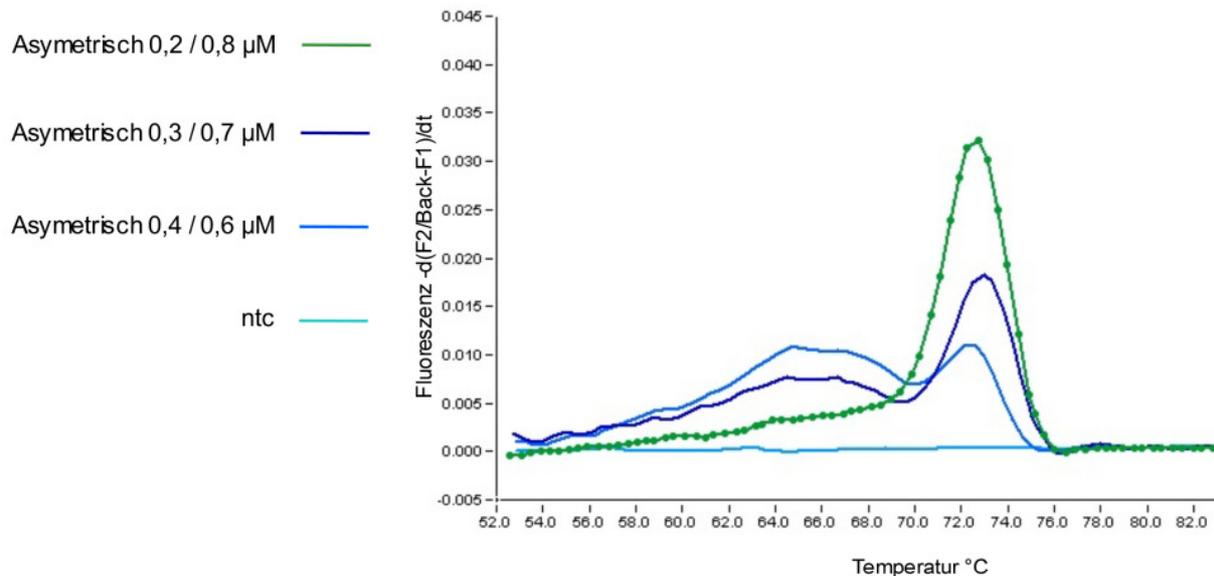


Abbildung 10: Vergleich der Schmelzkurven bei unterschiedlichen asymmetrischer PCR-Bedingungen

Eine unverdünnte Positivkontrolle (H37Rv) wurde bei ansonsten gleichen Amplifikationsbedingungen unter unterschiedlich stark ausgeprägten asymmetrischen PCR-Bedingungen amplifiziert. Mit dem Analysemodul *Melting Curves* der LightCycler® Software werden die abgeleiteten Schmelzkurven dargestellt. Mit zunehmender Asymmetrie verschwindet die unerwünschte unspezifische Schulter und fehlt bei einer 20%/80% Asymmetrie fast vollständig. Dadurch wird eine reproduzierbare und spezifische Interpretation der Schmelzpunkte ermöglicht.

3.1.2.2. Optimierung der Primerkonzentrationen

Neben dem Verhältnis der Primer zueinander spielt auch die Optimierung der Gesamtkonzentration der Primer bei der Minimierung von Artefakten eine Rolle. Eine hohe Konzentration an den Primern selbst sowie an deren Amplifikationsprodukten erhöht die Chance unspezifischer Bindungen. Um die optimale Konzentration der Primer zu bestimmen, wurden die Schmelzkurven von Ansätzen mit einer Gesamtprimerkonzentration von 0,5 µM, 1 µM und 2 µM unter 30%/70% asymmetrischen Bedingungen miteinander verglichen.

Bei einer Gesamtprimerkonzentration von 2 µM (entsprechend 0,6 µM forward Primer und 1,4 µM reverse Primer) zeigte sich auch unter diesen asymmetrischen Bedingungen eine deutliche unspezifische Schulter, die bei einer Konzentration von 1 µM weitgehend vermieden werden konnte (siehe Abbildung 11). Eine niedrigere Primerkonzentration führt zu einer Verschlechterung der Sensitivität ohne weitere wesentliche Verminderung unspezifischer Effekte.

Asymetrische PCR (30 / 70%)
1:100 verdünnte Positivkontrolle

c Primer 0,15 / 0,35 μM —
c Primer 0,3 / 0,7 μM —
c Primer 0,6 / 1,4 μM —
ntc —

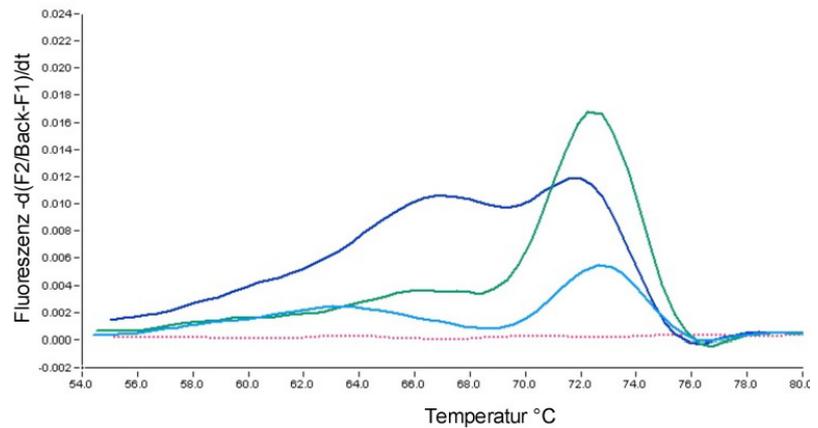


Abbildung 11: Optimierung der Primerkonzentrationen

Eine unverdünnte Positivkontrolle (H37Rv) wurde bei asymmetrischen Amplifikationsbedingungen (30%/70%) bei unterschiedlich hohen Gesamtprimerkonzentrationen amplifiziert. Mit dem Analysemodul *Melting Curves* der LightCycler® Software werden die abgeleiteten Schmelzkurven dargestellt. Hohe Gesamtprimerkonzentrationen (2 μM) begünstigen unspezifische Bindungen der Sonden, somit zeigt sich auch bei diesen asymmetrischen Bedingungen eine ausgeprägte unspezifische Schulter. Niedrige Konzentrationen (0,5 μM) verschlechtern die Amplifikation und somit die Sensitivität.

3.1.2.3. Variation der Sonden: Detektion des Gegenstranges und Mismatches

Unspezifische Bindungen können auch durch Veränderungen an den Sonden verringert werden. Die von den Sonden zu detektierende Sequenz ist allerdings durch die Lage der zu identifizierenden Mutationen weitestgehend vorbestimmt, so dass als Alternative vor allem die Detektion des Gegenstrangs in Frage kommt. Hierzu wurden die zu den ursprünglichen Sonden komplementären Sequenzen verwendet (gyrAs - AG und gyrAs – SG) und ebenfalls unter symmetrische und asymmetrischen Bedingungen (unter Bevorzugung des forward Primers) getestet. Auf dem LightCycler® System basierende PCR`s mit diesem Sondenpaar zeigten im Vergleich zu dem ursprünglichen Set auch bei vergleichbaren Intensitäten der Fluoreszenz eine deutlich stärkere Oszillation und einen höheren Background (siehe Abbildung 12).

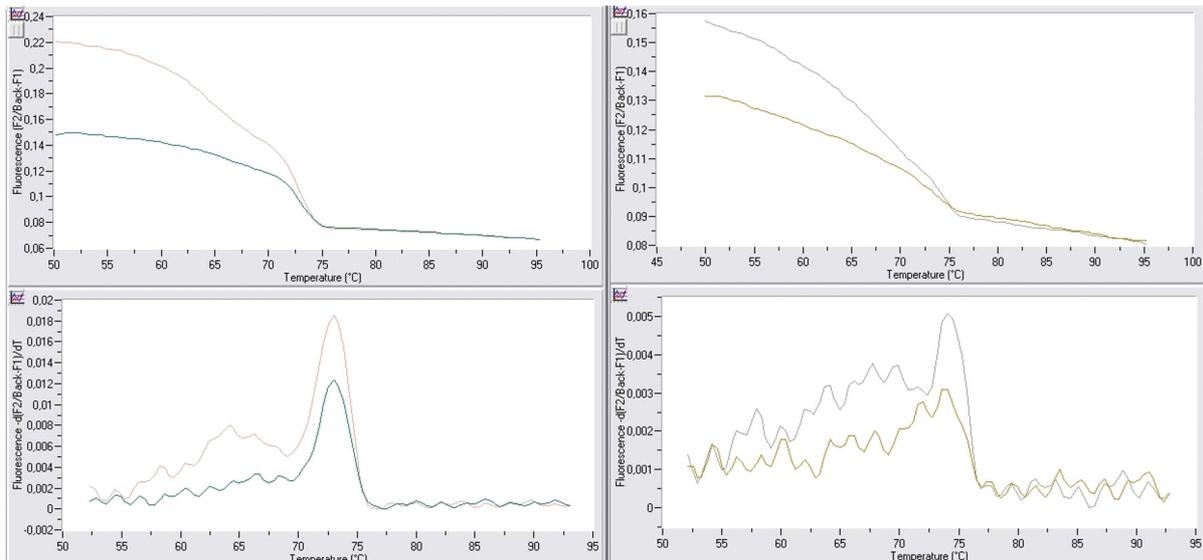


Abbildung 12: Vergleich des ursprünglichen Sets (links) mit dem mit dem Gegenstrang hybridisierenden Sondenpaar (rechts).

Eine unverdünnte (obere Linie) und eine 1:100 verdünnten (untere Linie) Positivkontrolle (H37Rv) wurde unter Bevorzugung des hybridisierenden Strangs bei asymmetrischen Amplifikationsbedingungen (30%/70% bzw. 70%/30%) amplifiziert. Als *Hybridization Probes* dienen das ursprüngliche Sondenpaar gyrAs - A und gyrAs - S und das mit dem Gegenstrang hybridisierenden Sondenpaar gyrAs - AG und gyrAs - SG. Das für die Hybridisierung mit dem Gegenstrang konzipierte Sondenpaar konnte die unspezifischen Artefakte nicht verringern und zeigte zudem bei ähnlicher Fluoreszenz eine stärkere Oszillation der abgeleiteten Schmelzkurve.

Als weitere Möglichkeiten zur Optimierung der Schmelzkurven wurden auch die Effekte von kalkulierten Mismatches in den Sonden untersucht. Die Einführung von Mismatches in den Sonden führt zu einer weniger stringenten Bindung an die zu untersuchende Sequenz und damit auch zu einem schnelleren und saubereren Abschmelzen der Oligonukleotide. Zudem können schwache unspezifische Bindungen unter Umständen schon durch die Variation eines einzelnen Nukleotids verhindert werden.

Es wurden Mismatches an den unter dem Sensor liegenden Positionen 2579, 2581, und 2584 der Sequenz Gesamtgyrasegenoms gyrB/gyrA (Takiff, Salazar et al. 1994) eingeführt. Diese in den Codons 92 und 93 liegenden Positionen wurden vor allem deshalb ausgewählt, weil bisher in diesem Bereich keine Polymorphismen beschrieben wurden und somit eine Einschränkung der Aussagefähigkeit des Testsystems dadurch nicht zu erwarten ist.

Zur Evaluierung wurden die unterschiedlichen Sensor-Sonden zu einem ansonsten fertig präparierten und aliquotierten Mastermix hinzu pipetiert. Die Amplifikation der

von Festkulturen gewonnenen DNA der Stämme H37Rv (WT), 1 (Mutation Codon 90) und 2 (Mutation Codon 94) erfolgte unter symmetrischen PCR-Bedingungen. Die Einführung der Mismatches führte zu einer Absenkung des T_m 's um ca. 5 °C ($T_{m_{WT}}$ Total Match Sonde 72,0 °C, Mismatch 2579 Sonde 66,0 °C, Mismatch 2581 Sonde 67,0 °C, Mismatch 2584 Sonde 67,6 °C). Alle drei Mismatchsonden zeigten ein schärferes Abschmelzen der Sonden als die Total Match Sonde und ermöglichten so durch die gut abgrenzbaren *Peaks* in der Ableitung der Schmelzkurve eine zuverlässigere Interpretation (siehe Abbildung 13).

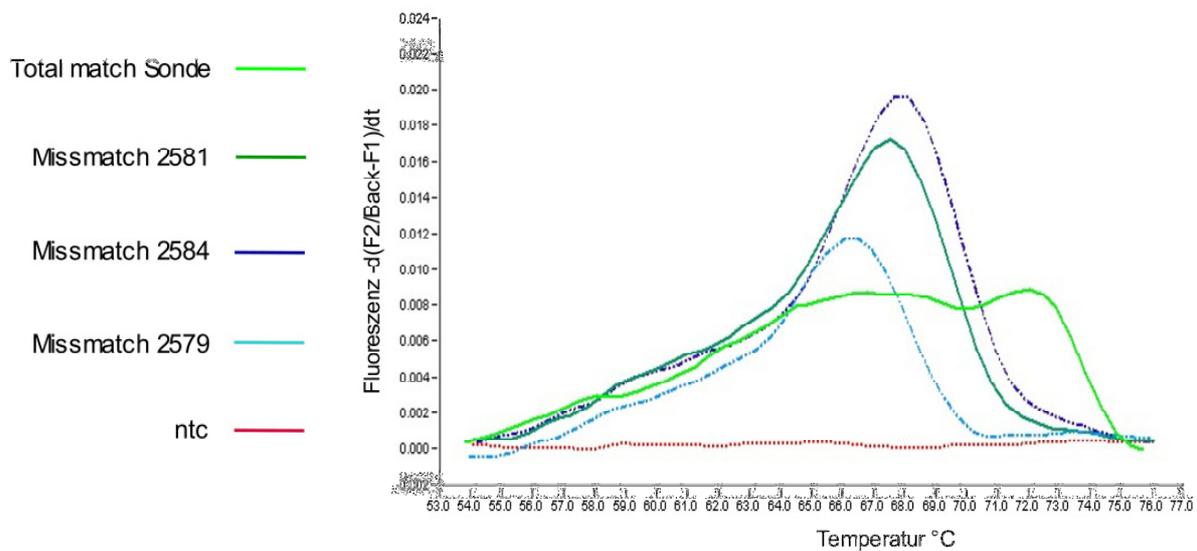


Abbildung 13: Schmelzkurven von Total Match und Mismatch Sonden

Eine unverdünnte Positivkontrolle (H37Rv) wurde symmetrischen Amplifikationsbedingungen (Gesamtprimerkonzentration 1 μ M, Magnesiumkonzentration 4mM) amplifiziert. Als Sensorsonde dienten die ursprüngliche Total Match Sonde *gyrAs* – S und die Mismatchsonden *gyrAs* – SM79, *gyrAs* – SM81 und *gyrAs* – SM84. Dargestellt sind die mit dem Analysemodul *Melting Curves* der LightCycler® Software erstellten abgeleiteten Schmelzkurven. Die Einführung eines Mismatches in die Sensorsonde führt bei der Analyse des Wildtyps unter symmetrischen Bedingungen zu einem saubereren abschmelzen der Sonden. Die bei der ursprünglichen Full Match Sonde beobachtete unspezifische Schulter kann so weitgehend vermieden werden.

Mittels des T_m -Shifts konnte allerdings durch die Mismatchsonde 2584 der WT nicht von der Mutation 94 differenziert werden ($T_{m_{WT}}$ und $T_{m_{Mut94}}$ ca. 67,7 °C). Somit war dieses Set für die Mutationsanalyse nicht geeignet. Bei der Schmelzpunktanalyse mit den Mismatchsonden 2579 und 2581 konnten der Wildtyp und die bisher identifizierten Mutationen relativ gut voneinander abgegrenzt werden (ΔT_m WT-Mut94 für beide Mismatchsonden ca. 2,2 °C), beide Varianten erscheinen daher

für die Mutationsanalyse geeignet (siehe Abbildung 14). Im Vergleich zur Mismatchsonde 2581 zeigte sich bei der Verwendung der Mismatchsonde 2579 eine schlechtere Amplifikation. Dies könnte allerdings auch technisch bedingt sein z.B. durch eine geringere Sondenkonzentration im Mastermix oder eine schlechtere Markierung der Oligonukleotide mit Fluoreszein bei der Herstellung der Sonden.

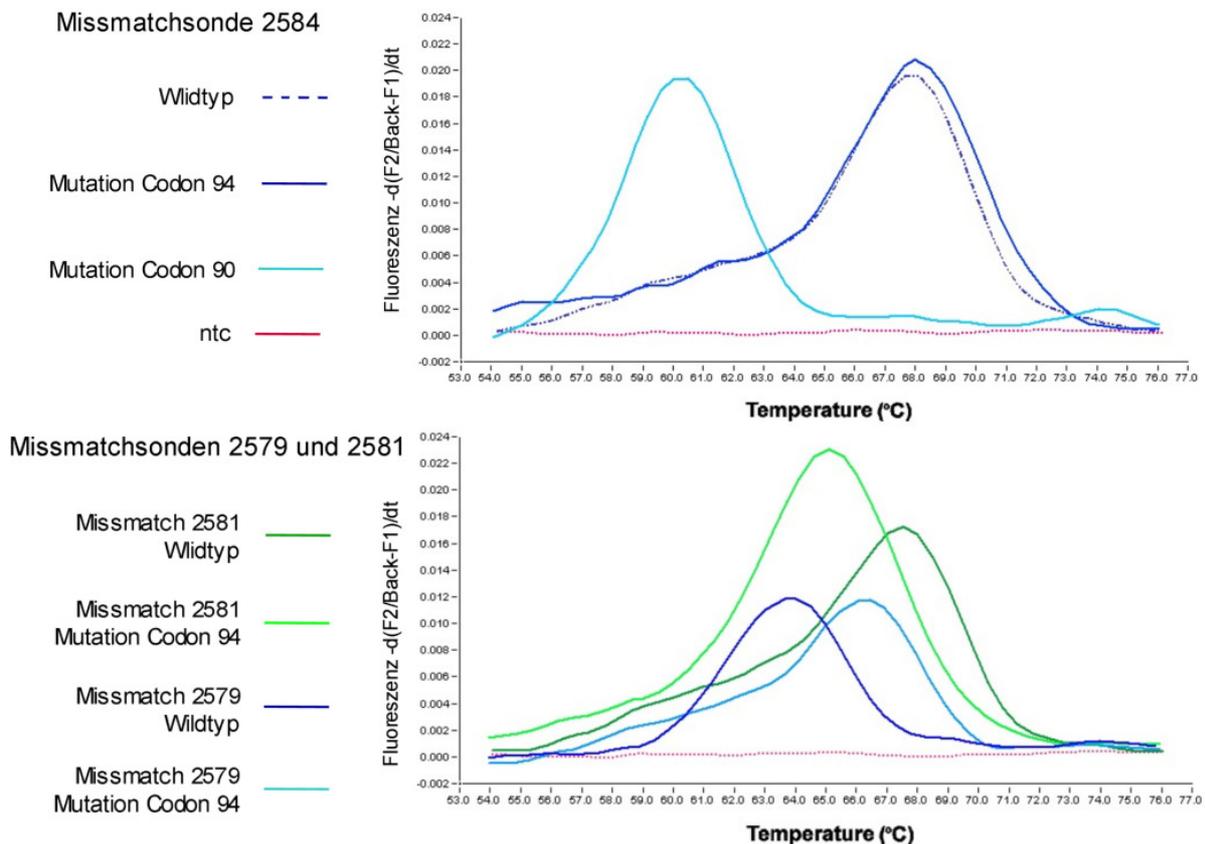


Abbildung 14: Mutationsanalyse mit Mismatchsonden

Eine unverdünnte Positivkontrolle (H37Rv) und zwei Stämme mit bekannten Mutationen im Codon 90 (GCG → GTG) bzw. im Codon 94 (GAC → GGC) wurde symmetrischen Amplifikationsbedingungen (Gesamtprimerkonzentration 1 μ M, Magnesiumkonzentration 4mM) amplifiziert. Als Sensorsonde dienten die ursprüngliche Total Match Sonde gyrAs – S und die Mismatchsonden gyrAs – SM79, gyrAs – SM81 und gyrAs – SM84. Dargestellt sind die mit dem Analysemodul *Melting Curves* der LightCycler® Software erstellten abgeleiteten Schmelzkurven. Die Mismatchsonde 2584 ermöglicht keine Differenzierung der Mutation 94 vom Wildtyp (oberes Bild). Die Mismatchsonden 2579 und 2581 ermöglichen hingegen eine ausreichende Abgrenzung (unteres Bild).

3.1.2.4. Einfluss der Schmelzgeschwindigkeit auf das Schmelzverhalten

Während der Etablierung war aufgefallen, dass bei Versuchsreihen mit voll beladenem Karussell (32 Proben) und ansonsten gleichen Versuchsbedingungen häufiger Artefakte auftraten als bei den Vorversuchen mit kleinerer Probenanzahl.

Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei vollem Rotor im Vergleich zu Versuchen mit geringerer Probenanzahl bei hohen Heizraten unter kontinuierlicher Messung technisch bedingt weniger Messpunkte pro Kapillare bestimmt werden können. Eine leichte Reduzierung der Schmelzgeschwindigkeit auf 1,5 °C/sec minimiert diesen Effekt.

3.1.3. Erstellung eines Standardprotokolls zur Durchführung der *gyrA* PCR auf dem LightCycler® System

3.1.3.1. Festlegung der Versuchsparameter der Real-Time PCR

Ziel bei der Erstellung der Protokolle war eine weitestgehende Standardisierung dieses neu etablierten Testverfahrens, um möglichst einfach zu interpretierende Resultate sowie eine hohe Reproduzierbarkeit der Daten zu erreichen.

Wie im Kapitel 3.1.2 demonstriert, zeigten sich allerdings häufig unspezifische Artefakte der Schmelzkurve, meist in Form eines verzögerten und unsaubereren Abschmelzens. Diese können mit etwas Erfahrung bei einer inhomogenen, breiten Schulterbildung in der Ableitung der Schmelzkurve ($-d(F2)/dt$) vermutet werden, beeinträchtigen aber erheblich die Zuverlässigkeit der Auswertung. Auffallend war insbesondere die hohe Varianz des Auftretens und der Ausprägung der Artefakte auch bei gleichen Versuchsparametern im Intraassayvergleich. Ursächlich hierfür könnten inhomogenes Probenmaterial (z.B. DNA-Konzentration, Salzgehalt oder Inhibitoren), Pipetierungenauigkeiten, die Varianz zwischen einzelnen Chargen oder auch veränderte Umgebungsbedingungen (z.B. Außentemperatur) angenommen werden.

Um die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten dieser Artefakte bzw. um deren Ausprägung zu minimieren, wurden die im vorhergehenden Kapitel identifizierten Optimierungen der Versuchsbedingungen kombiniert um so eine möglichst hohe Zuverlässigkeit des Testverfahrens zu erreichen.

Aus diesen Gründen erfolgte bei der Erstellung der Standardprotokolle die Festlegung auf die Mismatchsonde 2581 als Sensorsonde, da durch die Einführung des Mismatches häufig unspezifische Artefakte weitgehend vermieden werden können. Um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens weiter zu minimieren, wurde zudem generell eine 20/80 Asymmetrie der Primer in das Standardprotokoll aufgenommen, die Gesamtprimerkonzentration wurde bei 1 µM belassen. Abbildung 15 demonstriert den positiven Effekt der Asymmetrie am Beispiel der

Schmelzkurve einer mittels Chelex100 offensichtlich nur unzureichend aufgereinigten Positivkontrolle (siehe Kapitel 2.1.4.2).

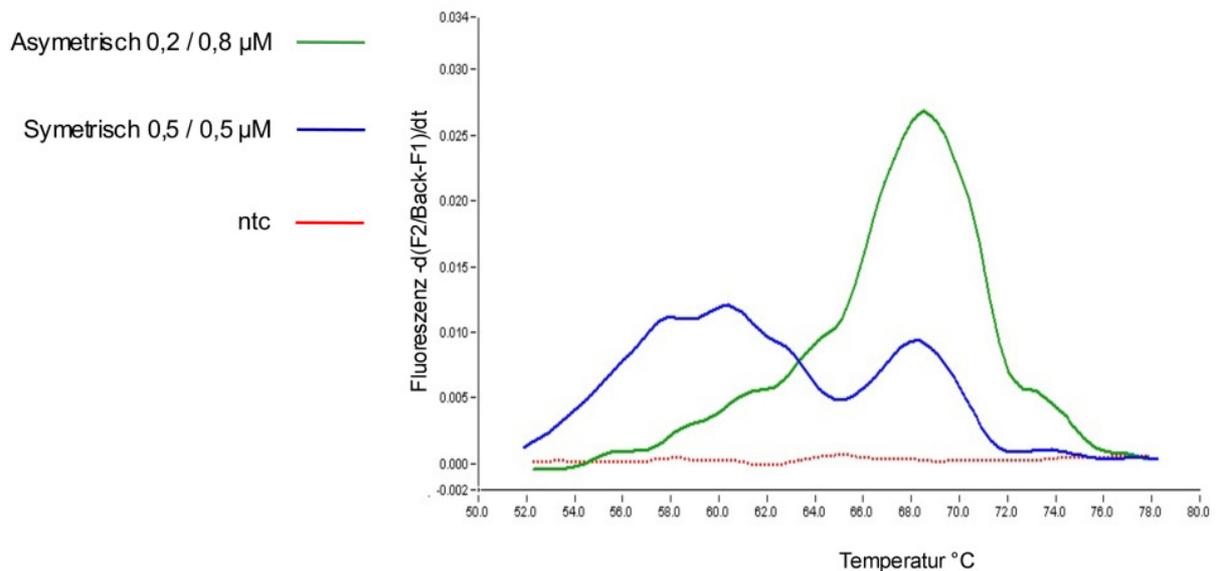


Abbildung 15: Asymmetrische PCR mit der Mismatchsonde 2581

Die DNA von H37Rv wurde mit Chelex100 präpariert und nicht über eine Säule aufgereinigt. Bei Präparationen mit Chelex 100 werden lediglich die möglicherweise die PCR beeinflussenden Metallionen durch eine Chelatbildung „inhibiert“ und die DNA nur unsauber mittels Zentrifugation von weiteren zellulären Bestandteilen getrennt. Die Probe wurde unter symmetrischen und asymmetrischer (20%/80%) PCR-Bedingungen unter ansonsten gleichen PCR-Bedingungen amplifiziert. Als Sensorsonde diente die Mismatchsonde *gyrAs* – SM81. Dargestellt sind die mit dem Analysemodul *Melting Curves* der LightCycler® Software erstellten abgeleiteten Schmelzkurven. Unter symmetrischen Bedingungen zeigt sich bei dieser unsauberen Proben-DNA erneut eine unspezifische Schulter als Artefakt. Unter asymmetrischen Bedingungen kann diese weitgehend verhindert werden. Chelex100 ist für die Präparation von Proben-DNA für den Einsatz in die *gyrA* PCR unter Verwendung des LightCycler® Systems nur bedingt geeignet.

Nach der Festlegung auf die Mismatchsonde *gyrAs* – SM81 und die asymmetrischen PCR-Bedingungen zur Verbesserung der Schmelzkurven wurde zur Optimierung der Amplifikationsbedingungen noch einmal mit diesen geänderten Versuchsparametern die Magnesiumkonzentration titriert (siehe Abbildung 16). Die Festlegung auf eine Magnesiumkonzentration von 4 mM konnte so bestätigt werden.

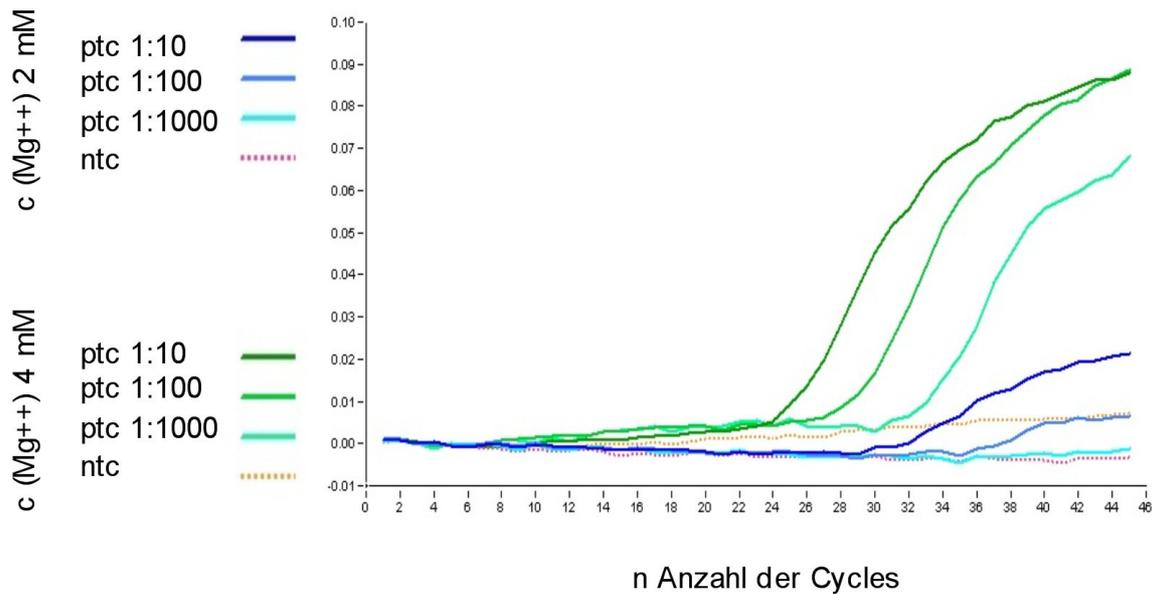


Abbildung 16: Magnesiumtitration nach Optimierung der Versuchsparameter

Verdünnungen einer Positivkontrolle (H37Rv) wurden unter einer 20%/80% Asymmetrie bei einer Gesamtprimerkonzentration von 1 μ M bei verschiedenen Magnesiumkonzentrationen amplifiziert, als Sensorsonde diente die Mismatchsonde gyrAs – SM81. Die Amplifikation wird mit dem Analysemodul *Quantifikation* der LightCycler® Software dargestellt. Bei einer Magnesiumkonzentration von 4 mM zeigt sich eine deutlich bessere Amplifikation.

Aufgrund der relativen Nähe der T_m 's des Wildtypes und der Mutation94 und dem gelegentlichen Auftreten der Artefakte wurde zudem festgelegt, dass prinzipiell auch Positivkontrollen für die Mutationen bei allen Testdurchführungen mit analysiert werden sollten.

3.1.3.2. Probenvorbereitung

Für die Gewinnung amplifizierbarer DNA von mykobakteriellen Festkulturen und direkt aus Sputumproben wurden unterschiedliche Verfahren evaluiert. Der direkte Einsatz des Überstandes lysierter Suspensionen von Mykobakterien (siehe 2.1.4.1) in die Real-time-PCR führte meist zu einer Inhibition der PCR. Zudem zeigten auch bei erfolgreicher Amplifikation die Schmelzkurven unerwünschte Artefakte, so dass diese Methode insgesamt als ungeeignet eingestuft werden kann.

Die mittels der Chelex100 Methode (siehe 2.1.4.2) zumindest theoretisch von inhibierenden Metallionen weitgehend befreiten DNA-Aufbereitungen waren ebenfalls, wenn auch seltener, inhibiert und auch die Schmelzkurven zeigten gelegentlich Artefakte. Diese Methode ist wegen dieser Varianz allenfalls als Notlösung für die schnelle Präparation von Positivkontrollen geeignet. Beide

Methoden eignen sich auch auf Grund der niedrigeren DNA-Konzentration nach der Präparation nicht für den Direktnachweis aus dem Sputum.

Als Methode der Wahl etablierte sich die DNA-Gewinnung mittels mechanisch-biochemischer Lyse und anschließender Aufreinigung des Überstandes mit dem Roche High Pure PCR template preparation kit (siehe 2.1.4.3). Sie zeigte eine auch für den Direktnachweis aus dem Sputum ausreichend hohe Sensitivität (s.u.) und unter den optimierten PCR Bedingungen weitgehend artefaktfreie und somit gut auswertbare Schmelzkurven. Die Probenvorbereitung wurde in Abbildung 5 (siehe Seite 38) zusammengefasst.

3.1.3.3. Testdurchführung

Für das Ansetzen der Reagenzien und des Mastermixes wurde eine Microsoft Excel Datei erstellt, die alle nötigen Berechnungen automatisiert und eine lückenlose Dokumentation der Testdurchführung ermöglicht. Ein Ausdruck dieses Spreadsheets findet sich im Anhang C. Alle durch den Anwender einzugebenden Variablen sind bei diesem Ausdruck blau unterlegt, alle automatisierten Berechnungen gelb. Die Datei ist in elektronischer Fassung dieser Arbeit beigefügt oder kann vom Autor bezogen werden. Bezug nehmend auf diese Datei wurde ein Standardprotokoll für die Durchführung der gyrA PCR unter Verwendung des LightCycler® Systems erstellt und ebenfalls der Arbeit angehängt.

3.1.3.4. Auswertung

Um eine möglichst objektive Beurteilung der Schmelzkurven zu gewährleisten, wurde für die Auswertung ebenfalls eine Microsoft Excel Datei für eine weitgehend automatisierte und standardisierte Auswertung erstellt.

Grundlage der Auswertung stellt die Beurteilung der Schmelzkurven in Kategorien dar, die vorzugsweise von einem mit der Real-time-PCR Erfahrenen und mit dem LightCycler® System Vertrauten vorgenommen werden sollte (siehe Tabelle 6). Sollten nicht sämtliche Positivkontrollen den Kategorien 1 oder 2 zugeordnet werden können, kann der Test insgesamt nicht ausgewertet werden und muss mit einem neuem Mastermix und eventuell auch geänderten PCR-Parametern wiederholt werden. Das gleiche gilt für Versuche mit positiven Negativkontrollen (z.B. bei DNA-Kontamination des Mastermix).

Kategorie 1	Symmetrische peaks, Verlauf und Maximum der Schmelzkurve weitgehend deckungsgleich mit der Berechnungskurve	Automatisierte Auswertung (peak area analysis) und manuelle Kontrolle
Kategorie 2	Asymmetrische aber typische peaks, dadurch Verschiebung der Berechnungskurve zu niedrigeren Temperaturen	Manuelle Auswertung (Manual Tm)
Kategorie 3	Zwei deutlich abgrenzbare peaks (V.a. Heteroresistenz)	Automatisierte Auswertung des Tm1 möglich → Bestätigung durch Sequenzierung
Kategorie 4	Abgeleitete Schmelzkurven mit sehr breiter Basis oder zwei oder mehr Wendepunkten	→ Sequenzierung <i>Befund: V.a. Heteroresistenz</i>
Kategorie 5	Typischer peak mit einem von den Positivkontrollen deutlich differenzierbaren Tm	V.a. bisher mit diesem Testverfahren nicht identifizierte Mutation → Identifizierung mittels Sequenzierung <i>Befund: V.a. neue Mut.</i>
Kategorie 6	stark oszillierende Schmelzkurve, inhomogene Schulterbildung (Artefakt)	Wiederholung der Probe, evtl. alternative Aufbereitungsmethoden <i>Befund: Artefakt</i>
Kategorie 7	Schmelzkurve analog Negativkontrolle, keine Amplifikation: Zu wenig DNA, Inhibition der PCR oder atypische Mykobakterien	Wiederholung, alternative Aufbereitungsmethoden, Speziesidentifikation <i>Befund: d.n.ampl.</i>

Tabelle 6: Zuordnung von Schmelzprofilen zu Kategorien

Basierend auf einer Einteilung durch den Untersucher werden für die Kategorien 1-3 aus den eingegebenen Tm's der Proben automatisch die ΔTm 's zu den Positivkontrollen berechnet sowie die Probe einem Genotyp (Wildtyp, Mutation Codon94, Mutation Codon90) zugeordnet. Berechnungsgrundlage hierfür ist ein maximaler Abstand von maximal 0,7°C des Tm's der Sonde von dem Mittelwert der jeweiligen Positivkontrollen. Kann der Tm einer Probe so nicht zugeordnet werden wird der Befund „neue Mutation?“ ausgegeben. Die automatisierte Zuordnung sollte abschließend immer auch noch einmal von dem Anwender überprüft werden. Für die anderen Proben erfolgt die Befunderstellung gemäß der Kategorisierung.

Der Ausdruck dieses Spreadsheets findet sich ebenfalls im Anhang. Alle durch den Anwender einzugebenden Variablen sind bei diesem Ausdruck auch hier blau unterlegt, alle automatisierten Berechnungen gelb. Auch diese Datei ist in elektronischer Fassung dieser Arbeit beigefügt oder kann vom Autor bezogen werden.

3.1.4. Nachweis von Mutationen in der QRDR durch die Schmelzpunktanalyse

Mit Hilfe der Schmelzpunktanalyse können mittels der gyrA PCR unter Verwendung des LightCycler® Systems Resistenz vermittelnde Punktmutationen (single nucleotide polymorphisms (SNPs)) identifiziert werden. Mutationen in dem unter den Sonden liegenden DNA-Abschnitt führen auf Grund der schlechteren Bindung der Oligonukleotide an die zu untersuchende Sequenz beim Erhitzen zu einem früheren Abschmelzen der Sonden und somit zum *T_m-Shift*.

Bei der Analyse der DNA der 44 zur Verfügung stehenden mykobakteriellen Stämme konnten neben dem für den Wildtyp des QRDR spezifischen Schmelzpunktes zwei weitere mutationsspezifische Schmelzpunkte identifiziert werden. Die DNA-Extrakte von zwei Stämmen ergaben Schmelzkurven, die auf einen Polymorphismus im QRDR des Stammes hingewiesen haben und als Heteroresistenz beschrieben wurden.

3.1.4.1. Schmelzpunktprofil des Wildtyps der QRDR

DNA-Extrakte des Referenzstammes H37Rv zeigten ein homogenes Abschmelzprofil mit einem durchschnittlichen *T_m* von ca. 66,7 °C. Dreiunddreißig Stämme, darunter zwei phänotypisch resistente Stämme zeigten ein dazu analoges Schmelzprofil. Für die einunddreißig ciprofloxacinsensiblen Stämme kann aufgrund ihres Resistenzverhaltens und ihres Schmelzprofils somit ein Wildtyp angenommen werden. Bei den beiden resistenten Stämmen konnte im amplifizierten Bereich die Sequenz des Wildtyps durch die Sequenzierung bestätigt werden. Die in Abbildung 17 dargestellten Schmelzkurven der beiden Ciprofloxacinresistenten Stämme 14 und 30 zeigen repräsentativ ein der Positivkontrolle bzw. dem Wildtyp entsprechendes Schmelzprofil.

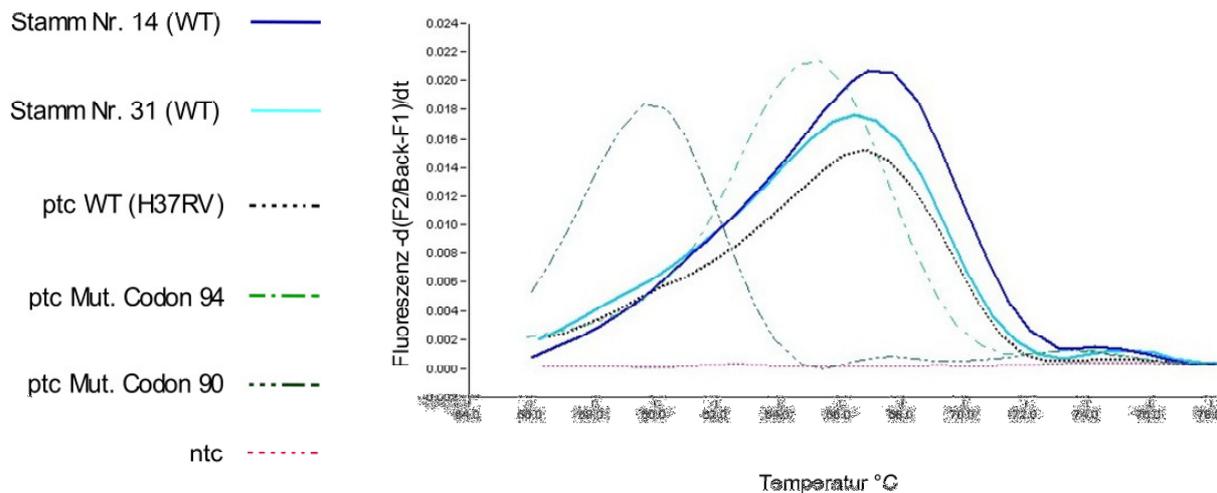


Abbildung 17: Schmelzkurven von Stämmen mit Wildtyp

Die *gyrA* Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System wurde mit den während der Etablierung identifizierten PCR-Bedingungen durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Schmelzpunktanalyse der Positivkontrolle (H37Rv) und der beiden phänotypisch resistenten Stämme 14 und 30. Alle drei Proben weisen einen dem Wildtyp entsprechenden Schmelzpunkt von ca. 67 °C auf. Der Wildtyp wurde bei den klinischen Stämmen durch Sequenzierung bestätigt. Die unterbrochenen Linien stellen repräsentative Schmelzkurven von Mutationen dar.

3.1.4.2. Schmelzpunktprofil der Mutationen Codon 90 (GCG → GTG)

Die Schmelzpunktanalyse der DNA von drei Stämmen mittels der Real-Time PCR ergab einen T_m von durchschnittlich ca. 59,7 °C. Dies entspricht einem T_m -Shift (ΔT_m) von durchschnittlich ca. -7,0 °C in Bezug auf den Wildtyp und von ca. -4,9 °C in Bezug auf den der Mutation Codon 94 (s.u.) und ermöglicht so eine eindeutige Abgrenzung (siehe Abbildung 18). Bei der Sequenzierung des Amplifikates zeigte sich bei allen drei Stämmen eine Mutation im Codon 90 vom GCG des Wildtyps zu GTG, welche zu einem Austausch des Alanins an den Positionen 90 der beiden *gyrA* Subunits des Gyraseenzym durch Valin führt.

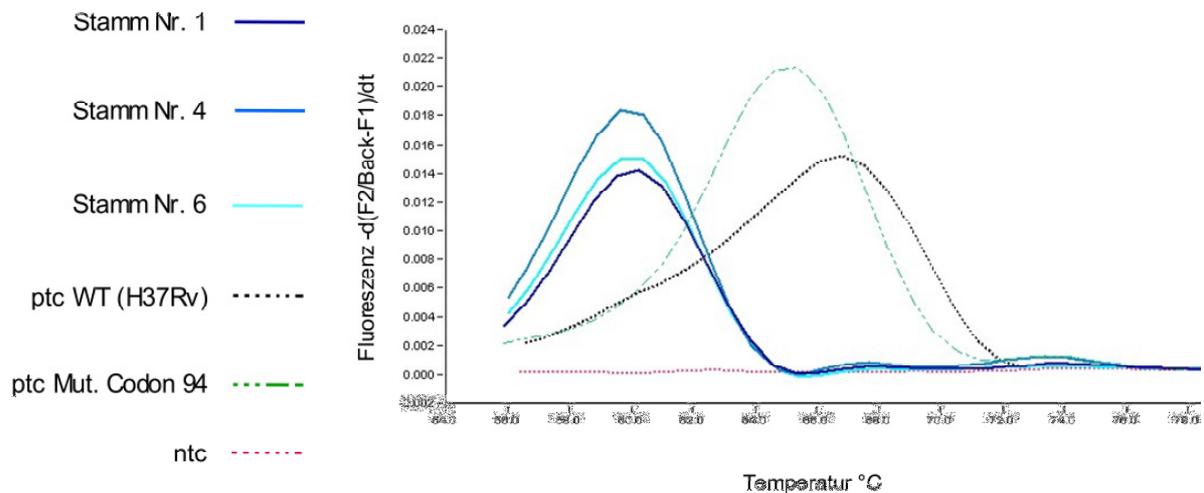


Abbildung 18: Schmelzkurven von Stämmen mit Mutation des Codon 90

Die *gyrA* Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System wurde mit dem während der Etablierung identifizierten PCR-Bedingungen durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Schmelzpunktanalyse der phänotypisch resistenten Stämme Nr.1, Nr. 4 und Nr. 6. Die Proben besitzen einen durchschnittlichen Schmelzpunkt von 59,7 °C, dies entspricht einem *Shift* von ca. 7 °C in Bezug auf den Wildtyp. Durch die Sequenzierung konnte bei den drei Stämmen eine Mutationen im Codon 90 (GCG → GTG) identifiziert werden. Mit unterbrochenen Linien sind die Positivkontrollen für den Wildtyp (H37Rv) und für die Mutation Codon 94 (Stamm 2) dargestellt.

3.1.4.3. Schmelzpunktprofil der Mutationen Codon 94 (GAC → GGC)

Die Schmelzkurven von fünf weiteren Stämmen hoben sich ebenfalls als Kurvenschar deutlich vom Wildtyp ab und wurden von einem T_m von im Mittel ca. 64,6 °C charakterisiert (siehe Abbildung 19). Die Sequenzierung des Amplifikationsproduktes ergab bei allen fünf Stämmen eine Mutation im Codon 94 vom GAC des Wildtyps zu GGC, welche zu einem Austausch der entsprechenden Aminosäure Asparaginsäure durch Glycin führt. Für diese Resistenz vermittelnde Mutation zeigt sich also ein T_m -*Shift* von durchschnittlich ca. -2,1 °C vom Wildtyp und von ca. +4,9 °C gegenüber dem T_m der Mutation Codon 90 (s.o.). Eine Abgrenzung von der Mutation 90 ist somit gut möglich, der T_m -*Shift* gegenüber dem Wildtyp fällt allerdings etwas geringer aus als üblicherweise empfohlen (anzustrebendes $\Delta T_m \geq 3$ °C). Dennoch ließen sich die Kurvenscharen der Schmelzkurven repräsentativ für Proben mit einer Mutation Codon 94 im Intra- und Interassayvergleich immer gut von denen des Wildtyps differenzieren.

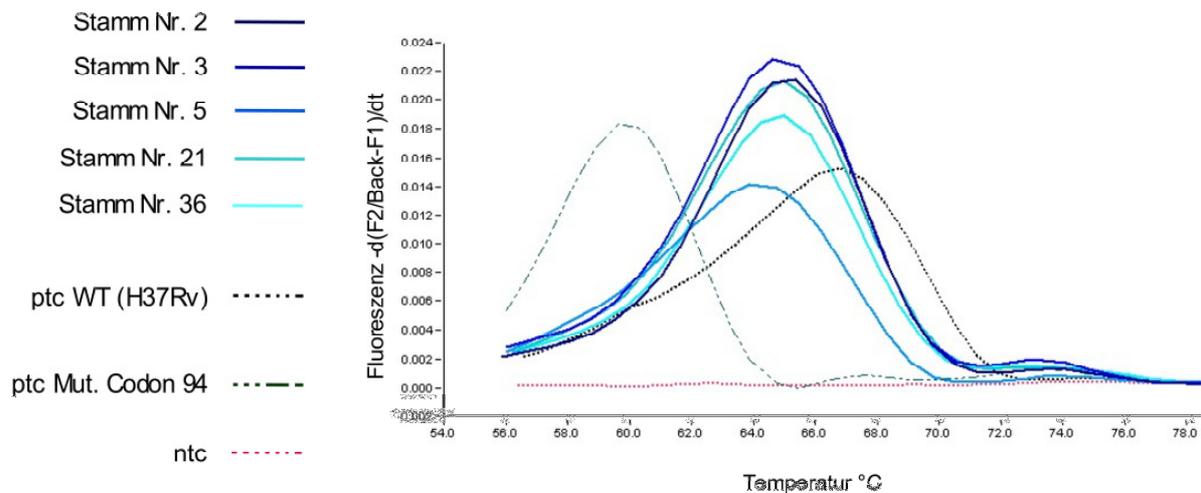


Abbildung 19: Schmelzkurven von Stämmen mit Mutation des Codon 94

Die *gyrA* Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System wurde mit den während der Etablierung identifizierten PCR-Bedingungen durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Schmelzpunktanalyse der phänotypisch resistenten Stämme Nr. 2, Nr. 3, Nr. 5, Nr. 21 und Nr. 36. Die Proben besitzen einen durchschnittlichen Schmelzpunkt von 64,6 °C, dies entspricht einem *Shift* von ca. 2,1 °C in Bezug auf den Wildtyp und von 4,9 °C in Bezug auf die Mutation im Codon 90. Durch die Sequenzierung konnte bei den fünf Stämmen eine Mutationen im Codon 94 (GAC → GGC) nachgewiesen werden. Mit unterbrochenen Linien sind die Positivkontrollen für den Wildtyp (H37Rv) und für die Mutation Codon 90 (Stamm 1) dargestellt.

3.1.4.4. Reproduzierbarkeit spezifischer Schmelzpunkte im Intra- und Interassayvergleich

Die Analyse der Varianz der Schmelzpunkte im Intra- und Interassayvergleich ermöglicht die Einschätzung der Reproduzierbarkeit des Testsystems sowie die Festlegung der Grenzwerte (cutoffs).

Für den Intraassayvergleich wurden jeweils drei Stämme der Mutationen und zwei des Wildtyps sowie der Stamm 13 (mit Heteroresistenz) in einem Testlauf unter gleichen Standardbedingungen in Triplets (drei unabhängige Probenansätze pro Test) ausschließlich mittels der automatisierten Auswertung analysiert (siehe Abbildung 20).

Innerhalb eines Stammes zeigte sich eine hohe Reproduzierbarkeit der Schmelzpunkte, die Varianz in den Schmelzpunkten reichte von einem ΔT von nur 0,01 °C (Positivkontrolle H37Rv / WT) bis zu einem ΔT von 0,33 °C (Stamm 14 / WT) zwischen dem jeweils höchstem und dem niedrigsten gemessenen T_m . Eine größere

Varianz zeigte sich lediglich bei Stamm 13 mit einem ΔT von $0,54^\circ\text{C}$. Dieser wäre allerdings wegen seiner Schulterbildung aufgrund der eingeführten Kategorisierung gemäß dem Standardprotokoll schon als auffällig und nicht automatisch auswertbar eingestuft worden.

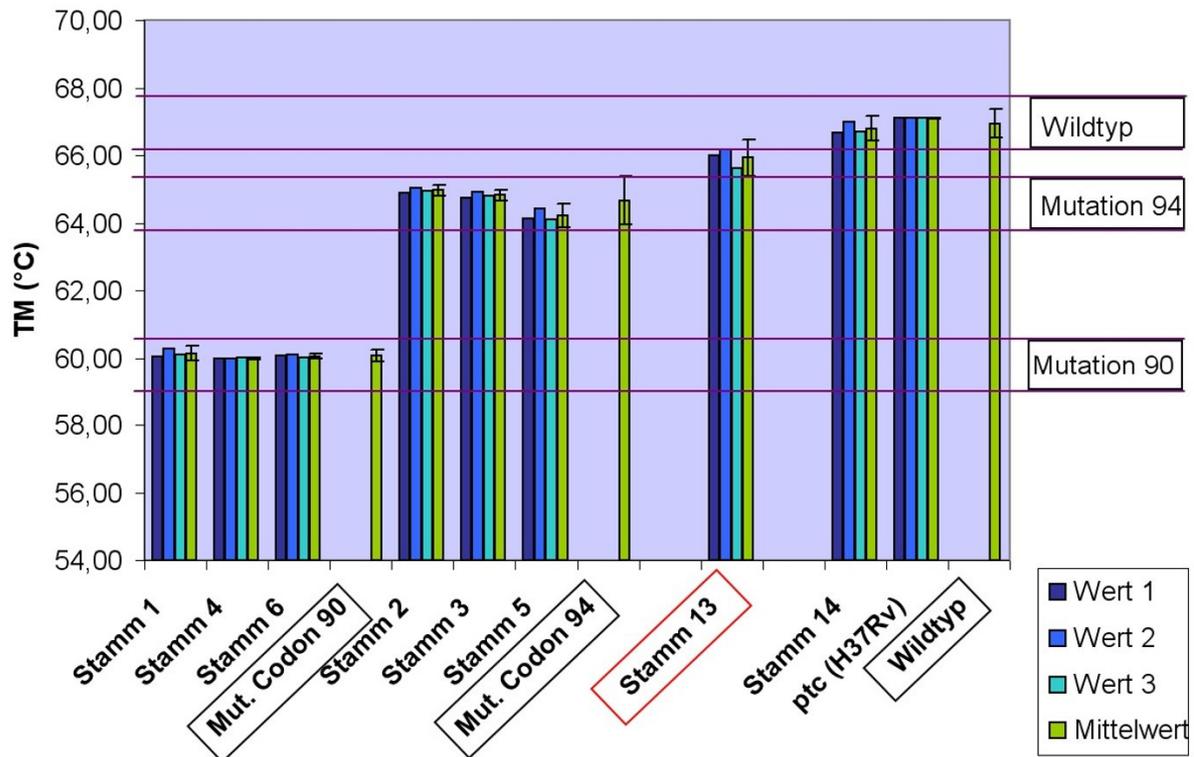


Abbildung 20: Intraassayvergleich der Schmelzpunkte

Schmelzpunkte von Stämmen mit bekannter QRDR-Sequenz, ermittelt unter Standardbedingungen innerhalb eines Testlaufes der *gyrA* Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System. Die grünen Balken repräsentieren Mittelwerte, der T-Balken indiziert die doppelte Standardabweichung. Alle Schmelzpunkte liegen jeweils in dem für die vorliegende Mutation spezifischen von den violetten Linien eingefassten Bereich (gemäß dem Standardprotokoll $\pm 0,7^\circ\text{C}$ vom Mittelwert). Die Reproduzierbarkeit der Schmelzpunkte innerhalb einer DNA-Präparation bzw. Stammes ist gut, innerhalb des Genotyps ausreichend. Stamm 13 besitzt einen probeninternen Polymorphismus (Wildtyp \gg Mutation Codon 90).

Innerhalb eines Genotyps zeigte sich teilweise eine höhere Varianz. Für die Mutation 90 errechnet sich für den T_m ein Mittelwert von $60,06^\circ\text{C}$ (einfache Standardabweichung $0,09^\circ\text{C}$) bei einer Varianz von $59,98^\circ\text{C}$ bis $60,27^\circ\text{C}$. Damit liegen alle Schmelzpunkte deutlich innerhalb des im Standardprotokoll festgelegten Grenzbereiches von $\pm 0,7^\circ\text{C}$ vom Mittelwert. Die Schmelzpunkte von Stämmen mit der Mutation 94 zeigen eine höhere Varianz (Mittelwert $64,67^\circ\text{C}$,

Standardabweichung 0,36 °C, Maximalwert 65,05 °C, Minimalwert 64,10 °C), dennoch liegen ebenfalls alle Schmelzpunkte innerhalb des Grenzbereichs. Dies gilt auch für die beiden Stämme mit dem Wildtyp (Mittelwert 66,95 °C, Standardabweichung 0,21 °C, Maximalwert 67,11 °C, Minimalwert 66,67 °C).

Im Intraassayvergleich sind somit sowohl die Schmelzpunkte und als auch die Zuordnungen zum Genotyp anhand des definierten Cutoffs ($\pm 0,7$ °C vom Mittelwert der Kontrollen) gut reproduzierbar.

Für den Interassayvergleich wurden drei Versuche von unterschiedlichen Tagen und mit teils unterschiedlichen DNA-Präparationen verglichen. Im Versuch 1 wurden Triplets ($z=3$) der Stämme Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 14 sowie der Positivkontrolle (H37Rv), im Versuch 2 die gleichen Stämme als Duplikate ($z=2$) analysiert. Im Versuch 3 wurden die Schmelzpunkte der gleichen Stämme sowie zusätzlich die für die Stämme Nr. 7 – 20 sowie Nr. 30 nur einfach ($z=1$) bestimmt (siehe Abbildung 21).

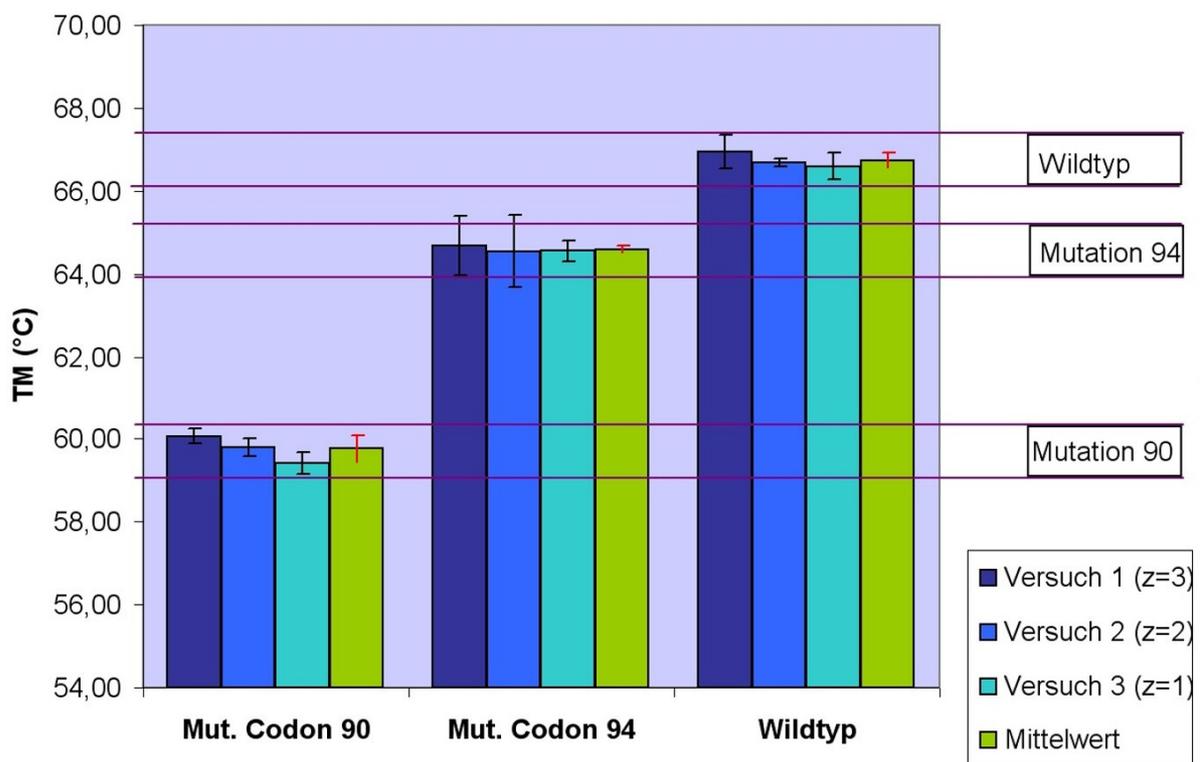


Abbildung 21: Interassayvergleich von Schmelzpunkten:

Mittelwerte von Schmelzpunkten für die drei bisher identifizierten Genotypen innerhalb der drei unabhängigen Versuche (blau), der schwarze Balken indiziert die doppelte Standardabweichung der Einzelwerte. Der grüne Balken indiziert den Mittelwert aus den Mittelwerten der Einzelversuche, der rote Balken die daraus resultierende doppelte Standardabweichung. Die Cutoffs für die Genotypen wurden Bezug nehmend auf diesen Interassay-Mittelwert festgelegt (violette Linien).

Aufgrund der weniger konstanten Versuchsbedingungen (z.B. Salzgehalt des Untersuchungsmaterials, Zusammensetzung des Mastermixes u.s.w.) ist im Interassayvergleich die Varianz der Schmelzpunkte der einzelnen Stämme meist größer. Das größte ΔT zwischen den Maximalwerten innerhalb eines Stammes betrug $0,71\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Stamm 1 mit Mutation Codon 90).

Im Interassayvergleich zeigt sich nur eine geringe Varianz der Intraassaymittelwerte für die Schmelzpunkte der einzelnen Genotypen. Für die Mutation im Codon 90 ergab sich ein Interassaymittelwert von $59,76\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Standardabweichung $0,32\text{ }^{\circ}\text{C}$), für die Mutation im Codon 94 ein Interassaymittelwert von $64,60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Standardabweichung $0,07\text{ }^{\circ}\text{C}$) und für den Wildtyp ein Interassaymittelwert von $66,74\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Standardabweichung $0,18\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Im Interassayvergleich sind die Schmelzpunkte somit ebenfalls gut reproduzierbar. Fast alle Einzelmessungen würden auch innerhalb der statischen Grenzwerte $\pm 0,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ vom Interassaymittelwert des jeweiligen Genotyps fallen. Die einzige Ausnahme bildet eine Messung des Stammes 5 in Versuch 2. Der Schmelzpunkt liegt mit $63,81\text{ }^{\circ}\text{C}$ um $0,09\text{ }^{\circ}\text{C}$ außerhalb des zugehörigen Cutoffs von $63,90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die zweite Messung (Intraassayduplikat) lag mit $63,91\text{ }^{\circ}\text{C}$ noch knapp innerhalb dieses Grenzwertes. Diese Präparation des Stammes 5 ergab allerdings in mehrere Assays einen etwas niedrigeren T_m als der mittlere T_m der anderen Codon 94 asp→gly Mutationen. Alle weiteren Werte lagen allerdings innerhalb des Cutoffs. In neuen Präparationen des Stammes 5 fielen diese Abweichungen nicht mehr auf, so dass eine unterschiedliche Salzkonzentrationen als Ursache für die Abweichung vermutet werden können.

3.1.4.5. Unspezifische Schmelzpunkte und Heteroresistenzen

Bei der Evaluierung der ciprofloxacinresistenten Stämme zeigten die DNA-Extraktionen von zwei Stämmen (Stamm Nr. 13 und 37) ein sich von den Schmelzkurven der Positivkontrollen unterscheidendes Profil. In der Ableitung ergab sich ein zweigipfliges oder ein durch eine homogene Schulterbildung ausgezeichnetes Schmelzprofil, das sich deutlich von der inhomogenen Schulterbildung bei Artefakten abgrenzen ließ (siehe Abbildung 22). Die Schmelzpunkte dieser Proben zeigten eine deutlich größere Varianz im Intra- oder Interassayvergleich (siehe Stamm 13 in Abbildung 20) und lagen bei der

automatisierten Auswertung häufig außerhalb der beschriebenen Cutoffs. Durch die Sequenzierung des PCR-Produkts konnte der Verdacht auf einen Polymorphismus (Wildtyp >> Mutation Codon 90) innerhalb der beiden Proben bestätigt werden. Dieser probeninterne Polymorphismus wird auch als Heteroresistenz bezeichnet (Rinder, Mieskes et al. 2001).

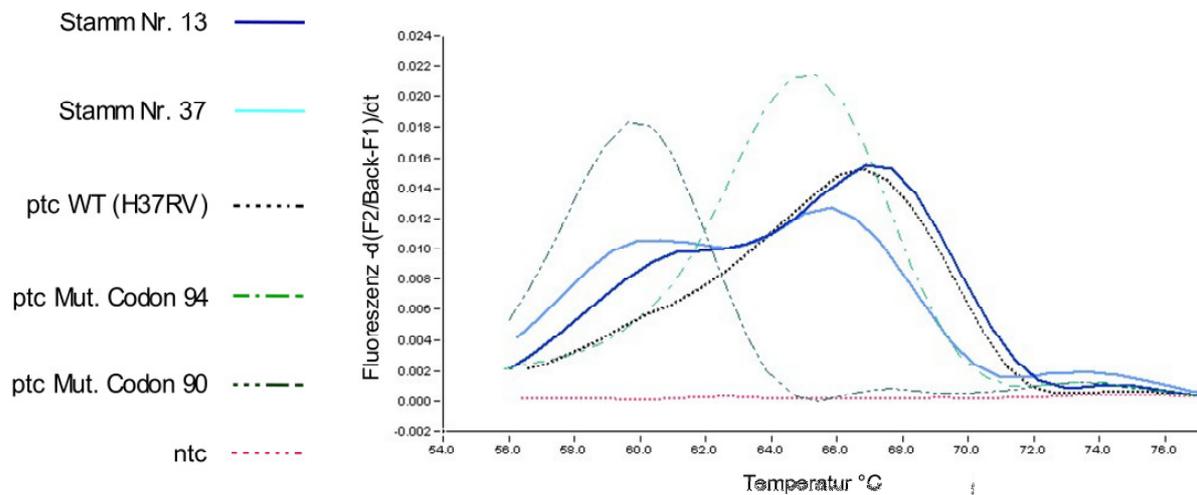


Abbildung 22: Schmelzkurven von Stämmen mit Heteroresistenz

Die gyrA Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System wurde mit den während der Etablierung identifizierten PCR-Bedingungen durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Schmelzpunktanalyse der phänotypisch resistenten Stämme Nr.13 und Nr. 37. Die Schmelzkurven zeigen ein deutlich vom Wildtyp (H37Rv) unterscheidbares Abschmelzprofil. Durch die Sequenzierung konnte bei diesen Proben ein Polymorphismus innerhalb des Gyrasegens identifiziert werden. Dabei überwiegt der Anteil der Amplifikate mit der Sequenz des Wildtyps gegenüber denen der Mutation im Codon 90 (GCG→GTG). Bei Stamm Nr. 37 konnte mit dem Analysemodul *Melting Curves* der LightCycler® - Software zwei Schmelzpunkte identifiziert werden. Das Abschmelzen des Probenanteils mit der Mutation im Codon 90 bewirkt bei Stamm Nr. 13 eine „Verzerrung“ des Schmelzpunktes zu niedrigeren Temperaturen im Vergleich zu dem Schmelzpunkt des reinen Wildtyps. Proben mit internen Polymorphismen (Heteroresistenzen) eignen sich daher häufig nicht zur automatisierten Auswertung.

Um den Effekt von Heteroresistenzen auf die Schmelzkurven zu untersuchen wurden negative Sammelputumproben mit unterschiedlichen Mengen des resistenten Stamms Nr. 1 (Mutation Ala90→Val, GCG→GTG) und des sensiblen Referenzstamms H37Rv (WT) versetzt (siehe Abbildung 23). Auch eine nur 10% Beimengung eines Genotyps konnte so noch nachgewiesen werden (siehe Probe V. e). Je nach Anteil der Genotypen in der DNA-Probe kommt es bei probeninternen

Polymorphismen zu einem zweigipfligen Abschmelzen bzw. zu einer Schulterbildung. So spiegelt der Verlauf der Schmelzkurve der artifiziellen Probe V.b gut den Verlauf der Schmelzkurve des Stammes 37 wieder (vergleiche mit Abbildung 22). Insbesondere bei sehr unausgewogenem Verhältnis der beiden Genotypen kommt es wie bei Stamm 13 unter Umständen nur noch zu einer Schulterbildung, die bei der automatisierten Auswertung nicht mehr zu einem zweifachen T_m , sondern zu einer „Verzerrung“, bzw. Verschiebung des Schmelzpunktes (siehe Stamm 13 in Abbildung 22).

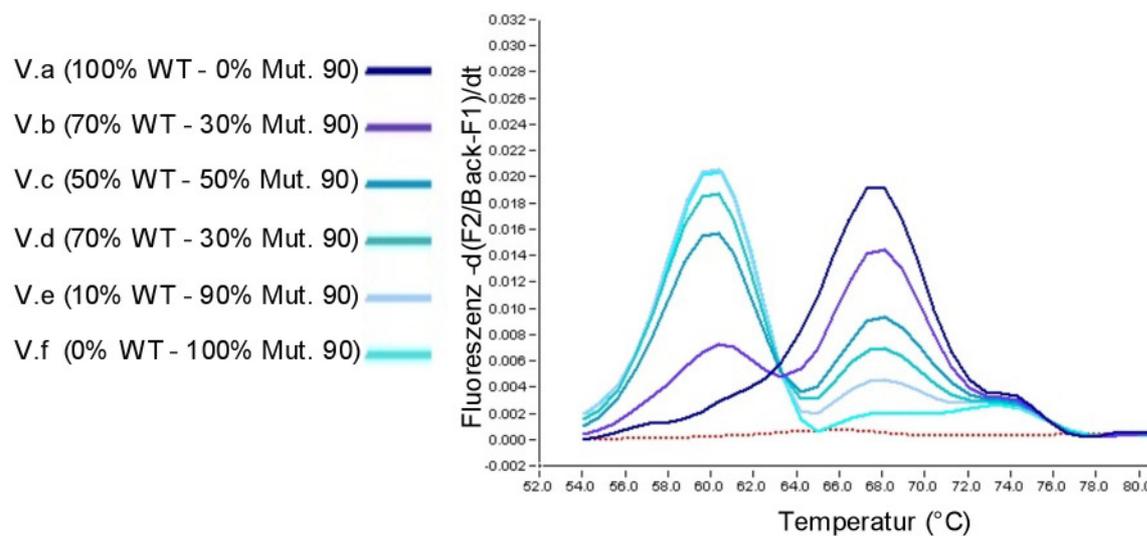


Abbildung 23: Schmelzkurven von artifiziellen Heteroresistenzen

Die *gyrA* Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System ist in der Lage probeninterne Polymorphismen nachzuweisen. Hierfür wurden Heteroresistenzen durch die Zugabe von unterschiedlichen Anteilen des resistenten Stammes Nr. 1 (Mutation Ala90→Val, GCG→GTG) und des sensiblen Referenzstammes H37Rv (WT) zu negative Sammelsputumproben simuliert. Der interne Polymorphismus wird im zweigipfligen Schmelzverhalten widergespiegelt. Eine 10% Beimengung eines Genotyps ist noch abgrenzbar (siehe Probe V.e).

Eine automatisierte Auswertung ist bei Heteroresistenzen aufgrund dieser Schulterbildung und der zuvor beschriebenen Verzerrung der berechneten Schmelzpunkte häufig nicht möglich. Um Fehlinterpretationen aufgrund dieses Effektes zu minimieren und um die Heteroresistenzen zu identifizieren wurde in das Standardprotokoll für die Auswertung die Kategorisierung aufgenommen (siehe Kapitel 3.1.3.4.)

3.2. Bestimmung der Chinolonresistenz mit der PCR auf dem LightCycler® System

3.2.1. Spezifität und analytische Sensitivität der *gyrA* auf dem LightCycler® System

Die Spezifität eines Testverfahrens beschreibt dessen Fähigkeit, den zu untersuchenden Analyt unzweideutig in Gegenwart jener Komponenten zu bestimmen, die erwartet werden können. Typischerweise könnten dies Verunreinigungen, Degredentien oder die Matrix wie z.B. Sputum sein (EMEA 1998). Die wichtigste Funktion der *gyrA* Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System beruht auf der spezifischen Identifikation chinolonresistenter Mykobakterien des *Mycobacterium tuberculosis* – Komplexes. Insgesamt wurden bei der Validation des Testverfahrens 44 Tuberkulosestämmen, darunter alle 13 bekannten und wiederkultivierbaren hochresistenten Stämme der Stammsammlung des SRL Gauting (entsprechend der Gruppen A+ und B im Anhang A), getestet (siehe Abbildung 24). Die DNA hierfür wurde von Löwenstein-Jensen-Kulturen gewonnen.

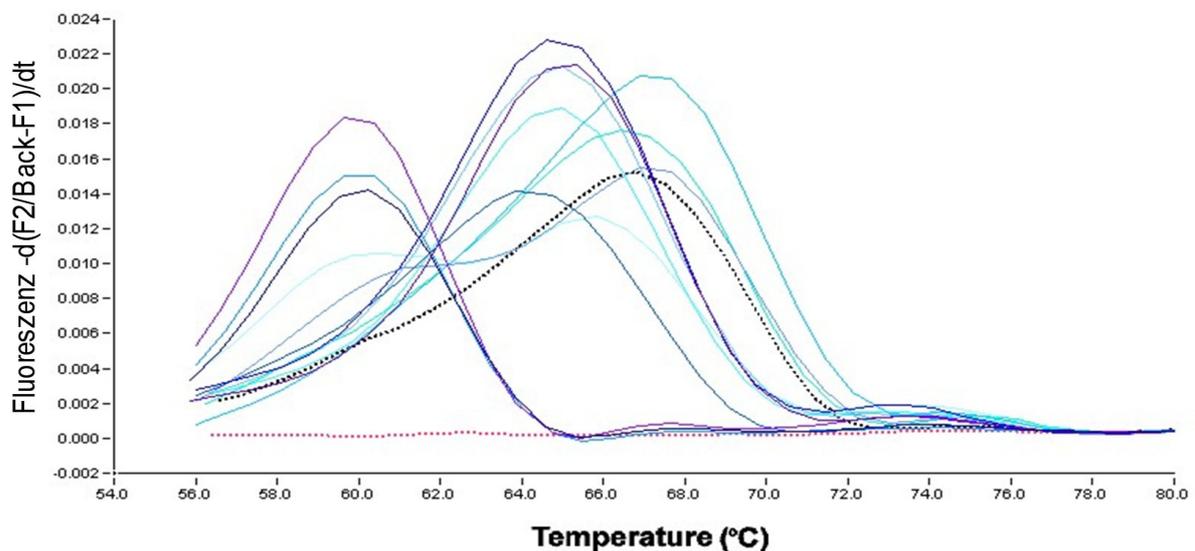


Abbildung 24: Schmelzpunktanalyse aller hochresistenter Stämme

Dargestellt sind die mittels der *gyrA* Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System unter Standardbedingungen erstellte Schmelzkurven aller 13 phänotypisch chinolonresistenten Stämme des SRL Gauting. Neun zeigen einen eindeutigen *Shift* des Schmelzpunktes. Zwei weitere Stämme (Nr. 13 und Nr. 37) zeigen einen für Heteroresistenzen typischen zweigipfligen Verlauf bzw. eine homogene Schulterbildung. Zwei Stämme besitzen keinen *Shift*, der Wildtyp wurde auch durch die Sequenzierung bestätigt. Die Positivkontrolle (H37Rv) wird durch die schwarze gepunktete Linie, die Negativkontrolle durch die rote gepunktete Linie dargestellt.

Für hochgradige Chinolonesistenzen ist im SRL Gauting als diskriminative Grenzwerte für Ciprofloxacin eine MHK ≥ 4 und für Moxifloxacin eine MHK > 1 festgelegt. Von den 13 kulturell als hochresistent für Ciprofloxacin bestimmten Stämmen zeigten 11 einen relevanten *Shift* des Tm's oder eine für eine Heteroresistenz typische Schmelzkurve. Die beiden weiteren Stämme hatten ein dem Wildtyp entsprechendes Schmelzprofil Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 noch einmal zusammengefasst.

Stamm Nr.	Name	MHK Cipro $\mu\text{g/ml}$	MHK Moxi $\mu\text{g/ml}$	Tm1	Tm2	Mutation	Stamm
1	C.,M.	>4	>2	59,56		Codon 90 (GCG→GTG)	CDC
2	Nepal 2003/2	>4	>2	64,68		Codon 94 (GAC→GGC)	CDC
3	K.,S.	>4	>2	64,41		Codon 94 (GAC→GGC)	CDC
4	A.,L.	>4	>2	59,30		Codon 90 (GCG→GTG)	CDC
5	H.,G.	>4	>2	64,64		Codon 94 (GAC→GGC)	H37Rv
6	A.,K.	>4	>2	59,40		Codon 90 (GCG→GTG)	CDC
13	Nepal 867 WHO	>4	0,5	65,7	Kat.4	Codon 90 (GCG→GTG) (Heteroresistenz)	CDC
14	Nepal 147 WHO	>4	0,5	66,81		V.a. WT	CDC
21	R.,A.	>4	>2	64,5		Codon 94 (GAC→GGC)	CDC
30	J.,G.	>4	>2	66,45		V.a. WT	H37Rv
36	G.,A	>4	>2	64,23		Codon 94 (GAC→GGC)	CDC
37	M.,T.	>4	>2	59,33	65,38	Codon 90 (GCG→GTG) (Heteroresistenz)	CDC
St. Beij.	Beijing Borstel	>4	>2	64,82		Codon 94 (GAC→GGC)	CDC

Tabelle 7: Mutationsanalyse chinolonresistenter Stämme mittels der gyrA Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System

Aufstellung aller 13 phänotypisch Chinolon-resistenten Stämme des SRL Gautings. In diesem Fall wurden alle Schmelzpunkte automatisch mittels der *Peak Area* Analyse der LightCycler® Software bestimmt. Stamm 37 war eindeutig zweigipflig und konnte ebenfalls automatisiert ausgewertet werden (*Number of peaks: Two*). Stamm 13 zeigt eine für Heteroresistenzen typische homogene Schulter, die bei einer automatisierten Auswertung den errechneten Schmelzpunkt durch die Mittelwertbildung absenkt.

Neben diesen hochresistenten Stämmen wurden noch die Schmelzprofile von 31 Stämmen mit einer niedrigeren MHK für Ciprofloxacin bestimmt. Alle phänotypisch sensiblen Stämme zeigten keinen relevanten *Shift* des Tm's zur H37Rv Positivkontrolle (siehe Abbildung 25).

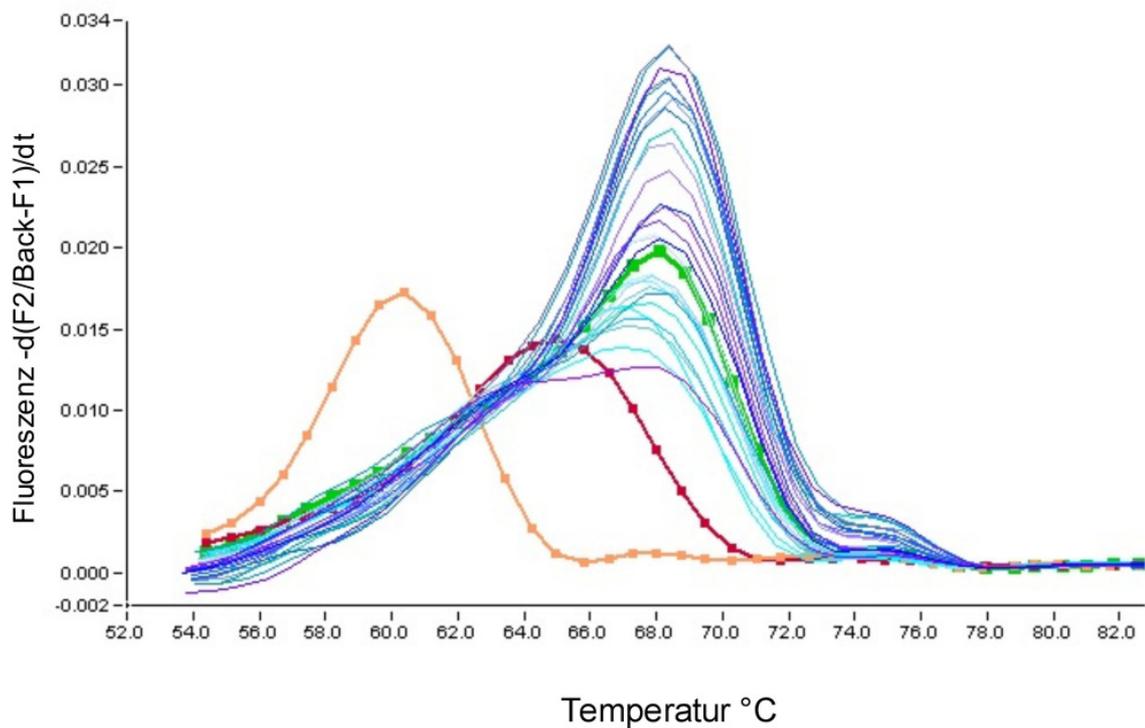


Abbildung 25 Schmelzkurven von 28 phänotypisch sensible Stämmen

Dargestellt sind die mittels der *gyrA* Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System unter Standardbedingungen erstellten Schmelzkurven von 28 phänotypisch chinolonsensiblen Stämmen des SRL Gauting. Alle sensiblen Stämme zeigen keinen *Shift* der T_m gegenüber dem Wildtyp (H37Rv, grüne Linie). Die Mutationen Codon 90 (orange Linie) und Codon 94 (rote Linie) sind deutlich abgrenzbar.

Für die statistische Validierung neuer Testverfahren vergleicht man das neue Verfahren mit dem bisher der vermuteten Wirklichkeit am nächsten kommenden Verfahren, dem Goldstandard. Als diagnostischer Goldstandard für die Bestimmung der Ciprofloxacinresistenz gilt gegenwärtig die Bestimmung der MHK mittels der Resistenzkultur auf Festmedien (Löwenstein-Jensen).

Die analytische Sensitivität bezeichnet die Wahrscheinlichkeit für ein positives Testergebnis bei Analyten mit dem zu untersuchende Charakteristikum (Beaglehole, Bonita et al. 1993). Mittels der *gyrA* Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System konnten 11 der 13 Stämme mit einer MHK $>4 \mu\text{g/ml}$ für Ciprofloxacin identifiziert werden; dies entspricht einer analytischen Sensitivität von 85%.

Die analytische Spezifität entspricht der Wahrscheinlichkeit für ein negatives Testergebnis bei Analyten ohne das zu untersuchende Charakteristikum

(Beaglehole, Bonita et al. 1993). Da alle Stämme mit einer MHK $<4 \mu\text{g/ml}$ für Ciprofloxacin keinen Tm-Shift aufwiesen entspricht dies einer analytischen Spezifität von 100% für dieses Kollektiv (siehe Tabelle 8).

Phänotyp Genotyp	Resistent	Sensibel	Σ	
Resistent	11	0	11	Sensitivität: 0,85 (= 11 / 13)
Sensibel	2	31	33	Spezifität: 1 (= 31 / 31)
Σ	13	31	44	Positiver prädiktiver Wert: 1 (= 11 / 11)
				Negative prädiktiver Wert: 0,94 (= 31 / 33)

Tabelle 8: Validierung der gyrA Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System

Vergleich der genotypischen Bestimmung der Ciprofloxacinresistenz mittels der gyrA Real-time-PCR (Bestätigung durch Sequenzierung) mit dem phänotypischen Goldstandard (absolute Konzentrationsmethode auf Löwenstein-Jensen Festmedien).

3.2.2. Speziespezifität für den *M. tuberculosis* –Komplex

Neben der Spezifität für die Resistenzbestimmung spielt insbesondere beim Direktnachweis aus dem Sputum vor allem die Speziespezifität des Testsystems eine Rolle um auch sicher gehen zu können, dass die Resistenz vermittelnde Mutation tatsächlich dem *Mycobacterium tuberculosis* – Komplex zugeordnet werden kann.

Zum Nachweis der Speziespezifität wurde direkt von den Kulturen präparierte DNA von insgesamt 23 Mykobakterien-Stämmen (siehe Anhang A) der Stammsammlung sowie humane leukozytäre DNA und DNA-Präparationen von Sammelsputen überprüft. Eine Amplifikation konnte mittels der Real-Time PCR nur bei den 7 Mitgliedern des *Mycobacterium tuberculosis* – Komplexes (*M. tuberculosis*, *M. tuberculosis subspecies beijing*, *M. bovis BCG*, *M. bovis*, *M. africanum* 1 und 2 sowie *M. canetti*) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war bei den 16 atypischen Mykobakterienstämmen sowie bei der Probe mit humaner DNA keine Amplifikation zu beobachten. Schmelzpunkte waren dementsprechend nur bei den Stämmen des

TB-Komplexes zu ermitteln und entsprachen für fast alle Mitglieder dem der H37Rv Positivkontrolle (ca. 67,0 °C). Außer den Positivkontrollen für die Mutationen (Stamm Nr.1 und Nr.2) zeigte lediglich der Beijing-Stamm einen *Shift* des T_m nach 64,8 °C (siehe Abbildung 26).

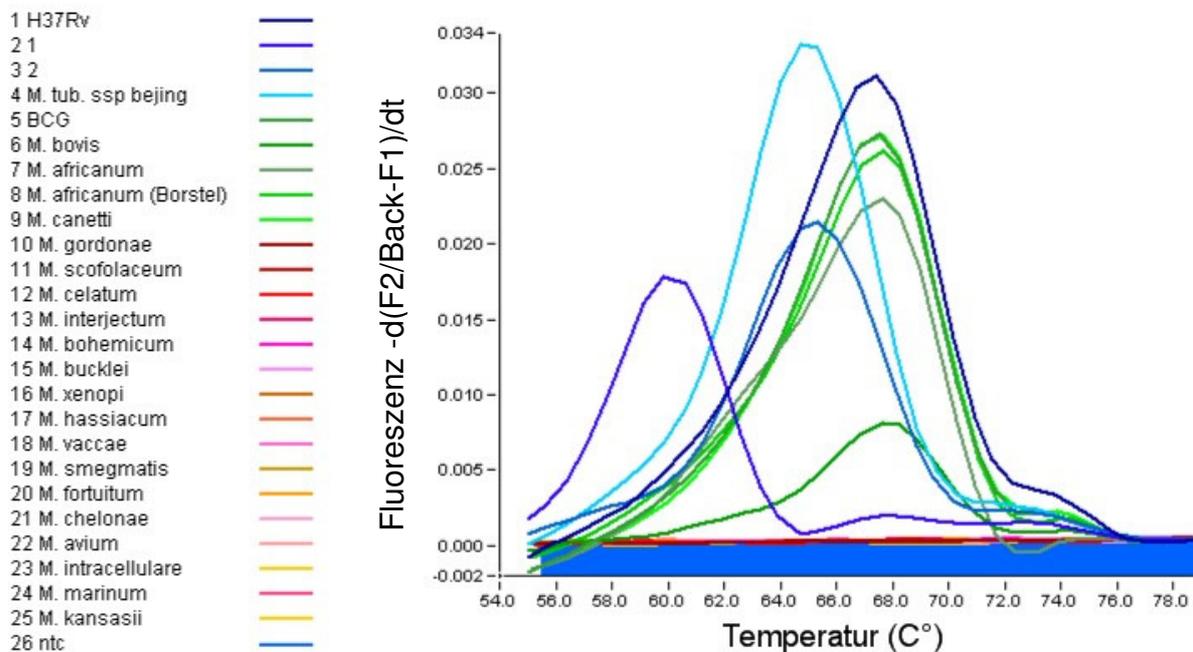


Abbildung 26: Speziesspezifität der gyrA Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System

Dargestellt sind die mittels der gyrA Real-time-PCR unter Standardbedingungen erstellten Schmelzkurven von DNA-Präparationen unterschiedlicher Mykobakterien. Mitglieder des *M.tub.*-Komplexes sind in blauen bis grünen Farbtönen dargestellt und zeigen typische abgeleitete Schmelzkurven, teilweise mit einem *Shift* aufgrund von Mutationen des gyrA-Gens. Atypische Mykobakterien sind in gelben bis roten Farbtönen dargestellt, da sie aber von den Primern nicht amplifiziert werden, zeigen sie auch keine Schmelzkurven und verlaufen mit der Negativkontrolle. Das Testsystem ist also dementsprechend spezifisch für den *Mycobacterium tuberculosis* - Komplex.

Um sicher zu gehen, dass tatsächlich keine Amplifikation stattgefunden hat und das fehlende Signal nicht nur dadurch bedingt ist, dass das Amplifikat von den Sonden nicht detektiert werden konnte, wurden die Proben nach der Real-Time PCR in einem 3% Agarosegel überprüft. Übereinstimmend mit den Real-time-PCR Daten konnte nur bei den sieben überprüften Mitgliedern des *Mycobacterium tuberculosis* – Komplexes die spezifische Bande bei 224 bp nachgewiesen werden. Bei den atypischen Mykobakterien zeigten sich nur unspezifische Banden, besonders prominent bei *M. hassiacum*, *M. marinum* und *M. smegmatis*, sowie diffuser bei den anderen Mitgliedern der photochromogenen und der schnellwachsenden Gruppe

(siehe Abbildung 27). Die Amplifikate der Proben mit DNA-Präparationen von *M. hassiacum* und *M. smegmatis* wurden sequenziert, zeigten aber keine Homologie zur *gyrA*-Sequenz.

Die Analyse von Proben mit humaner leukozytärer DNA mittels der *gyrA* Real-time-PCR zeigte ebenfalls keine Amplifikation, dementsprechend konnten keine Schmelzkurven ermittelt werden. Ebenso konnte bei insgesamt 4 Sammelsputen aus je 8 Patientensputen keine Amplifikation nachgewiesen werden. Auch hier konnte aufgrund der fehlenden spezifischen Banden in der Gelelektrophorese sichergestellt werden, dass dieses Ergebnis auf fehlende Amplifikation und nicht auf mangelnde Hybridisierung der Sonden zurückzuführen ist. (siehe Abbildung 28).

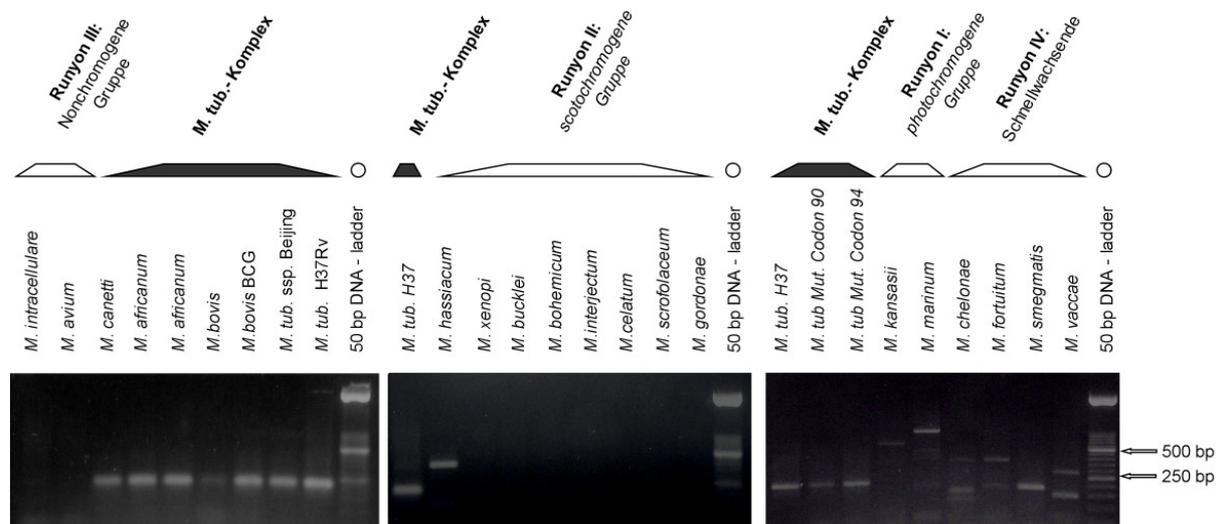


Abbildung 27: Gelelektrophoretischer Nachweis der Spezifität der Primer

Amplifikate der *gyrA* Real-time-PCR wurden anhand der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR Produkte in einem 3% Agarosegel überprüft. Die spezifische Bande des *gyrA*-Amplifikats (228bp) kann nur bei den Mitgliedern des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes nachgewiesen werden. Relevante unspezifische Amplifikate finden sich bei den atypischen Mykobakterien *M. hassiacum*, *M. marinum* und *M. smegmatis*. Diese Amplifikate wurden zur Absicherung sequenziert und zeigten keine Homologien zur Sequenz des *gyrA*-Gens.

Zusammenfassend zeigte sich eine hohe Spezifität des Testverfahrens für den *Mycobacterium tuberculosis* – Komplex. Die Identifizierung konnte unzweideutig auch in Gegenwart jener Komponenten bestimmt werden, die erwartet werden können (Sputum, humane DNA, Mischflora des Rachenraums).

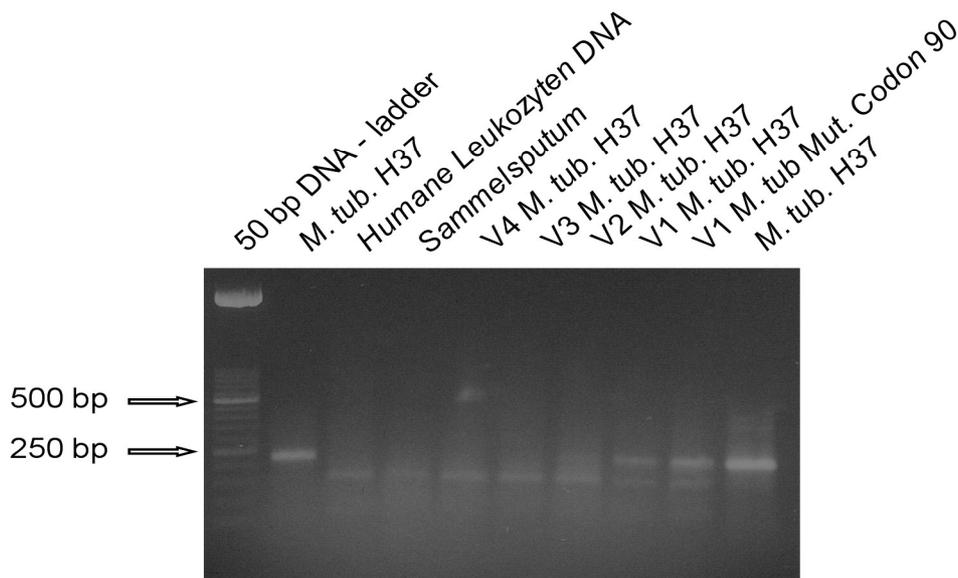


Abbildung 28: Gelelektrophorese der Amplifikate aus Sputumproben bzw. mit hDNA

Gelelektrophoretische Auftrennung von *gyrA* Real-time-PCR-Produkten. Bei den Proben V1 – V4 handelt es sich um Sammelsputen, die mit einer seriellen Verdünnungsreihe von Mykobakterien versetzt wurden. Die spezifische Bande liegt bei 250 bp. Sie zeigt sich bei allen mit größeren Mengen Mykobakterien versehenen Proben. Die Nachweisgrenze liegt bei 10^3 Kolonien (Probe V3) bildenden Einheiten. Aus negativen Sammelsputen oder aus humanen DNA-Präparationen konnten keine Amplifikate nachgewiesen werden. Bei den kleineren Fragmenten handelt es sich um die Sonden und die Primer.

3.2.3. Sensitivität (Nachweisgrenze) und Direktnachweis aus dem Sputum

Die Sensitivität auch eines qualitativen Testverfahrens wird maßgeblich von dessen Nachweisgrenze bestimmt. Bei sämtlichen Präparationen (insgesamt mehreren hundert) von Löwenstein-Jensen-Kulturen der Mykobakterien konnte ausreichend DNA isoliert werden um sie mittels der auf dem LightCycler® System basierenden *gyrA* Real-time-PCR amplifizieren und analysieren zu können. Die Sensitivität ist für den Nachweis von Resistenzen von Primärkulturen ausreichend sensitiv.

Kritischer ist eine hohe Sensitivität für den Direktnachweis aus dem Sputum, da im Gegensatz zum Nachweis von der Primärkultur hier die Existenz von Mykobakterien im Präparat nicht zweifelsfrei belegbar ist. Um die Nachweisgrenze für den Direktnachweis aus dem Sputum bestimmen zu können wurden Sputen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Referenzstamms H37Rv versetzt (Proben V1-V4) und die Schmelzkurven mittels der *gyrA* Real-time-PCR ermittelt. Um die Sensitivität des Testsystems mit den konventionellen Methoden zu vergleichen

wurden dieselben Proben auch mikroskopisch und kulturell untersucht. Der Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* - Komplex gelang mittels der auf dem LightCycler® System basierenden gyrA Real-time-PCR bis zu der Probe V3, entsprechend 10^3 Mykobakterien (siehe Abbildung 29). Das Ergebnis lag innerhalb eines Tages vor.

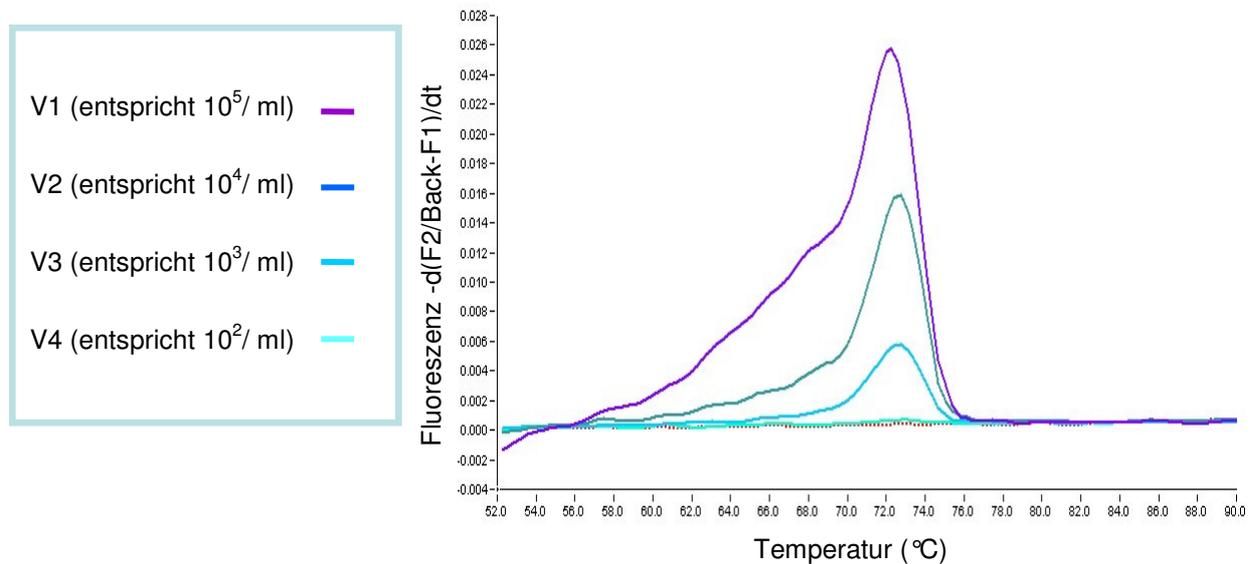


Abbildung 29: Schmelzkurven von mit Mykobakterien versetzten Sammelsputen

Dargestellt sind die mittels der gyrA Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System unter Standardbedingungen erstellten abgeleiteten Schmelzkurven von DNA-Präparationen von Sammelsputen. Diese wurden mit den seriellen 1:10 Verdünnungen einer auf die Trübung McFarland 1 eingestellten Bakteriensuspension versetzt. Schmelzpunkte und damit das Resistenzverhalten und die Spezieszugehörigkeit ließen sich bis zur Probe V3 nachweisen, also für ca. 10^3 Kolonien bildenden Einheiten (KBE)

Sowohl bei der lichtmikroskopischen Untersuchung nach Ziehl-Neelsen Färbung als auch beim fluoreszenzmikroskopischen Verfahren mittels Auraminfärbung konnten säurefeste Stäbchen bis zur Probe V2, entsprechend 10^4 Mykobakterien pro ml, nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich das fluoreszenzmikroskopische Verfahren dem lichtmikroskopischen geringfügig überlegen. Für die mikroskopischen Nachweise wurden mit Anreicherung ca. je 2 Stunden benötigt. Eine Aussage über das Resistenzverhalten und die Vitalität der säurefesten Bakterien ist licht- bzw. fluoreszenzmikroskopisch nicht möglich.

Der Nachweis von Mykobakterien mittels des LJ – Festkultur dauerte im Routinebetrieb 28 Tage. Alle Verdünnungen waren positiv, in der Probe V4 fanden sich 50-100 Kolonien. Bei Vorliegen von Mykobakterien wurde eine Resistenzkultur angelegt,

deren Ergebnis für alle Versuche nach weiteren 27 Tagen, also nach insgesamt 55 Tagen vorlag.

Der Nachweis von Mykobakterien mittels der Flüssigkultur gelang nach 5 (V1) bis 11 (V4) Tagen. Die Resistenzbestimmung mittels Flüssigkultur ist für Chinolone noch nicht abschließend etabliert und wird im SRL Gauting nicht routinemäßig durchgeführt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Sensitivität der auf dem LightCycler® basierenden gyrA Real-time PCR mit einer Nachweißgrenze von ca. 10^3 Kolonien bildenden Einheiten (KBE) etwa eine Größenordnung sensitiver ist als mikroskopische Verfahren und zudem Aussagen über Spezieszugehörigkeit und Resistenzverhalten gegenüber Chinolonen ermöglicht. Kulturelle Verfahren sind zwar noch sensitiver, benötigen aber bis zum Vorliegen eines Ergebnisses erheblich mehr Zeit (siehe Tabelle 9).

Probenname	Entspricht ca. KBE / ml	Licht-mikroskopie	Fluoreszenz-mikroskopie	Festkultur (Löwenstein-Jensen)	Flüssigkultur (MGIT 960)	gyrA LC-PCR
V1	10^5	+/+/ 2 Stunden/ nicht möglich	+/+/ 2 Stunden/ nicht möglich	+++ 28 Tage/ 55 Tage	+++ 5 Tage/ nicht etabliert	+++ 1 Tag/ 1 Tag
V2	10^4	1-3/1-3/1-3 2 Stunden/ nicht möglich	1-3/+/ 2 Stunden/ nicht möglich	+++ 28 Tage/ 55 Tage	+++ 7 Tage/ nicht etabliert	++ 1 Tag/ 1 Tag
V3	10^3	Negativ 2 Stunden/ nicht möglich	Negativ 2 Stunden/ nicht möglich	++ 28 Tage/ 55 Tage	++ 10 Tage/ nicht etabliert	+ 1 Tag/ 1 Tag
V4	10^2	Negativ 2 Stunden/ nicht möglich	Negativ 2 Stunden/ nicht möglich	(+) 28 Tage/ 55 Tage	++ 11 Tage/ nicht etabliert	Negativ 1 Tag/ kein Tm
Negativ-Kontrolle (V0)	0	Negativ 2 Stunden	Negativ 2 Stunden	Negativ	Negativ	Negativ

Tabelle 9: Zusammenfassung der Sensitivität und des Zeitbedarfs unterschiedlicher Methoden zum Nachweis von Mykobakterien und ihren Resistenzen

Bei den Proben V1 – V4 handelt es sich um Sammelsputen, die mit einer seriellen Verdünnungsreihe von Mykobakterien versetzt wurden. Mikroskopische Präparate wurden von 3 unterschiedlichen Untersuchern beurteilt. Die erste Zeitangabe bezieht sich auf die Zeit bis zum Nachweis von Mykobakterien, die zweite Zeitangabe auf die Zeit bis zum Nachweis der Resistenz gegenüber Chinolonen. Die Resistenztestung für Chinolone wird inzwischen häufig durchgeführt, gilt aber als noch nicht abschließend evaluiert.

3.3. Molekulargenetische Charakterisierung chinolonresistenter Stämme

Insgesamt konnten nur zwölf klinische Isolate und ein Referenzstamm in der Stammsammlung (ebenfalls ein klinisches Isolat des Forschungszentrums Borstel) identifiziert und rekultiviert werden, die phänotypische eine hochgradige Chinolonresistenz aufwiesen. Aufgrund dieser geringen Anzahl von unterschiedlichen zur Evaluierung der Real-Time PCR zur Verfügung stehenden Stämmen sollte deren genotypische Unabhängigkeit mittels des IS6110 Fingerprinting nachgewiesen werden.

Die genotypischen Verwandtschaftsbeziehungen der Stämme werden in Abbildung 30 mittels eines mit der GelCompar® Software erstellten Dendrogramms dargestellt. Es findet sich ein Cluster mit identischem RFLP-Muster bestehend aus zwei in Nepal isolierten Stämmen. Über die epidemiologischen Zusammenhänge zwischen den Patienten ist nichts bekannt. Die beiden Stämme codieren allerdings für jeweils unterschiedliche Gyrase-Mutationen (Codon 90 im Stamm Nr. 1 und Codon 94 im Stamm Nr. 2), so dass von einer unabhängigen Entstehung der Mutationen ausgegangen werden kann. Zwei weitere Stämme unterscheiden sich lediglich in einer zusätzlichen Bande (in Stamm Nr. 6 gegenüber Stamm Nr. 3), der Resistenzmechanismus wird aber ebenfalls von zwei unterschiedlichen Gyrase-Mutationen vermittelt. Die Stämme Nr. 31 und Nr. 36 wurden in zeitlichem Abstand aus dem Sputum des gleichen Patienten isoliert, der zwischen den beiden Proben seine Therapie abgebrochen hatte. Das identische RFLP Muster belegt die Resistenzentstehung durch Neumutation bei insuffizienter/unterbrochener Therapie und schließt eine Superinfektion weitestgehend aus. Es finden sich keine weiteren sich genotypisch stark ähnelnde Stämme. Zusammenfassend kann aufgrund des IS6110 Fingerprintings von einer unabhängigen Entstehung der Mutationen ausgegangen werden.

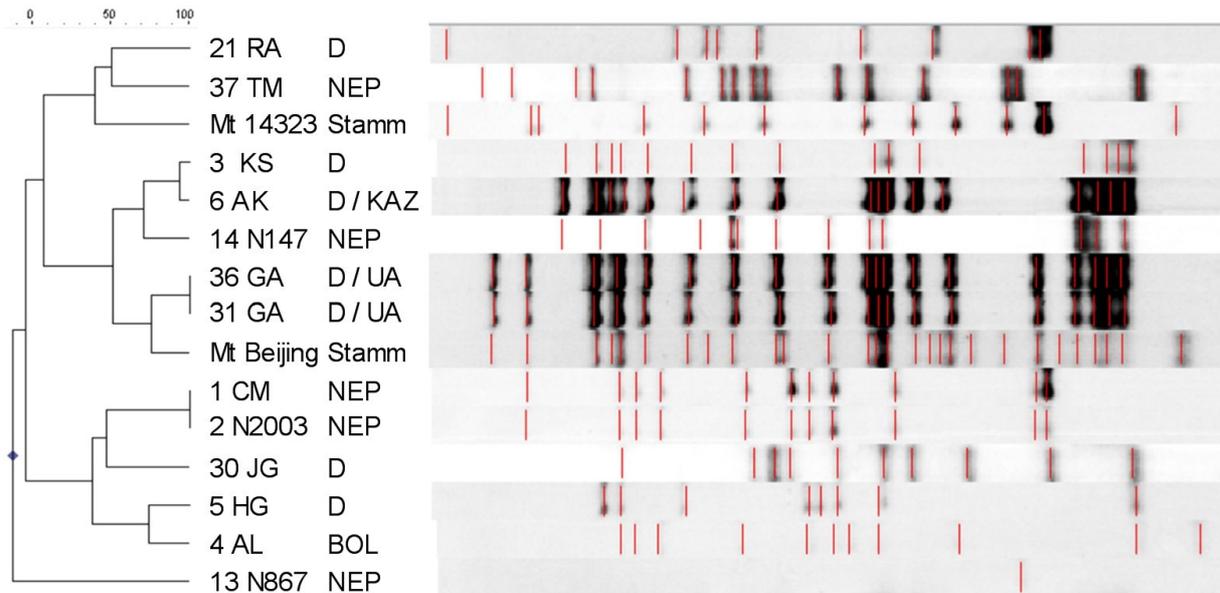


Abbildung 30: Fingerprintingmuster der 13 für Chinolone phänotypisch hochresistenten Stämme des SRL Gautings

Durchführung und Dokumentation der IS6119 RFLP erfolgten analog zu den Vorgaben der Fingerprintingstudie der Europäischen Union. Es findet sich eine Clusterbildung der Stämme Nr.1 und Nr.2, die Stämme Nr. 3 und Nr. 6 unterscheiden sich nur durch eine zusätzliche Bande. Da die Stämme Nr.1 und Nr. 6 jeweils eine Mutation im Codon 90, die Stämme Nr. 2 und Nr. 3 aber im Codon 94 aufweisen, ist von einer unabhängigen Entstehung der Resistenzen auszugehen. Die Stämme 31 und 36 wurden von demselben Patienten isoliert; Stamm 31 ist phänotypisch allerdings chinolonsensibel, Stamm 36 resistent. Die Stämme Nr. 3, Nr. 6, Nr. 14, Nr. 31, Nr. 36 und *Mt. Beijing* konnten durch den Vergleich mit Referenzstämmen als Beijing-Stämme klassifiziert werden.

Die Genotypisierung mittels des IS6110 RFLPs ermöglicht über den Vergleich mit Referenzstämmen auch eine Zuordnung der Stämme zu der Beijing-Familie. Die Stämme Nr. 3 (90,3% Ähnlichkeit mit den Referenzstämmen), Nr. 6 (90,9%), Nr. 14 (89,7%) sowie Nr. 31/Nr. 36 (85,7%) konnten so auch ohne Spoligotyping als Beijing-Stämme identifiziert werden. Erstaunlicherweise zeigte der bekannte Beijing-Referenzstamm mit 76,9% eine nur knapp über dem die Beijing-Stämme definierenden Cutoff von 75% liegende Ähnlichkeit mit den Referenzstämmen.

4. Diskussion

4.1. Etablierung einer Real-Time PCR basierend auf dem LightCycler® System zur Analyse resistenzvermittelnder Mutationen im gyrA Gen: Die gyrA PCR auf dem LightCycler® System

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines neuen molekularbiologischen Testverfahrens zur schnellen Bestimmung bzw. zur schnellen Vorhersage von Chinolonresistenzen bei *Mycobacterium tuberculosis*. Speziesübergreifend wurde als häufigster Mechanismus für diese Resistenzen Mutationen im gyrA-Gen identifiziert (Pidcock 1999).

4.1.1. Optimierung der Testdurchführung

Zur Bestimmung der Gyrase Mutationen wurde als Testverfahren die Mutationsanalyse durch die Schmelzpunktanalyse von Hybridisierungssonden mittels der Real-Time PCR unter Nutzung des LightCycler® Systems der Firma Roche Diagnostics gewählt. Diese Methode ermöglicht im Gegensatz zum in der klinischen Routine nicht praktikablen Goldstandard, der Mutationsanalyse durch Sequenzierung, einen auch für größere Probenzahlen weitgehend automatisierbaren Versuchsablauf bei relativ günstigen Kosten. Durch die simultane Amplifikation der Ziel-DNA und die Detektion der Amplifikate durch fluoreszenzmarkierte Hybridisierungssonden können auch quantitative Aussagen gemacht werden. Aufgrund der sehr inhomogenen Verteilung der Mykobakterien in Sputumproben spielt die Anzahl der in der Probe befindlichen Kopien des Erregers zwar für die klinische Diagnostik der Tuberkulose nur eine geringfügige Rolle. Die quantitative Bestimmung der mykobakteriellen DNA eröffnet allerdings neue Möglichkeiten bei zahlreichen experimentellen Fragestellungen, wie z.B. bei der Analyse der Effektivität verschiedener Anreicherungsverfahren. Entscheidend ist jedoch, dass durch das System von Amplifikation und Detektion in einer verschlossenen Kapillare auch die Möglichkeit von Cross-Kontaminationen und somit falsch positiver Ergebnisse minimiert werden kann. Das LightCycler® Kapillarsystem ermöglicht schnelle Temperaturwechsel und kürzeste Inkubationszeiten im Sinne einer Rapid-Cycle-PCR (Wittwer, Reed et al. 1994). Da Amplifikation und Schmelzpunktanalyse direkt aufeinander in einem Gerät durchgeführt werden, entfällt auch der Zeitaufwand für weitere Arbeitsschritte. Somit liefert das LightCycler® System mit am schnellsten

Ergebnisse. Zudem ermöglicht die Schmelzpunktanalyse mit lediglich zwei Hybridisierungs sonden die Identifikation vieler unterschiedlicher, auch bisher unbekannter Mutationen in dem durch sie abgedeckten Genabschnitt.

Die Etablierung der auf dem LightCycler® System basierenden gyrA Real-time-PCR wurde durch die starke Abhängigkeit des Testverfahrens von den Versuchsbedingungen erheblich erschwert und führte anfangs häufig zu nicht sicher zu reproduzierenden Ergebnissen. Als Ursache für die hierfür meist verantwortlichen Artefakte in den Schmelzkurven können unter anderem unspezifische Hybridisierungen zwischen Primern, Hybridisierungssonden und den Amplifikaten vermutet werden. Um das Auftreten und die Ausprägung der Artefakte zu minimieren wurden zahlreiche Versuchsparameter variiert. Der Einfluss von Probenmaterial, Mg^{2+} -Konzentration, Asymmetrie der PCR-Bedingungen, Konzentration der Primer sowie der Schmelzgeschwindigkeiten und der Probenanzahl wurden im Ergebnisteil demonstriert.

Um das Auftreten von Artefakten auch bei unterschiedlichen Probenmaterialien und kleineren Pipetierungenauigkeiten weitgehend zu vermeiden und so ein robustes Testsystem zu etablieren wurde das Abschmelzverhalten der Sonden optimiert. So wurden für die Testdurchführung asymmetrische PCR-Bedingungen (20%/80%, d.h. forward und reverse Primer im Verhältnisse 1 zu 4) gewählt. Durch die Einführung eines kalkulierten Mismatches in die Sensorsonde konnten die unspezifischen Effekte weiter reduziert und die Teststabilität erhöht werden. So war die im Ergebnisteil beschriebene unspezifische Schulterbildung der Schmelzkurven bei den beiden Mismatchsonden 2579 und 2581 weitgehend verschwunden. Bei gleichem ΔT_m zwischen dem WT und der Mutation Asp94→Gly wurde der Mismatchsonde 2581 für die weiteren Versuche der Vorzug gegeben. Ausschlaggebend hierfür war der größere räumlichen Abstands des Mismatches zu der bekannten, im untersuchten Kollektiv allerdings nicht gefundenen Mutation Ser91→Pro. Durch die Erstellung detaillierter Standardprotokolle soll auch Nutzern mit wenig Erfahrung mit dem LightCycler® System eine reproduzierbare und standardisierbare Testdurchführung ermöglicht werden.

4.1.2. Testauswertung

Besonders die Auswertung der Schmelzkurven setzt eine gewisse Erfahrung voraus, insbesondere bei der Abgrenzung unspezifischer Artefakte und bei der Bestimmung

des T_m 's. Durch die zuvor beschriebenen Veränderungen der Versuchsparameter und der Sensorsonde können diese bei Befolgung des Standardprotokolls weitestgehend vermieden werden. Durch das Standardprotokoll zur Testauswertung können auch Unerfahrene saubere Schmelzkurven erkennen, automatisiert auswerten und dem Wildtyp bzw. den Mutationen Ala90→Val und Asp94→Gly zuordnen.

Durch die Festlegung auf die relativ knapp bemessenen Grenzwerte (eine Abweichung von maximal $0,7^\circ\text{C}$ des T_m 's der Probe vom Mittelwert der für den Genotyp im gleichen Test bestimmten Schmelzpunkte) soll vor allem eine zuverlässige Abgrenzung des Wildtyps von den Mutationen sichergestellt werden. Der keine Resistenz vermittelnde Polymorphismus des Codons 95 sollte von der Sonde ausgespart bleiben, um deren Abschmelzverhalten nicht zu beeinflussen. Daher ließ es sich leider nicht vermeiden, dass die bei Mutationen im Codon 94 auftretenden Mismatches sehr nah am Sondenrand positioniert sind und im Schnitt mit einem ΔT_m von nur $2,2^\circ\text{C}$ einen relativ kleinen T_m -Shift in Bezug auf den T_m des Wildtyps bewirken. Aufgrund der eng gesetzten Grenzwerte ergibt sich so aber immerhin ein Abstand von im Mittel $0,8^\circ\text{C}$ zwischen dem oberen Grenzwert der Mutation Asp94→Gly und dem unteren Grenzwert des Wildtyps.

Während der Etablierung konnte demonstriert werden, dass durch geringfügige Veränderung der Versuchsbedingungen nicht nur das Auftreten von Artefakten, d.h. die Qualität der Schmelzkurven sondern auch der T_m beeinflusst werden kann (siehe Kapitel 3.1.2). Durch die Einführung dynamischer Grenzwerte, d.h. deren Errechnung aus Positivkontrollen des gleichen Versuchs, werden die Auswirkungen dieser Variation so weit wie möglich minimiert.

In den Intra- und Interassayvergleichen konnte eine gute Reproduzierbarkeit der Schmelzpunkte demonstriert werden. Von mehreren hundert Einzelmessungen lag lediglich ein Schmelzpunkt wohl präparationsbedingt knapp außerhalb der im Protokoll festgelegten zugehörigen Grenzwerte (Stamm 5, siehe Kapitel 3.1.4.4.). Eine automatisierte Testauswertung gemäß dem beschriebenen Standardprotokoll hätte auch in diesem Fall dennoch einen vom Wildtyp abweichenden Genotyp ergeben und den Befund *V.a. neue Mutation* errechnet. Im Anhang C wird die automatisierte Auswertung anhand eines Versuchs mit den Stämmen Nr. 1 - 21 sowie Nr. 30, Nr. 36 und Nr. 37 demonstriert.

Die Etablierung konnte nur anhand der im untersuchten Kollektiv gefundenen Mutationen Ala90→Val und Asp94→Gly durchgeführt werden. Allerdings sind bisher 5 weitere Mutationen im gyrA-Gen in klinischen Proben bekannt, die ebenfalls zu einer Chinolonresistenz führen. Bei der Konzeption des Testsystems wurde darauf geachtet, dass die Identifizierung aller dieser bekannten Mutationen theoretisch möglich sein sollte. Die entsprechenden Codons werden ebenfalls von der Sensorsonde abgedeckt. Ein Mismatch mit der Sensorsonde sollte dementsprechend ebenfalls zu einem Tm-Shift gegenüber dem Wildtyp führen. Bei einer analog des Standardprotokolls durchgeführten Testauswertung mittels des Excel-Spreadsheets werden Proben mit Schmelzpunkten, die nicht einem der bisherigen Genotypen zugeordnet werden können, mit *V.a. neue Mutation* befundet und die Sequenzierung empfohlen.

Zur Weiterentwicklung des Testsystems sollten die weiteren bekannten resistenzvermittelnden Mutationen und weitere durch bisher unbekanntes Tm's neu identifizierte Mutationen in die Testauswertung integriert werden. Dabei ist es durchaus denkbar, dass sich die Referenzbereiche der bisherigen Genotypen ganz oder teilweise mit diesen neu zu etablierenden Genotypen überschneiden. Da alle aus klinischen Proben bekannten Mutationen, die in dem durch die Hybridisierungssonden abgedeckten Bereich liegen, eine relevante Chinolonresistenz vermitteln, kann man eventuell auf eine weitere Differenzierung dieser Mutationen untereinander verzichten. Das LightCycler® System ermöglicht allerdings auch die parallele Detektion weiterer Fluochrome (z.B. LCRed705) so dass weitere Sensorsonden konzipiert werden könnten, um zwischen diesen Mutationen durch die Analyse ihrer Schmelzkurven im zweiten Farbkanal zu unterscheiden.

4.2. Gyrase Mutationen in Stämmen des SRL Gauting

Unter den untersuchten Stämmen des supranationalen Referenzlabors für Mykobakterien Gauting konnten mit Hilfe der neu etablierten gyrA Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System 11 Stämme mit Mutationen im gyrA Gen identifiziert werden. Alle diese Stämme zeigten phänotypisch eine Medikamentenresistenz gegen Ciprofloxacin (MHK >4 µg/ml). 6 Stämme (55%) wiesen die Mutation Asp94→Gly auf, 5 Stämme (45%) die Mutation Ala90→Val, zwei davon allerdings zusammen mit dem Wildtyp als Heteroresistenz. Bei beiden Heteroresistenzen war der Anteil des Wildtyps größer als der der Mutation. Zwei der

13 sequenzierten Stämme codierten entsprechend dem Referenzstamm H37Rv im Codon 95 für Serin (AGC), die restlichen Stämme entsprechend dem Referenzstamm CDC1551 für Threonin (ACC). Dieser Polymorphismus ist entwicklungsgeschichtlich relativ alt und daher weit verbreitet (Brosch, Gordon et al. 2002). Es ist bekannt, dass er keine Resistenz vermittelt. Stämme die im Codon 95 für Threonin kodieren finden sich allerdings gehäuft in Clustern, so dass bei Ihnen eine höhere Virulenz vermutet wird (Dolzani, Rosato et al. 2004).

Um diese Ergebnisse besser einordnen zu können wurde eine Übersicht über alle publizierten klinischen Stämme mit Gyrase-Mutationen erstellt (siehe Anhang E). In 11 Publikationen wurden insgesamt 98 klinische Stämme mit 7 unterschiedlichen Mutationen des gyrA-Mutationen Gens veröffentlicht (siehe Tabelle 10). In fast allen Studien wurde auch das gyrB-Gen analysiert, Mutationen wurden aber meist nicht gefunden. Lediglich in einer Studie konnte ein Stamm mit einer gyrB Asp505→Ala Mutation identifiziert werden (Lee, Tang et al. 2002). Mehrfachmutationen in den beiden Gyrasegenen wurden bisher in klinischen Stämmen nicht beschrieben. Durch mehrfache Selektion auf medikamentenhaltigen Nährböden konnten diese aber im Labor induziert werden (gyrA/gyrA und gyrA/gyrB). Sie weisen mit MHKs von ≥ 80 $\mu\text{g/ml}$ die höchste Ciprofloxacinresistenz auf (Kocagoz, Hackbarth et al. 1996).

Asp94→Asn	Asp94→Ala	Asp94→His	Asp94→Gly	Asp94→Tyr	Ala90→Val	Ser91→Pro	Gly88→Cys
8	8	6	29 (6)	10	27 (5)	9	1

Tabelle 10: Verteilung der gyrA-Mutationen in klinischen Stämmen

Auflistung der bis 2005 veröffentlichte 98 klinischen Stämme mit gyrA Mutationen. In Klammern werden die im Rahmen dieser Publikation identifizierten Stämme angegeben. Verkürzte Fassung des Anhangs E.

Alle bisher gefunden Mutationen des gyrA-Gens vermitteln fast immer eine hochgradige Chinolonresistenz (MHK ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$). Die Mutationen Ser91→Pro und Gly88→Cys zeigen allerdings deutlich häufiger als die anderen grenzwertige MHKs (2-4 $\mu\text{g/ml}$).

Die beiden in den untersuchten Stämmen des Labors Gauting gefunden Mutationen repräsentieren die mit Abstand am häufigsten gefundenen Mutationen und finden sich in ca. 60% aller identifizierten klinischen Stämmen mit Gyrasemutationen. Heteroresistenzen wurden bisher für Ciprofloxacin resistente Stämme nicht beschrieben. Fast alle bisherigen Publikationen analysierten die Gyrasemutationen

nur durch Sequenzierung, ein probeninterner Polymorphismus ist hierbei insbesondere bei ungleicher Verteilung häufig nicht zu erkennen.

Ein wesentlicher Vorteil der vorgestellten *gyrA* Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System ist daher auch die Fähigkeit, sogar einen 10%-Anteil eines resistenten Klons in einer vorwiegend aus dem Wildtyp bestehenden Bakterienpopulation zu entdecken (siehe Kapitel 3.1.4.5).

4.3. Genotypischer Nachweis von Chinolonresistenzen mittels der Mutationsanalyse des *gyrA*-Gens

Einer der wichtigsten Mechanismen der Resistenzentstehung beruht auf der genetischen Variation von Bakterien. Unter Exposition von Antibiotika werden Klone selektioniert, die auch in Gegenwart des Medikaments gut überleben können und somit eine Resistenz erlangen. Häufig besitzen diese Klone Mutationen, die die Konformation der Zielproteine der jeweiligen Medikamente derart verändern, dass diese ihre Wirkung verlieren. Zielmolekül der Chinolone ist bei Mykobakterien die von den Genen *gyrA* und *gyrB* kodierte Gyrase. Über die Analyse der Gyrasemutationen durch die *gyrA* Real-time-PCR kann so indirekt eine Information über das zu erwartende Resistenzverhalten des untersuchten Stammes gegenüber Chinolonen gewonnen werden.

4.3.1. Molekularbiologische Charakterisierung von chinolonresistenten und sensiblen Stämmen von *Mycobacterium tuberculosis* des SRL Gauting

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Studie 44 klinische Stämme aus den Jahren 1993-2004 evaluiert. Die Charakteristika der Stämme sind in Anhang A aufgeführt. Bei eingefrorenen Stämmen wurde die nach dem Auftauen bestimmte MHK gewertet. 21 Stämme wiesen eine MHK von <2 µg/ml für Ciprofloxacin bei der phänotypischen Resistenzbestimmung mittels der adaptierten Proportionsmethode auf, 10 weitere Stämme eine grenzwertige MHK von 2 µg/ml. Analog zu der Definition der WHO (kritische Proportion 1% bei 2 mg/ml,(WHO 2001)) wurden diese Stämme als sensibel gewertet. Kein Stamm besaß eine MHK von 4 µg/ml. 13 Stämme wiesen mit einer MHK von > 4 µg/ml eine hochgradige Ciprofloxacinresistenz auf.

Von den 13 als phänotypisch resistent gewerteten Stämmen konnte bei 11 Stämmen mittels der *gyrA* Real-time-PCR eine relevante Gyrasemutation (6 x Asp94→Gly, 5 x Ala90→Val) identifiziert werden, die durch die Sequenzierung bestätigt wurde. Die heteroresistenten Stämme Nr. 13 und Nr. 37 wurden dabei mit eingeschlossen, da

davon ausgegangen werden kann, dass sowohl klinisch unter einer Antibiotikatherapie als auch bei der phänotypischen Resistenztestung der resistente Klon herausselektioniert würde. Die Sensitivität der molekularbiologischen Resistenztestung mittels der Analyse von Mutationen des *gyrA*-Gens liegt dementsprechend in diesem Kollektiv bei 85%. In sämtlichen als sensibel gewerteten Stämmen konnten keine Mutationen nachgewiesen werden, die Spezifität beträgt in dieser Studie dementsprechend 100%.

Die untersuchten Stämme stellen einen repräsentativen Querschnitt durch die Stammsammlung des supranationalen Referenzlabors für Mykobakterien Gauting dar und umfassen Stämme aus Deutschland, Nepal und Bolivien. Hochgradige Chinolonresistenzen sind in diesem Kollektiv glücklicher Weise noch selten und wurden trotz mehrerer hundert analysierter Stämme phänotypisch nur bei den beschriebenen 13 Stämmen beobachtet. Damit standen relativ wenige Stämme zur Evaluierung zur Verfügung.

Durch die molekularepidemiologische Untersuchung der resistenten Stämme durch das IS6110 Fingerprinting sollte zumindest sichergestellt werden, dass sich diese Resistenzen unabhängig von einander entwickelt haben. Eine genetische Verwandtschaft der Stämme hätte die Aussagekraft des kleinen Kollektivs weiter eingeschränkt. Innerhalb der 13 Stämme wiesen 2 Stämme (Nr. 1 und Nr. 2) aus Nepal ein identisches IS6110 RFLP-Muster auf. Zwei weitere in Deutschland isolierte Stämme (Nr. 3 und Nr.6) unterschieden sich durch lediglich eine zusätzliche Bande. In beiden Paaren wiesen die jeweiligen Partner allerdings unterschiedliche Mutationen auf, daher kann von einer unabhängigen Entstehung der Resistenzen ausgegangen werden.

Vier Stämme konnten auf Grund des Vergleichs mit Referenzstämmen dem Beijing-Stamm zugeordnet werden. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 30% und liegt somit in dem für ein derartig vorselektioniertes Kollektiv von multiresistenten Stämmen im Rahmen der Erwartung.

Die beiden phänotypisch resistenten Stämme ohne *gyrA* Mutation zeigten keine gemeinsamen Charakteristika. Stamm Nr. 30 fiel phänotypisch durch ein besonders feines, wenn auch dichtes Wachstum auf. Zudem wies er mit einer MHK von $>2 \mu\text{g/ml}$ auch eine ausgeprägte Resistenz gegen Moxifloxacin auf. Aufgrund des IS6110-RFLPs konnte der Stamm der Beijing-Familie zugeordnet werden. Es ist der älteste Stamm des Kollektivs und war somit auch am längsten (10 Jahre) bei -20°C

eingefroren. Stamm Nr. 14 zeigte andererseits ein unauffälliges Wachstum, wies mit einer MHK von 0,5 µg/ml nur eine Niedrigresistenz gegen Moxifloxacin auf und war nur 2 Jahre eingefroren. Interessanterweise fand sich nur bei einem weiteren Stamm mit einer $MHK_{Cipro} > 4$ µg/ml eine so niedrige MHK für Moxifloxacin (Stamm Nr. 13). Zudem lag bei diesem Stamm eine Heteroresistenz vor.

Über die Ursachen der Resistenzentstehung bei diesen beiden Stämmen kann nur spekuliert werden. Das auffällige phänotypische Wachstum des Stammes Nr. 30 könnte als Hinweis auf eine morphologische Adaptation auf die Antibiotikaexposition interpretiert werden. Als Mechanismus der Resistenzentstehung sind in diesem Fall z.B. Veränderungen des Zellwandaufbaus oder wenig selektive Effluxpumpen denkbar. Stamm 14 gehört der Beijing-Familie an, für die das überproportionale Vorkommen von Resistenzen beschrieben ist (Drobniewski, Balabanova et al. 2002). Auffällig ist die Diskrepanz zwischen der hohen MHK für Ciprofloxacin und der relativ niedrigen MHK für Moxifloxacin.

4.3.2. Zusammenfassung veröffentlichter Studien zu Gyrase Mutationen in chinolonresistenten und chinolonsensiblen Stämmen

In zahlreichen Reviews und Publikationen wird der Wert molekularbiologischer Methoden für die Resistenzbestimmung diskutiert. Über die entscheidende Frage, in wie vielen phänotypisch resistenten Stämmen Gyrase Mutationen hierfür verantwortlich gemacht werden können, finden sich häufig widersprüchliche Angaben. So wurden in einer Studie aus Hongkong (Williams, Chan et al. 1996) in allen untersuchten resistenten Stämmen *gyrA*-Mutationen gefunden, wohingegen in einer Studie aus Singapur in keinem der untersuchten Stämme eine *gyrA*-Mutation identifiziert werden konnte (Lee, Tang et al. 2002). Mehrere Reviews (Ramaswamy and Musser 1998; Ginsburg, Grosset et al. 2003) fassen zusammen, dass *gyrA*-Mutationen in ca. 42% – 85% der resistenten Stämme gefunden werden können. Die Angabe einer so großen Bandbreite kann durchaus dahingehend interpretiert werden, dass es Schwierigkeiten bereitet, die diskrepanten Daten einzuordnen und sich auf den Wert molekularbiologischer Methoden für die Resistenzbestimmung von Chinolonen festzulegen.

Um zu einer genaueren Einschätzung der Aussagekraft von Gyrase Mutationen für die Vorhersage des phänotypischen Resistenzverhaltens zu kommen, wurde die Studienlage anhand der Primärliteratur unter besonderer Berücksichtigung der

verwendeten Grenzwerte und Techniken analysiert. Hierzu dienten die in den Reviews von Ramaswamy und Musser (1998), Piddock (1999), Jacobs (1999) Bryskier und Lowther (2002), Victor et al. (2002), Ginsburg et al. (2003), Jakobs (2004) und Wade et. al (2004) zitierte Primärliteratur. Zudem wurde die PubMed-Datenbank nach den Stichworten „*resistance*“, „*tuberculosis*“ und „*gyrA*“ durchsucht. In die vorliegende Statistik wurden alle bis Oktober 2005 in englischer Sprache erschienenen Primärliteraturquellen mit Angaben zu klinischen Isolaten aufgenommen und um die Ergebnisse dieser Arbeit ergänzt (siehe Tabelle 11 und Anhang D).

Publikation	n	Resistente Stämme mit MHK $\mu\text{g/ml}$						Sensible St.		Med.		
		2	%	4	%	>4	%	alle	%		<2	%
Takiff et al. 1994	59	1	0	2	100	12	100	15	93	40	100	C
Cambau et al. 1994 (2)	1					1	100	1	100	1	100	O
Alangaden et al. 1995	5					2	100	2	100	k.A.	k.A.	C
Sullivan et al. 1995	16	?		?		?		16	75	k.A.	k.A.	k.A.
Williams et al. 1996	8	1	100	4	100	3	100	8	100	k.A.	k.A.	O
Xu et al. 1996	>600	ID ₅₀ Messungen						13	85	>600	100	C
Perlman et al. 1997	1			1	100			1	100	k.A.	k.A.	L
Sougakoff et al. 1997	2	?		?		?		2	100	k.A.	k.A.	k.A.
Harris et al. 2000	4	?		?		?		2	0	2	100	C
Siddiqi et al. 2002	71	?		?		?		68	9	3	100	C
Lee et al. 2002	48			48+	0			48	0			O
Yew et al. 2002	139	26	0	32+	100			58	55	81	100	O
Johansen et al. 2003	20					2	100	2	100	18	100	C
Cheng et al. 2004	138	20	5	9	66	26	96	55	58	83	100	O
Post et al. 2004	13	5 ⁺	100					5	100	8	87	O
Giannoni et al. 2005	30	1	0	14	100	5	60	20	85	10	100	C
Diese Publikation	44	10	0	0	n/a	13	85	13	48	21	100	C
Gesamt (MHK \geq des in der Spalte angegebenen Wertes)	>1200	329	48	174	68 (94)*	64	92	329	48	>870	99	

Tabelle 11: GyrA Mutationen in klinischen Isolaten von *Mycobacterium tuberculosis*

Gekürzte Zusammenfassung des Anhangs D. C = Ciprofloxacin, O = Ofloxacin, L = Levofloxacin, k.A. keine Angaben. Angegeben ist jeweils die Gesamtzahl der phänotypisch resistent getesteten Stämme mit der angegebenen MHK sowie der prozentuale Anteil der Stämme mit nachgewiesener *gyrA* Mutation. *Bei der Studie von Lee et al. (2002) kann ein systematischer Fehler vermutet werden (siehe Text). Unter Ausschluss dieser Studie finden sich in 94 % der Stämme mit einer MHK von 4 $\mu\text{g/ml}$ *gyrA* Mutationen. ⁺Diskriminative Testung bei MHK 2 $\mu\text{g/ml}$. Die resistent gewerteten Stämme werden dabei nicht inhibiert, besitzen also eine MHK von > 2 $\mu\text{g/ml}$.

In den aufgelisteten 17 Studien wurden insgesamt mehr als 1200 klinische Isolate von *Mycobacterium tuberculosis* auf Gyrasemutationen getestet. Die Bestimmung der phänotypischen Resistenz erfolgte meist mittels der adaptierten Proportionsmethode auf Löwenstein-Jensen-Festmedien, durch die Bestimmung der MHK (Johansen, Larsen et al. 2003) bzw. der ID₅₀ in Flüssigkulturmedien (Xu, Kreiswirth et al. 1996). Eine Publikation verwendete den von AB-Biodisk (Solna, Schweden) vertriebenen ETest, eine Abwandlung des Disc Effusion Assays. Die Chinolonresistenz wurde zudem mit unterschiedlichen Medikamenten getestet. Acht Studien testeten mit Ciprofloxacin, sechs mit Ofloxacin und eine mit Levofloxacin. Bei zwei als Briefe/Kurzberichte veröffentlichten Studien wurde das zur phänotypischen Testung verwendete Medikament nicht erwähnt. Die Bestimmung erfolgte bei den unterschiedlichen Studien nicht bei einheitlichen Konzentrationen. Gelegentlich wurde die Resistenz bei nur einer diskriminativen Konzentration ermittelt, häufig erfolgte die Bestimmung der MHK aber bei mehreren Konzentrationen. Der Grenzwert für die Zuordnung zu einem resistenten bzw. sensiblen Phänotyp erfolgte teils bei unterschiedlichen MHKs. So bewerteten mehrere Studien Stämme mit einer MHK von 2 µg/ml oder höher als resistent, andere setzen diesen Cutoff bei >2 µg/ml, ≥3 µg/ml oder ≥4 µg/ml. Es darf vermutet werden, dass die unterschiedliche Methodik und insbesondere auch die uneinheitliche Grenzwertsetzung der phänotypischen Resistenztestung erheblichen Einfluss auf die hohe Varianz der Ergebnisse dieser Studien bei der Bestimmung des prädiktiven Wertes von Gyrasemutationen hat.

Für den vorliegenden Gesamtüberblick wurden primär alle identifizierten Studien eingeschlossen. Es wird angenommen, dass sich die Resistenzprofile aufgrund der unterschiedlichen verwendeten Medikamente nicht wesentlich unterscheiden. Eine Verfälschung der Statistik durch den Einschluss ein und desselben Stammes in zwei oder mehr der analysierten Studien wird nicht erwartet, da nur klinische Isolate und keine Referenzstämme in die Aufzählung eingeschlossen wurden. Die Stämme wurden für die Auflistung zur Vereinheitlichung bestmöglich den MHKs 2 µg/ml (für die veröffentlichten MHKs 2 µg/ml, >2 µg/ml und 3 µg/ml) 4 µg/ml und >4 µg/ml zugeordnet. Insgesamt konnten so 329 Stämme identifiziert werden, die mit einer MHK von ≥ 2 µg/ml zumindest eine grenzwertige Resistenz gegen Chinolone aufwiesen.

Gyrasemutationen wurden meist durch Sequenzierung bestimmt. Zum Screening dienten auch die SSCP-PCR, line-probe-Assays und die auf dem LightCycler® System basierende Real-time-PCR. Identifizierte Mutationen wurden dabei durch die Sequenzierung bestätigt. Mutationen im *gyrB*-Gen wurden nur bei etwa der Hälfte der aufgelisteten Isolate untersucht.

Unter den 329 Stämmen mit einer MHK $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ konnten bei 159 Stämmen eine Mutation im *gyrA* Gen gefunden werden, dies entspricht 48% der Stichprobe. Deletionen, Insertionen oder Mehrfachmutationen wurden nicht gefunden. In einem Stamm wurde eine isolierte *gyrB* Mutation identifiziert. Unter den 174 Stämmen die eine MHK von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ konnten bei 119 Stämme (68%) *gyrA*-Mutationen nachgewiesen werden. Fast alle Studien finden allerdings unter diesen höhergradigen Resistenzen in deutlich mehr als 80% der Fälle Mutationen. Die einzige Ausnahme hierzu stellt die Studie von Lee et al. (2002) aus Singapur dar, die unter 48 Stämmen mit einer MHK von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ keine einzige *gyrA*-Mutation entdeckte. Hierzu ist anzumerken, dass die Studie den MHK mittels des ETests von AB Biodisk (Solna, Schweden) bestimmte. Dieses Testverfahren wurde zwar in einer Studie für die Bestimmung mykobakterieller Resistenzen positiv evaluiert (Joloba, Bajaksouzian et al. 2000), es wird allerdings vom deutschen Vertreter nicht für die Anwendung zur Resistenzbestimmung von *Mycobacterium tuberculosis* empfohlen. Grund hierfür ist die zeitliche Instabilität des vom Streifen in das Festmedium difundierenden Medikaments. Aufgrund der langsamen Wachstumsgeschwindigkeit von TB-Bakterien werden dadurch mit üblichen Inokuli häufig deutlich zu hohe MHKs bestimmt. Schließt man aufgrund dieses möglichen Bias die Studie von Lee et al. (2002) aus, so errechnet sich für die verbliebenen 126 hochresistenten Stämme mit einer MHK von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ eine 94% Konkordanz zwischen phänotypischer Resistenz und *gyrA*-Mutationen (118 Isolate).

Schwierig einzuordnen sind auch die Ergebnisse der Studie von Siddiqi et al. (2002). Die Autoren verwendeten für die Resistenzbestimmung die Proportionsmethode auf Festmedien. Die MHK bei der das Vorliegen einer Resistenz angenommen wurde, wurde mit $\approx 2 \mu\text{g/ml}$ für Ciprofloxacin angegeben; niedrigere Konzentrationen sind anscheinend auch getestet worden. Es finden sich keine Angaben darüber, welche Medikamentenkonzentrationen getestet wurden und welche MHK die 6 Isolate mit Gyrasemutationen aufwiesen. Im Gegensatz dazu verwenden Post et al. (2004) als einzige der analysierten Studien die von der WHO empfohlenen diskriminative

Testung bei einer Medikamentenkonzentration von 2 µg/ml; resistente Stämme zeigen dabei Wachstum, besitzen also eine MHK >2mg/ml.

Bei den 58 Stämmen, denen anhand der Angaben der Quellen eindeutig die MHK = 2 µg/ml zugeordnet werden konnten, also auch niedrigere Konzentrationen getestet wurden, konnte nur bei 2 Stämmen, entsprechend 3,5% eine *gyrA*-Mutation nachgewiesen werden.

Unter den mehr als 870 als sensibel gewerteten und auf Gyrase Mutationen analysierten Stämmen konnte lediglich ein Stamm identifiziert werden, der eine relevante *gyrA*-Mutation (Ala90→Val) aufwies (Post, Willcox et al. 2004). Mehrere Studien analysierten auch den Polymorphismus des Codons 95 (AGC→ACC), es konnte aber erwartungsgemäß keine Korrelation mit dem Resistenzmuster gefunden werden. Wie schon mehrfach erwähnt, gilt es als weitgehend gesichert, dass dieser keine Resistenz vermittelt.

4.3.3. Kritische Evaluation der phänotypischen und der genotypischen Resistenzbestimmung gegenüber Chinolonen bei Mycobacterium tuberculosis

Phänotypische Methoden gelten bei der Resistenzbestimmung als Goldstandard. Sie bieten den Vorteil, dass die zu testende Bakterienpopulation direkt dem wirkenden Agens ausgesetzt wird und somit auch ihr Verhalten unter bestimmten Medikamentenkonzentrationen direkt beobachtet werden kann. Genotypische Methoden untersuchen die Ursachen für dieses Resistenzverhalten. Da die Vermittlung von Resistenz multikausal bedingt sein kann, bergen sie das Risiko, dass die Resistenz auch von nicht untersuchten oder gar nicht bekannten Genen vermittelt wird. Zudem sind auch nicht genetisch determinierte Ursachen für eine Resistenzentstehung denkbar. Im Gegensatz zu phänotypischen Methoden setzen sich genotypische Methoden daher dem Verdacht aus, aus theoretischen Gründen nicht alle Resistenzen identifizieren zu können. Um diese Bedenken zu entkräften, wird häufig eine hohe statistische Konkordanz zwischen der neuen Methode mittels Genotypisierung und dem Goldstandard phänotypische Resistenztestung gefordert.

4.3.3.1. Genotypische Hinweise zur phänotypischen Grenzwertbestimmung

Im vorangegangenen Kapitel konnte dargestellt werden, dass diese Konkordanz in Abhängigkeit von der Methodik und insbesondere in starker Abhängigkeit von der Grenzwertsetzung steht. Der große Interpretationsspielraum bei der Zuordnung

resistent oder sensibel ist vor allem dadurch bedingt, dass für die Chinolone im Gegensatz zu fast allen anderen Tuberkulostatika keine kritischen Proportionen analog zu den Versuchen von Canetti et al. (1969) ermittelt werden konnten, da wie in der Einführung erläutert Monotherapien ethisch nicht mehr vertretbar sind. Die Bestimmung des Grenzwertes erfolgte daher primär nicht im Vergleich mit anderen Isolaten mit klinisch bestätigter Resistenz, sondern im Sinne Mitchinsons (Mitchison 2005) in Abgrenzung zu Wildtyppopulationen, die nie Kontakt zu Chinolonen hatten. Auf die große Varianz in den publizierten MHKs der Wildtypen von 0,6 µg/ml bis 4,3 µg/ml wurde ebenfalls in der Einleitung schon hingewiesen. Ein Konsens über die zu testende diskriminative(n) Konzentration(en) wurde anfänglich nicht erzielt und erst durch die Veröffentlichung der Richtlinien zur Resistenzbestimmung von Reservemedikamenten (WHO 2001) angestrebt. Allerdings wird auch in dieser Publikation die Frage der Grenzwertsetzung zur Diskussion gestellt und weitere Forschung diesbezüglich angeregt.

In dieser Situation kann die molekularbiologische Charakterisierung resistenter Stämme wertvolle Informationen zur Evaluierung der phänotypischen Grenzwerte liefern, gerade da sie die beobachtete Resistenz kausal erklären kann. So konnte proteinchemisch anhand von DNA-supercoiling Assays mit rekombinanter Gyrase nachgewiesen werden, dass bei Vorliegen einer Mutation Ala90→Val eine mehr als 40-fach höhere Ciprofloxacin-Dosis nötig ist, um die Gyraseaktivität um 50% zu inhibieren. Um sicherzustellen, dass dieser Effekt ausschließlich der Gyrase-Mutation zuzuordnen ist wurden die Gyrasegene des H37Rv in einen Expressionsvektor inseriert und in *E.coli* transformiert. Die Mutation wurde gezielt durch *In Vitro* Mutagenese induziert, und das von *E.coli* exprimierte Enzym schließlich gereinigt und analysiert (Onodera, Tanaka et al. 2001). Somit kann die hohe Spezifität und der hohe positive prädiktive Wert der relevanten Gyrase-Mutationen für die phänotypische Resistenz auch theoretisch gut nachvollzogen werden.

Bezug nehmend auf die kritische Auswertung publizierter klinischer Isolate (siehe Kapitel 4.3.2) konnten in Stämmen mit einer MHK < 2 µg/ml nur in weniger als 1% und in Stämmen mit einer MHK von = 2 µg/ml in ca. 3,5% der Isolate relevante gyrA-Mutationen entdeckt werden, wohingegen bei Stämmen mit einer MHK von ≥ 4 µg/ml in deutlich über 90% der Fälle Mutationen identifiziert werden konnten. Dementsprechend scheint aus genotypischer Sichtweise der Grenzbereich für Resistenz zwischen > 2 µg/ml und <4 µg/ml zu liegen. Da der Übergang fließend

verläuft ist die Festlegung einer diskriminativen Konzentration schwierig. Ihr zugrunde liegt letztlich die Abwägung, ob man mehr falsch positive oder mehr falsch negative Ergebnisse bereit ist zu akzeptieren. Die von der WHO gewählte diskriminative Resistenztestung bei einer Medikamentenkonzentration von 2 µg/ml erscheint bei der derzeitigen Datenlage sinnvoll, da die so als resistent identifizierten Stämme zu über 90% relevante Mutationen aufweisen, wohingegen diese bei weniger als 1% der sensiblen zu finden sind. Es sein nochmals darauf hingewiesen, dass bei dieser Definition resistente Stämme eine MHK von **> 2 µg/ml** besitzen!

Bei der Festsetzung des Grenzwertes spielen natürlich neben diesen genotypischen Erwägungen auch die in den Zielzellen *in vivo* erreichbaren Medikamentenkonzentrationen eine Rolle. Bei der Therapie der Tuberkulose mit Ciprofloxacin wird eine Dosierung von 2 x täglich 750 mg p.o. empfohlen. Bei einer Dosis von 2 x 500 mg p.o. konnten Serumspiegel von 1 - 9,2 µg/ml und Gewebespiegel von 1,5 – 17 µg/ml erreicht werden (Honeybourne, Wise et al. 1987). Dabei reichern sich Chinolone vor allem in Alveolarmakrophagen an und erreichen die höchsten Konzentrationen. Es ist daher wahrscheinlich, dass Mykobakterien während der Therapie meist Ciprofloxacinkonzentrationen von mehr als 4 µg/ml ausgesetzt werden. Den Grenzwert für Resistenz bei einer MHK von >2 µg/ml zu setzen ist somit auch klinisch plausibel.

4.3.3.2. Modelle der Resistenzentstehung

Auch bei dieser Grenzwertsetzung werden bei einigen Stämmen keine Mutationen des *gyrA*-Gens gefunden. Prinzipiell kommen hierfür Veränderungen an der Konformation und der Konzentration der Zielmoleküle oder des Medikamentes in Frage, die genetisch aber auch regulativ bedingt sein können.

Als genetisch die Konformation des Zielmoleküls beeinflussende Mutationen werden bei hochresistenten Stämmen ohne *gyrA*-Mutationen häufig Mutationen des zweiten die Gyrase kodierenden Gens *gyrB* vermutet. Bei mehreren hundert bisher analysierten Stämme mit Chinolonresistenzen konnte allerdings erst ein einziges Isolat mit einer Mutation Asp505→Ala identifiziert werden (Lee, Tang et al. 2002). In laborselektierten Isolaten wurden mehrere *gyrB* Mutationen identifiziert. In einer Studie wurden sie nur in Kombination mit *gyrA*-Mutationen beobachtet und potenzierten dabei deren Effekt auf die Resistenz (Kocagoz, Hackbarth et al. 1996). In einer zweiten Studie konnten unter niedrigen Ciprofloxacinkonzentrationen

Einfachmutationen des *gyrB*-Gens selektiert werden (Zhou, Dong et al. 2000). Analysiert wird bei beiden Genen normalerweise nur die QRDR. Mutationen außerhalb dieses Bereiches sind prinzipiell denkbar, wenn auch offensichtlich selten. Häufig wird auch auf Mutationen der die Topoisomerase IV kodierenden Gene (*parC* und *parE* bei *E. coli*) verwiesen. Eine Analyse des inzwischen voll sequenzierten Genoms des *Mycobacterium tuberculosis* macht die Existenz dieser Gene, bzw. des Enzyms für TB unwahrscheinlich. Weitere Targets der Chinolone wurden bisher auch in anderen Spezies bisher nicht identifiziert, ihre Existenz ist aber möglich.

Als regulativer Resistenzmechanismus insbesondere für Niedrigresistenzen ist eine vermehrte Expression der Gyrase denkbar. Hierzu liegen aber bisher keine Studien vor.

Regulative Mechanismen könnten auch durch eine Beeinflussung der Konzentration eines aktiven Medikaments Resistenz vermitteln. Denkbar ist eine verminderte Aufnahme durch Veränderung der Zusammensetzung der Zellwand und ihrer Transportproteine, eine Modifikation oder der Abbau des Medikamentes, dessen kompetitive Inhibition oder dessen aktive Ausschleusung. In diesem Zusammenhang wird bei resistenten Isolaten ohne Gyrasemutationen häufig auf aktive Effluxpumpen verwiesen. 1996 wurde von Takiff et al. für *Mycobacterium smegmatis* mit dem *lfrA*-Gen (low-fluochinolone-resistanceA) das erste für eine solche Pumpe kodierende Gen in Mykobakterien beschrieben. Inzwischen wurden weitere Pumpen auch für *Mycobacterium tuberculosis* beschrieben (Viveiros, Leandro et al. 2003). In einer Studie konnte die vermehrte Expression eines dieser Gene (*tap*, Rv1258c) auch in einem klinischen Isolat mit nachgewiesener Resistenz beobachtet werden (Siddiqi, Das et al. 2004). Interessant ist auch die Entdeckung des Proteins *mfpA* (Montero, Mateu et al. 2001), dass eine DNA-ähnliche Form aufweist und an das die bakterielle Gyrase binden kann. Es ist wohl zumindest teilweise für die relative Chinolonunempfindlichkeit des *Mycobacterium smegmatis* verantwortlich. Chinolone können nur gebundene Gyrasemoleküle inhibieren. Da aber anscheinend auch der Komplex aus Gyrase und *mfpA*-Molekül Chinolone binden kann, ist eine kompetitive Inhibition der Chinolonaktivität als Resistenzmechanismus denkbar.

Bei den genannten Beispielen scheint die Resistenzentstehung durch vermehrte Expression der entsprechenden Gene vermittelt zu werden, es ist aber auch denkbar, dass durch genetische Variation der jeweils codierenden Gene deren Wirkung noch potenziert werden kann.

Die schrittweise Entstehung von Chinolonresistenzen ist für mehrere Bakterienspezies beschrieben. Für *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* konnten als Ursache hierfür sequenzielle Mutationen beschrieben werden. Dabei kommt es im Allgemeinen zuerst zu einer Mutation im gyrA-Gen und in der Folge zu einer zweiten Mutation im parC-Gen (Bearden and Danziger 2001). parC wird von *Mycobacterium tuberculosis* nicht codiert, die Mehrfachmutationen gyrA/gyrA und gyrA/gyrB sind wie in Kapitel 4.3.2 erwähnt bisher nur in laborinduzierten Isolaten identifiziert worden. Mehrfachmutationen führen aber auch beim Tuberkuloseerreger zu einer mindestens zehnfachen Erhöhung der MHK.

Aufgrund der vorliegenden Daten erscheint für die Resistenzentstehung des *Mycobacterium tuberculosis* folgendes Modell denkbar. Die zuvor beschriebenen regulativen Mechanismen scheinen in der Lage zu sein, den Tuberkuloseerregern eine gewisse Zeit unter Antibiotikaexposition ein Überleben zu ermöglichen, indem sie meist eine Niedrigresistenz vermitteln. Genetisch fixierte Resistenzen gegenüber Chinolonen treten zufällig mit einer Frequenz von 1 pro 10^6 auf (Bryskier and Lowther 2002). In der erweiterten Zeitspanne können so zuvor vorhandene oder zufällig neu entstandene Klone mit relevanten Mutationen eine kritische Masse erreichen. Unter fortdauernder Medikamentenexposition führt die Selektion dieser Klone zu einer resistenten Population. Der hohe Prozentsatz von Gyrase Mutationen in klinischen Isolaten mit höhergradigen Resistenzen impliziert, dass diese für ein dauerhaftes Überleben unter diesen Antibiotikakonzentrationen nötig sind. Dass bisher klinisch bei Tuberkuloseerregern keine Mehrfachmutationen identifiziert werden konnten spricht dafür, dass diese bei den im Zielgewebe erreichbaren Konzentrationen für eine ausreichende Resistenz gegenüber den bisher im klinischen Gebrauch üblichen Chinolonen (Ciprofloxacin, Ofloxacin, Levofloxacin) nicht nötig sind. Dies gilt aufgrund ihrer größeren antimykobakteriellen Aktivität vermutlich nicht mehr für die Chinolone der neusten Generation wie Moxifloxacin (Sindelar, Zhao et al. 2000). Es wird vermutet, dass für eine ausreichende klinische Resistenz eine zweite Mutation nötig ist. Doppelmutationen sind statistisch bei einer Frequenz von 1 zu 10^{12} unwahrscheinlich. Wird allerdings bei Therapieversagen von Ciprofloxacin auf Moxifloxacin umgestellt, ist es durchaus wahrscheinlich, dass aus der durch die Ciprofloxacinbehandlung entstandenen Bakterienpopulation mit einer GyrA-Mutation Klone mit einer Mehrfachmutation herausselektioniert werden. Da *Mycobacterium*

tuberculosis wohl keine Topoisomerase IV besitzt, sind dann wie in den laborselektierten Stämmen *gyrA/gyrA* oder *gyrA/gyrB* Mehrfachmutationen zu erwarten.

Die Vorstellung von der Entstehung von hochgradigen Resistenzen durch sequenzielle Mutationen fließt ein in das Konzept der MPC, der „*Mutant Prevention Concentration*“, also jener Konzentration eines Antibiotikums, jenseits der die Entstehung einer Resistenz unwahrscheinlich ist (Zhao and Drlica 2002). Mit Ciprofloxacin wird die entsprechende Konzentration im Zielgewebe klinisch nicht erreicht, während sie bei einer Therapie mit Moxifloxacin durchaus überschritten werden kann.

4.3.3.3. Vor und Nachteile phäno- und genotypische Resistenztestung

Der wesentliche Vorteil der phänotypischen Resistenztestung liegt in der direkten Beobachtung des Wachstumsverhaltens des untersuchten Keimes in Gegenwart des Medikamentes und unter definierten Bedingungen. Die Ursache der Resistenz wird nicht untersucht. Das Testverfahren ist dementsprechend ergebnisorientiert und ursachenunabhängig. Häufig wird das Resultat als absolutes Ergebnis bewertet. Weitere Vorteile sind der im Schnitt niedrigere Kostenaufwand und der geringere apparative und technische Aufwand (Feldmann 2001).

Die genotypische Resistenztestung dagegen ist ursachenorientiert. Das Ergebnis wird nicht direkt untersucht, sondern auf Grund der bisher erforschten Ursache-Wirkungsbeziehungen empirisch erwartet. Da die vollständige Aufklärung aller Ursachen absehbar nicht möglich ist, beruht das Testresultat auf Wahrscheinlichkeiten. Dass das Testresultat daher häufig als ein relatives, zumeist auch unvollständiges Ergebnis bewertet wird, ist der entscheidende Nachteil der genotypischen Resistenztestung. Weitere Nachteile sind der hohe technische und apparative Aufwand und vor allem die benötigte Erfahrung beim Umgang mit molekularbiologischen Techniken. Im Allgemeinen wird vor allem in dem deutlich schnelleren Vorliegen eines Testergebnisses der entscheidende Vorteil der genotypischen Resistenztestung gesehen.

Hierbei ist aber zu bedenken, dass die absoluten Ergebnisse der phänotypischen Resistenztestung auch nur für die getesteten Bedingungen gelten. Zum Ersten wird daher die Zuverlässigkeit der Aussage dadurch eingeschränkt, dass diese

Bedingungen einer erheblichen Variabilität unterliegen. Diese resultiert zum Teil aus der Vielzahl der verwendeten unterschiedlichen Testverfahren und Grenzwerte (siehe Kapitel 4.3.2.). Es gibt allerdings auch mehrere technischen Einschränkungen. Chinolone sind aufgelöst in Medien nicht sehr stabil und verlieren über den langen Untersuchungszeitraum sicher einen erheblichen Teil ihrer Aktivität. Die Herstellung eines repräsentativen Inokulums ist schwierig, die Anpassung an die Trübung eines McFarland¹ ungenau. Interessant sind in diesem Zusammenhang besonders die in dieser Arbeit erstmals für Chinolone beschriebenen Heteroresistenzen (siehe Kapitel 3.1.4.5). Heteroresistenzen können bei der Bestimmung aus der Primärkultur insbesondere bei der Proportionsmethode unter Umständen eine niedrigere MHK des Stammes imitieren, da das Inokulum auf die Gesamtheit der Population und nicht auf deren resistenten Anteil geeicht wird (Rinder, Mieskes et al. 2001). In diesem Zusammenhang sei auch darauf verwiesen, dass bei einer Paneluntersuchung nordeuropäischer Laboratorien über die Chinolonresistenz trotz des Ausschlusses grenzwertiger Befunde von 20 Stämmen nur bei 18 Stämmen ein eindeutiges Ergebnis erzielt werden konnte (Johansen, Larsen et al. 2003).

Zum Zweiten muss hierbei auch bedacht werden, dass diese Untersuchungsbedingungen nicht denen *in vivo* entsprechen, sondern dass alle etablierten Kulturverfahren, ob Festkultur auf Löwenstein-Jensen Medien oder Flüssigkulturen, das absolut wirkende Ergebnis anhand eines sehr artifiziellen und wohl auch unzureichenden Modells ermitteln. Mykobakterien finden bei Kulturverfahren ein ausreichendes Nahrungsangebot, konkurrieren nicht mit anderen Bakterien oder Pilzen usw. und werden vor allem nicht von einem Immunsystem bekämpft. Mechanismen, die unter diesen artifiziellen Bedingungen eine Resistenz vermitteln können, können unter *in vivo* Bedingungen unzureichend sein. In diesem Zusammenhang sei beispielhaft auf die Efflux-Mechanismen hingewiesen. Da die Efflux-Mechanismen zumeist sehr unspezifisch wirken (Viveiros, Leandro et al. 2003), werden neben den Medikamenten unter Umständen auch wichtige weitere Komponenten aus den Zellen gepumpt, die im Gegensatz zu den *in vitro* unter *in vivo* Bedingungen zumindest langfristig essentiell zum Überleben seien könnten. Bezug nehmend auf das im vorherigen Kapitel erläuterte Modell der Resistenzentstehung erscheint unter dieser Vorstellung auch die hohe Präsenz von Gyrasemutationen unter klinischen Stämmen mit höhergradigen Chinolonresistenzen plausibel.

Anhand dieses Abschnittes sollte klar gemacht werden, dass die phänotypische und die genotypische Resistenzbestimmung eigenständige Informationen liefern, die, ohne sich zuvor auf ihre Wertigkeit festzulegen, auch dazu genutzt werden sollten, die jeweils andere Methode zu evaluieren. So fehlt für die Chinolone eine Charakterisierung klinische resistenter Stämme analog zu den Versuchen Canettis. Die offenbar vielfach angewandte Übertragung von Grenzwerten anderer Bakterien (die MHK=2 gilt bei *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* u.a. als resistent) scheint schon deshalb unangebracht, da dem *Mycobacterium tuberculosis* die Topoisomerase IV fehlt. In Kapitel 4.3.3.1 konnte demonstriert werden, wie unter diesen Umständen der genotypische Nachweis von Gyrasemutationen Hinweise für die Setzung eines klinisch relevanten Grenzwerts liefern könnte.

4.4. Implikationen für einen Direktnachweis von Resistenzen aus dem Sputum

Ein wesentlicher Vorteil molekularbiologischer Methoden liegt im schnellen Vorliegen eines Testergebnisses. Damit dieser Vorteil adäquat genutzt werden kann muss das Testverfahren zwei Bedingungen erfüllen. Es muss sensitiv genug sein, um auch direkt aus Sputumproben, die mikroskopisch als positiv identifiziert wurden, die Resistenz bestimmen zu können. Zum anderen muss es spezifisch für den *Mycobacterium tuberculosis* - Komplex sein, damit die identifizierten Mutationen auch diesem zugeordnet werden können.

Für die Chinolone werden bisher keine molekularbiologischen Testsysteme zum Resistenznachweis kommerziell vertrieben. Das vorliegende Testsystem stellt das erste dar, das auch für den Direktnachweis dieser Resistenzen aus dem Sputum konzipiert und evaluiert wurde. Eine Weiterentwicklung des vorliegenden Testsystems zu einem kommerziell vertriebenen In-Vitro-Diagnostikum ist denkbar. Die Sensitivität ist etwa eine Größenordnung höher als die der mikroskopischen Verfahren (siehe Kapitel 3.2.3). Das Testsystem ist hochspezifisch für den *Mycobacterium tuberculosis* - Komplex (siehe Kapitel 3.2.2).

In bisherigen Veröffentlichungen wurde die DNA für den Nachweis der Gyrasemutationen auch bei den klinischen Isolaten von Primär- oder Subkulturen gewonnen. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die für den Test eingesetzte DNA ausschließlich mykobakteriellen Ursprungs war. Zumeist wurden für die Amplifikation die von Takiff, Salazar et al. (1994) beschriebenen Primer

verwendet. Diese wurden allerdings ursprünglich nicht für den Direktnachweis konzipiert und weisen relativ hohe Homologien zu DNA-Bestandteilen auf, die im Sputum erwartet werden können. So findet sich bei dem beschriebene forward-Primer (5'-CAGCTACATCGACTATGCGA-3') nur ein einziger, mittig gelegener Mismatch gegenüber einem Abschnitt des Genoms des *Corynebacterium diphtheriae* und auch eine hohe Homologie mit dem Chromosom 16 des humanen Genoms (gemäß eines BlastN in der Nucleotide Datenbank des NCBI).

Auch die beiden bisher kommerziell vertriebenen molekularbiologischen Testsysteme zur Resistenzbestimmung für Rifampicin und Isoniazid (innoLipa®-RifTB der Firma Innogenetics, Gent und GenoType® MTBDR der Firma Hain Lifesience, Nehren) wurden ursprünglich für den Nachweis von Mutationen des rpoB bzw. des katG-Gens mittels DNA-Präparationen von Primärkulturen etabliert. Der Direktnachweis aus dem Sputum wird von den Firmen nicht direkt propagiert, wurde aber schon bald nach deren Veröffentlichung beschrieben (Goyal, Shaw et al. 1997). Die Speziesspezifität wird in beiden Testverfahren über eine separate Hybridisierung mit einer wohl außerhalb der RRDR gelegenen für den *M. tb.* - Komplex spezifischen Sonde gesichert. Daher ist anzunehmen, dass die nicht veröffentlichten Primer keine besonders hohe Speziesspezifität besitzen.

Bei der Konzeption der auf dem LightCycler® System beruhenden gyrA Real-time-PCR wurde darauf geachtet, dass schon die Primer eine hohe Spezifität für den *Mycobacterium tuberculosis* - Komplex besitzen. Einerseits kann so sichergestellt werden, dass die Sensitivität des Testsystems nicht durch einen erhöhten Primerverbrauch aufgrund einer unspezifischen Amplifikation von z.B. humaner DNA eingeschränkt wird. Andererseits erlaubt die hohe Spezifität die eindeutige Zuordnung der beobachteten Mutationen zum *Mycobacterium tuberculosis* - Komplex. Würde aber aufgrund unspezifischerer Primer neben der mykobakteriellen DNA auch die anderer Bakterien amplifiziert, kann unter Umständen eine Resistenz vorgetäuscht werden. Die Existenz von Mykobakterien könnte in diesem Fall zwar durch eine separate speziesspezifische Sonde bestätigt werden. Aufgrund der über die Speziesgrenzen hinweg hoch konservierten QRDR wäre es aber nicht unwahrscheinlich, dass die Sonden auch an weitere bakterielle Amplifikate binden und die identifizierten „Mutationen“ nicht dem Tuberkuloseerreger zuzuordnen sind. Die abgeänderte Sequenz könnte zudem durchaus dem Wildtyp des eventuell auch nicht humanpathogenen Keims entsprechen.

Für molekularbiologischen Testverfahren, die Mutationen direkt aus dem Sputum bestimmen sollen, ist daher eine hohe Spezifität der Primer zu fordern.

4.5. Bedeutung der schnellen Identifizierung von Medikamentenresistenzen für die Behandlung und die Kontrolle der Weiterverbreitung der Tuberkulose

Mit der Zunahme der primären Medikamentenresistenzen in den letzten Jahren treten verstärkt Forderungen der Kliniker nach schnelleren Resistenztests auf. Das Ergebnis der klassischen phänotypischen Resistenztestung lag auch im Rahmen gut organisierter Studien in Peru (Kongressbericht IUATLD 2003) häufig erst nach 6 Monaten, d.h. meist nach dem Abschluss der Kategorie I - Therapie dem behandelnden Arzt vor. Diese lange Latenzzeit bis zum Vorliegen eines Resistenzmusters bzw. die Tatsache, dass aufgrund des hohen technischen, finanziellen und vor allem auch logistischen Aufwandes eine kulturelle Resistenzbestimmung nicht durchgeführt werden kann, bedingt, dass Patienten heute primär im Rahmen der DOTS-Strategie über Monate lediglich standardisiert behandelt werden. In Situationen mit niedrigen Resistenzquoten ist ein solches Vorgehen Erfolg versprechend und kosteneffektiv. In Situationen mit einer hohen Prävalenz von Resistenzen auch unter bisher unbehandelten Patienten besteht allerdings die Befürchtung, dass dieses Vorgehen die Entstehung von Multi- und Polyresistenzen fördert. So werden Patienten mit z.B. einer unerkannten Isoniazidmonoresistenz nach Abschluss der Initialphase unter DOTS letztlich mit nur einem wirksamen Medikament, dem Rifampicin, therapiert. Insbesondere bei ausgedehnten Befunden ist es daher denkbar, dass noch genug Bakterien vorhanden sind, dass aufgrund der funktionellen Monotherapie in der *Continuation Phase* (siehe Kapitel 1.2) zusätzlich eine Rifampicinresistenz, also eine MDR-Tuberkulose herausselektioniert werden kann. Diese Befürchtungen werden genährt durch die Tatsache, dass in Kasachstan und Karakalpakistan derzeit mehr als 20% der Stämme von bisher unbehandelten Patienten eine Isoniazid-, aber keine Rifampicinresistenz aufweisen (WHO 2004). Der Anstieg der MDR-TB in fast allen Nachfolgestaaten der Sowjetunion über die letzten Jahre hinweg dokumentiert vor diesem Hintergrund die akute Bedrohung. Zudem sind Patienten länger infektiös, wenn sie aufgrund einer unerkannten Resistenz lange funktionell insuffizient behandelt werden.

Medikamentenresistenzen stellen heute dementsprechend neben der HIV-Pandemie die bedeutendste Herausforderung bei der Behandlung und der Kontrolle der Weiterverbreitung der Tuberkulose in der Welt dar. Aus diesem Grund räumt die WHO in ihrer Forschungsagenda zur MDR-TB der Entwicklung schneller Resistenztests eine hohe Priorität ein (WHO 2003 (2)). In Kooperation mit der WHO werden in Peru von FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics) derzeit mehrere Schnelltestverfahren evaluiert.

Schnellere Ergebnisse können einerseits durch die Beschleunigung der Kulturverfahren durch verbesserte Detektionsverfahren erzielt werden. Dies erlauben z.B. die Indikatorsysteme der automatisierten Flüssigkultursysteme (z.B. MGIT960) oder neu entwickelte Farbstoffindikatoren für Festmedien (TK-Medium® der Firma Salubris, Istanbul, Türkei). Beide verkürzen unter optimalen Bedingungen die Zeit vom Anlegen einer Primärkultur bis zum Vorliegen eines Resistenzbefundes auf ca. 25 Tage. Weiter verkürzen lässt sich der Zeitaufwand für die Resistenzbestimmung mittels des FASTPlaqueTB™-Testverfahrens (Biotec Laboratories Ltd, Ipswich, UK). Dabei werden die Tuberkuloseerreger mit spezifischen Bakteriophagen infiziert. Die Phagen werden intrazellulär amplifiziert und infizieren nach der Lyse des Bakteriums wiederum schnellwachsende Mykobakterien (Sensorzellen). Aufgrund der Lyse der Sensorzellen entstehen Plaques, die einfach optisch ausgewertet werden können. Auf diese Weise können innerhalb 2 Tagen Tuberkuloseerreger direkt aus dem Sputum nachgewiesen werden (Muzaffar, Batool et al. 2002). Für die Resistenztestung mittels des FASTPlaqueTB-MDR™ werden allerdings definierte Bakterienkonzentrationen benötigt, so dass der Test nicht direkt mit dem Sputum sondern mit Flüssigkulturen durchgeführt wird (Albert, Trollip et al. 2002). Das Ergebnis liegt mit diesem Testverfahren ca. 14 Tagen nach Abgabe des Sputums vor. Flüssigkultursysteme bedürfen eines hohen apparativen und auch finanziellen Aufwands, das TK-Medium® ist verhältnismäßig günstig. Allen phänotypischen Verfahren für die Resistenzbestimmung ist gemein, dass sie zumindest während der Präparation der benötigten definierten Inokuli Arbeiten mit hochkonzentrierten Bakteriensuspensionen bedürfen. Daher sind derartige Arbeiten aufgrund des hohen Infektionsrisikos allgemein in Laborbereichen der Sicherheitsklasse III durchzuführen. Der Standard für die Resistenztestung für Chinolone ist die Festkultur, Flüssigkulturverfahren werden verbreitet angewendet, eine abschließende Evaluation steht aber für die Gyrasehemmer noch aus. Bisher wurden keine Studien

über die Verwendung des TK-Mediums® oder der FastPlaque™-Technik für die Bestimmung der Chinolonresistenz veröffentlicht.

Genotypische Methoden ermöglichen die weitere Verkürzung der für eine Resistenzbestimmung benötigten Zeit. Für die Gene *rpoB* und *katG* (Rifampicin- und Isoniazidresistenz) liegen wie erwähnt bereits kommerzielle Kits vor. Die Tests wurden nicht für den Direktnachweis aus dem Sputum konzipiert und hierfür bisher auch nicht befriedigend evaluiert. Dennoch werden die Testverfahren schon verbreitet für den Direktnachweis aus dem Sputum eingesetzt. Ergebnisse lagen meist noch am gleichen Tag vor, die Therapie konnte bereits primär an die vermutete Resistenz angepasst werden. Die Testverfahren wurden bereits erfolgreich in Programme integriert, z.B. dem Lisbon-fast track TB programm (Viveiros, Leandro et al. 2005).

Für die genotypische Bestimmung von Chinolonresistenzen werden bisher keine Testverfahren kommerziell vertrieben. Als ein für die Laborroutine geeigneter Test wurde 2005 von Giannoni, Iona et al. ein Line Probe Assay vorgestellt. Mit dem Testverfahren ist es möglich, alle bisher in klinischen Isolaten gefundene Mutationen zu identifizieren (siehe Tabelle 10). Der Test wurde allerdings ebenfalls nicht explizit für die Direktbestimmung aus dem Sputum konzipiert und verwendet die von Takiff, Salazar et al. (1994) vorgestellten Primer (siehe vorheriges Kapitel).

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte *gyrA* LightCycler® PCR ist unseres Wissens nach das erste für das Routinelabor geeignete Testverfahren, dass für die direkte Bestimmung der für eine Chinolonresistenz verantwortlichen Mutationen des *gyrA*-Gen aus dem Sputum konzipiert und evaluiert wurde. Auch wenn anhand der zur Verfügung stehenden Stämme die Funktionalität des Testsystems bisher nur für die beiden häufigsten Mutationen Codon 90 (Ala→Val, GCG→GTG) und Codon 94 (Asp→Gly, GAC→GGC) nachgewiesen wurde, ist diese aufgrund der Konzeption auch für die weiteren bekannten Mutationen wahrscheinlich.

Die Kosten für den einzelnen Test sind bei molekularbiologischen Tests relativ hoch. Da die Mykobakterien aber schon in der Sputumprobe abgetötet werden können, besteht im Vergleich zu den phänotypischen Methoden ein deutlich geringeres Infektionsrisiko. Zudem können inaktivierte Proben auch einfacher verschickt werden. Auch das für die Vor-Ort-Bestimmung benötigte Material ist im Gegensatz zu den bei der Kultur benötigten Sicherheitskabinen und Brutschränken einfach

transportabel, so dass insgesamt weniger Zentren ausgestattet werden müssten. Insbesondere aus diesen logistischen Gründen kann durchaus vermutet werden, dass die genotypische Resistenzbestimmung oft sogar praktikabler und kosteneffektiver ist als die phänotypischen Methoden.

Letztlich wird sich die molekularbiologische Resistenzbestimmung vermutlich nur dann durchsetzen, wenn im Rahmen von Studien nachgewiesen werden kann, dass die Patienten von einer schnellen effektiven Therapie profitieren. Chinolone werden derzeit als erste Kandidaten für den Ersatz des Isoniazids auch in einem Kategorie I – Regime gehandelt. Aktuell wird diesem Zusammenhang von der Firma Bayer in Zusammenarbeit mit der WHO (BayerHealthCareAG 2005) der Einsatz von Moxifloxacin mit der Hoffnung evaluiert, dass durch den Einsatz dieses Gyrasehemmers der neusten Generation sogar die Behandlungsdauer der Kategorie I um zwei Monate verkürzt werden könnte. Allerdings sind Chinolonresistenzen bei *Mycobacterium tuberculosis* in manchen geographischen Regionen wie den Philippinen (54% der MDR-Stämme besitzen auch eine Resistenz gegen Gyrasehemmer) durchaus nicht selten (Grimaldo, Tupasi et al. 2001).

Setzen sich die Chinolone als First-Line-Medikament bei der Tuberkulosebehandlung durch, könnte so insbesondere in Ländern mit hoher Mono- und Multiresistenzen wie Kasachstan mit Hilfe des GenoTypes® MTBDR und der gyrA Real-time-PCR das für die Resistenzlage des Patienten besser Geeignete der beiden Medikamente für der Kombinationstherapie identifiziert werden. Bei einem durch einen positiven Sputumausstrich identifizierten neuen Patienten könnte diese noch am gleichen Tag eingeleitet werden. Zudem könnte durch die hohe Speziespezifität der gyrA Realtime-PCR zeitgleich bestätigt werden, dass die in der Mikroskopie identifizierten säurefesten Stäbchen tatsächlich dem *Mycobacterium tuberculosis* - Komplex zugeordnet werden können. Auf diese Weise könnte durch den Einsatz einer auf dem LightCycler® Systems basierenden gyrA Real-time-PCR auch ein wesentlicher Einfluss auf die Verbreitung der Tuberkulose allgemein und auf die der MDR-TB im Speziellen genommen werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde basierend auf der genotypischen Charakterisierung von Stämmen des *Mycobacterium tuberculosis* - Komplexes anhand des *gyrA*-Gens mit Hilfe einer auf dem LightCycler® System basierenden *gyrA* Real-time-PCR ein neuartiges Testverfahren zur Bestimmung von Chinolonresistenzen konzipiert und etabliert.

Bei der Evaluierung des Testverfahrens mit 13 phänotypisch resistenten Stämmen mit einer MHK ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ für Ciprofloxacin zeigten 9 Stämme bei der Schmelzpunktanalyse eine Mutation anzeigenden *Shift* des T_m 's, 2 weitere wiesen die typische Schmelzkurve einer Heteroresistenz auf. Die Sequenzierung ergab, dass 5 dieser Stämme eine Mutation des Codon 90 (Ala \rightarrow Val, GCG \rightarrow GTG) und 6 Stämme eine Mutation des Codons 94 (Asp \rightarrow Gly, GAC \rightarrow GGC) aufwiesen. Die beiden verbliebenen Stämme hatten den Schmelzpunkt des Wildtyps, der durch die Sequenzierung bestätigt werden konnte. Die molekularepidemiologische Unabhängigkeit der resistenten Stämme wurde durch das IS6110 Fingerprinting bestätigt. 44 phänotypisch sensible Stämme wiesen ebenfalls den T_m des Wildtyps auf. Damit besitzt das Testverfahren für den Nachweis von Chinolonresistenzen eine Sensitivität von 85% und eine Spezifität von 100%.

Die Speziespezifität wurde anhand von 7 typischen und 16 atypischen Mykobakterien sowie humanen DNA-Präparationen und Sputumproben überprüft, wobei sich eine Amplifikation nur bei Mitgliedern des *M.tb.* - Komplexes fand. Das Testverfahren ist somit hochspezifisch für den *Mycobacterium tuberculosis* - Komplex.

Der Test wurde für die Bestimmung von der Primärkultur und für den Direktnachweis aus dem Sputum evaluiert. Der Nachweis von Mykobakterien direkt aus dem Sputum mit dem Testverfahren ist mit 10^3 KBE/ml eine Größenordnung sensitiver als die Mikroskopie. Das Testergebnis liegt in der Regel innerhalb eines Tages vor.

Für die Testdurchführung und die Testauswertung wurden Standardprotokolle erstellt.

Anhand einer kritischen Evaluation der Primärliteratur konnte gezeigt werden, dass eine hohe Konkordanz von über 90% zwischen höhergradigen Chinolonresistenzen (MHK ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) und Mutationen des *gyrA*-Gens besteht. Die Informationen aus der phänotypischen und der genotypischen Resistenztestung sollte genutzt werden, um

die beiden Verfahren gegenseitig zu evaluieren. So sprechen die bisherigen molekularbiologischen Daten für den von der WHO vorgeschlagenen Grenzwert von $>2\mu\text{g/ml}$ bei der phänotypischen Resistenzbestimmung. Anhand von klinischen Studien sollte die Grenzwertsetzung überprüft und vor allem der Nutzen der Techniken für den Patienten evaluiert werden.

Chinolone haben eine stark zunehmende Bedeutung bei der Behandlung der Tuberkulose und werden bisher vor allem bei der Behandlung der MDR-Tuberkulose eingesetzt. In mehreren klinischen Studien wird derzeit auch der Einsatz von Gyrasehemmern der neusten Generation als Standardmedikament untersucht. Hiervon verspricht man sich insbesondere eine Verkürzung und eine bessere Verträglichkeit der Therapie. Sollten sich die Chinolone als *First Line* Medikament zur Behandlung der Tuberkulose durchsetzen, könnte die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte auf dem LightCycler® System basierende *gyrA* Real-time-PCR aufgrund der schnellen Resistenzbestimmung innerhalb eines Tages dem Kliniker entscheidende Hinweise für die primäre Einleitung einer effektiven Therapie geben.

Im September 2006 veröffentlichte die WHO einen dringenden Warnhinweis bezüglich einer in Südafrika neu aufgetretenen Tuberkuloseepidemie mit einem extensiv medikamentenresistenten Tuberkulosestamm. Für diese aggressiven Stämme wurde der Begriff XDR TB (extensive drug resistant tuberculosis) gewählt. 52 von 53 infizierten Patienten starben im Schnitt innerhalb von 25 Tagen nach Abgabe Ihrer Sputumproben (WHO 2006). In einem eilig einberaumten Expertentreffen wurde als eine der vordringlichsten Maßnahmen die Entwicklung von Schnelltests zur Identifikation von MDR und XDR TB-Stämmen gefordert. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte *gyrA* Real-time-PCR unter Verwendung des LightCycler® Systems ermöglicht genau diese geforderte schnelle Identifizierung von potentiellen XDR-Stämmen, da Chinolone die wichtigste Antibiotikagruppe unter den Zweitlinienmedikamenten darstellen.

Anhang

A Stammsammlung

Nr.	Stamm Nr.	Jahr	R. Nr.	E. Nr.	Name	Einsender	Cipro MHK	Moxi MHK	Tm (°C)
-----	-----------	------	--------	--------	------	-----------	-----------	----------	---------

A. *M.tuberculosis* mit Ciprofloxacin MHK >4 (Hochresistente)

1	1	2003	129		C.,M.	Nepal	>4	>2	59,56
2	2	2003	132		Nepal 2003/2	Nepal	>4	>2	64,68
3	3	2000	997	873	K.,S.	Deutschland	>4	>2	64,41
4	4	1999	480	859	A.,L.	Bolivien	>4	>2	59,30
5	5	1996	735	714	H.,G.	Deutschland	>4	>2	64,64
6	6	1998	745	723	A.,K.	Deutschland	>4	>2	59,40
7	13	2001	196	1138	Nepal 867 WHO	Nepal	>4	0,5	Kat.4
8	14	2001	193	1135	Nepal 147 WHO	Nepal	>4	0,5	66,81
9	21	1999	620	912	R.,A.	Deutschland	>4	>2	64,50
10	30	1993	774/93	347	J.,G.	Deutschland	>4	>2	66,45
11	36	2000	608/01	1004	G.,A	Deutschland	>4	4	64,23
12	37	2004	59		M.,T.	Nepal	>4	>2	Kat.4
13		2004	Stamm		Beijing Borstel	Deutschland	>4	>2	64,87

A1. Bei phänotypischer Nachtestung sensibel (siehe B)

x.1	28	2000	958	919	C.,I	Deutschland	>4/2*	< 0,5*	WT
x.2	29	2003	392		D.,G	Deutschland	>4/<2*	1/<0,5*	WT
x.3	34	2001	50	1045	Nepal 4323	Nepal	>4/<2*	< 0,5*	WT

* Resistenzmuster der Kultur nach dem Auftauen der primär resistenten *M. tub* -Kulturen

A2. Eingefrorene Kulturen nicht wieder anzüchtbar / kein Material

0.1	x	2002	265	na	K.,Y.	Deutschland	>4	n.d.	n.d.
0.2	x	1998	935	na	S.,D.	Bolivien	>4	>2	n.d.
0.3	x	1998	808	na	Z.,A.	Bolivien	>4	>2	n.d.
0.4	x	1998	798	819	G.,R	Bolivien	>4	>2	n.d.

Tm spezifisch für Mutationen im Codon 90 (GCG→GTG)

Tm spezifisch für Mutationen im Codon 94 (GAC→GGC)

Tm spezifisch für den Wildtyp (H37Rv)

Nr.	Prep. Nr.	Jahr	R. Nr.	E. Nr.	Name	Einsender	Cipro MHK	Moxi MHK	T _m (°C)
-----	-----------	------	--------	--------	------	-----------	-----------	----------	---------------------

B. *M.tuberculosis* mit Ciprofloxacin MHK < 4 mg/ml

1	7	2003	163		I.,A.	Deutschland	2	0,13	WT
2	8	2001	131		Y.,S.	Nepal	2	n.d.	WT
3	9	2001	130		Nepal, R.	Nepal	2	n.d.	WT
4	10	1999	775	878	C.,S.	Deutschland	2	n.d.	WT
5	11	2002	607	1096	A.,N	Deutschland	2	n.d.	WT
6	12	1995	879	589	E.,L	Deutschland	2	n.d.	WT
7	15	2002	567	1091	C.,K	Deutschland	1	n.d.	WT
8	16	2002	273	1065	W.,E.	Deutschland	1	n.d.	WT
9	17	1993	128	359	D.,G	Deutschland	1	n.d.	WT
10	18	1999	843	879	F.,H	Deutschland	1	0,25	WT
11	19	2000	6	961	S.,E	Deutschland	1	0,25	WT
12	20	2002	683	1099	A.,F	Deutschland	1	0,25	WT
13	35	1993	626/93	305	R.,G	Deutschland	1	n.d.	WT
14	38	2004	92		K.,W.	Deutschland	2	< 0,5	WT
15	39	2004	107		A.,P.	Deutschland	1	< 0,5	WT
16	40	2004	118		R.,W.	Deutschland	<2	< 0,5	WT
17	41	2004	121		G.,R.	Deutschland	<2	< 0,5	WT
18	42	2004	122		S.,S.	Deutschland	<2	< 0,5	WT
19	43	2004	123		B.,H.	Deutschland	<2	< 0,5	WT
20	44	2004	126		H.,R.	Deutschland	<2	< 0,5	WT
21	45	2004	129		K.,I.	Deutschland	<2	< 0,5	WT
22	46	2004	132		S.,F.	Deutschland	<2	< 0,5	WT
23	47	2004	137		S.,E.	Deutschland	<2	< 0,5	WT
24	48	2004	138		V.,S.	Deutschland	<2	< 0,5	WT
25	49	2004	140		S.,W.	Deutschland	2	< 0,5	WT
26	50	2004	141		T.,B.	Deutschland	2	< 0,5	WT
27	51	2004	157		B.,A.	Deutschland	<2	< 0,5	WT
28*	31	2000	963/00	928	G.,A.	Deutschland	1	0,25	WT
29*	28	2000	958	919	C.,I.	Deutschland	>4/2*	< 0,5	WT
30*	29	2003	392		D.,G	Deutschland	>4/<2*	1/<0,5*	WT
31*	34	2001	50	1045	Nepal 4323	Nepal	>4/<2*	n.d.	WT

+ Patient später resistent (Siehe A Nr. 11)

* Stämme ursprünglich resistent, nach dem Ausfrieren aber phänotypisch sensibel getestet (siehe A Nr. x.1, x.2 und x.3)

T_m spezifisch für Mutationen im Codon 90 (GCG→GTG)

T_m spezifisch für Mutationen im Codon 94 (GAC→GGC)

T_m spezifisch für den Wildtyp (H37Rv)

Nr.	Prep. Nr.	Jahr	R. Nr.	Name	Amplifikation (Gelelektrophorese)	Tm (°C)
-----	-----------	------	--------	------	--------------------------------------	---------

C: Mykobakterielle Referenzkulturen

<i>Mycobacterium tuberculosis</i> - Komplex						
1	S1	2004	Stamm	H37Rv	Ja	WT
2	S2	2004	Stamm	BCG	Ja	WT
3	S3	2004	Stamm	<i>M. bovis</i>	Ja	WT
4	S4	2004	Stamm	<i>M. africanum</i> 1	Ja	WT
5	S5	2004	Stamm	<i>M. africanum</i> 2	Ja	WT
6	S6	2004	Stamm	<i>M. canetti</i>	Ja	WT
7	S7	2004	Stamm	<i>M. tub. Ssp. Beijing</i>	Ja	64,87
Runyon-Gruppe II :scotochromogene Gruppe						
8	S8	2004	Stamm	<i>M. goodnae</i>	Nein	∅
9	S9	2004	Stamm	<i>M. scrofulaceum</i>	Nein	∅
10	S10	2004	Stamm	<i>M. celatum</i>	Nein	∅
11	S11	2004	Stamm	<i>M. interjectum</i>	Nein	∅
12	S12	2004	Stamm	<i>M. bohemicum</i>	Nein	∅
13	S13	2004	Stamm	<i>M. bucklei</i>	Nein	∅
14	S14	2004	Stamm	<i>M. xenopi</i>	Nein	∅
15	S15	2004	Stamm	<i>M. hassiacum</i>	Ja (unspezifisch)	∅
Runyon-Gruppe IV: schnellwachsende Gruppe						
16	S16	2004	Stamm	<i>M. vaccae</i>	Ja (unspezifisch)	∅
17	S17	2004	Stamm	<i>M. smegmatis</i>	Ja (unspezifisch)	∅
18	S18	2004	Stamm	<i>M. fortuitum</i>	Wenig unspezifisch	∅
19	S19	2004	Stamm	<i>M. chelonae</i>	Wenig unspezifisch	∅
Runyon-Gruppe III: nonchromogene Gruppe						
20	S20	2004	Stamm	<i>M. avium</i>	Nein	∅
21	S21	2004	Stamm	<i>M. intracellulare</i>	Nein	∅
Runyon-Gruppe I: photochromogene Gruppe						
22	S22	2004	Stamm	<i>M. marinum</i>	Ja (unspezifisch)	∅
23	S23	2004	Stamm	<i>M. kansasii</i>	Wenig unspezifisch	∅

Tm spezifisch für Mutationen im Codon 90 (GCG→GTG)

Tm spezifisch für Mutationen im Codon 94 (GAC→GGC)

Tm spezifisch für den Wildtyp (H37Rv)

B Konzept der gyrA PCR auf dem LightCycler® System

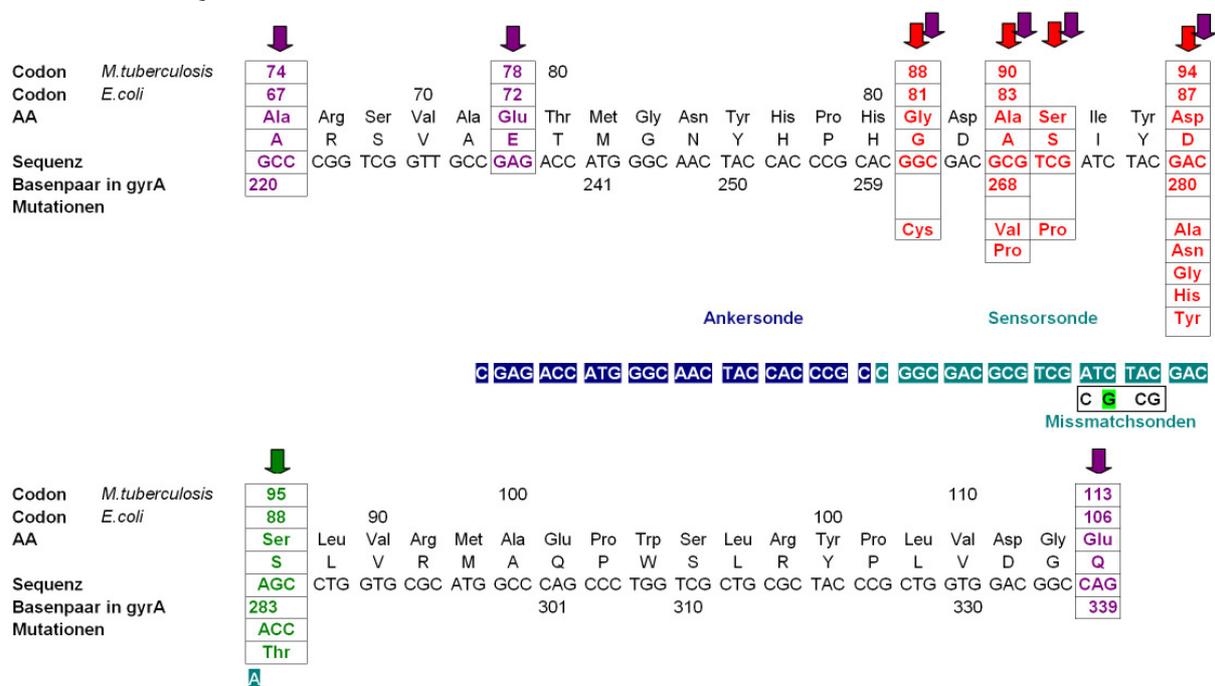
Locus: gyr A Gen
Genus: *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv)
Accession Code: NC_000962
Target: QRDR

Eingangssequenz:

```
001 ATGACAGACA CGACGTTGCC GCCTGACGAC TCGCTCGACC GGATCGAACC GGTGACATC
061 GAGCAGGAGA TGCAGCGCAG CTACATCGAC TATGCGATGA GCGTGATCGT CGGCCGCGCG
121 CTGCCGGAGG TGC GCGACGG GCTCAAGCCC GTGCATCGCC GGGTGCTCTA TGCAATGTTTC
181 GATTCCGGCT TCCGCCCGGA CCGCAGCCAC GCCAAGTCG 219 ...
```

QRDR (Quinolone resistance determining sequence):

220 – 339 QRDR



Folgesequenz:

```
0301 ... 340 G GCAACTTCGG CTCGCCAGGC
0361 AATGACCCAC CGGCGGCGAT GAGGTACACC GAAGCCCGGC TGACCCCGTT GGCGATGGAG
0421 ATGCTGAGGG AAATCGACGA GGAGACAGTC GATTTCATCC CTAACACGA CGGCCGGGTG
0481 CAAGAGCCGA CGGTGCTACC CAGCCGGTTC CCCAACCTGC TGGCCAACGG GTCAGGCGGC
0541 ATCGCGGTCG GCATGGCAAC CAATATCCCG CCGCACAACC TCGTGAGCT GGCCGACGG
0601 GTGTTCTGGG CGCTGGAGAA TCACGACGCC GACGAAGAGG AGACCCTGGC CGCGGTCATG
0661 GGGCGGGTTA AAGGCCCGGA CTTCCCGACC GCCGGACTGA TCGTCGGATC CCAGGGCACC
0721 GCTGATGCCT ACAAACCTGG CCGCGGCTCC ATTCGAATGC GCGGAGTTGT TGAGGTAGAA
0781 GAGGATTCCC GCGGTCGTAC CTCGCTGGTG ATCACCGAGT TGCCGTATCA GGTCAACCAC
0841 GACAACCTCA TCACTTCGAT CGCCGAACAG GTCCGAGACG GCAAGCTGGC CGGCATTTCC
0901 AACATTGAGG ACCAGTCTAG CGATCGGGTC GGTTTACGCA TCGTCATCGA GATCAAGCGC
0961 GATGCGGTGG CCAAGGTGGT GATCAATAAC CTTTACAAGC ACACCCAGCT GCAGACCAGC
1021 TTTGGCGCCA ACATGCTAGC GATCGTCGAC GGGGTGCCGC GCACGCTGCG GCTGGACCAG
1081 CTGATCCGCT ATTACGTTGA CCACCAACTC GACGTCATTG TGCGGCGCAC CACCTACCGG
1141 CTGCGCAAGG CAAACGAGCG AGCCACATT CTGCGCGGCC TGGTTAAAGC GCTCGACGCG
```

1201 CTGGACGAGG TCATTGCACT GATCCGGGCG TCGGAGACCG TCGATATCGC CCGGGCCGGA
 1261 CTGATCGAGC TGCTCGACAT CGACGAGATC CAGGCCAGG CAATCCTGGA CATGCAGTTG
 1321 CGGCGCCTGG CCGCACTGGA ACGCCAGCGC ATCATCGACG ACCTGGCCAA AATCGAGGCC
 1381 GAGATCGCCG ATCTGGAAGA CATCCTGGCA AAACCCGAGC GGCAGCGTGG GATCGTGC GC
 1441 GACGAACTCG CCGAAATCGT GGACAGGCAC GGCGACGACC GGC GTACCCG GATCATCGCG
 1501 GCCGACGGAG ACGTCAGCGA CGAGGATTTG ATCGCCCGCG AGGACGTCGT TG TCACTATC
 1561 ACCGAAACGG GATACGCCAA GCGCACCAAG ACCGATCTGT ATCGCAGCCA GAAACGCGGC
 1621 GGCAAGGGCG TGCAGGGTGC GGGGTTGAAG CAGGACGACA TCGTCGCGCA CTCTTCGTG
 1681 TGCTCCACCC ACGATTTGAT CCTGTTCTTC ACCACCCAGG GACGGGTTTA TCGGGCCAAG
 1741 GCCTACGACT TGCCCGAGGC CTCCCGGACG GCGCGCGGGC AGCACGTGGC CAACCTGTTA
 1801 GCCTTCCAGC CCGAGGAACG CATCGCCAG GTCATCCAGA TTCGCGGCTA CACCGACGCC
 1861 CCGTACCTGG TGCTGGCCAC TCGCAACGGG CTGGTGAAAA AGTCCAAGCT GACCGACTTC
 1921 GACTCCAATC GCTCGGGCGG AATCGTGGCG GTCAACCTGC GCGACAACGA CGAGCTGGTC
 1981 GGTGCGGTGC TGTGTTCCGC CGGCGACGAC CTGCTGCTGG TCTCGCCAA CGGGCAGTCC
 2041 ATCAGTTTCT CGGCGACCGA CGAGGCGCTG CGGCCAATGG GTCGTGCCAC CTCGGGTGTG
 2101 CAGGGCATGC GGTTC AATAT CGACGACCGG CTGCTGTGCG TGAACGTCGT GCGTGAAGGC
 2161 ACCTATCTGC TGGTGGCGAC GTCAGGGGGC TATGCGAAAC GTACCGCGAT CGAGGAATAC
 2221 CCGGTACAGG GCCGCGGCGG TAAAGGTGTG CTGACGGTCA TGTACGACCG CCGGCGCGGC
 2281 AGGTTGGTTG GGGCGTTGAT TGTCGACGAC GACAGCGAGC TGTATGCCGT CACTTCCGGC
 2341 GGTGGCGTGA TCCGCACCGC GGCACGCCAG GTTCGCAAGG CGGGACGGCA GACCAAGGGT
 2401 GTTCGGTTGA TGAATCTGGG CGAGGGCGAC AACTGTTGG CCATCGCGCG CAACGCCGAA

Primer:

Name	Position	Sequenz
gyrAp – f	175 - 193	ATG TTC GAT TCC GGC TTC C
gyrAp – r	380 – 398 (S)	T GAG GTA CAC CGA AGC CCG
	398 – 380 (AS)	CGG GCT TCG GTG TAC CTC A

Sonden:

Name	Position	Sequenz
gyrAs – A	233 – 259	CGA GAC CAT GGG CAA CTA CCA CCC GC-FL
gyrAs – AG	259 – 233 (AS)	LCRed640-GCG GGT GGT AGT TGC CCA TGG TCT CG-ph
gyrAs – S	261 – 283	LCRed640-CGG CGA CGC GTC GAT CTA CGA CA-ph
gyrAs – SG	283 – 261 (AS)	TGT CGT AGA TCG ACG CGT CGC CG-FL
gyrAs – SM79	261 – 283	LCRed640-CGG CGA CGC GTC GCT CTA CGA CA-ph
gyrAs – SM81	261 – 283	LCRed640-CGG CGA CGC GTC GAT GTA CGA CA-ph
gyrAs – SM83	261 – 283	LCRed640-CGG CGA CGC GTC GAT CTC CGA CA-ph
gyrAs – SM84	261 – 283	LCRed640-CGG CGA CGC GTC GAT CTA GGA CA-ph

C Standardprotokolle

Exemplarisch sind hier die für die LightCycler® PCR Nr. 60 erstellten Standardprotokolle abgedruckt. Bei diesem Test wurden alle resistente und einige sensible Stämme in einem Lauf getestet.

Testdurchführung

gyrA LightCycler® Test

Dokumentation für die Testdurchführung

Test ID-Nr.: 60 Datum: 28.05.2004

Testcharge: 2581c2 HZ:

Anmerkungen:

A. Materialien:

Vorbereitung und Verdünnung der Materialien

1. Primers:

Set:					
Name	c Stock (µM)	v Stock(µl)	c Use (µM)	Add H2O (µl)	c End in 20µl
gyrAp - f	50	40	10	160	0,2
gyrAp - r	50	40	10	160	0,8

Check

2. Sonden

Set:					
Name	c Stock (µM)	v Stock(µl)	c Use (µM)	Add H2O (µl)	c End in 20µl
gyrAs - A	20	10	5	30	0,2
gyrAs-SM81	20	10	5	30	0,2

Check

3. Master Hybridisation Probes:

Check

60µl von Lösung 1b zu Lösung 1a pipetieren und mischen

4. Templates (Controls)

Set:				
Name:	Stock (Batch)	Verdünnung: 1 zu x	Add H2O to 5µl	c
ptcWT	ptcWT	unverdünnt		n/a
ptcWT 1:10	ptcWT	10	45	n/a
ptc94	ptc94	unverdünnt		n/a
ptc90	ptc94	unverdünnt		n/a
ntc	H2O			n/a

Check

gyrA LightCycler® Test

Dokumentation für die Testdurchführung

C. LightCycler Settings

Check

LightCycler und Computer einschalten, Software starten, Programm wählen und Parameter überprüfen



1. Denaturation



Cycle Programm Data	Value
Cycles:	1
Analysis mode:	none
Temperature Targets	Segment 1
Target Temperature (°C)	95
Incubation time (min:s)	10.0
Temperature Transition Rate (°C/s)	20.0
Acquisition Mode	none

2. Amplifikation



Cycle Programm Data	Value		
Cycles:	45 (<i>Norm 30-50</i>)		
Analysis mode:	Quantification		
Temperature Targets	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Target Temperature (°C)	95	55	72
Incubation time (s)	0	10	10
Temperature Transition Rate (°C/s)	20.0	20.0	20.0
Acquisition Mode	none	single	none

3. Melting



Cycle Programm Data	Value		
Cycles:	1		
Analysis mode:	Melting Curve		
Temperature Targets	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Target Temperature (°C)	95	50	95
Incubation time (s)	30	120	0
Temperature Transition Rate (°C/s)	20.0	20.0	0.15
Acquisition Mode	none	none	cont.

4. Cooling



Cycle Programm Data	Value
Cycles:	1
Analysis mode:	none
Temperature Targets	Segment 1
Target Temperature (°C)	40
Incubation time (min:s)	01:00
Temperature Transition Rate (°C/min)	20.0
Acquisition Mode	none

Testauswertung

gyrA LightCycler® Test Ergebnisdokumentation

Test ID-Nr.: Datum:
 Testcharge: HZ:
 Datum der Auswertung:

Anmerkungen:

A: Testbeurteilung

Kontrollen:

Name	Kategorie	TM (1)	TM (2)	TM (3)	TM (4)	TM Mittelwert
ptcWT	1	66,54	66,80	66,99		66,78
ptc94	1	65,23				65,23
ptc90	1	60,38				60,38
ntc		0	0			0

Achtung: Test nur auswertbar, wenn alle Positivkontrollen der Kategorie 1 oder 2 zugeordnet werden können

Klassifizierung in die Kategorien:

Kategorie 1	Symmetrische peaks, Verlauf und Maximum der Schmelzkurve weitgehend deckungsgleich mit der Berechnungskurve	Automatisierte Auswertung (peak aerea analysis)
Kategorie 2	Asymmetrische aber typische peaks, dadurch Verschiebung der Berechnungskurve zu niedrigeren Temperaturen	Manuelle Auswertung (Manual TM)
Kategorie 3	Zwei deutlich abgrenzbare peaks (V.a. Heteroresistenz)	Auto. Auswertung des TM1 möglich → Bestätigung durch Sequenzierung
Kategorie 4	Abgeleitete Schmelzkurven mit sehr breiter Basis oder zwei oder mehr Wendepunkten	→ Sequenzierung <i>Befund: V.a. Heteroresistenz</i>
Kategorie 5	Typischer peak mit einem von den Positivkontrollen deutlich differenzierbaren TM	V.a. bisher mit diesem Testverfahren nicht identifizierte Mutation → Identifizierung mittels Sequenzierung <i>Befund: V.a. neue Mut.</i>
Kategorie 6	stark oszillierende Schmelzkurve, inhomogene Schulterbildung (Artefakt)	Wiederholung der Probe, evtl. alternative Aufbereitungsmethoden <i>Befund: Artefakt</i>
Kategorie 7	Schmelzkurve analog Negativkontrolle, keine Amplifikation: Zu wenig DNA, Inhibition der PCR oder atypische Mykobakterien	Wiederholung, alternative Aufbereitungsmethoden, Speziesidentifikation <i>Befund: d.n.ampl.</i>

gyrA LightCycler® Test

Ergebnisdokumentation

B: Schmelzkurvenanalyse

Lab.Nr.	Crossing point	Kategorie	TM1	Δ TM (WT)	Δ TM (95)	Δ TM (90)
1	25,21	1	60,38	6,40	4,85	0,00
2	19,51	1	65,23	1,55	0,00	-4,85
3	17,48	1	64,96	1,82	0,27	-4,58
4	18,85	1	59,99	6,79	5,24	0,39
5	23,1	1	64,98	1,80	0,25	-4,60
6	26,3	1	60,17	6,61	5,06	0,21
7	22,62	1	66,41	0,37	-1,18	-6,03
8	19,31	1	66,64	0,14	-1,41	-6,26
9	23,7	1	66,44	0,34	-1,21	-6,06
10	20,44	1	66,77	0,01	-1,54	-6,39
11	20,58	1	66,64	0,14	-1,41	-6,26
12	20,67	1	66,73	0,05	-1,50	-6,35
13	19,58	4	66,89	n/a	n/a	n/a
14	17,87	1	66,94	-0,16	-1,71	-6,56
15	17,99	2	66,92	-0,14	-1,69	-6,54
16	18,51	1	66,80	-0,02	-1,57	-6,42
17	17,16	1	66,81	-0,03	-1,58	-6,43
18	18,52	1	66,74	0,04	-1,51	-6,36
19	19,94	1	66,70	0,08	-1,47	-6,32
20	18,68	1	66,92	-0,14	-1,69	-6,54
21	15,94	1	65,10	1,68	0,13	-4,72
30	21,08	1	66,64	0,14	-1,41	-6,26
36	16,81	1	64,77	2,01	0,46	-4,39
37	15,42	4	63,53	n/a	n/a	n/a

C: Probenauswertung

Lab.Nr.	Name	Geb.Datum	Pat.ID	Genotyp	Bemerkungen
1			R129	Mut.90	
2			R132	Mut.95	
3			R997	Mut.95	
4			R480	Mut.90	
5			R735	Mut.95	
6			R745	Mut.90	
7			R163	WT	
8			R131	WT	
9			R130	WT	
10			R775	WT	
11			R607	WT	
12			R879	WT	
13			R196	V.a. Hetero	Sequenzierung: Hetroresistenz WT / Codon90
14			R193	WT	
15			R567	WT	
16			R273	WT	
17			R128	WT	
18			R843	WT	
19			R6	WT	
20			R683	WT	
21			R620	Mut.95	
30			R774	WT	
36			R608	Mut.95	
37			R59	V.a. Hetero	Sequenzierung: Hetroresistenz WT / Codon90

E Verteilung der gyrA Mutationen klinischer Isolate

Publikation	Klinische Stämme																	
	Asp94→Asn		Asp94→Ala		Asp94→His		Asp94→Gly		Asp94→Tyr		Asp94→Leu		Ala90→Val		Ser91→Pro		Gly88→Cys	
	n	MHK (µg/ml)	n	MHK (µg/ml)	n	MHK (µg/ml)	n	MHK (µg/ml)	n	MHK (µg/ml)	n	MHK (µg/ml)	n	MHK (µg/ml)	n	MHK (µg/ml)	n	MHK (µg/ml)
Takiff et al. 1994	1	>8 C	1	4 C	1	>4 C	5	>8 C	2	>8 C			3	4-8 C	1	4 C		
Cambau et al. 1994 (2)					1	32 O												
Alangaden et al. 1995	1	16 C	1	16 C														
Williams et al. 1996	1	8 O					1	8 O					4	4-8 O	1	2 O		
Xu et al. 1996 ²	3	ID ₅₀			1	ID ₅₀	2	ID ₅₀	3	ID ₅₀			2	ID ₅₀				
Perlman et al. 1997																	1	4 L
Siddiqi et al. 2002			2	?			1	?					2	?	1	?		
Johansen et al. 2003							2	>8 C										
Cheng et al. 2004	1	8 O	3	8 O	3	16 O	11	4-16 O	5	16 O			5	4-16 O	4	2-4 O		
Post et al. 2004 ⁵							3	2+ O					2	2+ O				
Giannoni et al. 2005	1	4 C	1	4 C			4	4 C					9	4-8 C	2	4 C		
Diese Publikation							6	>4					5	>4				
Gesamt	8	4+	8	4+	6	>4	35	2+	10	>8			32	2+	9	2+	1	4
%	7		7		6		32		9				29		8		1	
Sullivan et al. 1995	min. 1	?	min. 1	?	min. 1	?	min. 1	?	min. 1	?			min. 1	?				
Yew et al. 2002	keine Angaben																	
Laborinduzierte Stämme																		
Takiff et al 1994	1												4	>3 C			1	>3 C
Alangaden et al 1995	2	16 C											1	4 C				
Kocagöz et al. 1996 ¹					1	5 C			1	40 C			9 ^{*1}	C 2,5+ C	1	2,5 C		
Zou et al. 2000 ³							13	3/5 sel.	4	3/5 sel.	1	3 sel.					1	3 sel.

^{*1} 2 x einfache Mutation MHK 2,5 bzw. 5, 7 x multiple Mutationen (gyrA 91 bzw. 94 und gyrB 496) mit MHK >40

^{*2} Die beiden resistent gewerteten Stämme ohne Mutation wiesen mit einem im Vergleich zum WT 13 bzw 17-fach höheren ID50 eine ähnliches Resistenzverhalten wie die Codon 90 Mutationen auf

^{*3} Selektion der resistenten Stämme auf den als MIC angegebenen Nährböden

^{*4} Resistenzbestimmung mit E-Test

^{*5} Sensibler Stamm mit Ala90→Val Mutation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Geschätzte Inzidenz aller Formen der Tuberkulose 2003 (WHO 2005 (4)).....	7
Abbildung 2:	Prävalenz der MDR-TB unter neuen Fällen 1994 – 2002, (WHO 2004).....	10
Abbildung 3:	Wirkungsweise von <i>Hybridization Probes</i>	18
Abbildung 4:	Konzeption der <i>gyrA</i> PCR unter Verwendung des LightCycler® Systems	36
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der Probenvorbereitung	38
Abbildung 6:	Lokalisierung der Sonden und Primer der <i>gyrA</i> Real-Time-PCR	60
Abbildung 7:	Amplifikation bei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen	61
Abbildung 8:	Amplifikation unter asymmetrischen Bedingungen.....	62
Abbildung 9:	Schmelzpunktanalyse mittels des ursprünglichen <i>gyrA</i> Sensors	63
Abbildung 10:	Vergleich der Schmelzkurven bei unterschiedlichen asymmetrischer PCR-Bedingungen	65
Abbildung 11:	Optimierung der Primerkonzentrationen.....	66
Abbildung 12:	Vergleich des ursprünglichen Sets (links) mit dem mit dem Gegenstrang hybridisierenden Sondenpaar (rechts).....	67
Abbildung 13:	Schmelzkurven von Total Match und Mismatch Sonden	68
Abbildung 14:	Mutationsanalyse mit Mismatchsonden.....	69
Abbildung 15:	Asymmetrische PCR mit der Mismatchsonde 2581	71
Abbildung 16:	Magnesiumtitration nach Optimierung der Versuchsparameter	72
Abbildung 17:	Schmelzkurven von Stämmen mit Wildtyp	76
Abbildung 18:	Schmelzkurven von Stämmen mit Mutation des Codon 90	77
Abbildung 19:	Schmelzkurven von Stämmen mit Mutation des Codon 94	78
Abbildung 20:	Intraassayvergleich der Schmelzpunkte.....	79
Abbildung 21:	Interassayvergleich von Schmelzpunkten:	80
Abbildung 22:	Schmelzkurven von Stämmen mit Heteroresistenz	82
Abbildung 23:	Schmelzkurven von artifiziellen Heteroresistenzen	83
Abbildung 24:	Schmelzpunktanalyse aller hochresistenter Stämme	84
Abbildung 25:	Schmelzkurven von 28 phänotypisch sensible Stämmen.....	86
Abbildung 26:	Speziesspezifität der <i>gyrA</i> Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System.....	88
Abbildung 27:	Gelelektrophoretischer Nachweis der Speziesspezifität der Primer.....	89
Abbildung 28:	Gelelektrophorese der Amplifikate aus Sputumproben bzw. mit hDNA.....	90
Abbildung 29:	Schmelzkurven von mit Mykobakterien versetzten Sammelsputen...91	
Abbildung 30:	Fingerprintingmuster der 13 für Chinolone phänotypisch hochresistenten Stämme des SRL Gautings.....	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Pipetierschema für das Spiken von 1,8 ml Sammelsputum	22
Tabelle 2:	Pipetierschema für die Herstellung von Stammlösungen für medikamentenhaltige Nährböden	33
Tabelle 3:	Verwendete Primer und Sonden der gyrA Real-Time PCR.....	37
Tabelle 4:	Mastermix der gyrA PCR unter Verwendung der LightCycler® Systems	40
Tabelle 5:	Parameter bei der Durchführung der gyrA PCR unter Verwendung des LightCycler® Systems	41
Tabelle 6:	Zuordnung von Schmelzprofilen zu Kategorien.....	74
Tabelle 7:	Mutationsanalyse chinolonresistenter Stämme mittels der gyrA Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System	85
Tabelle 8:	Validierung der gyrA Real-time-PCR basierend auf dem LightCycler® System.....	87
Tabelle 9:	Zusammenfassung der Sensitivität und des Zeitbedarfs unterschiedlicher Methoden zum Nachweis von Mykobakterien und ihren Resistenzen.....	92
Tabelle 10:	Verteilung der gyrA-Mutationen in klinischen Stämmen.....	99
Tabelle 11:	GyrA Mutationen in klinischen Isolaten von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	103

Abkürzungsverzeichnis

BCG	Bacille Calmette-Guérin (Tuberkulose – Lebendimpfstoff)
bp	base pairs (Basenpaare)
CFU	colony forming units (Kolonienbildende Einheiten)
C_{\max}	Maximale Serumkonzentration ($\mu\text{g/ml/70 kg}$)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOTS	Directly Observed Therapy, Short course
dpi	dots per inch
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBA	early bactericidal activity (frühe bakterizide Aktivität)
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
gyrA	Gyrase A
ID ₅₀	Inhibitory Dosis (benötigte Medikamentendosis um das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur um 50% zu reduzieren)
KBE	Kolonien bildende Einheiten
<i>M. tub.</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MHK	Minimale Hemmkonzentration
n	Anzahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information, National Institute of Health, USA
ntc	negative template control (Negativkontrolle)
p.o.	per os (orale Medikamentengabe)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasenkettenreaktion)
ptc	positive template control (Positivkontrolle)
QRDR	Quinolone resistance determining region
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RRDR	Rifampicin resistance determining region
Sm+/Sm-	Sputum smear positive / negativ (Mikroskopisch positiver / negativer Sputumaustrich)
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
SRL	Supranationales Referenzlabor der WHO für Mykobakterien
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism
Ssp.	Subspezies
TB	Tuberkulose
U	Unit(s) (Maßeinheit für Enzyme)
UNION	Union against tuberculosis and lung diseases
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)

Literaturverzeichnis

- DIN 58943-32 :Medizinische Mikrobiologie TUBERKULOSEDIAGNOSTIK Teil 32: Mikroskopische Methoden zum Nachweis von Mykobakterien.
- Aitken, M. L., R. Sparks, et al. (1984). "Predictors of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis." Am Rev Respir Dis **130**(5): 831-3.
- Alangaden, G. J., E. K. Manavathu, et al. (1995). "Characterization of fluoroquinolone-resistant mutant strains of Mycobacterium tuberculosis selected in the laboratory and isolated from patients." Antimicrob Agents Chemother **39**(8): 1700-3.
- Albert, H., A. P. Trollip, et al. (2002). "Rapid indication of multidrug-resistant tuberculosis from liquid cultures using FASTPlaqueTB-RIF, a manual phage-based test." Int J Tuberc Lung Dis **6**(6): 523-8.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-402.
- Alvarez-Freites, E. J., J. L. Carter, et al. (2002). "In vitro and in vivo activities of gatifloxacin against Mycobacterium tuberculosis." Antimicrob Agents Chemother **46**(4): 1022-5.
- Banerjee, A., E. Dubnau, et al. (1994). "inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis." Science **263**(5144): 227-30.
- Bates, J. H. and W. W. Stead (1993). "The history of tuberculosis as a global epidemic." Med Clin North Am **77**(6): 1205-17.
- BayerHealthCareAG (2005). Bayer und TB Alliance starten weltweites Tuberkulose-Studienprogramm mit Moxifloxacin.
- Beaglehole, R., R. Bonita, et al. (1993). Basic Epidemiology, WHO.
- Bearden, D. T. and L. H. Danziger (2001). "Mechanism of action of and resistance to quinolones." Pharmacotherapy **21**(10 Pt 2): 224S-232S.
- Bergstermann, H. and A. Ruchardt (1997). "Ciprofloxacin once daily versus twice daily for the treatment of pulmonary tuberculosis." Infection **25**(4): 227-32.
- Bishop, P. J. and G. Neumann (1970). "The history of the Ziehl-Nielsen stain." Tubercle **51**: 196-206.
- Bonnet, M., V. Sizaire, et al. (2005). "Does one size fit all? Drug resistance and standard treatments: results of six tuberculosis programmes in former Soviet countries." Int J Tuberc Lung Dis **9**(10): 1147-54.
- Brosch, R., S. V. Gordon, et al. (2002). "A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3684-9.

-
- Brown RA, L. M., Wittwer, CT (1998). Rapid cycle amplification for construction of competitive templates, in genetic engineering with PCR. T. R. Horton RM. Norfolk, England, Horizon scientific press: 57-70.
- Bryskier, A. and J. Lowther (2002). "Fluoroquinolones and tuberculosis." Expert Opin Investig Drugs **11**(2): 233-58.
- Cambau, E., W. Sougakoff, et al. (1994 (2)). "Selection of a gyrA mutant of Mycobacterium tuberculosis resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin." J Infect Dis **170**(2): 479-83.
- Canetti, G., W. Fox, et al. (1969). "Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes." Bull World Health Organ **41**(1): 21-43.
- Cheng, A. F., W. W. Yew, et al. (2004). "Multiplex PCR amplicon conformation analysis for rapid detection of gyrA mutations in fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates." Antimicrob Agents Chemother **48**(2): 596-601.
- Cole, S. T., R. Brosch, et al. (1998). "Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence." Nature **393**(6685): 537-44.
- Collins, C. H. (1955). "A streptomycin disc technique for screening resistant strains of tubercle bacilli." Tubercle **36**(6): 182-4; passim.
- Collins, C. M., J. M. Grange, et al. (1997). Tuberculosis Bacteriology: Organization and Practice, Butterworth&Heinemann.
- Coninx, R., G. E. Pfyffer, et al. (1998). "Drug resistant tuberculosis in prisons in Azerbaijan: case study." Bmj **316**(7142): 1423-5.
- Council, M. R. (1948). "Streptomycin treatment of pulmonary tuberculosis: a Medical Research Council Investigation." Br Med J **2**: 769-782.
- David, H. L. (1970). "Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of Mycobacterium tuberculosis." Appl Microbiol **20**(5): 810-4.
- Dolzani, L., M. Rosato, et al. (2004). "Mycobacterium tuberculosis isolates belonging to katG gyrA group 2 are associated with clustered cases of tuberculosis in Italian patients." J Med Microbiol **53**(Pt 2): 155-9.
- Drobniewski, F., Y. Balabanova, et al. (2002). "Rifampin- and multidrug-resistant tuberculosis in Russian civilians and prison inmates: dominance of the Beijing strain family." Emerg Infect Dis **8**(11): 1320-6.
- Drobniewski, F. A., R. Atun, et al. (2004). "The 'bear trap': the colliding epidemics of tuberculosis and HIV in Russia." Int J STD AIDS **15**(10): 641-6.
- EMA (1998). Guideline on Validation of analytical procedures: Definition and Terminology. VICH Topic GL1 (Validation: Definition).

-
- Espasa, M., J. Gonzalez-Martin, et al. (2005). "Direct detection in clinical samples of multiple gene mutations causing resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampicin using fluorogenic probes." J Antimicrob Chemother **55**(6): 860-5.
- Feldmann, K. (2001). "Diagnostische Standards und neue Methoden in der Mykobakteriologie." Der Bay. Int. **21**(4): 198 - 212.
- Giannoni, F., E. Iona, et al. (2005). "Evaluation of a new line probe assay for rapid identification of *gyrA* mutations in *Mycobacterium tuberculosis*." Antimicrob Agents Chemother **49**(7): 2928-33.
- Ginsburg, A. S., J. H. Grosset, et al. (2003). "Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance." Lancet Infect Dis **3**(7): 432-42.
- Ginsburg, A. S., S. C. Woolwine, et al. (2003). "The rapid development of fluoroquinolone resistance in *M. tuberculosis*." N Engl J Med **349**(20): 1977-8.
- Gorzynski, E. A., S. I. Gutman, et al. (1989). "Comparative antimycobacterial activities of difloxacin, temafloxacin, enoxacin, pefloxacin, reference fluoroquinolones, and a new macrolide, clarithromycin." Antimicrob Agents Chemother **33**(4): 591-2.
- Goyal, M., R. J. Shaw, et al. (1997). "Rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis." Eur Respir J **10**(5): 1120-4.
- Grimaldo, E. R., T. E. Tupasi, et al. (2001). "Increased resistance to ciprofloxacin and ofloxacin in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients seen at a tertiary hospital in the Philippines." Int J Tuberc Lung Dis **5**(6): 546-50.
- Harries, A., D. Maher, et al. (2004). TB/HIV: A clinical manual. Geneva, WHO.
- Heifets, L., J. Simon, et al. (2005). "Capreomycin is active against non-replicating *M. tuberculosis*." Ann Clin Microbiol Antimicrob **4**(1): 6.
- Honeybourne, D., R. Wise, et al. (1987). "Ciprofloxacin penetration into lungs." Lancet **May 2**: 1040.
- Hooper, D. C., J. S. Wolfson, et al. (1986). "Genetic and biochemical characterization of norfloxacin resistance in *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **29**(4): 639-44.
- Iseman, M. D. (2000). "Tuberculosis-still the #1 killer in infectious diseases." Int J Clin Pract Suppl(115): 78.
- Jacobs, M. R. (1999). "Activity of quinolones against mycobacteria." Drugs **58 Suppl 2**: 19-22.
- Jacobs, M. R. (2004). "Fluoroquinolones as chemotherapeutics against mycobacterial infections." Curr Pharm Des **10**(26): 3213-20.
- Ji, B., N. Lounis, et al. (1998). "In vitro and in vivo activities of moxifloxacin and clinafloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*." Antimicrob Agents Chemother **42**(8): 2066-9.

- Johansen, I. S., A. R. Larsen, et al. (2003). "Drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to fluoroquinolones: first experience with a quality control panel in the Nordic-Baltic collaboration." Int J Tuberc Lung Dis **7**(9): 899-902.
- Joloba, M. L., S. Bajaksouzian, et al. (2000). "Evaluation of Etest for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis." J Clin Microbiol **38**(10): 3834-6.
- Karak, K. and P. K. De (1995). "Comparative in vitro activity of fluoroquinolones against Mycobacterium tuberculosis." Indian J Med Res **101**: 147-9.
- Kocagoz, T., C. J. Hackbarth, et al. (1996). "Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of Mycobacterium tuberculosis H37Ra." Antimicrob Agents Chemother **40**(8): 1768-74.
- Koch, R. (1912 (Nachdruck 1968)). Die Ätiologie und die Bekämpfung der Tuberkulose, Zentralantiquariat der DDR (Unveränderter Nachdruck der Ausgabe von L. A. Barth, Leipzig).
- Konietzko, N. H. (1996). Der Kampf gegen die Tuberkulose: 100 DZK / [Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose(DZK)]. Frankfurt am Main, pmi Verlagsgruppe.
- Kremer, K., J. R. Glynn, et al. (2004). "Definition of the Beijing/W lineage of Mycobacterium tuberculosis on the basis of genetic markers." J Clin Microbiol **42**(9): 4040-9.
- Lay, M. J. and C. T. Wittwer (1997). "Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR." Clic Chem **43**: 2262-2267.
- Lee, A. S., L. L. Tang, et al. (2002). "Characterization of pyrazinamide and ofloxacin resistance among drug resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Singapore." Int J Infect Dis **6**(1): 48-51.
- Leppmeier, B., Reischl, U "Method for the Isolation of Mycobacterial DNA." Roche Molecular Biochemicals Application Note No. HP2 zu Cat. No. 1 796 828.
- Lounis, N., A. Bentoucha, et al. (2001). "Effectiveness of once-weekly rifapentine and moxifloxacin regimens against Mycobacterium tuberculosis in mice." Antimicrob Agents Chemother **45**(12): 3482-6.
- Marks, J. (1961). "The design of sensitivity tests on tubercle bacilli." Tubercle **42**: 314-6.
- Marttila, H. J., H. Soini, et al. (1998). "Rapid detection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis by sequencing and line probe assay." Scand J Infect Dis **30**(2): 129-32.
- Meissner, G. (1964). "[the Current Position of Culture and Animal Tests in the Diagnosis of Tuberculosis. Ii. The Significance of Isoniazid Resistance and Bacterial Count.]." Prax Pneumol **18**: 781-97.
- Meuer, S., C. T. Wittwer, et al. (2001). Rapid Cycle Real-Time PCR. Heidelberg, Springer.
- Mitchison, D. A. (2005). "Drug resistance in tuberculosis." Eur Respir J **25**(2): 376-9.

- Mokrousov, I., T. Otten, et al. (2002). "Detection of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by a multiplex allele-specific PCR assay targeting katG codon 315 variation." J Clin Microbiol **40**(7): 2509-12.
- Montero, C., G. Mateu, et al. (2001). "Intrinsic resistance of Mycobacterium smegmatis to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA." Antimicrob Agents Chemother **45**(12): 3387-92.
- Mor, N., J. Vanderkolk, et al. (1994). "Inhibitory and bactericidal activities of levofloxacin against Mycobacterium tuberculosis in vitro and in human macrophages." Antimicrob Agents Chemother **38**(5): 1161-4.
- Muzaffar, R., S. Batool, et al. (2002). "Evaluation of the FASTPlaqueTB assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens." Int J Tuberc Lung Dis **6**(7): 635-40.
- Nachamkin, I., C. Kang, et al. (1997). "Detection of resistance to isoniazid, rifampin, and streptomycin in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis by molecular methods." Clin Infect Dis **24**(5): 894-900.
- Nunn, P., B. Williams, et al. (2005). "Tuberculosis control in the era of HIV." Nat Rev Immunol **5**(10): 819-26.
- Onodera, Y., M. Tanaka, et al. (2001). "Inhibitory activity of quinolones against DNA gyrase of Mycobacterium tuberculosis." J Antimicrob Chemother **47**(4): 447-50.
- Perlman, D. C., W. M. El Sadr, et al. (1997). "Susceptibility to levofloxacin of Mycobacterium tuberculosis isolates from patients with HIV-related tuberculosis and characterization of a strain with levofloxacin monoresistance. Community Programs for Clinical Research on AIDS 019 and the AIDS Clinical Trials Group 222 Protocol Team." Aids **11**(12): 1473-8.
- Piddock, L. J. (1999). "Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998." Drugs **58 Suppl 2**: 11-8.
- Pletz, M. W., A. De Roux, et al. (2004). "Early bactericidal activity of moxifloxacin in treatment of pulmonary tuberculosis: a prospective, randomized study." Antimicrob Agents Chemother **48**(3): 780-2.
- Post, F. A., P. A. Willcox, et al. (2004). "Genetic polymorphism in Mycobacterium tuberculosis isolates from patients with chronic multidrug-resistant tuberculosis." J Infect Dis **190**(1): 99-106.
- Quiagen (2001). Quiagen Genomic DNA Handbook.
- Ramaswamy, S. and J. M. Musser (1998). "Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update." Tuber Lung Dis **79**(1): 3-29.
- Rastogi, N., B. C. Ross, et al. (1992). "Emergence during unsuccessful chemotherapy of multiple drug resistance in a strain of Mycobacterium tuberculosis." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **11**(10): 901-7.

-
- Reichman, L. B., Hersfield, E. S. (2000). Tuberculosis: A comprehensive international approach, Marcel Dekker, Inc.
- Rinder, H., K. Feldmann, et al. (1999). "Culture-independent prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by *katG* gene analysis directly from sputum samples." Mol Diagn **4**(2): 145-52.
- Rinder, H., K. T. Mieskes, et al. (2001). "Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*." Int J Tuberc Lung Dis **5**(4): 339-45.
- Rossau, R., H. Traore, et al. (1997). "Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin." Antimicrob Agents Chemother **41**(10): 2093-8.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Sequiserve Bahnhofstraße 30, 85591 Vaterstetten, www.sequiserve.de.
- Shoemaker, S. A. (1986). "Molecular biology and mycobacteria." Semin Respir Infect **1**(4): 265-9.
- Siddiqi, N., R. Das, et al. (2004). "Mycobacterium tuberculosis isolate with a distinct genomic identity overexpresses a tap-like efflux pump." Infection **32**(2): 109-11.
- Siddiqi, N., M. Shamim, et al. (2002). "Molecular characterization of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients in North India." Antimicrob Agents Chemother **46**(2): 443-50.
- Sindelar, G., X. Zhao, et al. (2000). "Mutant prevention concentration as a measure of fluoroquinolone potency against mycobacteria." Antimicrob Agents Chemother **44**(12): 3337-43.
- Sougakoff, W., N. Lemaitre, et al. (1997). "Nonradioactive single-strand conformation polymorphism analysis for detection of fluoroquinolone resistance in mycobacteria." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **16**(5): 395-8.
- Steiner, P., M. Rao, et al. (1985). "Primary drug-resistant tuberculosis in children. Correlation of drug-susceptibility patterns of matched patient and source case strains of *Mycobacterium tuberculosis*." Am J Dis Child **139**(8): 780-2.
- Sullivan, E. A., B. N. Kreiswirth, et al. (1995). "Emergence of fluoroquinolone-resistant tuberculosis in New York City." Lancet **345**(8958): 1148-50.
- Takiff, H. E., M. Cimino, et al. (1996). "Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 362-6.
- Takiff, H. E., L. Salazar, et al. (1994). "Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations." Antimicrob Agents Chemother **38**(4): 773-80.

-
- Telenti, A., P. Imboden, et al. (1993). "Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*." Lancet **341**(8846): 647-50.
- Telenti, A., P. Imboden, et al. (1993). "Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis." Antimicrob Agents Chemother **37**(10): 2054-8.
- Thomas, L., P. Naumann, et al. (1986). "[In vitro activity of ciprofloxacin and ofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. africanum*, *M. kansasii* and BCG strains]." Immun Infekt **14**(6): 203-7.
- Torres, M. J., A. Criado, et al. (2001). Rapid Detection of Resistance Associated Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* by LightCycler PCR. Priprint from Rapid Cycle Real-Time PCR Methods and Applications: Microbiology and Food Analysis. U. Reischl, C. T. Wittwer and F. Cockerill, Springer Verlag.
- Torres, M. J., A. Criado, et al. (2000). "Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*." J Clin Microbiol **38**(9): 3194-9.
- Torres, M. J., A. Criado, et al. (2003). "Improved real-time PCR for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates." Diagn Microbiol Infect Dis **45**(3): 207-12.
- Tsukamura, M., S. Mizuno, et al. (1984). "[In vitro antituberculous activity of DL8280 on *Mycobacterium tuberculosis*. The mode of bacteriostatic activity, bactericidal activity, cross-resistance and combined effect with other antituberculous agent]." Kekkaku **59**(7): 429-34.
- Tsukamura, M., E. Nakamura, et al. (1985). "Therapeutic effect of a new antibacterial substance ofloxacin (DL8280) on pulmonary tuberculosis." Am Rev Respir Dis **131**(3): 352-6.
- van Soolingen, D., P. E. de Haas, et al. (1993). "Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*." J Clin Microbiol **31**(8): 1987-95.
- van Soolingen, D., P. E. de Haas, et al. Manual For Fingerprinting of *M. tuberculosis* Strains. Bilthoven, The Netherlands, National Institute of Public Health and Environmental Protection.
- Victor, T. C., P. D. van Helden, et al. (2002). "Prediction of drug resistance in *M. tuberculosis*: molecular mechanisms, tools, and applications." IUBMB Life **53**(4-5): 231-7.
- Vincke, G., O. Yegers, et al. (1982). "Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a radiometric technique." J Antimicrob Chemother **10**(4): 351-4.
- Viveiros, M., C. Leandro, et al. (2003). "Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications." Int J Antimicrob Agents **22**(3): 274-8.
- Viveiros, M., C. Leandro, et al. (2005). The Lisbon-fast track TB programm ensures the fastest turnaround time possible for the diagnosis of MDR-TB. ESM 2005, Istanbul.

- Wada, T., S. Maeda, et al. (2004). "Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR." J Clin Microbiol **42**(11): 5277-85.
- Wade, M. M. and Y. Zhang (2004). "Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." Front Biosci **9**: 975-94.
- Walsh, P. S., D. A. Metzger, et al. (1991). "Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material." Biotechniques **10**(4): 506-13.
- WHO (1997). Treatment of tuberculosis: Guidelines for national programmes (WHO/TB/97.220). Geneva.
- WHO (2001). Guidelines for drug susceptible testing for second line anti-tuberculosis drugs for DOTS-PLUS (WHO/CDS/TB/2001.288). Geneva.
- WHO (2003). Guidelines for surveillance of drug resistance testing in tuberculosis.
- WHO (2003 (2)). "A prioritised research agenda for DOTS-Plus for multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)." INT J TUBERC LUNG DIS **7**(5): 410-414.
- WHO (2004). Anti-Tuberculosis Drug Resistance In The World; Third Global Report (WHO/HTM/TB/2004.343). Geneva, World Health Organization.
- WHO (2005 (1)). Fact Sheet 2005: Tuberculosis - The Global Burden, http://www.who.int/tb/publications/tb_global_facts_sep05_en.pdf.
- WHO (2005 (2)). ["http://www.who.int/tb/features_archive/tb_emergency_declaration/en/index.html."](http://www.who.int/tb/features_archive/tb_emergency_declaration/en/index.html)
- WHO (2005 (3)). ["http://www.euro.who.int/eprise/main/WHO/features/2005/featuretb/TopPage."](http://www.euro.who.int/eprise/main/WHO/features/2005/featuretb/TopPage)
- WHO (2005 (4)). Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2005. (WHO/HTM/TB2005.349). Geneva, World Health Organization.
- WHO (2006). "Addressing the threat of tuberculosis caused by extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*." Weekly epidemiological record WHO STOB TB pre-publication version for the website (September 2006, 81 year).
- WHO/UNION (1994). "The promise and reality of fixed-dose combinations with rifampicin. A joint statement of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease and the Tuberculosis Programme of the World Health Organization." Tuber Lung Dis **75**(3): 180-1.
- Williams, K. J., R. Chan, et al. (1996). "gyrA of ofloxacin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hong Kong." J Antimicrob Chemother **37**(5): 1032-4.
- Wittwer, C. T. (2001). Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications. Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications. S. Mueuer, C. T. Wittwer and K. Nakagawara. Heidelberg, Springer: 1-8.

- Wittwer, C. T., G. B. Reed, et al. (1994). Rapid Cycle DNA Amplifikation. The polymerase chain reaction. K. Mullis, F. Ferre and R. Gibbs, Springer-Verlag: 174-181.
- Wittwer, C. T., K. M. Ririe, et al. (1997). "The LightCycler: A microvolume multisample fluorimeter with rapid temperatur control." Biotechniques **22**: 176-181.
- Woodcock, J. M., J. M. Andrews, et al. (1997). "In vitro activity of BAY 12-8039, a new fluoroquinolone." Antimicrob Agents Chemother **41**(1): 101-6.
- Xu, C., B. N. Kreiswirth, et al. (1996). "Fluoroquinolone resistance associated with specific gyrase mutations in clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*." J Infect Dis **174**(5): 1127-30.
- Yew, W. W., E. Chan, et al. (2002). "Genotypic and phenotypic resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifamycins and fluoroquinolones." Int J Tuberc Lung Dis **6**(10): 936-7.
- Zhang, Y., B. Heym, et al. (1992). "The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*." Nature **358**(6387): 591-3.
- Zhao, X. and K. Drlica (2002). "Restricting the selection of antibiotic-resistant mutant bacteria: measurement and potential use of the mutant selection window." J Infect Dis **185**(4): 561-5.
- Zhou, J., Y. Dong, et al. (2000). "Selection of antibiotic-resistant bacterial mutants: allelic diversity among fluoroquinolone-resistant mutations." J Infect Dis **182**(2): 517-25.
- Zink, A. R., C. Sola, et al. (2003). "Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping." J Clin Microbiol **41**(1): 359-67.

Eigene Publikationen:

- A. Färber, M. Frankenberger, K. Feldmann (2003): „Direktnachweis von Resistenzmutationen im rpoB und katG Gen bei *Mycobacterium tuberculosis* aus Sputum mittels der LightCycler® PCR“; Poster auf dem 44. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, München 2003
- A. Faerber, K. Feldmann (2003): "Direct determination of resistance-inducing mutations in the rpoB and katG genes of *mycobacterium tuberculosis* from sputum by the LightCycler® PCR"; 22nd IUATLD Eastern Conference Kathmandu, Nepal 2003
- A. Faerber, K. Feldmann (2005): "Direct characterisation of AFB positive sputum by a gyrA targeted PCR on the LightCycler®-System: Simultaneous identification of the *Mycobacterium tuberculosis* - complex and prediction of the Ciprofloxacin resistance."; Plenarsaalvortrag ESM2005 (26th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology); Istanbul, Turkey 2005
- A. Faerber, K. Feldmann (2005): "Molecular epidemiological characterisation of quinolone resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* by IS6110 fingerprinting" Int J Tuberc Lung Dis **9**(11): S193 – S194

Software:

- Microsoft® Word 2002 (Microsoft)
- Microsoft® Excel 2002 (Microsoft)
- Microsoft® PowerPoint 2002 (Microsoft)
- Microsoft Picture It! Foto v7.0(Microsoft)
- TM Utility Software v. 1.5 (Idaho Technology Inc.)
- GelCompar® Version 2.5 (Applied Math)
- LightCycler Software Version 3.5 (Roche Molecular Diagnostics)
- EndNote® for Students V6 (Thomson ISI Researchsoft)

Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. Dr. med. Knut Feldmann möchte ich mich dafür bedanken, mir einen tiefen Einblick in die Bedeutung der Tuberkulosebekämpfung gewährt zu haben. Meine nachhaltige Begeisterung für diese Thematik begründet sich auf dem produktiven Austausch, den er mir stets ermöglichte, und seine Bereitwilligkeit, mich bei zahlreichen Kongressen und WHO-Veranstaltungen in die „*TB-Community*“ zu integrieren. Durch die Mitarbeit bei einigen Projekten des Kuratoriums Tuberkulose in der Welt e.V. konnte ich dabei selbst erste praktische Erfahrungen sammeln. Professor Feldmann verdanke ich auch die Überlassung des Themas molekularbiologische Resistenztestung mittels der Real-Time PCR auf dem LightCycler® System. Während der Arbeit stand er mir bei technischen Schwierigkeiten immer zur Seite und motivierte mich mit neuen Ideen. Dr. med. Harald Hoffmann unterstützte mich nach der Übernahme der Laborleitung nach Kräften. Ich danke Ihm vor allem für die Anregungen bezüglich möglicher Veröffentlichungsstrategien für Teile dieser Arbeit. Professor Dr. med. Karl Häußinger danke ich für die Übernahme der Mitbetreuung dieser Dissertation und für die Möglichkeit, mir auch klinisch ein Bild von Tuberkulosekranken machen zu können.

Mein besonderer Dank gilt auch sämtlichen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Laboratoriumsmedizin an den Asklepios Fachkliniken München-Gauting für ihre Geduld und ihre großzügige praktische Unterstützung im Laboralltag. Neben Herrn Dr. Mohamed Rifai seien an dieser Stelle insbesondere die Mitarbeiter im Tuberkuloselabor hervorgehoben: Antje Beneke, Elke Schmidt, Katrin Stehr, Rosi Spatz, Heide Beutler und Tine Tunger. Frau Dr. Marion Frankenberger vom GSF-Institut für Inhalationsbiologie Gauting stellte im Anfangsstadium dieses Projekts das LightCycler® System zur Verfügung und half mir über erste technische Hürden hinweg.

Diese Arbeit wurde vor allem durch die finanzielle und technische Unterstützung durch Roche Molecular Diagnostics, Penzberg ermöglicht. In diesem Zusammenhang möchte ich mich besonders bei Frau Dr. Sabine Lohmann und Frau Dr. Ulrike Salat bedanken, die mir mit Ihrer großen fachlichen Kompetenz stets zur Seite standen und mich beim Design der Sonden und bei vielen weiteren technischen Fragestellungen unterstützen.

Schließlich möchte ich meinen Eltern Helga und Eberhard Färber danken, für ihre Geduld und ihre Unterstützung, und dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben.

Lebenslauf Andreas Färber:

geboren: 31.12.1970 in München
 Anschrift: Brennergasse 8a
 87435 Kempten
 e-mail: andreas@faerber.net
 Nationalität: deutsch
 Familienstand: ledig

Berufliche Laufbahn:

- 2006 – Klinikum Kempten**
 I. Medizinische Abteilung (Gastroenterologie, Leitung Dr. med. Angeli) seit 04/2006
- 2002 - 2006 Asklepios Fachkliniken München-Gauting**
 Arzt in der klinischen Forschung am Institut für Laboratoriumsmedizin (Leitung Prof. Dr. Dr. med. K. Feldmann) 08/2002 bis 03/2006
 Forschungsprojekt in Kooperation mit Roche Molecular Diagnostics, Penzberg:
 Genotypische Resistenztestung bei *Mycobacterium tuberculosis*
- Arzt im Praktikum:**
- 2000 - 2001 Städtisches Krankenhaus München Harlaching**
 II. Medizinische Abteilung (Nephrologie, Leitung Prof. Dr. J. E. Scherberich)
 07/2000 bis 10/2001
- 2000 Interne Klinik Dr. Argirov**
 Innere Abteilung 04/2000 bis 06/2000

Zusätzliche Qualifikationen:

- Diploma of tropical medicine and public health
- Reisemedizin

Mitgliedschaften:

- Kuratorium Tuberkulose in der Welt e.V., Gauting (seit 2002), Mitglied des geschäftsführenden Ausschusses (seit 2005)
- International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases

Universitäre Laufbahn:

- 2001 - Humboldt - Universität Berlin**
- Teilzeitstudium (postgraduate program) International Health (Abschluss Master of Science) im Rahmen des TropED Programms.
 - Core Course in Tropenmedizin und Public Health, Kurse zu klinischer Tropenmedizin (01 bis 03/2002 in Moshi, Tansania) und Impfstoffkunde.
- 1994 – 1998 Ludwig-Maximilians-Universität, München**
- Dezember 1998: Abschluß des Studiums der Humanmedizin
- 1991 - 1994 Medizinische Universität zu Lübeck**

Schulische Laufbahn:

- 1981 – 1991 Ernst-Mach-Gymnasium Haar**
 Abschluss 1991 mit der Allgemeinen Hochschulreife
 Leistungskurse: Physik und Biologie
- 1977-1981 Grundschule am Jagdfeld, Haar**