

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
der Medizinischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Löscher

**Longitudinale Untersuchung zum Einfluss der Heteroresistenz auf die Entwicklung von
Resistenzen bei *Mycobacterium tuberculosis* unter Therapie**

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

vorgelegt von
Anja Trumm
aus
München
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Dr. rer. nat. Heinz Rinder
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Rainer Haas
Priv. Doz. Dr. Michael Weber
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2010

Meiner Mutter

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Geschichte und gegenwärtige Bedeutung der Tuberkulose	1
1.2	Pathologie und Klinik der Tuberkulose	5
1.3	Diagnose und Therapie der antituberkulotikaresistenten Tuberkulose.....	6
1.4	Molekulare Grundlagen von Resistenzen bei <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
1.5	Heteroresistenz.....	11
2	Problemstellung und Zielsetzung	12
3	Material und Methoden.....	14
3.1	Material	14
3.1.1	Geräte	14
3.1.2	Chemikalien	14
3.1.3	Gelmaterialien.....	15
3.1.4	Enzyme	15
3.1.5	Puffer.....	15
3.1.6	Nukleotide.....	16
3.1.7	Kommerzielle “Kits”	16
3.1.8	Herkunft der Sputen.....	17
3.2	Methoden	18
3.2.1	Isolierung von Mykobakterien-DNA aus Sputum	18
3.2.2	DNA-Amplifizierung durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	21
3.2.3	PCR-Produktnachweis mittels Gelelektrophorese	23
3.2.4	DNA-Gel-Extraktion.....	23
3.2.5	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus.....	24
3.2.6	Design der Studie zur Resistenzentwicklung von Patienten mit initial heteroresistenten Primärisolaten in Bulgarien	26
4	Ergebnisse.....	28
4.1	Methodische Vorarbeiten.....	28
4.1.1	DNA-Isolationsmethoden	28
4.1.2	Vergleich zwischen kultureller und molekularer Resistenzbestimmung.....	29
4.2	Longitudinale Untersuchung zur Resistenzentwicklung von Patienten mit initial heteroresistenten Primärisolaten aus Sofia, Bulgarien	36
4.3	Charakterisierung heteroresistenter Isolate von Patienten aus Abchasien im Rahmen des EU-Projektes „LONG-DRUG“	38
4.4	Resistenzgenotypen in Abchasien zu Therapiebeginn.....	45
5	Diskussion	50
5.1	Methodische Aspekte.....	50
5.1.1	Vergleich der DNA-Isolierungsmethoden	50
5.1.2	Unterscheidung zwischen Wildtyp, mutiertem Genotyp und Heteroresistenz	50
5.2	Prädiktiver Wert von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen von Resistenzgenen.....	51
5.2.1	<i>katG</i>	51
5.2.2	<i>embB</i>	52

5.3	Auftreten resistenzverursachender Mutationen unter antituberkulotischer Therapie	54
5.4	Tauglichkeit des Nachweises von Heteroresistenz zur Vorhersage von Resistenzentwicklungen.....	57
6	Zusammenfassung.....	60
7	Ausblick	62
8	Literaturverzeichnis	63
9	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	69
10	Abkürzungsverzeichnis	71
11	Lebenslauf.....	72
12	Danksagungen	73

1 Einleitung

1.1 Die Geschichte und gegenwärtige Bedeutung der Tuberkulose

Die Tuberkulose ist noch immer eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Dabei gilt *Mycobacterium tuberculosis* im Vergleich zu anderen Krankheitserregern als noch relativ jung. Aufgrund molekularbiologischer Untersuchungen wird das Alter auf 15.300 - 20.400 Jahre geschätzt (Kapur et al., 1994). Die Entstehung der Spezies *Mycobacterium tuberculosis* geht wahrscheinlich auf eine Mutation von *Mycobacterium bovis* zurück (Brothwell et al., 1968). Allerdings zeigen erst Skelettfunde aus dem Neolithikum, also ungefähr 6.000 - 9.000 Jahre v. Chr. tuberkulöse Veränderungen. Es scheint also eine zeitliche Differenz zwischen dem ersten Auftreten von *Mycobacterium tuberculosis* und den ersten Erkrankungen beim Menschen zu geben. Transformationen der Pathogenität und der Virulenz mögen dabei ebenso eine Rolle gespielt haben wie auch die Veränderungen der Lebensbedingungen der Bevölkerung hin zu Siedlungskulturen auf engem Raum (Kayser et al., 1993). Der erste gesicherte Nachweis des Erregers gelang aus einer kindlichen ägyptischen Mumie aus dem 1. Jahrtausend v. Chr. mittels Isolation des Erregers aus pulmonalarteriellen Blut (Teschner, 1999).

In der Antike wurde erstmals versucht, Krankheiten systematisch einzuteilen. Hippokrates (460 - 370 v. Chr.) bezeichnete die Tuberkulose als Phtisis (Schwindsucht) und beschrieb charakteristische klinische Untersuchungsbefunde. Hierunter fielen jedoch auch weitere Erkrankungen, die mit Kachexie einhergehen. Die Erkrankung wurde damit erklärt, dass eitriger Schleim von Kopf und Gehirn aus dem Rest des Körpers angesaugt würde, und dass, wenn der Kopf voll dieses Schleimes wäre, dieser Schleim in die Lungen fallen würde und dort Tuberkel entstehen ließe (Brown, 1941). Der Grundsatz der Behandlung lautete „nil nocere“, denn „wenn der Arzt nicht mehr helfen kann, da schade er wenigstens nicht“ (Haeser, 1884). Wurde die Erkrankung früh genug erkannt, konnte auch mit der Herstellung von Harmonie nach der Vier-Säfte-Lehre versucht werden, die Krankheit zu behandeln. Bis zum Ende des Mittelalters änderten sich diese Behandlungsformen bis auf wenige Ausnahmen nicht (Brown, 1941).

Erst durch Obduktionen im 16. Jahrhundert konnten organische Veränderungen bei der Tuberkulose festgestellt werden. Sylvius de la Boe vermutete 1679 als erster den

Zusammenhang zwischen den Tuberkeln und der Tuberkulose. Bis zum Nachweis des Tuberkuloseerregers durch Robert Koch herrschte jedoch ein Zwiespalt über die Kontagiosität der Tuberkulose. In der 50er Jahren des 19. Jahrhunderts wies J. A. Villemin zwar die Impfbarkeit der Tuberkulose bei Kaninchen nach und folgerte daraus deren Infektiosität, bis zum endgültigen Nachweis durch die Entdeckung des Tuberkuloseerregers durch Robert Koch im Jahre 1882 blieb dies jedoch bei Kritikern umstritten.

Trotz der Entdeckung von *Mycobacterium tuberculosis* war die Erkrankung in den darauf folgenden Jahrzehnten auch weiterhin nach gesicherter Diagnose in den meisten Fällen tödlich. Mit der Heilstättenbehandlung, bei der Schwindsüchtige an einen „immunen Ort“ gebracht wurden, an dem kein Bewohner an der Tuberkulose erkrankt war, wurde versucht, die Abwehrkräfte zu stärken. Weiterhin wurden chirurgische Methoden wie ein künstlicher Pneumothorax, Lungenresektionen und Thorakoplastiken angewandt (Teschner, 1999). Trotzdem starben innerhalb der ersten vier Jahre nach Diagnosestellung 65 % der Patienten (Hahn et al., 1991). Anfang der 20er Jahre des 20. Jahrhunderts konnte ein Impfstoff eingeführt werden (Benevolo-de-Andrade et al., 2005). Ein Durchbruch in der Behandlung der Tuberkulose gelang allerdings erst durch die Entwicklung spezifischer Chemotherapeutika. Da diese eine überragende Rolle in der Therapie der Tuberkulose spielen, führt die gegenwärtige Entwicklung von Resistenzen zu einem wachsenden Problem in der Behandlung (Teschner, 1999).

Die Bedeutung, die dieser Erkrankung zukommt, wird klar, wenn man die Zahlen betrachtet: Jährlich gibt es weltweit ca. 9 Millionen Neuerkrankte, von denen ca. 4 Millionen an der sogenannten „offenen“ Tuberkulose, der ansteckenden Form, leiden. Etwa 2 Millionen Menschen sterben jährlich an Tuberkulose, mehr als an jeder anderen behandelbaren Infektionskrankheit (Robert-Koch-Institut, 2006). Ein unbehandelter Patient mit offener Tuberkulose infiziert durchschnittlich pro Jahr zwischen 10 und 15 weitere Personen, von denen ca. 5 - 10 % im Laufe ihres Lebens daran erkranken. Insgesamt ist ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem Tuberkuloseerreger infiziert. Abbildung 1.1 und Abbildung 1.2 zeigen die Verteilung der Tuberkuloseerkrankungen 2005 weltweit. So finden sich zwar in Asien in absoluten Zahlen die meisten Neuerkrankungen, bezogen auf die Bevölkerung ist jedoch in Afrika der Anteil höher. (WHO, 2007)

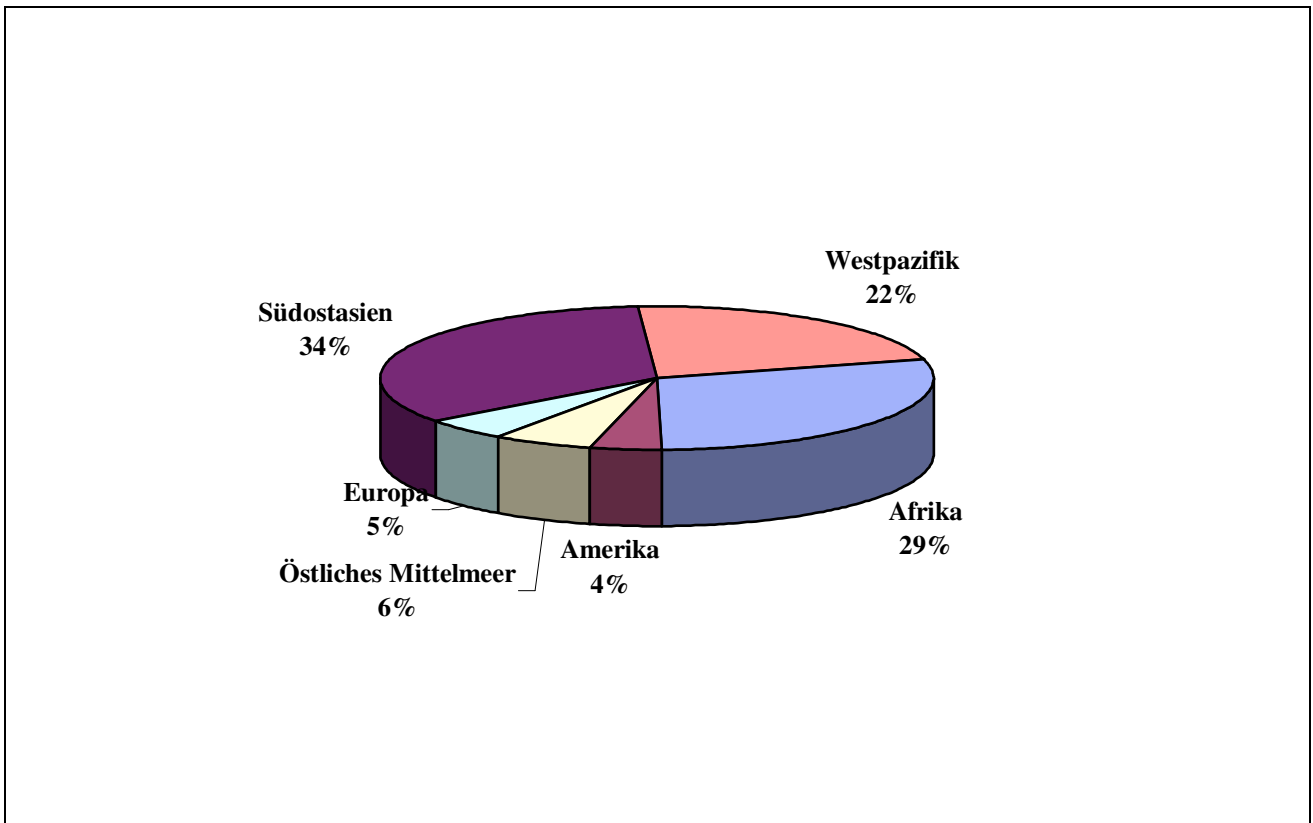


Abbildung 1.1: Geographische Verteilung der Tuberkuloseerkrankungen 2005

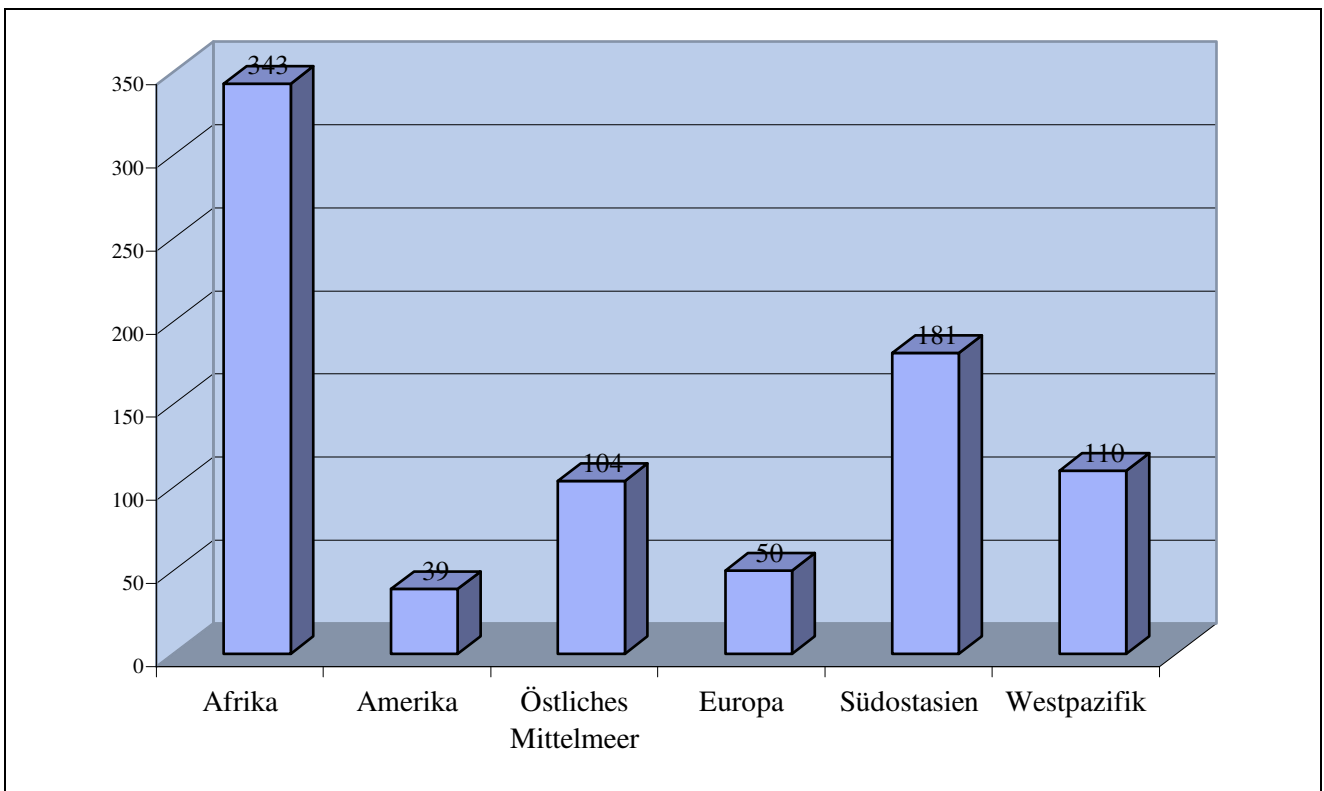


Abbildung 1.2: Weltweite Tuberkuloseinzidenz 2005 pro 100.000 Einwohner

Jährlich wird weltweit eine Zunahme der Inzidenz der Tuberkulose um ca. 1,1 % registriert. Der stärkste Anstieg ist hierbei in Osteuropa und Afrika zu verzeichnen. Die Zunahme hängt von verschiedenen, zusammenwirkenden Faktoren ab. Dazu gehören eine inadäquate antituberkulotische Chemotherapie, Migration, Armut und eine zunehmende Zahl von HIV-Infizierten (Robert-Koch-Institut, März 2005).

Bei Patienten mit AIDS ist Tuberkulose weltweit die häufigste Todesursache, unter anderem, weil Tuberkulose und HIV sich gegenseitig verstärken. So beträgt das Lebenszeitrisiko, an Tuberkulose zu erkranken, bei HIV-negativen Tuberkuloseinfizierten 5 - 10 %. Bei HIV-positiven Tuberkuloseinfizierten ist dies bereits das Erkrankungsrisiko pro Jahr (Murray, 1988).

Ein zunehmendes Problem der Behandlung und des Versuchs der Eindämmung der Tuberkulose stellt die steigende Zahl resistenter Tuberkuloseerreger dar. Durch Non-compliance und falsche Behandlungsformen wurden und werden diese Resistenzen weiter gefördert. Besonders in der ehemaligen Sowjetunion und in einigen Provinzen Chinas ist diese Form der Erkrankung weit vertreten. So waren zwischen 1999 und 2002 in Russland bis zu 37 % der Neuinfektionen gegen mindestens ein Antituberkulotikum resistent, wobei am häufigsten Resistenzen gegen Streptomycin und Isoniazid auftraten. Weltweit liegen die Resistenzen gegen mindestens eines der Antituberkulotika der ersten Wahl bei 10 %. Ebenso ist hier die Prävalenz für Streptomycin- und Isoniazidresistenzen mit 6,3 % bzw. 5,9 % relativ hoch im Vergleich zu Rifampicin- und Ethambutolresistenzen mit 1,4 % bzw. 0,8 % (Aziz et al., 2006). Weiterhin steigen die Infektionen mit multiresistenten (MDR) Mykobakterien. Hierbei wird die MDR-Tuberkulose definiert als eine Erkrankung durch Tuberkulosebakterien, die mindestens gegen Isoniazid und Rifampicin resistent sind (WHO, 2004). In einigen Regionen Russlands sind bereits über 13 % der Neuinfektionen multiresistent, der weltweite Durchschnitt liegt bei 1,1 % (Aziz et al., 2006).

Die Resistenzentwicklung des Tuberkuloseerregers stellt eine neue Herausforderung an die Wissenschaft dar. Auch in Europa muss mit einer Rückkehr und steigenden Zahlen dieser heute schon zum Teil in Vergessenheit geratenen Erkrankung gerechnet werden.

1.2 Pathologie und Klinik der Tuberkulose

Mit rein pathologischen und klinischen Untersuchungen kann nicht zwischen Infektionen mit antituberkulotikasensiblen und –resistenten Mykobakterien unterschieden werden. Natürlich kann ein fehlendes Ansprechen auf Antituberkulotika unter Therapie einen Hinweis auf Resistenzen geben, letztendlich können jedoch nur direkte Resistenztestungen des Erregers einen Beweis liefern. Zwar gibt es Hinweise, dass der Zugewinn einer Resistenz zu Lasten der „Fitness“ und des Wachstums von *Mycobacterium tuberculosis* geht und damit auch die klinische Erscheinung variieren kann, trotzdem scheinen selbst multiresistente Tuberkuloseerreger ihre Virulenz nicht oder nicht immer zu verlieren (Davies et al., 2000).

Die Tuberkulose ist eine Infektionskrankheit, die in mehreren Stadien abläuft. Als pathologisches Erscheinungsbild der Erkrankung findet sich eine granulomatöse Entzündung, die sich, im Gegensatz zu Fremdkörpergranulomen durch die Anwesenheit von Lymphozyten auszeichnet (Kaufmann et al., 1988). Die Immunantwort des betroffenen Patienten ist fast ausschließlich zellvermittelt, wobei die Epitheloidzellen eine zentrale Rolle spielen. Makrophagen zeigen im Rahmen einer verzögerten Immunantwort eine erhöhte Fähigkeit zur Phagozytose und zur intrazellulären Abtötung der Bakterien (Mariano et al., 1977). Durch die Toxizität der Mykobakterien und die Freisetzung verschiedener Zytokine kann es in den Granulomen zu einer zentralen Nekrose kommen, die als Verkäsung bezeichnet wird (Rook et al., 1987).

In der Regel wird die Tuberkulose durch die Inhalation winziger ($<10\ \mu\text{m}$) erregerehaltiger Sputumtröpfchen übertragen (Hahn et al., 1991). Der Großteil dieser Mykobakterien aus den Aerosolen wird durch Phagozytose initial von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen abgetötet. Ein Teil überlebt allerdings, vermehrt sich in den Fresszellen und verursacht deren Zelltod. Obwohl weitere Monozyten aus der Blutbahn rekrutiert werden, fehlt oft deren Aktivierung, so dass sie die Mykobakterien nicht zerstören können. Weiterhin werden die Erreger in lokale Lymphknoten transportiert, in denen sich Epitheloidzellgranulome bilden. Ab diesem Zeitpunkt ist es möglich, eine Infektion mittels Tuberkulintest nachzuweisen (Sheffield, 1994). Diese Primärinfektion, die klinisch meist inapparent verläuft, führt nach einer Latenz von fünf bis sechs Wochen zu einem Primärkomplex, der im Röntgenbild als „Ghon-Herd“ in Erscheinung tritt. Dieser Primärkomplex besteht aus dem als Primäraffekt bezeichneten Entzündungsherd sowie den lokalen Lymphknoten. Die Einschmelzung des Primärkomplexes führt zu einer Primärkaverne, die bronchogen und hämatogen streuen kann.

Mögliche Folgen sind kleine Infektionsherde in allen Organen. Diese können nach einer Reaktivierung eine so genannte „postprimäre“ Organtuberkulose verursachen.

Die primäre Tuberkulose kann sich mit Symptomen wie Nachtschweiß, Husten, subfebrilen Temperaturen, Appetitverlust und Erythema nodosum manifestieren (Raviglione et al., 2001). 5 - 10 % der Patienten mit einem Tuberkuloseprimärkomplex erkranken im Laufe ihres Lebens an einer postprimären Tuberkulose. Zu 90 % geht diese Erkrankung von einer Reaktivierung der in den Primärkomplexen überlebenden Mykobakterien aus. Eine Immunsuppression wirkt darauf begünstigend. Die übrigen postprimären Tuberkulosen entstehen durch eine exogene Reinfektion oder eine Superinfektion mit weiteren Tuberkuloseerregern bei noch bestehender Infektion (Sheffield, 1994; Garay, 2004). Bei einer Reaktivierung kommt es zu verkäsenden Nekrosen der Granulome, die sich häufig verflüssigen. Die daraus entstehenden Kavernen, flüssigkeitsgefüllte Hohlräume, können durch Anschluss an das Bronchialsystem zu einer offenen Tuberkulose führen (Dannenber, 1982).

Klinisch äußert sich die postprimäre Tuberkulose ähnlich der primären in unspezifischen Symptomen. Dazu gehören Gewichtsverlust, subfebrile Temperaturen, Fieber, Nachtschweiß und Müdigkeit sowie Husten und Hämoptysen (Pursel et al., 1961). Neben der Lunge kann die Erkrankung jedes weitere Organ des Körpers befallen. Häufig betroffen sind zervikale Lymphknoten, die Meningen, Nieren, Nebennieren, Knochen, Adnexe und Nebenhoden (Banner, 1979).

1.3 Diagnose und Therapie der antituberkulotikaresistenten Tuberkulose

Die Diagnose einer antituberkulotikaresistenten Tuberkulose ist nur durch eine direkte Untersuchung der krankheitsversursachenden Mykobakterien möglich. Ebenso liefert nur der Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* einen eindeutigen Beweis für eine Tuberkuloseinfektion. Mikroskopisch gelingt dies in der Ziehl-Neelsen-Färbung ab einer Keimkonzentration von ca. 10^3 /ml Untersuchungsmaterial. Hierbei kann jedoch nur die Gattung *Mycobacterium* erkannt werden. Deswegen sind zur Klassifizierung der Spezies weitere Untersuchungen notwendig (Siemon et al., 1999). Die Diagnostik von Resistenzen erfordert eine Anzucht der Mykobakterien mittels Kultur mit anschließender Sensibilitätstestung auf antituberkulotikahaltigen Platten. Da dieser Prozess bis zu acht Wochen dauert, wurde vielfach versucht, Methoden zu entwickeln, die eine schnellere

Aussage über Resistenzen der Mykobakterien treffen können. Hierunter fallen zum Beispiel auch molokularbiologische Untersuchungen, bei denen Mutationen in Genen nachgewiesen werden, die mit einer Resistenz gegen bestimmte Antituberkulotika assoziiert sind (Kirsten, 1999).

Verschiedene weitere Untersuchungen können Hinweise auf eine Tuberkuloseinfektion geben. Hierbei ist jedoch eine Unterscheidung zwischen einer antituberkulotikaresistenten und einer antituberkulotikasensiblen Tuberkulose nicht möglich. Mittlerweile gibt es verschiedene Testverfahren, um indirekt eine Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* nachzuweisen. Das deutsche Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose (Diel et al., 2007) empfiehlt, bei Verdacht auf eine Tuberkuloseinfektion zunächst einen Tuberkulin-Hauttest als Mendel-Mantoux-Test durchzuführen. Dieser weist eine allergische Spätreaktion auf Bestandteile von Mykobakterien nach. Hierbei gibt es jedoch häufig falsch positive Ergebnisse nach vorangegangener BCG-Impfung oder häufiger Durchführung des Hauttests. Ebenso gibt es Kreuzreaktionen nach Infektion mit nicht-tuberkulösen Mykobakterien. Deswegen wird bei positivem Hauttest die Durchführung eines Interferon-Gamma-Tests zur weiteren Differenzierung empfohlen. Dieser beruht auf einem Nachweis von Interferon-Gamma, das von T-Lymphozyten sezerniert wird, die im Rahmen einer aktuellen oder früheren Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* sensibilisiert wurden. Falsch negative Ergebnisse können unter anderem bei Immunsuppression und erst kürzlich erfolgter Infektion auftreten. Eine Unterscheidung zwischen einer frischen oder schon länger bestehenden Infektion ist bei beiden Verfahren nicht möglich (Siemon et al., 1999; Diel et al., 2007).

Generell sollte eine Therapie der Tuberkulose zur Vermeidung von Resistenzbildungen immer als eine Mehrfachtherapie erfolgen. Die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzbildung gegen ein Medikament unter Therapie liegt bei ca. 1 %. Durch eine Therapie mit mehreren verschiedenen Medikamenten kann das Risiko der Resistenzbildung deutlich gesenkt werden (CDC, 1993). Als Antituberkulotika der ersten Wahl gelten die fünf Medikamente Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol, Streptomycin und Pyrazinamid. In der Regel erfolgt die Behandlung einer unkomplizierten Tuberkulose über sechs bis neun Monate mit einer anfänglichen Vierer-Kombination aus Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol oder Streptomycin. Nach zwei bis drei Monaten kann in der Regel auf eine Zweier-Kombination aus Isoniazid und Rifampicin umgestellt werden (Raviglione et al., 2001). Als mögliche Medikamente der zweiten Wahl stehen zur Auswahl: Ethionamid, Cycloserin, p-

Aminosalicylsäure, Clofazimine, Amoxicillin-Clavulansäure, Clarithromycin, Azithromycin und Rifabutin.

Monoresistenzen gegen eines der Medikamente der ersten Wahl können mit einer Dreier- bis Vierer-Kombination der anderen Mittel der ersten Wahl behandelt werden. Bei Mehrfachresistenzen dagegen sollten generell bis zu fünf Antituberkulotika eingesetzt werden, auf die der Tuberkuloseerreger sensibel ist. Bei der Therapie sollten, wenn möglich, Mittel der ersten Wahl bevorzugt werden. Ab einer nachweislich negativen Kultur sollten bei Mehrfachresistenzen über mindestens neun weitere Monate drei Antituberkulotika gegeben werden (Ormerod, 2005). Des Weiteren nehmen bei Patienten mit Multiresistenzen Behandlungsweisen zu, die aus der Zeit vor der Chemotherapie bekannt sind. So zeigen Studien, dass Patienten mit einer lokalisierten multiresistenten Tuberkulose Vorteile aus einer chirurgischen Behandlung ziehen (Sung et al., 1999). Grundsätzlich ist auch eine multiresistente Tuberkulose heilbar (Mirsaeidi et al., 2005). Die folgende Tabelle 1.1 zeigt ein mögliches Therapieregime bei Resistenz gegen Antituberkulotika.

Tabelle 1.1: Mögliches Therapie-Regime bei Resistenz gegen Antituberkulotika (Chan et al., 2002)

Resistenz	Empfohlene Behandlung	Therapiedauer	Bemerkungen
INH, SM und PZA	RMP, PZA, EMB, AM	6-9 Monate	Voraussichtlich 100 % Konversion* und Rückfallrate <5 %
INH und EMB (+/- SM)	RMP, PZA, OFX oder CPX, AM	6-12 Monate	Vergleichbar oberem Therapieregime
INH und RMP (+/- SM)	PZA, EMB, OFX oder CPX, AM	18-24 Monate	eventuell chirurgische Maßnahmen
INH, RMP und EMB (+/- SM)	PZA, OFX oder CPX, AM plus 2 weitere	24 Monate nach Konversion	eventuell chirurgische Maßnahmen
INH, RMP und PZA (+/- SM)	EMB, OFX oder CPX, AM plus 2 weitere	24 Monate nach Konversion	eventuell chirurgische Maßnahmen
INH, RMP, PZA und EMB (+/- SM)	OFX oder CPX, AM plus 3 weitere	24 Monate nach Konversion	Chirurgische Maßnahmen, wenn Operation möglich

Abkürzungen: INH: Isoniazid, SM: Streptomycin, PZA: Pyrazinamid, EMB: Ethambutol, RMP: Rifampicin, OFX: Ofloxacin, CPX: Ciprofloxacin, AM: Amikacin

* mikroskopisch und kulturell ohne Nachweis von *M. tuberculosis* im Sputum

1.4 Molekulare Grundlagen von Resistenzen bei *Mycobacterium tuberculosis*

Im Gegensatz zu anderen Bakterien werden Resistenzen bei *Mycobacterium tuberculosis* fast ausschließlich durch Mutationen im Erbgut der Bakterien verursacht. Efflux- und Inaktivierungsmechanismen, Plasmide oder sonstige mobile Elemente spielen bei der Resistenzentstehung keine oder zumindest keine klinisch bedeutende Rolle. In der Regel

beschränkt sich die Resistenzentwicklung auf Punktmutationen in Genen, deren Produkte Ziel der Antituberkulotika sind oder diese aktivieren. Für die primäre Resistenz der Mykobakterien ist der besondere Aufbau der Zellwand im Vergleich zu anderen Bakterien verantwortlich, die für viele Substanzen undurchlässig ist. Des Weiteren ist sie unempfindlich gegenüber vielen Antibiotika, die in den Zellwandaufbau eingreifen (Woodford et al., 2007; Hett et al., 2008).

Den Resistenzen gegen die einzelnen Antituberkulotika liegen unterschiedliche Mechanismen zugrunde. Isoniazid liegt als Vorstufe des eigentlich wirksamen Moleküls vor und muss zunächst durch die mykobakterielle Katalase-Peroxidase (kodiert durch das Gen *katG*) aktiviert werden. Anschließend kann die nun aktivierte Form durch Koppelung an NADH das Genprodukt InhA inhibieren, ein Protein, das an der Biosynthese der mykobakteriellen Zellwand beteiligt ist. Bei Punktmutationen der Katalase-Peroxidase wird Isoniazid nicht mehr in die aktive Form umgewandelt. Eine Mutation an Kodon 315 des *katG*-Gens wurde in mehr als der Hälfte der Isoniazid-resistenten Mykobakterien nachgewiesen (Zhang, 2004; Ghiladi et al., 2005).

Im Gegensatz hierzu entstehen Streptomycin-Resistenzen durch Mutationen im ribosomalen S12-Protein. Die antibakterielle Wirkungsweise von Streptomycin erfolgt über eine Bindung an die mykobakterielle ribosomale S30-Untereinheit, so dass die Translation und die Proteinbiosynthese inhibiert werden oder es zu Fehlern in diesen Vorgängen kommt. Über eine Punktmutation an Kodon 43 des *rpsL*-Gens, das das ribosomale S12-Protein kodiert, kommt es zu einer verminderten Bindung der rRNA an dieses Protein und damit zu einer Veränderung der Bindungsstelle für Streptomycin. Ebenso wurden Mutationen um die Basen 530 und 912 der 16S rRNA mit einer Resistenz gegen Streptomycin in Zusammenhang gebracht (Finken et al., 1993; Honore et al., 1994; Cooksey et al., 1996).

Das Antituberkulotikum Ethambutol wirkt bakteriostatisch über eine Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese, indem der Einbau von Arabinose in Arabinogalactose und Lipoarabinomannose verhindert wird. Hierbei scheint eine Punktmutation an Kodon 306 des *embB*-Gens eine Rolle bei der Resistenz der Mykobakterien zu spielen. Inwiefern diese Mutation direkt auf eine Resistenz gegen Ethambutol schließen lässt, ist derzeit wieder umstritten, aber besonders beim Auftreten von Mehrfachresistenzen scheint sie eine Rolle zu spielen (Hazbon et al., 2005; Plinke et al., 2006).

1.5 Heteroresistenz

Im Rahmen der zunehmenden molekularbiologischen Untersuchungen von Resistenzen bei *Mycobacterium tuberculosis* ist vermehrt ein Phänomen zu beobachten, das als Heteroresistenz bezeichnet wird. In allen Populationen von antituberkulotikasensiblen Tuberkulosebakterien treten durch natürliche Mutationen geringe Anteile von resistenten Individuen auf. Diese natürlichen Mutationsraten liegen bei Isoniazid bei 10^{-9} bis 10^{-8} , für Ethambutol betragen sie um die 10^{-7} bis 10^{-6} , für Streptomycin werden sie bei 10^{-8} bis 10^{-5} angegeben (Kirsten, 1999; Mieskes, 2002). Ein inadäquater Einsatz von Antituberkulotika fördert durch Selektion das Überleben der resistenten und das Absterben der sensiblen Bakterien.

Heteroresistenz kann als das Vorhandensein einer gemischten Population aus resistenten und sensiblen Organismen in einem Patienten definiert werden, bei der der Anteil der resistenten Organismen nicht durch die natürliche Mutationsrate allein erklärt werden kann, da ihr Anteil deutlich höher liegt. Das Phänomen wurde bisher bei wenigen Organismen beschrieben, die allesamt „Problemkeime“ in der Therapie darstellen, wie z.B. *Streptococcus aureus*, *Gardnerella vaginalis*, *Cryptococcus neoformans* und *Mycobacterium tuberculosis* (Altrichter et al., 1994; Ryffel et al., 1994; Mondon et al., 1999; Rinder, 2001). Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis*-Populationen, die unterschiedliche Resistenzgen-Genotypen aufweisen, sind mittlerweile als Störfaktoren in kulturellen sowie molekularen Sensibilitätstestungen gut dokumentiert (Heep et al., 2001; Victor et al., 2002; Adjers-Koskela et al., 2003). Eine Aussage, inwiefern die Heteroresistenz den Erfolg einer Therapie der Tuberkulose beeinflusst, gab es bis zur Anfertigung dieser Arbeit noch nicht.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Gegenwärtig stellen Resistenzentwicklungen von *Mycobacterium tuberculosis* ein wachsendes Problem in der Behandlung der Tuberkulose dar. Um die Patienten möglichst früh optimal behandeln zu können, wurden neben der kulturellen Sensibilitätstestung verschiedene molekulargenetische Verfahren entwickelt, die eine Aussage über die Resistenz des Erregers direkt aus Untersuchungen des Sputums ermöglichen. Hierbei wurde ein Phänomen beobachtet, bei dem gleichermaßen in den Resistenzgenen mutierte als auch nicht mutierte Mykobakterien aus denselben Sputen nachgewiesen werden konnten. Dieses Phänomen, das als Heteroresistenz bezeichnet wird, wurde mittlerweile bei *Mycobacterium tuberculosis* in der Literatur mehrfach beschrieben. Selbst in Gegenden, in denen selten Resistenzen auftreten, wurden bereits mehrfach mittels molekulargenetischer Methoden wie PCR-RFLP Heteroresistenzen des Tuberkuloseerregers bei Patienten identifiziert (Cullen et al., 2006). Bislang gibt es jedoch keine Studien darüber, welche Auswirkungen Heteroresistenzen auf die spätere phänotypische Resistenzentwicklung haben und inwiefern diese eine Therapieanpassung notwendig erscheinen lassen.

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, ob das Vorliegen einer Heteroresistenz Einfluss auf die Entwicklung phänotypisch manifester Resistenzen hat. Hierzu wurden Sputen von Patienten aus Abchasien im Rahmen einer von der Europäischen Union geförderten Studie (LONG-DRUG) longitudinal im Verlauf der Therapie untersucht. Die Erreger wurden dabei sowohl molekulargenetisch mittels PCR-RPLF untersucht als auch phänotypisch in der Kultur auf Resistenzen getestet. Weiterhin werden Ergebnisse einer Studie diskutiert, bei der es erstmals gelang, Heteroresistenz kulturell nachzuweisen. Hierbei konnten gleichzeitig resistente als auch sensible *Mycobacterium-tuberculosis*-Isolate desselben Stammes aus Sputen bulgarischer Patienten noch vor Therapiebeginn in der Kultur angezüchtet werden. Sowohl bei den Patienten aus Abchasien als auch bei denen aus Bulgarien sollte der Einfluss der Heteroresistenz auf eine spätere Resistenzentwicklung untersucht werden.

Des Weiteren wurden im Rahmen der longitudinalen Studie LONG-DRUG Sputen von Patienten aus Abchasien auf molekulargenetischer Ebene mittels PCR-RFLP sowie kulturell mit dem Ziel untersucht, auch unabhängig vom Vorliegen einer Heteroresistenz Veränderungen der Resistenz unter Antituberkulotika-Therapie nachzuweisen.

In dieser Arbeit wurden insbesondere die Resistenzen gegen Isoniazid, Ethambutol und Streptomycin untersucht. Als Untersuchungsmaterial dienten Sputen von Patienten aus Abchasien im Rahmen der LONG-DRUG-Studie sowie von Patienten aus Bulgarien. Molekulargenetisch wurden dabei mittels PCR-RFLP Punktmutationen im *katG*-Gen und *embB*-Gen nachgewiesen, die im Zusammenhang mit Resistenzen des Tuberkuloseerregers gegen Isoniazid bzw. Ethambutol stehen. Resistenzen gegen Streptomycin wurden auf kultureller Ebene bei den Patienten aus Bulgarien untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Horizontal-Gelelektrophorese-Kammer:	Größe: 10 x 11 cm, Bioplex, Strehlau + Kruse GmbH, Freiburg
PCR-Gerät:	UNO II, Biometra, Göttingen
Pipetten:	Pipetman P 1000, P 200 und P 20, Gilson, Bad Camberg
Schüttler:	„Vortex Genie 2“, Bender & Hobein AG, München
Sofortbildkamera:	„Polaroid MP-4“, Polaroid, Cambridge, USA
Tischzentrifugen:	Tischzentrifuge „Biofuge 13“, Heraeus Instruments, Hanau
Tischzentrifuge:	“Mikroliter”, Hettich, Tuttlingen
UV-Leuchttisch:	Typ „B IL-350-M“, 312 nm, Bachofer GmbH, Reutlingen
Waagen:	Tischwaage Sartorius BP210D, Sartorius-Werke, Göttingen Tischwaage Sartorius 3716, Sartorius-Werke, Göttingen
Wasserbäder:	Wasserbad „Julabo SW1“, Julabo Labortechnik, Seelbach Wasserbad „Multicool 2209“, LKB, Bromma

3.1.2 Chemikalien

Merck, Darmstadt:	Natriumacetat, mind. 99 %, p.A.
Roth, Karlsruhe:	Dimethylsulfoxid (DMSO), 99,5 %, p.A. Ethanol, 99,6 Gew.% DAB9 Isopropanol, mind. 99,7 %, p.A.

Sigma, Deisenhofen: Ethidiumbromid

Glycerin

Mineralöl „Light White Oil“

Tris (Tris[hydroxymethyl]methylamin)

Tris-HCl (Tris[hydroxymethyl]methylaminhydrochlorid)

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)

„Blaupuffer“ (mit Tryphanblaulösung gefärbter Gelladepuffer)

3.1.3 Gelmaterialien

Agarose: Agarose „molecular biology grade“, Appligene, Heidelberg

3.1.4 Enzyme

Taq-DNA-Polymerase:

5 units/ μ l, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Restriktionsendonukleasen:

New England Biolabs GmbH, Schwalbach:

Aci I (5 units/ μ l, 10 units/ μ l): in 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4),
0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 μ g/ml BSA
und 50 % Glycerin

Nla III (5 units/ μ l) : in 200 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5),
0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 500 μ g/ml BSA,
und 50 % Glycerin

3.1.5 Puffer

New England BioLabs GmbH, Schwalbach:

10X NE-Puffer 3: 1000 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl,
100 mM MgCl₂, 10 mM DTT (pH 7,9 bei
25 °C)

10X NE-Puffer 4: 500 mM Kaliumacetat, 200 mM Tris-acetat,
 100 mM Magnesiumacetat, 10 mM DTT
 (pH 7,9 bei 25 °C)

3.1.6 Nukleotide

dGTP, dATP, dCTP, dTTP: 100 mM, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

100 bp Leiter: Invitrogen life technologies, Carlsbad, Kalifornien

Oligonukleotide: MWG Biotech GmbH, Ebersberg:

PCR-Primer:

MYC-21 5'-CGC TGC AGC AGC TGG T(AC)C GCA A-3'
 MYC-22 5'-CGC AAT TCG GTT CTT (GC)AC ACC CTG-3'
 MYC-30 5'-CGA ACC CGA GGC TGC TCC-3'
 MYC-31 5'-CAC CCG CAG CGA GAG GTC-3'
 MYC-32 5'-TGG AGC AGA TGG GCT TGG-3'
 MYC-33 5'-CAG TGG CCA GCA TCG TCG-3'
 MYC-36 5'-AAG GTC AAG ACC GCG GC-3'
 MYC-37 5'-TGA TCT TGT AGC GCA CAC-3'
 MYC-44 5'-CGT CTA GAT CGC GTT GTG GCG CCT-3'
 MYC-45 5'-CGC TGC AGT CCA CAG ACT GGC GTC GC-3'
 MYC-46 5'-CTG CTC TGG CAT GTC AT-3'
 MYC-47 5'-AGC GGA AAT AGT TGG AC-3'

3.1.7 Kommerzielle "Kits"

QIAEX II, Qiagen, Hilden

QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden

QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen, Hilden

QIAGEN MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden

3.1.8 Herkunft der Sputen

Die Sputen wurden im Rahmen einer Studie der Europäischen Union (LONG-DRUG) von Mitarbeitern der Organisation Médecins Sans Frontières in Abchasien, einer Teilrepublik Georgiens, gesammelt. Die Patienten stammten sowohl aus dem zivilen Bereich als auch aus Gefängnissen. Nach der Anlage einer Kultur sowie der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MIC) für vier Antituberkulotika der ersten Wahl (Isoniazid, Streptomycin, Rifampicin, Ethambutol) wurden die Sputen durch Hitze inaktiviert und versandt.

Die Sputen wurden mittels zweier Zahlen und den Buchstaben A oder B, z. B. 7-31-B, kodiert. Die erste Zahl stand für eine dem Patienten zugeteilte Nummer, die zweite Zahl gab Auskunft über den Monat nach Therapiebeginn. Der Buchstabe A bedeutete eine Vorbehandlung der Sputen mit N-Acetyl-L-Cystein-OH, der Buchstabe B besagte, dass die Sputen nicht vorbehandelt waren. Wenn für denselben Monat bei demselben Patienten zwei Versionen A und B vorlagen, wurde in dieser Arbeit mit dem nicht vorbehandelten Sputum (B) gearbeitet. Für die Studie in Bulgarien wurden nur Sputen von Patienten mit Erstdiagnose einer Tuberkulose verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung von Mykobakterien-DNA aus Sputum

Dieser Schritt diente der DNA-Isolierung aus Sputen von Patienten, die im Verdacht standen, an einer Tuberkulose erkrankt zu sein. Um festzustellen, welche DNA-Isolierungsmethode die besten PCR-Ergebnisse liefern würde, wurden zunächst vier verschiedene Methoden miteinander verglichen. Um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden diese Methoden an jeweils vier Vergleichsproben getestet. Da pro Patient nur ein Sputumvolumen von ca. 300 µl zur Verfügung stand, das nicht bereits vor Beginn der eigentlichen Untersuchung verbraucht sein sollte, wurden zur Herstellung jeder Vergleichsprobe je 50 µl aus 16 Sputen verwendet. Auf diese Weise war das spätere Ergebnis ebenfalls vom Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein von Mykobakterien-DNA in einem einzelnen Sputum unabhängig. Die Proben setzten sich folgendermaßen zusammen:

- Mix A: 7-33-B; 7-34-B; 53-12-B; 147-9-B; 299-11-B; 299-13-B; 333-1-B; 402-0-B; 405-0-B; 406-0-B; 411-0-B; 412-0-B; 413-0-B; 415-0-B; 418-0-B; 419-0-B.
- Mix B: 96-24-B; 147-8-B; 267-14-B; 290-11-B; 346-4-B; 374-3-B; 376-4-B; 399-0-B; 400-0-B; 403-0-B; 404-0-B; 409-0-B; 410-0-B; 416-0-B; 420-0-B; 421-0-B.
- Mix C: 236-2-B; 333-2-B; 396-3-B; 422-0-B; 424-0-B; 426-0-B; 429-0-B; 430-0-B; 431-0-B; 432-0-B; 436-0-B; 437-0-B; 440-0-B; 442-0-B; 446-0-B; 447-0-B.
- Mix D: 7-30-B; 7-31-B; 22-28-B; 147-5-B; 147-6-B; 210-1-B; 299-8-B; 372-0-B; 376-0-B; 377-0-B; 381-0-B; 383-0-B; 384-0-B; 386-0-B; 387-0-B; 388-0-B.

Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Als Negativprobe wurde steriles Wasser verwendet.

3.2.1.1 DNA-Isolierung mittels Natronlauge

Hierzu wurden 300 µl Sputum 2 Minuten lang bei 8000 rpm zentrifugiert, der Überstand in den Reaktionsgefäßen anschließend abpipettiert und in weiteren Reaktionsgefäßen aufbewahrt, da der flüssige Überstand bereits DNA enthalten konnte. Das Sediment, das sich durch die Zentrifugation abgesetzt hatte, wurde mit 100 µl einer Lösung aus 1 M NaOH und 2 %

TitonX-100 aufsuspendiert und anschließend 5 Minuten lang in kochendem Wasser erhitzt. Zur Neutralisation wurde mit 100 µl ungepufferter 1 M Tris-HCl-Lösung gemischt. Daraufhin erfolgte eine erneute Zentrifugation für 3 Minuten bei 8000 rpm. Die überstehende DNA-Lösung (ca. 190 µl) wurde mit 150 µl des aufbewahrten Überstandes gemischt. Hierbei wurden die Angaben der Publikation nach Reischl (Reischl et al., 1994) abgewandelt, die vorsehen, den Überstand mit 200 µl des aufbewahrten Überstandes zu mischen. Dies geschah, da die Reaktionsgefäße sonst zu voll geworden wären. Anschließend wurde die DNA unter Zuhilfenahme des QIAEX II-Kits weiter isoliert (siehe Kapitel 3.2.1.2).

3.2.1.2 Isolierung von DNA mittels alkalischer Lyse

Hierzu wurden zu 100 µl Sputum in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 33,3 µl 1 M KOH und 9,3 µl 1 M DTT pipettiert. Anschließend wurde geschüttelt bis eine homogene Lösung entstand. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 65 °C wurden 80 µl 2 M Tris-HCl-Lösung, pH 8,3 und 4,3 µl 25 % HCl hinzugefügt und das Gemisch anschließend nochmals geschüttelt. Die darauffolgende Zentrifugation von 4 Minuten ergab einen Überstand, der in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß abpipettiert, erneut 4 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand davon wiederum in ein neues Reaktionsgefäß gegeben wurde. Anschließend wurde die DNA unter Zuhilfenahme eines QIAEX II-Kits weiter aufgereinigt.

Bei der Aufreinigung der DNA mittels QIAEX II-Kits wurde den Proben, die mittels alkalischer Lyse bzw. mit Natronlauge (siehe Kapitel 3.2.1.1) vorbehandelt worden waren, das 3-fache Probenvolumen an Puffer QX1 hinzugefügt. Die Lösung musste nun eine gelbe Farbe haben, da diese Farbe einen pH-Wert < 7,5 anzeigte, der für die nachfolgenden Reaktionen notwendig war. Bei den Proben, die mit Natronlauge vorbehandelt worden waren, war dies nicht der Fall, so dass zusätzlich 30 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,0, dazugegeben werden musste.

Anschließend wurde 10 µl QIAEX II-Suspension (für maximal 5 µg zu isolierende DNA) zugefügt. Da 5 µg DNA in jedem Fall ausreichend für eine PCR wären, wurde für alle Aufarbeitungen jeweils 10 µl QIAEX II-Suspension verwendet. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit, während der alle 2 Minuten die Reaktionsgefäße geschüttelt wurden, um die Bestandteile der Lösung in Suspension zu halten, wurden die Proben 30 Sekunden lang zentrifugiert und der Überstand daraufhin entfernt. Das zurückbleibende DNA-Pellet am

Boden des Reaktionsgefäßes wurde zweimal mit 500 µl PE-Puffer gewaschen, d.h. es wurde mit dem Puffer aufsuspendiert, anschließend 30 Sekunden lang erneut zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Abschließend wurden die Proben erneut zentrifugiert und die restliche Flüssigkeit abpipettiert.

Das Pellet wurde ca. 15 - 20 Minuten lang luftgetrocknet, bis es weiß wurde. Zum Eluieren der DNA wurden 100 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, dazugegeben, aufsuspendiert, die Probe bei 50 °C 10 Minuten lang inkubiert und anschließend 30 Sekunden lang zentrifugiert. Der Überstand, der nun die DNA enthielt, wurde zur weiteren Verwendung in ein neues Reaktionsgefäß gegeben.

3.2.1.3 Isolierung von DNA mittels des QIAamp DNA Mini Kits

Bei dieser Methode wurde die hohe Bindungsfähigkeit von DNA an Silikagel ausgenutzt. Dabei wurde 200 µl Sputum mit einer Protease (Proteinase K) lysiert und anschließend mit 200 µl eines Puffers (Buffer AL) vermischt und 15 Sekunden geschüttelt. Nach einer 10-minütigen Inkubation im Wasserbad bei 56 °C wurden 200 µl Ethanol der Probe beigegeben und diese erneut 15 Sekunden lang geschüttelt. Daraufhin wurde das Gemisch in eine QIAamp Spin Column aus dem QIAamp DNA Mini Kit gefüllt und diese 1 Minute lang zentrifugiert. Anschließend folgten 2 Waschschrte. Beim ersten wurde 500 µl AW1-Puffer hinzugefügt, gefolgt von einer 1-minütigen Zentrifugation, während bei dem zweiten Schritt 500 µl AW2-Puffer beigelegt wurden und die Spin Columns 3 Minuten lang zentrifugiert wurden. Abschließend erfolgte die Elution der DNA in 200 µl AE-Puffer. Dazu wurde dieser Puffer in die Spin Columns, in denen die DNA nun an der Silikagelschicht haftete, gegeben, und nach 1-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 1 Minute lang zentrifugiert. Die Spin Columns wurden verworfen, die Reaktionsgefäße enthielten jetzt die DNA-Lösung.

3.2.1.4 Isolierung von DNA unter Zuhilfenahme des QIAamp Stool Mini Kits

Bei dieser Methode wurde ebenfalls die gute Bindungsfähigkeit von DNA an Silikagel ausgenutzt. Hierzu wurde zu 200 µl Sputum in einem 2 ml Reaktionsgefäß 1,4 ml ASL-Puffer pipettiert, ein Puffer des QIAamp Stool Mini Kits, der für die Lyse der Probe verantwortlich ist. Anschließend wurde das Gemisch 1 Minute lang geschüttelt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 70 °C wurden die Proben 15 Sekunden geschüttelt und anschließend 1 Minute

lang bei 12000 rpm zentrifugiert. 1,2 ml des Überstandes wurden nun in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und das Pellet verworfen. Danach wurde eine „InhibitEx“-Tablette hinzugefügt, ein patentgeschütztes Material, das Verunreinigungen absorbieren soll. Die Probe wurde 1 Minute geschüttelt und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der anschließenden 3-minütigen Zentrifugation bei 12000 rpm entstand ein Überstand, der komplett in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert wurde. Das darauf folgende Vorgehen entspricht dem in 3.2.1.3 beschriebenen Verfahren.

3.2.2 DNA-Amplifizierung durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Dieser Schritt diente der Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte. Um eine größere Menge des gewünschten PCR-Produktes zu erhalten, wurden stets zwei aufeinander folgende Amplifizierungen durchgeführt, wobei die Primer des zweiten Vervielfältigungsvorganges („nested PCR“) näher an der gewünschten DNA-Sequenz lagen und dadurch ein kleineres Produkt entstand. Der Sinn bestand darin, trotz möglicher Nebenprodukte aus der ersten PCR das gewünschte Produkt selektiv weiter zu amplifizieren. Die jeweiligen Primerpaare und die Größe der zugehörigen PCR-Produkte sowie die Verwendung von DMSO sind in Tabelle 3.1 wiedergegeben.

Tabelle 3.1: Primerpaare und deren Zielsequenzen

Primerpaar	Zielgen	Größe des Amplifikates	DMSO [µl]
MYC-44 und MYC-45	embB	364 bp	-
MYC-46 und MYC-47	embB	103 bp	-
MYC-30 und MYC-31	katG	301 bp	1
MYC-32 und MYC-33	katG	264 bp	1

bp: Basenpaar

Ein Reaktionsansatz enthielt jeweils 1 µl der beiden Primer (50 mM), die optimierte Menge an DMSO (siehe Tabelle 3.1) sowie DNA-Lösung (Mieskes, 2002). Bei dem ersten PCR-Durchgang wurden 3 µl DNA-Lösung (siehe Kapitel 3.2.1) dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Bei der nested PCR waren dies 2 µl der ersten PCR-Lösung. Negativproben mit 3 µl Lösung

der Negativprobe aus 3.2.1 bzw. 2 µl der Negativprobe des ersten PCR-Durchganges wurden ebenfalls durchgeführt. Anschließend wurde die Probe mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 44 µl ergänzt, so dass nach Zugabe von 6 µl Mastermix ein Endvolumen von 50 µl entstand. Dieser Mastermix bestand aus 5 µl 10X PCR-Puffer (100 mM Tris-HCL, pH 8,3, 500 mM KCl), 0,5 µl dNTPs (je 25 mM) und 0,5 µl *Taq*-Polymerase (5 u/µl). Überschichtet wurde der Ansatz mit 2 Tropfen Mineralöl, um ein Verdampfen während der Zugabe des Mastermixes (bei entferntem Heizdeckel) zu verhindern und einer Kondensation von Flüssigkeit am Deckel des PCR-Gefäßes während der PCR-Zyklen vorzubeugen. Als zusätzlicher Schutz vor einer Kondensation wurden die Deckel während der gesamten Zeit im PCR-Gerät auf 105 °C erhitzt. Nach einem 2-minütigen „Hot Start“ bei 96 °C erfolgte die Zugabe des Mastermixes bei 85 °C. Diese initiale Denaturierung diente der Vermeidung einer unspezifischen Paarung von Primern sowie einer möglichst vollständigen Denaturierung genomischer Doppelstrang-DNA. Anschließend erfolgte der eigentliche Amplifizierungsvorgang, der abhängig von dem gewünschten Produkt eine unterschiedliche Zyklenzahl erforderte. Ebenso wurden unterschiedliche „Annealing-Temperaturen“ verwendet. Die Zyklenzahlen sowie die genauen Denaturierungs-, Annealing- und Extensionstemperaturen können der Tabelle 3.2 entnommen werden.

Tabelle 3.2: PCR-Reaktionsbedingungen

	katG 1.PCR	katG nested PCR	embB 1.PCR	embB nested PCR
Primerpaar	MYC-30/31	MYC-31/32	MYC-44/45	MYC-46/47
Hot Start				
Temp.[°C]	96	96	96	96
Zeit [sec]	120	120	120	120
Denaturierung				
Temp.[°C]	92	92	92	92
Zeit [sec]	60	60	60	60
Annealing				
Temp.[°C]	57	57	48	46
Zeit [sec]	60	60	60	60
Extension				
Temp.[°C]	72	72	72	72
Zeit [sec]	60	60	60	60
Zyklenzahl	45	45	50	50

3.2.3 PCR-Produktnachweis mittels Gelelektrophorese

Um zu sehen, ob die PCR der DNA einer Sputumprobe auch zur Vervielfältigung des zu untersuchenden Genes von *Mycobacterium tuberculosis* geführt hatte, wurde das PCR-Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen, um eine Gelelektrophorese durchzuführen.

Zur Herstellung eines 2,5-%igen Agarosegels wurden 1,1 g Agarose mit 44 ml 2xTAE-Puffer gemischt und zum Kochen gebracht. Nachdem es auf ca. 50 - 60 °C abgekühlt war, wurde 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) beigemischt und das Gel in die Gelkammern gegossen. Anschließend konnte auf des erkaltete Gel, das mit 2xTAE-Puffer überschichtet wurde, das PCR-Produkt aufgetragen werden. Hierzu wurden 1,5 µl 10xBlaupuffer mit 9 µl PCR-Produkt aus der nested PCR vermischt. 10 µl des Gemisches wurden dann auf das Gel aufgetragen, sowie pro Zeile zusätzlich 10 µl einer 100 bp-DNA-Leiter. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 36 V durchgeführt, bis die blaue Farbe des Puffers ca. 2 cm in Richtung Kathode gewandert war. Danach wurde das Gel unter UV-Licht photographiert. War eine deutliche Bande mit der gewünschten Länge an Basenpaaren (siehe Tabelle 3.3) vorhanden, wurde diese Bande ausgeschnitten und die DNA daraus isoliert (siehe Kapitel 3.2.4). Dazu durfte die Negativprobe an dieser Stelle keine Bande aufweisen, was sonst auf eine Kontamination hätte schließen lassen.

Tabelle 3.3: Länge der PCR-Produkte

Gen	Länge der PCR-Produkte
<i>embB</i>	103 bp
<i>katG</i>	264 bp

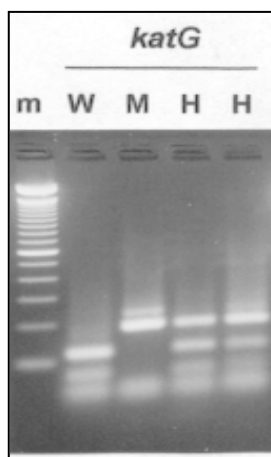
3.2.4 DNA-Gel-Extraktion

Die DNA-Gel-Extraktion erfolgte mit dem QIAGEN MinElute Gel Extraction Kit. Hierzu wurden die ausgeschnittenen Banden gewogen und in dem 6-fachen Volumen (in diesem Fall das 6-fache Gewicht) QG-Puffer gelöst. Während einer 10-minütigen Inkubation bei 50 °C wurden die Proben alle 2 - 3 Minuten geschüttelt. Hätten die Proben anschließend keine gelbe Farbe (pH-Indikator) gehabt, hätte durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,0, ein Farbumschlag zu gelb erzielt werden können. Dieser Schritt wurde in der vorliegenden Arbeit

bei keiner Extraktion notwendig. Nach der Zugabe einem dem Gelvolumen entsprechenden Volumen Isopropanol wurden die Proben durch mehrmaliges Umschwenken wiederum gemischt. Dieses Gemisch wurde nun in ein MinElute Column pipettiert und 1 Minute lang zentrifugiert. Bei einem zu großen Probenvolumen wurde dieser Schritt zweifach durchgeführt. Nun erfolgte das Waschen der DNA, die an der Silikagelschicht haften geblieben war, mittels Zugabe von 500 µl QG-Puffer und anschließender 1-minütiger Zentrifugation. Danach wurden 750 µl PE-Puffer zugegeben und erneut 1 Minute zentrifugiert. Um die Säule möglichst vollständig von Puffern zu befreien, wurde abschließend nochmals eine Zentrifugation ohne Zugabe eines Puffers 1 Minute lang durchgeführt. Nachdem die MinElute Column auf ein frisches Reaktionsgefäß gesetzt wurde, wurde 10 µl EB-Puffer hinzu pipettiert, um die DNA von dem Silikagel zu lösen. Nach einer 1-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 Minute lang zentrifugiert. Die so isolierte DNA konnte mittels Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) weiter untersucht werden.

3.2.5 Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus

3.2.5.1 *katG*



m: 100 Basenpaar-Leiter, W: Wildtyp,
M: Mutante, H: Heteroresistenz

Abbildung 3.1: RFLP-Muster von *katG*

Hierbei sollte eine Mutation im Kodon 315 des *katG*-Gens nachgewiesen werden. Bei Vorliegen der Basenfolge 5'...CCGC...3' (Wildtyp) konnte das Restriktionsenzym *Aci* I das PCR-Produkt an dieser Stelle schneiden. Bei einer Mutation des Kodons 315, das mit einer

Resistenz von *Mycobacterium tuberculosis* gegen Isoniazid assoziiert ist, wurde an dieser Stelle nicht geschnitten (siehe Abbildung 3.1).

8 µl der DNA-Lösung, die nach der Isolation aus dem Gel (siehe Kapitel 3.2.4) gewonnen wurden, wurden mit 2 µl eines Mastermixes (s.u.) vermischt und 90 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung in einem 2,5-%igen Agarosegel (siehe Kapitel 3.2.3). Die entstandenen Restriktionsprodukte wurden im UV-Licht sichtbar gemacht und das Gel fotografiert.

Mastermix: 1 µl 10X NE-Puffer 3 (New England BioLabs)

1 µl *Aci* I (New England BioLabs)

Eine Mutation an Kodon 315 des *katG*-Gens ließ sich durch Restriktion mit der Endonuklease *Aci* I anhand des Bandenmusters der RFLP erkennen (Abbildung 3.1). Kodon 315 findet sich nach 68 Basenpaaren des PCR-Produktes. Das 264 Basenpaar lange, nicht mutierte PCR-Produkt wurde insgesamt nach 68, 185 und 230 Basenpaaren geschnitten, so dass Bruchstücke in der Größe von 68, 117, 45 und 34 Basenpaaren entstanden. Dieses Muster entsprach somit dem Wildtyp. Bei einer Mutation an Kodon 315 gab es keine Schnittstelle nach 68 Basenpaaren, so dass nur Bruchstücke der Größe 34, 45 und 185 Basenpaaren entstanden. Dieses Muster entsprach somit der Mutante. Fanden sich in einem PCR-Produkt Bruchstücke der Größe 34, 45, 68, 117 und 185 Basenpaare, so wurde dies als heteroresistent bezeichnet; in dieser Probe gab es dann sowohl Mutationen als auch Wildtypen an Kodon 315.

Als fraglichen Wildtyp wurde ein Bandenmuster bezeichnet, das, wie der Wildtyp, Bruchstücke der Größe 34, 45, 68 und 117 aufwies, zusätzlich jedoch eine weitere Bande bei 264 Basenpaaren. In diesem Fall konnte auf Grund des dadurch nachgewiesenen Partialverdaus eine Heteroresistenz weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

3.2.5.2 *embB*

Hierbei sollte eine Mutation im Kodon 306 des *embB*-Gens nachgewiesen werden. Fand sich in *embB* eine Basenfolge 5'...CATG...3' (Wildtyp), so wurde mit dem Restriktionsenzym *Nla*III das PCR-Produkt an dieser Stelle geschnitten. Bei einer Mutation wurde an dieser Stelle nicht geschnitten.

8 µl der DNA-Lösung, die nach der Isolation aus dem Gel (siehe Kapitel 3.2.4) gewonnen wurden, wurden mit 2 µl eines Mastermixes (s.u.) vermischt und 90 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung in einem 2,5-%igen Agarosegel (siehe 3.2.3). Die entstandenen Restriktionsprodukte wurden im UV-Licht sichtbar gemacht und das Gel fotografiert.

Mastermix: 1 µl 10X NE4-Puffer (New England BioLabs)
0,1 µl 100X BSA (New England BioLabs)
1 µl *Nla* III (New England BioLabs)

Eine Mutation des Kondons 306 des *embB*-Gens, das mit einer Resistenz gegen Ethambutol assoziiert ist, ließ sich anhand eines charakteristischen Bandenmusters der RFLP erkennen. Kodon 306 findet sich nach 55 Basenpaaren des PCR-Produktes. Das 103 Basenpaare lange, nicht-mutierte PCR-Produkt wurde insgesamt nach 11, 55 und 85 Basenpaaren geschnitten, so dass Bruchstücke in der Größe von 11, 44, 30 und 18 Basenpaaren entstanden. Dieses Muster wurde als Wildtyp bezeichnet. Bei einer Mutation an Kodon 306 konnte keine Schnittstelle nach 55 Basenpaaren nachgewiesen werden, so dass ein RFLP-Muster mit Stücken von 11, 74 und 18 Basenpaaren Länge entstand. Dieses Muster wurde als Mutant bezeichnet. Fand sich ein Muster, in dem sich Wildtyp und Mutant überlagerten, also Banden der Länge von 11, 18, 30, 44 und 74 Basenpaaren auftraten, so wurde dies als Heteroresistenz bezeichnet.

3.2.6 Design der Studie zur Resistenzentwicklung von Patienten mit initial heteroresistenten Primärisolaten in Bulgarien

Die Daten dieser Studie wurden in Bulgarien von Frau Dr. Nadya Markova gesammelt und kulturell auf Resistenzen untersucht. In München war die Doktorandin Frau Waltraud Berger an der molekularbiologischen Untersuchung der Sputen beteiligt. Die Auswertung der Daten erfolgt in dieser Arbeit.

Insgesamt wurden 66 Tuberkulose-Patienten aus Bulgarien untersucht. Bedingung für die Aufnahme in die Studie war eine neu diagnostizierte Tuberkulose, bei der mikroskopisch säurefeste Stäbchen in der Ziehl-Neelsen-Färbung nachgewiesen werden konnten. Ein weiteres Kriterium war, dass die Patienten in der Routinetestung sensibel auf die

Antituberkulotika Isoniazid, Ethambutol, Streptomycin sowie Rifampicin waren. Neben einer molekularen Charakterisierung der Resistenzgene *katG* für Isoniazid, *embB* für Ethambutol und *rpsL* für Streptomycin mittels PCR und RFLP erfolgte eine Isolation von heteroresistenten Paaren eines Stammes aus einer Kultur. Hierbei wurden die resistenten Stämme direkt als Kolonien von den Antituberkulotika enthaltenden Platten abgetragen. Sensible Stämme wurden nachgewiesen, indem Kolonien von Platten, die keine Antituberkulotika enthielten, auf Antituberkulotika enthaltende Platten umgesetzt wurden. Hier fand kein Wachstum statt. Um Fehler möglichst auszuschließen, wurden etwaige Resistenzen ebenfalls in einem unabhängigen Labor, dem Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien in Borstel, bestimmt. Weiterhin wurden dort so genannte "Fingerprints" der isolierten genomischen DNA nach einem standardisiertem Protokoll (van Embden et al., 1993) sowie ein weiteres Verfahren zur Stamm-Differenzierung, die so genannte "Spoligotype"-Technik (Kamerbeek et al., 1997), durchgeführt.

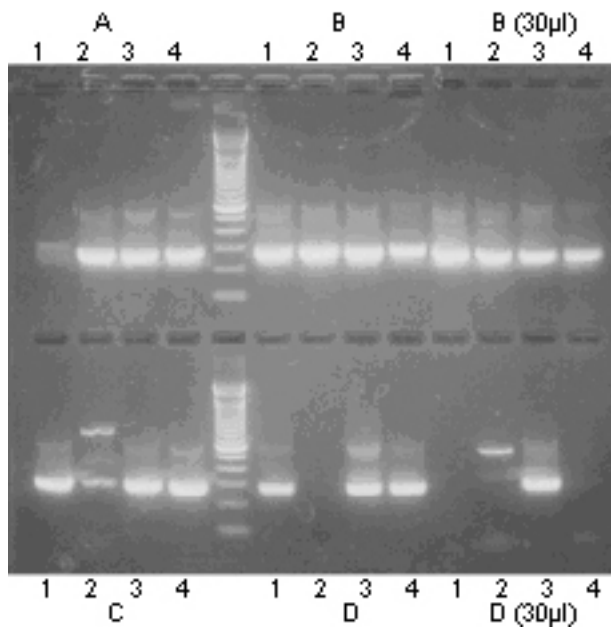
4 Ergebnisse

4.1 Methodische Vorarbeiten

4.1.1 DNA-Isolationsmethoden

Um vor Beginn der DNA-Isolation aus Sputum die Methode auszuwählen, die bei der anschließenden PCR die besten Ergebnisse liefert, wurden vier Methoden miteinander verglichen. Um zufällige Fehler möglichst weitgehend auszuschließen, wurden jeweils identische Aliquots von vier unterschiedlichen Vergleichsproben (A - D, siehe Kapitel 3.2.1) untersucht.

Nur bei der DNA-Isolation mithilfe des QIAamp DNA Mini Kits waren bei allen Ansätzen eindeutige Banden bei 264 bp vorzufinden (siehe Abbildung 4.1). Es bestand hierbei kein Unterschied zwischen Amplifikationen mit 3 μ l DNA im PCR-Ansatz und denen mit 30 μ l DNA im PCR-Ansatz.



DNA-Isolierung: 1: mittels Natronlauge, 2: mittels alkalischer Lyse; 3: mittels QIAamp DNA Mini Kit; 4: mittels QIAamp Stool Mini Kit
A, B, C, D: entsprechend Mix A, Mix B, Mix C, und Mix D.

Abbildung 4.1: Der Vergleich der getesteten DNA-Isolationsmethoden zeigt den Vorteil des QIAamp DNA Mini Kits

4.1.2 Vergleich zwischen kultureller und molekularer Resistenzbestimmung

In dieser Arbeit wurden sowohl Veränderungen in der Kultur als auch in der RFLP untersucht. Um später auch anhand von RFLP-Veränderungen Aussagen treffen zu können, wurde die Korrelation zwischen Ergebnissen der RFLP und kultureller Resistenztestung bestimmt.

4.1.2.1 Isoniazid-Resistenz

Bei insgesamt 63 Sputen konnten Daten aus der RFLP des *katG*-Gens mit denen aus der kulturellen Sensibilitätstestung verglichen werden (siehe Tabelle 4.1). Zunächst wurde ausgehend vom Kulturergebnis untersucht, welche genotypischen Merkmale die Proben aufwiesen. Hierbei zeigte sich, dass in 43 von 46 Proben, die in der Kultur eine Resistenz gegen Isoniazid aufwiesen, gleichzeitig eine Mutation an Kodon 315 des *katG*-Gens nachgewiesen werden konnte. Dies entspricht 94 %. Bei den restlichen 3 in der Kultur resistenten Proben wies einer (2 %) einen fraglichen Wildtyp (Erklärung siehe 5.1.2) in der RFLP auf, 2 (4 %) zeigten Heteroresistenz.

17 Proben zeigten sich kulturell sensibel auf Isoniazid. In keinem Fall konnte hier eine Mutation an Kodon 315 des *katG*-Gens nachgewiesen werden. Stattdessen konnte in 8 Fällen eine Heteroresistenz in der RFLP nachgewiesen werden, entsprechend 47 %, und in 9 Fällen ein Wildtyp, entsprechend 53 %. Da bei keinem dieser Wildtypen ein Partialverdau ausgeschlossen werden konnte, wurden sie als „fraglicher Wildtyp“ eingestuft (siehe Abbildung 4.2).

Tabelle 4.1: Korrelation von RFLP und Kultur bei Isoniazidresistenz (63 Sputen von 35 Patienten)

Originalbezeichnung		
	RFLP	Kultur
7-31B	mutiert	resistent
7-32-B	mutiert	resistent
7-34-B	mutiert	resistent
7-50-B	mutiert	resistent
53-9-B	mutiert	resistent
53-10-B	fraglicher Wildtyp	sensibel
147-5-B	mutiert	resistent
147-6-B(bis)	heteroresistent	sensibel

147-7-B	mutiert	resistent
147-9-B(bis)	mutiert	resistent
147-15-B	mutiert	resistent
147-16-B	mutiert	resistent
210-1-B	mutiert	resistent
287-9-B	mutiert	resistent
299-8-B	fraglicher Wildtyp	resistent
343-1-A	mutiert	resistent
343-6-A	mutiert	resistent
371-0-B	fraglicher Wildtyp	sensibel
372-0-B	fraglicher Wildtyp	sensibel
373-0-A	mutiert	resistent
375-0-B	heteroresistent	sensibel
376-0-B	heteroresistent	resistent
381-0-B	mutiert	resistent
382-0-B	mutiert	resistent
383-0-B	mutiert	resistent
384-0-B	fraglicher Wildtyp	sensibel
385-0-B	fraglicher Wildtyp	sensibel
386-0-B	fraglicher Wildtyp	sensibel
387-0-B	heteroresistent	sensibel
389-0-B	heteroresistent	sensibel
390-0-B	mutiert	resistent
391-0-B	heteroresistent	resistent
392-0-B	fraglicher Wildtyp	sensibel
395-0-B	heteroresistent	sensibel
396-0-B	heteroresistent	sensibel
397-0-B	heteroresistent	sensibel
410-8-A	mutiert	resistent
410-14-B	mutiert	resistent
427-6-B	mutiert	resistent
427-7-B	mutiert	resistent
428-0-B	mutiert	resistent
429-7-B	mutiert	resistent
429-8-B	mutiert	resistent
437-0-B	mutiert	resistent
437-16-B	mutiert	resistent
438-0-B	heteroresistent	sensibel
452-5-B	mutiert	resistent
452-7-A	mutiert	resistent
457-5-B	mutiert	resistent
505-3-B	mutiert	resistent
505-4-B	mutiert	resistent

533-0-B	fraglicher Wildtyp	sensibel
534-7-B	mutiert	resistent
534-10-A	mutiert	resistent
534-12-A	mutiert	resistent
542-6-B	mutiert	resistent
548-0-B	fraglicher Wildtyp	sensibel
566-4-B	mutiert	resistent
607-0-B	mutiert	resistent
607-3-B	mutiert	resistent
607-5-B	mutiert	resistent
624-1-B	mutiert	resistent
624-5-A bis	mutiert	resistent



Abbildung 4.2: Die Korrelation zwischen Kultur und RFLP bei Isoniazidresistenz zeigt Übereinstimmung bei 43 von 46 in der Kultur resistenten Isolatn und keine Mutationen bei 17 in der Kultur sensiblen Isolatn. Heteroresistenz wurde bei einem der in der Kultur resistenten und 9 der in der Kultur sensiblen Sputen nachgewiesen.

Wurde nun umgekehrt, ausgehend von den RFLP-Ergebnissen, untersucht, welche Kulturergebnisse dabei auftraten, so zeigte sich, dass alle Proben, die eine Mutation an Kodon 315 des *katG*-Gens aufwiesen, in der Kultur resistent gegen Isoniazid waren. Die 10 Proben, die in der RFLP als Wildtyp getestet wurden, waren in der Kultur zu 90 % sensibel

und nur zu 10 % resistent. Bei den 10 in der RFLP heteroresistenten Sputen erwiesen sich 8 (80 %) in der Kultur als sensibel und 2 (20 %) als resistent (siehe Abbildung 4.3).

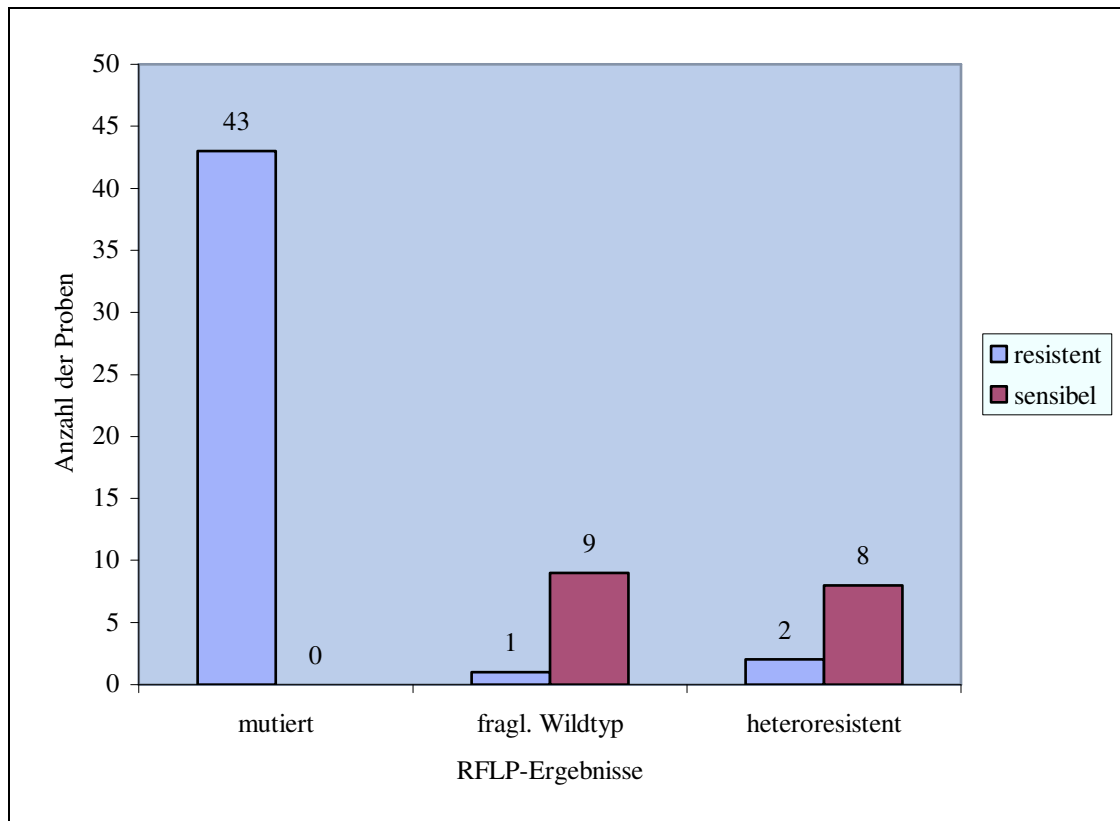


Abbildung 4.3: Die Korrelation zwischen RFLP und Kultur bei Isoniazidresistenz zeigt, dass alle mutierten Genotypen phänotypisch resistent waren. 2 der 10 heteroresistenten Genotypen zeigten in der Kultur Isoniazidresistenz, 8 waren sensibel.

4.1.2.2 Ethambutol-Resistenz

Bei 43 Proben konnte die RFLP des *embB*-Gens mit der Sensibilitätstestung auf Ethambutol in der Kultur verglichen werden (siehe Tabelle 4.2). Wiederum zunächst vom Kulturergebnis ausgehend, wurde die Korrelation mit den Ergebnissen der RFLP untersucht. Hierbei zeigte sich, dass alle 21 Proben, die sensibel in der Kultur waren, keine Mutation an Kodon 306 des *embB*-Gens aufwiesen. Ebenso verhielt es sich mit den Proben, die in der Kultur als fraglich sensibel bezeichnet wurden. Bei diesen handelte es sich um Sputen, bei denen in der Kultur resistente Mikrokolonien wuchsen, die als fraglich sensibel definiert wurden. Anders verhielt es sich mit den 20 Proben, die in der Kultur eine Resistenz gegen Ethambutol zeigten: so konnte bei 11 dieser Proben keine Mutation an Kodon 306 des *embB*-Gens nachgewiesen

werden (entsprechend 55 %), 8 zeigten eine Mutation (entsprechend 40 %) und bei einer zeigte sich in der RFLP eine Heteroresistenz (entsprechend 5 %, siehe Abbildung 4.4).

Tabelle 4.2: Korrelation von RFLP und Kultur bei Ethambutol-Resistenz (43 Sputen von 30 Patienten)

Originalbezeichnung		
	RFLP	Kultur
7-31B	Wildtyp	fragl. sensibel
7-34-B	Wildtyp	sensibel
147-6-B(bis)	Wildtyp	sensibel
147-9-B(bis)	Wildtyp	fragl. sensibel
147-15-B	Wildtyp	resistent
147-16-B	Wildtyp	resistent
147-21-B	Wildtyp	resistent
210-1-B	Wildtyp	sensibel
287-9-B	Wildtyp	sensibel
299-8-B	mutiert	resistent
371-0-B	Wildtyp	sensibel
372-0-B	Wildtyp	sensibel
375-0-B	Wildtyp	sensibel
376-0-B	Wildtyp	sensibel
377-0-B	Wildtyp	sensibel
383-0-B	Wildtyp	fragl. sensibel
384-0-B	Wildtyp	sensibel
385-0-B	Wildtyp	sensibel
386-0-B	Wildtyp	sensibel
387-0-B	Wildtyp	sensibel
393-0-B	Wildtyp	sensibel
395-0-B	Wildtyp	sensibel
410-8-A	heteroresistent	resistent
410-14-B	mutiert	resistent
429-7-B	Wildtyp	resistent
429-8-B	Wildtyp	resistent
429-12-B	Wildtyp	resistent
505-3-B	Wildtyp	sensibel
505-4-B	Wildtyp	resistent
542-6-B	mutiert	resistent
593-2-A	Wildtyp	sensibel
607-0-B	mutiert	resistent
607-2-B	mutiert	resistent

287-9-B	Wildtyp	sensibel
394-11-B	Wildtyp	resistent
394-12-B	Wildtyp	sensibel
534-0-B	Wildtyp	resistent
534-10-A	Wildtyp	resistent
551-2A	Wildtyp	sensibel
589-1-B	Wildtyp	resistent
598-0-B	mutiert	resistent
598-2-A	mutiert	resistent
605-0-B	mutiert	resistent
660-0-B	Wildtyp	sensibel

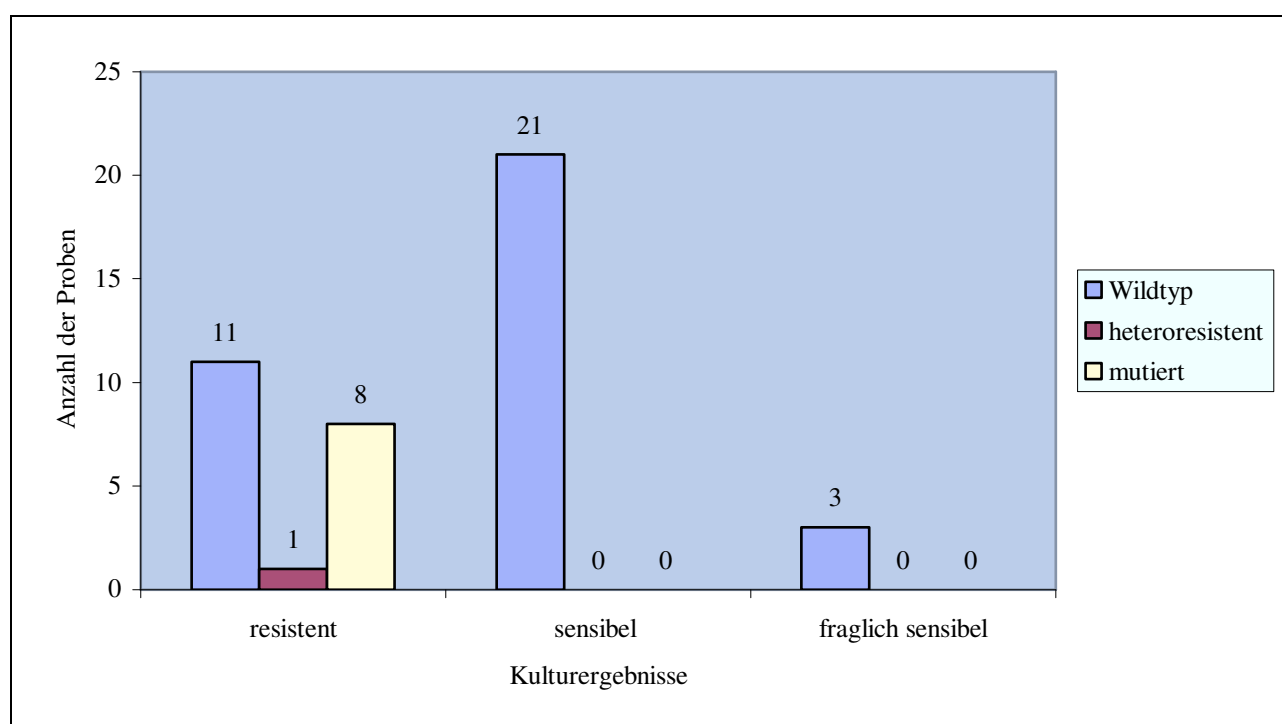


Abbildung 4.4: Die Korrelation zwischen Kultur und RFLP bei Ethambutolresistenz zeigt Übereinstimmung bei 11 von 20 in der Kultur resistenten Isolaten und keine Mutationen bei 21 in der Kultur sensiblen Isolaten. Heteroresistenz wurde bei einem der in der Kultur resistenten Sputen nachgewiesen.

Wurde nun ausgehend von den RFLP-Ergebnissen untersucht, welche Kulturergebnisse im Vergleich dazu auftraten, konnte bei allen 8 Sputen, bei denen eine Punktmutation an Kodon 306 des *embB*-Gens nachgewiesen werden konnte, kulturell eine Resistenz detektiert werden. Bei insgesamt 34 Proben fand sich keine Mutation an dieser Stelle, hiervon zeigten sich jedoch nur 21 (entsprechend 62 %) in der Kultur sensibel, 3 davon zeigten in der Kultur resistente Mikrokolonien (9 %) und wurden deswegen als fraglich sensibel bezeichnet. Die

restlichen 8 Proben (24 %) waren in der Kultur resistent gegen Ethambutol. Bei einer Probe konnten eine Heteroresistenz nachgewiesen werden, in der Kultur zeigte diese eine Resistenz (siehe Abbildung 4.5).

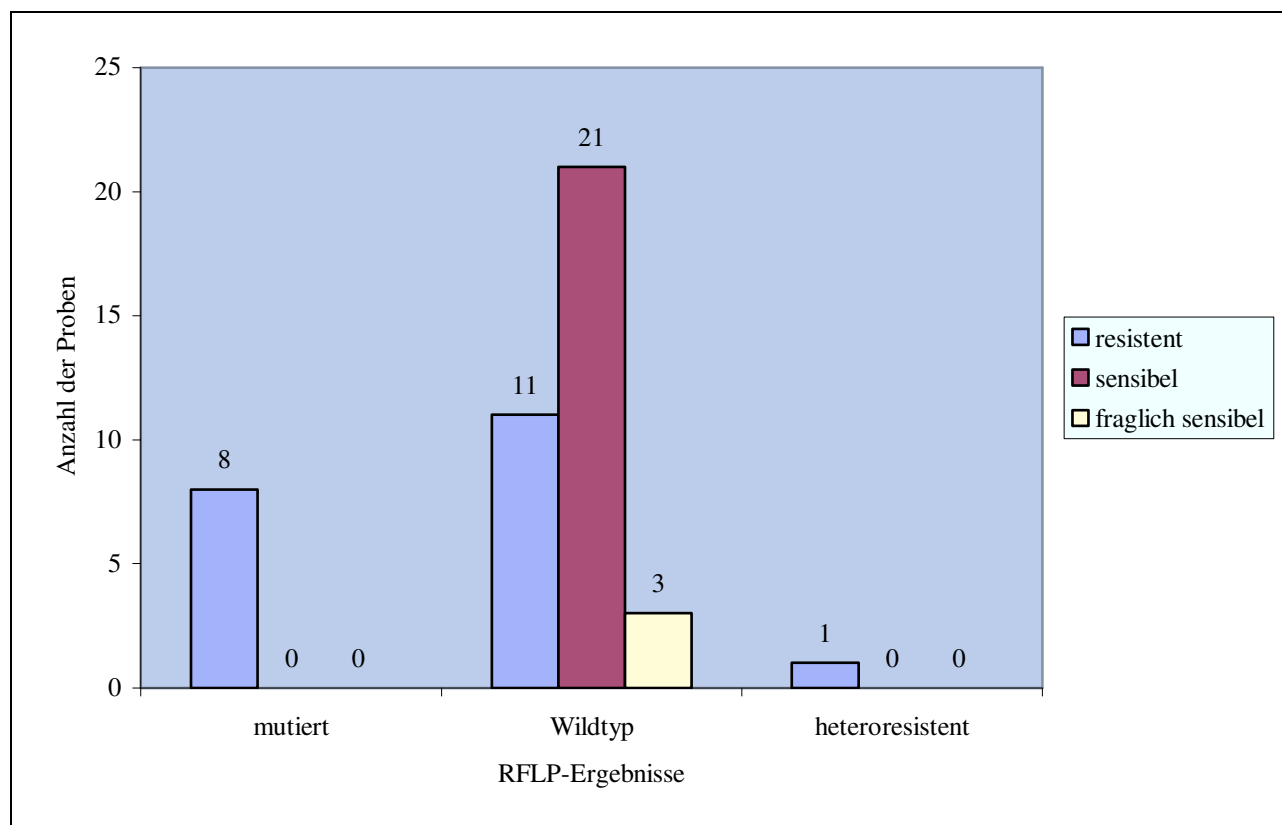


Abbildung 4.5: Die Korrelation zwischen RFLP und Kultur bei Ethambutolresistenz zeigt, dass alle mutierten Genotypen phänotypisch resistent waren, ebenso 11 der 35 Wildtypen. Das Sputum mit den heteroresistenten Genotypen zeigte in der Kultur Ethambutolresistenz.

4.2 Longitudinale Untersuchung zur Resistenzentwicklung von Patienten mit initial heteroresistenten Primärisolaten aus Sofia, Bulgarien

In der Studie in Bulgarien gelang es insgesamt bei 11 von 66 Patienten resistente und sensible Isolate von *Mycobacterium tuberculosis* aus demselben Sputum kulturell anzuzüchten (siehe Tabelle 4.3). Einschlusskriterien waren eine erstmals diagnostizierte Tuberkulose und die Abwesenheit kultureller Resistenzen gegen Isoniazid, Ethambutol, Streptomycin und Rifampicin in der Routinediagnostik.

Am häufigsten traten in Bulgarien Heteroresistenzen gegen Streptomycin auf. So konnten bei 7 Patienten (N42, N50, N57, N58, N60, N61, N64) kulturell sensible und resistente Mykobakterien desselben Sputums isoliert werden. Dies zeigt eine Häufigkeit von 11 %. Bei einem anschließendem molekularem IS6110 Fingerprinting dieser Isolate erwies sich eines der heteroresistenten Paare (N60) als nicht identisch, die übrigen 6 Paare hatten identische RFLP-Muster. Im weiteren Verlauf entwickelte unter diesen Patienten keiner eine Resistenz gegen Streptomycin.

Heteroresistenzen gegen Ethambutol und Isoniazid traten in Bulgarien gleich häufig auf. So zeigte sich bei 2 Patienten (N11 und N51) eine initiale Heteroresistenz gegen Isoniazid. Bezogen auf die Gesamtzahl der Patienten entspricht dies 3 %. Im Fingerprinting zeigte sich bei beiden Patienten ein jeweils identisches Ergebnismuster der heteroresistenten Paare. Im Verlauf entwickelte einer der beiden Patienten (N51) bereits bei einer Kontrolle nach 22 Tagen eine nun auch in der Kultur nachweisbare Resistenz gegen Isoniazid. Bei 2 weiteren Patienten (N45, N53) gelang kulturell der Nachweis von sensiblen und resistenten Mykobakterien gegen Ethambutol. Hierbei zeigte sich bei der Probe von Patient N53 ein nicht identisches Muster der heteroresistenten Isolate im molekularen IS6110 Fingerprint. Dieser entwickelte nach 3 Monaten eine kulturell nachgewiesene Resistenz gegen Ethambutol.

Eine direkte Amplifikation von DNA mittels PCR und anschließender Charakterisierung der Resistenzgene mittels RFLP gelang nur bei 2 der heteroresistenten Paare, wahrscheinlich bedingt durch die lange Lagerungszeit und den Transport von Sofia nach München. Beide Proben zeigten ein gemischtes genotypisches RFLP-Muster.

Insgesamt entwickelten 2 von 11 Patienten, bei denen anfangs Heteroresistenzen nachgewiesen werden konnten, im Therapieverlauf eine Resistenz. Dies entspricht 18 %. Eine Kontrollgruppe, bei der zu Therapiebeginn nur Mykobakterien nachgewiesen werden konnten, die sensibel auf Isoniazid, Ethambutol, Streptomycin und Rifampicin waren, bestand aus 15 Personen. Aus dieser Gruppe entwickelte nur einer, entsprechend 7 %, im Therapieverlauf Resistenzen. Vier Monate nach Beginn der Therapie konnte bei diesem Patienten im Rahmen der Routine-Untersuchung *Mycobacterium tuberculosis* isoliert werden, das resistent gegen Isoniazid und Ethambutol war.

Tabelle 4.3: Mikrobiologische und molekulare Ergebnisse von 11 Patienten mit heteroresistentem *Mycobacterium tuberculosis*

Patientennummer	Heteroresistenz in der Kultur gegen	Fingerprints von heteroresistenten Paaren	Entwicklung von Resistenzen unter Therapie
N11	Isoniazid	identisch	keine
N42	Streptomycin	identisch	keine
N45	Ethambutol	identisch	keine
N50	Streptomycin	identisch	keine
N51	Isoniazid	identisch	gegen Isoniazid
N53	Ethambutol	nicht identisch	gegen Ethambutol
N57	Streptomycin	identisch	keine
N58	Streptomycin	identisch	keine
N60	Streptomycin	nicht identisch	keine
N61	Streptomycin	identisch	keine
N64	Streptomycin	identisch	keine

4.3 Charakterisierung heteroresistenter Isolate von Patienten aus Abchasien im Rahmen des EU-Projektes „LONG-DRUG“

Insgesamt wurden für die vorliegende Arbeit 746 Sputen von 320 Patienten untersucht. Aus diesen gelang aus 330 Sputen eine Isolation und Amplifikation von *katG* und von diesen wiederum in 254 Fällen ein positives Ergebnis des Restriktionfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP). Von 36 Patienten konnte aufgrund von Verlaufsproben (Isolate von unterschiedlichen Zeitpunkten) eine Aussage getroffen werden, ob an Kodon 315 des *katG*-Gens eine Veränderung im Therapieverlauf eingetreten war. Ebenso gelang aus 330 Sputen eine Vervielfältigung des *embB*-Gens und davon wiederum in 211 Fällen ein positives RFLP-Ergebnis. Durch Verlaufsproben konnte bei 25 Patienten festgestellt werden, ob unter der Therapie eine Veränderung an Kodon 306 des *embB*-Gens eingetreten war.

In 16 Fällen konnte sowohl eine Aussage über Veränderungen im *katG*-Gen als auch im *embB*-Gen getroffen werden. Insgesamt gab es daher 45 Patienten, bei denen der Therapieverlauf beobachtet werden konnte (siehe Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Resistenzentwicklung im Therapieverlauf bei 45 Patienten

Patient	Isolat	Isoniazid		Ethambutol		Therapieerfolg
		Kultur	RFLP	Kultur	RFLP	
7	31-B	resistent	mutiert	fragl.sensibel	Wildtyp	Therapieversager
	32-B	resistent	mutiert			
	34-B	resistent	mutiert	sensibel	Wildtyp	
	45-B			kein Wachstum	Wildtyp	
	50-B	resistent	mutiert			
	52-B	keine Daten	mutiert	keine Daten	Wildtyp	
53	9-B	resistent	mutiert			Studienabbruch
	10-B	sensibel	fragl. Wildtyp			
	11-A	kein Wachstum	mutiert			
147	5-B	resistent	mutiert			Therapieversager
	6-B(bis)	sensibel	heteroresistent	sensibel	Wildtyp	
	7-B	resistent	mutiert			
	8-B	kontaminiert	mutiert			
	9-B(bis)	resistent	mutiert	fragl. sensibel	Wildtyp	
	10-B	kein Wachstum	mutiert			
	15-B	resistent	mutiert	resistent	Wildtyp	
	16-B	resistent	mutiert	resistent	Wildtyp	
	17-A	kein Wachstum	mutiert	kein Wachstum	Wildtyp	
21-B			resistent	Wildtyp		

287	9-B			sensibel	Wildtyp	keine Daten
	29-B			keine Daten	Wildtyp	
299	8-B	resistent	fragl. Wildtyp			Heilung
	11-B	kein Wachstum	heteroresistent			
343	1-A	resistent	mutiert			Therapieversager
	6-A	resistent	mutiert			
357	4-A	kein Wachstum	heteroresistent	kein Wachstum	Wildtyp	Heilung
	14-A	kein Wachstum	fragl. Wildtyp	kein Wachstum	Wildtyp	
377	5-B	kein Wachstum	heteroresistent			Heilung
	18-B	kein Wachstum	Wildtyp			
389	0-B	sensibel	heteroresistent			Heilung
	3-A	kein Wachstum	fragl. Wildtyp			
394	11-B			resistent	Wildtyp	keine Daten
	12-B			sensibel	Wildtyp	
	16-B			keine Daten	Wildtyp	
396	0-B	sensibel	heteroresistent			Heilung
	3-B	kontaminiert	heteroresistent			
410	0-B	keine Daten	mutiert	keine Daten	mutiert	Therapieversager
	6-B	kein Wachstum	mutiert			
	7-B	keine Daten	mutiert			
	8-B	resistent	mutiert	resistent	heteroresistent	
	9-B	keine Daten	mutiert			
	11-B			keine Daten	mutiert	
	12-B			keine Daten	mutiert	
	13-B			keine Daten	mutiert	
	14-B	resistent	mutiert	resistent	mutiert	
17-B	keine Daten	mutiert				
412	0-B	keine Daten	heteroresistent			Heilung
	19-B	kein Wachstum	Wildtyp			
418	0-B	keine Daten	mutiert	keine Daten	Wildtyp	Therapieversager
	10-A	kein Wachstum	mutiert	kein Wachstum	Wildtyp	
427	0-B	keine Daten	mutiert			Therapieversager
	6-B	resistent	mutiert			
	7-B	resistent	mutiert			
	9-A	kein Wachstum	mutiert			
428	0-B	resistent	mutiert			Therapieversager
	6-B	keine Daten	mutiert			
429	0-B			keine Daten	Wildtyp	Therapieversager
	7-B	resistent	mutiert	resistent	Wildtyp	
	8-B	resistent	mutiert	resistent	Wildtyp	
	12-B			resistent	Wildtyp	
	17-B	keine Daten	mutiert	keine Daten	Wildtyp	
	18-A	keine Daten	fragl. Wildtyp	keine Daten	Wildtyp	
437	0-B	resistent	mutiert			Studienabbruch
	16-B	resistent	mutiert			
438	0-B	sensibel	heteroresistent			Heilung
	10-B	keine Daten	mutiert			

452	5-B	resistent	mutiert			keine Daten
	7-A	resistent	mutiert			
457	5-B	resistent	mutiert			Tod durch andere Erkrankung
	6-B	keine Daten	mutiert			
505	3-B	resistent	mutiert	sensibel	Wildtyp	keine Daten
	4-B	resistent	mutiert	resistent	Wildtyp	
507	2-B			keine Daten	Wildtyp	Heilung
	3-B			kein Wachstum	Wildtyp	
530	0-B	keine Daten	fragl. Wildtyp			Heilung
	2-B	kein Wachstum	fragl. Wildtyp			
533	0-B	sensibel	fragl. Wildtyp			Heilung
	2-B	kein Wachstum	fragl. Wildtyp			
534	0-B			resistent	Wildtyp	Studienabbruch
	7-B	resistent	mutiert			
	10-A	resistent	mutiert	resistent	Wildtyp	
	11-B	keine Daten	mutiert			
	12-A	resistent	mutiert			
542	0-B	keine Daten	mutiert	keine Daten	mutiert	keine Daten
	6-B	resistent	mutiert	resistent	mutiert	
548	0-B	sensibel	fragl. Wildtyp			Therapieversager
	6-B	kein Wachstum	mutiert			
551	0-B			keine Daten	Wildtyp	Studienabbruch
	2-A			sensibel	Wildtyp	
565	0-B			keine Daten	Wildtyp	Studienabbruch
	4-A	kein Wachstum	heteroresistent	kein Wachstum	Wildtyp	
	5-B	kein Wachstum	mutiert			
566	0-B	keine Daten	mutiert			keine Daten
	4-B	resistent	mutiert			
585	0-B	keine Daten	fragl. Wildtyp			Therapieversager
	8-B	kein Wachstum	mutiert			
589	0-B			keine Daten	Wildtyp	Heilung
	2-A			resistent	Wildtyp	
593	0-B	keine Daten	mutiert	keine Daten	Wildtyp	keine Daten
	2-A			sensibel	Wildtyp	
	3-B	keine Daten	mutiert	keine Daten	Wildtyp	
	6-B	keine Daten	mutiert	keine Daten	Wildtyp	
597	0-B	kontaminiert	mutiert			Heilung
	2-A			kein Wachstum	Wildtyp	
	3-B	kein Wachstum	heteroresistent	kein Wachstum	Wildtyp	
	6-B	kein Wachstum	Wildtyp	kein Wachstum	Wildtyp	
598	0-B			resistent	mutiert	Studienabbruch
	2-A			resistent	mutiert	

605	0-B			resistent	mutiert	keine Daten
	1-B			keine Daten	mutiert	
607	0-B	resistent	mutiert	resistent	mutiert	Tod an Tuberkulose
	2-B			resistent	mutiert	
	3-B	resistent	mutiert			
	5-B	resistent	mutiert			
	6-B	kein Wachstum	mutiert			
618	0-B	keine Daten	mutiert	keine Daten	mutiert	keine Daten
	2-B	keine Daten	mutiert	keine Daten	mutiert	
	5-B	keine Daten	mutiert			
620	0-B			keine Daten	Wildtyp	keine Daten
	1-B	keine Daten	fragl. Wildtyp	keine Daten	Wildtyp	
	6-B	keine Daten	mutiert			
624	1-B	resistent	mutiert			keine Daten
	5-A(bis)	resistent	mutiert			
637	0-B			keine Daten	Wildtyp	keine Daten
	3-B			keine Daten	Wildtyp	
640	2-B	keine Daten	mutiert	keine Daten	Wildtyp	keine Daten
	6-B	keine Daten	fragl. Wildtyp	keine Daten	Wildtyp	
660	0-B			sensibel	Wildtyp	Heilung
	2-B			keine Daten	Wildtyp	
	3-B			keine Daten	Wildtyp	
674	0-B	keine Daten	fragl. Wildtyp			Heilung
	2-A	keine Daten	mutiert			

Folgende Veränderungen traten bei Patienten mit nachgewiesener Heteroresistenz auf:

- Patient 147 zeigte sechs Monate nach Therapiebeginn eine Heteroresistenz im *katG*-Gen. Einen Monat zuvor und in der Folge dominierte die Mutante. Die Sputumprobe, die den Heteroresistenznachweis erlaubte, zeigte in der kulturellen Resistenzbestimmung Empfindlichkeit gegenüber Isoniazid. Im Monat zuvor und in den elf Monaten danach konnte nur der mutierte Genotyp und kulturelle Resistenz gegen Isoniazid nachgewiesen werden.
- Patient 299 zeigte zunächst nach acht Monaten Therapie einen fraglichen Wildtyp im *katG*-Gen, drei Monate später war eine Heteroresistenz nachzuweisen.
- Patient 357 zeigte umgekehrt nach vier Monaten zunächst eine Heteroresistenz im *katG*-Gen, zehn Monate später dann einen fraglichen Wildtyp.
- Patient 377 zeigte ebenfalls zunächst eine Heteroresistenz in *katG* nach fünf Monaten, im Therapieverlauf konnte jedoch ein Wildtyp nach insgesamt 18 Monaten Therapie nachgewiesen werden.

- Patient 389 zeigte bereits zu Therapiebeginn eine Heteroresistenz in *katG*, drei Monate später konnte ein fraglicher Wildtyp nachgewiesen werden.
- Patient 396 wies in beiden untersuchten Proben, zu Therapiebeginn und drei Monate später, eine Heteroresistenz-Muster in der RFLP von *katG* auf.
- Patient 410 zeigte zunächst eine Mutation in *embB* zu Therapiebeginn, nach acht Monaten konnte eine Heteroresistenz nachgewiesen werden, nach elf Monaten erneut nur noch die Mutation.
- Patient 412 zeigte einen Wechsel von einer Heteroresistenz in *katG* zu Therapiebeginn zu einem Wildtyp 19 Monate später.
- Patient 438 zeigte nach einer anfänglichen Heteroresistenz in der RFLP von *katG* und einer Sensibilität gegen INH in der Kultur zu Therapiebeginn nach zehn Monaten eine Mutation in der RFLP. Kulturelle Daten konnten für das zweite Sputum nicht erhoben werden.
- Patient 565 zeigte einen Wechsel von einer Heteroresistenz in *katG* nach vier Monaten zu einer Mutation einen Monat später.
- Bei Patient 597 änderte sich das RFLP-Muster von *katG* von einer Mutation in ein Heteroresistenz-Muster drei Monate später und wiederum drei Monate später einen Wildtyp.

Patienten, bei denen im Therapieverlauf in der RFLP von *katG* eine neu aufgetretene Mutation nachgewiesen wurde:

- Patient 548 zeigte zu Therapiebeginn einen fraglichen Wildtyp an *katG*, nach einem halben Jahr konnte eine Mutation an dieser Stelle nachgewiesen werden.
- Patient 585 zeigte zu Therapiebeginn einen fraglichen Wildtyp an *katG*, acht Monate später jedoch eine Mutation.
- Patient 620 zeigte einen Monat nach Therapiebeginn einen fraglichen Wildtyp an *katG*, nach sechs Monaten eine Mutation.
- Patient 674 zeigte zu Therapiebeginn ebenfalls einen fraglichen Wildtyp an *katG*, zwei Monate später bereits eine Mutation.

Neu aufgetretene Resistenzen gegen Ethambutol wurden bei folgenden Patienten beobachtet:

- Patient 505 entwickelte eine in der Kultur nachweisbare Resistenz gegen Ethambutol. Zunächst konnte drei Monate nach Therapiebeginn eine Sensibilität nachgewiesen werden, ein Monat später war eine Resistenz nachweisbar. Allerdings fand sich in der RFLP zu beiden Zeitpunkten keine Mutation an Kodon 306 des *embB*-Gens.
- Patient 147 wies neben einer Veränderung der Resistenzlage gegen Isoniazid auch eine Veränderung der Resistenzlage gegen Ethambutol auf. Bei gleich bleibendem Wildtyp an Kodon 306 des *embB*-Gens entwickelte er dennoch eine Resistenz in der Kultur.

Weitere Veränderungen ohne Resistenzentwicklung wurden ebenso nachgewiesen:

- Patient 53 zeigte neun Monate nach Therapiebeginn innerhalb von zwei Monaten einen Wechsel zwischen einer Mutation zu einem fraglichen Wildtyp wiederum zu einer Mutation im *katG*-Gen. In der Kultur zeigte sich ebenfalls ein Wechsel von einer Resistenz zu einer Sensibilität gegen Isoniazid in den ersten beiden Isolaten. Aus dem dritten Sputum konnte kein kulturelles Wachstum erzielt werden.
- Patient 394 zeigte ebenfalls einen Wechsel von einer Resistenz zu einer Sensibilität, allerdings gegen Ethambutol bei gleichbleibendem Wildtyp in der RFLP von *embB*. Diese Veränderung trat zwischen dem elften und zwölften Monat nach Therapiebeginn auf.
- Patient 429 zeigte nach Mutationen im *katG*-Gen in den Monaten 7, 8 und 17 im Monat 18 einen fraglichen Wildtyp.

Von insgesamt 11 der 45 Patienten aus Abchasien konnte mindestens zu einem Zeitpunkt eine Heteroresistenz in der RFLP nachgewiesen werden. Bis auf Patient 410, bei dem eine Heteroresistenz 8 Monate nach Therapiebeginn in der RFLP des *embB*-Gens nachgewiesen wurde, bei dem aber zuvor und anschließend eine Mutation nachzuweisen war, fanden sich bei den übrigen Patienten Heteroresistenz-Muster ausschließlich im *katG*-Gen. Insgesamt entwickelten 3 der 11 Patienten eine Resistenz aus einer Heteroresistenz (Patient 147, Patient 438, Patient 565). Dies entspricht 27 %. Bei einem weiteren Patienten wurde bei anfänglicher Resistenz zwischenzeitlich eine Heteroresistenz nachgewiesen (Patient 410).

4 weitere Patienten (548, 585, 620, 674) entwickelten im Verlauf der Therapie in der RFLP eine Mutation im *katG*-Gen. Dies entspricht 12 %. Hierbei fällt auf, dass dies bei allen aus einem zuvor nachgewiesenen fraglichen Wildtyp erfolgte. Leider standen bei diesen Patienten keine Kulturergebnisse zur Verfügung. 2 weitere Patienten (505 und 147) entwickelten kulturelle Resistenzen gegen Ethambutol. Insgesamt entwickelten somit 6 von 35 Patienten (17 %), bei denen keine Heteroresistenz nachgewiesen werden konnte, eine Resistenz im Verlauf der Therapie.

4.4 Resistenzgenotypen in Abchasien zu Therapiebeginn

Von 253 Patienten aus Abchasien waren im Rahmen der LONG-DRUG-Studie Sputen zu Therapiebeginn vorhanden. Diese Sputen wurden auf Mutationen im Kodon 315 des *katG*-Gens sowie auf Mutationen im Kodon 306 des *embB*-Gens untersucht (siehe Tabelle 4.5).

Bei 59 Patienten (23 %) wurde eine Mutation im *katG*-Gen nachgewiesen, 3 Patienten (1 %) zeigten einen Wildtyp, bei 40 Patienten (16 %) zeigte sich in der RFLP ein fraglicher Wildtyp und bei 37 Patienten (14 %) konnte eine Heteroresistenz festgestellt werden. Bei 117 Patienten (46 %) ergab die PCR bzw. RFLP kein Ergebnis (siehe Abbildung 4.6).

Anders verhielt es sich zu Therapiebeginn mit Mutationen im *embB*-Gen. Hier fand sich bei 116 Patienten (45 %) in der RFLP ein Wildtyp, d.h. keine Mutation an Kodon 306. Nur bei 15 Patienten (6 %) fand sich eine Mutation und bei 125 Patienten (49 %) konnte kein Ergebnis in der PCR bzw. RFLP gewonnen werden (siehe Abbildung 4.7).

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Untersuchung von *katG* und *embB* zu Therapiebeginn

Patient	Isolat	RFLP	
		<i>katG</i>	<i>embB</i>
371	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
372	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
373	0-A	mutiert	kein Ergebnis
374	0-A	kein Ergebnis	Wildtyp
375	0-B	Heteroresistenz	Wildtyp
376	0-B	Heteroresistenz	Wildtyp
377	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
378	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
379	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
380	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
381	0-B	mutiert	kein Ergebnis
382	0-B	mutiert	kein Ergebnis
383	0-B	mutiert	Wildtyp
384	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
385	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
386	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
387	0-B	Heteroresistenz	Wildtyp
388	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
389	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
390	0-B	mutiert	kein Ergebnis
391	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
392	0-B	fragl. Wildtyp	kein Ergebnis
393	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
394	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
395	0-B	Heteroresistenz	Wildtyp
396	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
397	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
398	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
399	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
400	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
401	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
402	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
403	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
404	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
405	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
406	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
407	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
408	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
409	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
410	0-B	mutiert	mutiert
411	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
412	0-B	Heteroresistenz	Wildtyp
413	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp

Patient	Isolat	RFLP	
		<i>katG</i>	<i>embB</i>
566	0-B	mutiert	Wildtyp
567	0-A	fragl. Wildtyp	kein Ergebnis
568	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
569	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
570	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
571	0-A	Heteroresistenz	Wildtyp
572	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
573	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
574	0-B	mutiert	Wildtyp
575	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
577	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
578	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
579	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
580	0-B	mutiert	Wildtyp
581	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
582	0-B	mutiert	mutiert
583	0-A	mutiert	Wildtyp
584	0-B	Heteroresistenz	Wildtyp
585	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
586	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
587	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
588	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
589	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
590	0-B	mutiert	Wildtyp
591	0-B	mutiert	Wildtyp
592	0-B	mutiert	kein Ergebnis
593	0-B	mutiert	Wildtyp
594	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
595	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
596	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
597	0-B	mutiert	kein Ergebnis
598	0-B	mutiert	mutiert
599	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
600	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
601	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
603	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
604	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
605	0-B	kein Ergebnis	mutiert
606	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
607	0-B	mutiert	mutiert
608	0-A	kein Ergebnis	Wildtyp
609	0-A	mutiert	Wildtyp
610	0-B	mutiert	kein Ergebnis

414	0-A	Heteroresistenz	Wildtyp
415	0-B	Heteroresistenz	Wildtyp
416	0-B	Heteroresistenz	Wildtyp
417	0-B	mutiert	Wildtyp
418	0-B	mutiert	Wildtyp
419	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
420	0-B	Heteroresistenz	Wildtyp
421	0-B	kein Ergebnis	mutiert
422	0-B	mutiert	Wildtyp
423	0-A	Heteroresistenz	kein Ergebnis
424	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
425	0-A	kein Ergebnis	Wildtyp
426	0-B	mutiert	Wildtyp
427	0-B	mutiert	mutiert
428	0-B	mutiert	Wildtyp
429	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
430	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
431	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
432	0-B	Heteroresistenz	Wildtyp
433	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
434	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
435	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
436	0-B	mutiert	kein Ergebnis
437	0-B	mutiert	Wildtyp
438	0-B	Heteroresistenz	Wildtyp
439	0-B	Heteroresistenz	mutiert
440	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
441	0-A	fragl. Wildtyp	Wildtyp
442	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
443	0-A	mutiert	Wildtyp
444	0-B	mutiert	Wildtyp
445	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
446	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
447	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
511	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
512	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
513	0-B	mutiert	Wildtyp
514	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
515	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
517	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
519	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
521	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
522	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
523	0-B	mutiert	kein Ergebnis
524	0-B	mutiert	Wildtyp
525	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
526	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
527	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
529	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis

611	0-A	mutiert	Wildtyp
612	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
613	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
614	0-A	mutiert	Wildtyp
615	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
616	0-A	kein Ergebnis	Wildtyp
617	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
618	0-B	mutiert	mutiert
619	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
620	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
621	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
622	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
624	0-A	kein Ergebnis	mutiert
625	0-A	kein Ergebnis	mutiert
626	0-A	mutiert	Wildtyp
627	0-A	mutiert	Wildtyp
628	0-A	mutiert	Wildtyp
629	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
630	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
631	0-A	kein Ergebnis	Wildtyp
632	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
633	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
634	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
635	0-B	kein Ergebnis	mutiert
636	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
637	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
638	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
639	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
642	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
643	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
644	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
645	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
646	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
648	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
649	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
650	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
651	0-B	mutiert	kein Ergebnis
652	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
653	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
654	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
655	0-B	Heteroresistenz	Wildtyp
656	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
657	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
658	0-B	fragl. Wildtyp	kein Ergebnis
659	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
660	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
661	0-B	Heteroresistenz	kein Ergebnis
663	0-A	mutiert	Wildtyp
664	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis

530	0-B	fragl. Wildtyp	kein Ergebnis
531	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
532	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
533	0-B	fragl. Wildtyp	kein Ergebnis
534	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
535	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
536	0-B	fragl. Wildtyp	kein Ergebnis
537	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
538	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
539	0-B	mutiert	kein Ergebnis
540	0-B	mutiert	kein Ergebnis
541	0-B	fragl. Wildtyp	kein Ergebnis
542	0-B	mutiert	mutiert
543	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
544	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
545	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
546	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
547	0-A	fragl. Wildtyp	kein Ergebnis
548	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
549	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
550	0-A	kein Ergebnis	Wildtyp
551	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
552	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
553	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
554	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
555	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
556	0-B	fragl. Wildtyp	kein Ergebnis
557	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
558	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
559	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
560	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
562	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
563	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
564	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
565	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp

665	0-B	mutiert	mutiert
666	0-B	mutiert	Wildtyp
667	0-B	mutiert	Wildtyp
668	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
669	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
671	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
672	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
673	0-B	Wildtyp	Wildtyp
674	0-B	fragl. Wildtyp	kein Ergebnis
675	0-B	fragl. Wildtyp	Wildtyp
676	0-B	Heteroresistenz	Wildtyp
677	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
678	0-B	mutiert	mutiert
679	0-B	kein Ergebnis	Wildtyp
680	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
681	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
682	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
683	0-B	mutiert	kein Ergebnis
684	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
685	0-B	mutiert	kein Ergebnis
686	0-A	mutiert	kein Ergebnis
688	0-B	mutiert	kein Ergebnis
689	0-B	mutiert	Wildtyp
690	0-A	kein Ergebnis	Wildtyp
691	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
692	0-B	kein Ergebnis	kein Ergebnis
693	0-B	mutiert	Wildtyp
695	0-B	mutiert	kein Ergebnis
696	0-B	mutiert	kein Ergebnis
697	0-B	mutiert	Wildtyp
698	0-B	mutiert	kein Ergebnis
699	0-B	Wildtyp	Wildtyp
700	0-A	kein Ergebnis	kein Ergebnis
701	0-B	Wildtyp	Wildtyp

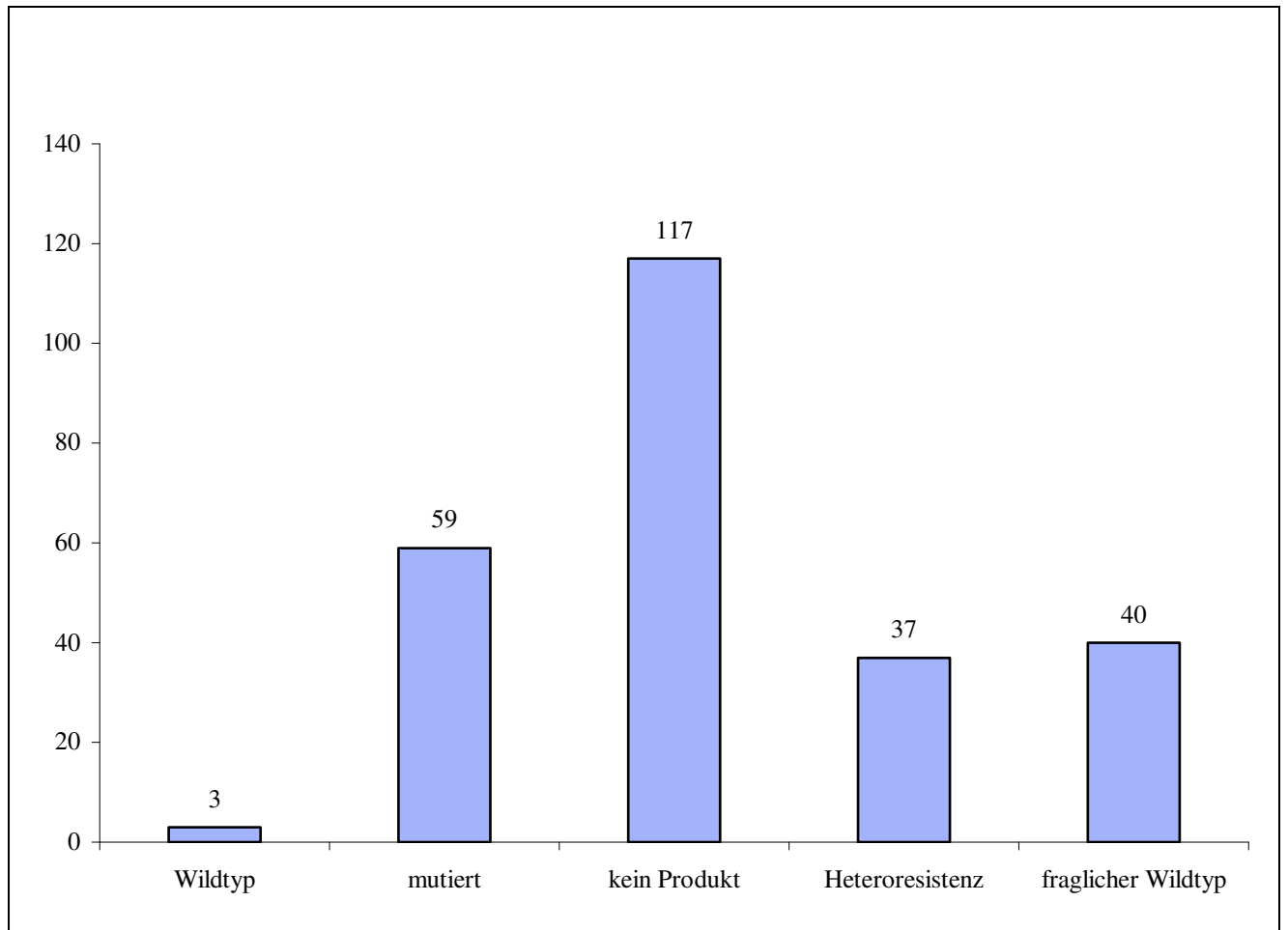


Abbildung 4.6: Verteilung der RFLP-Muster von *katG* zu Therapiebeginn

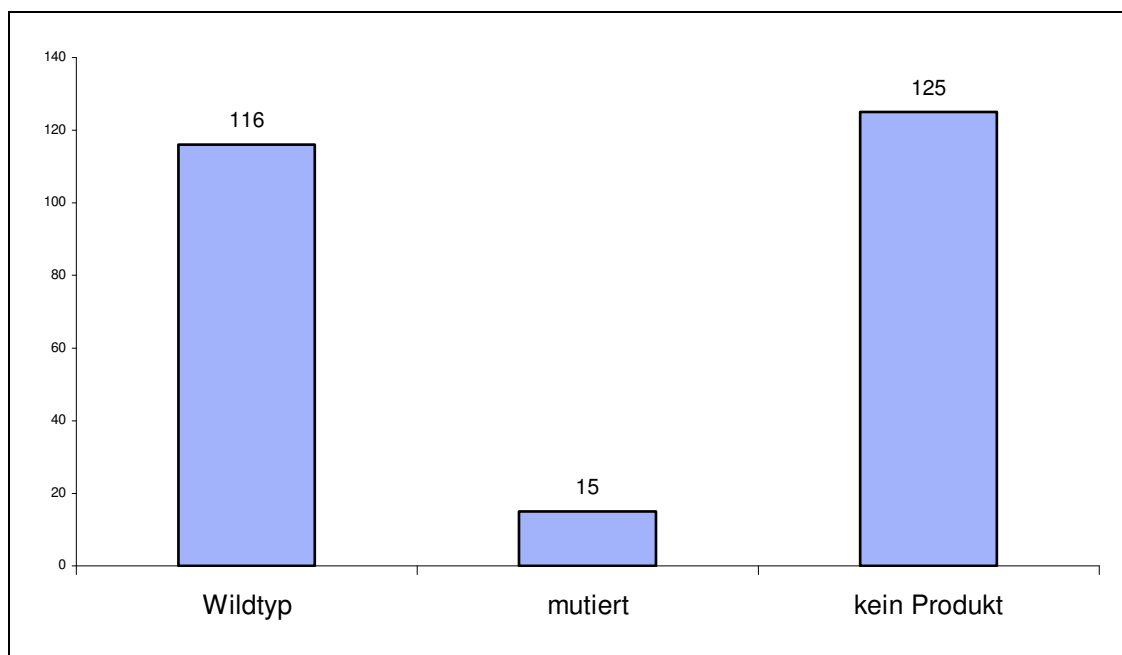


Abbildung 4.7: Verteilung der RFLP-Muster von *embB* zu Therapiebeginn

5 Diskussion

5.1 Methodische Aspekte

5.1.1 Vergleich der DNA-Isolierungsmethoden

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst verschiedene Methoden der DNA-Isolierung miteinander verglichen. Eine DNA-Isolierung aus allen Vergleichsproben gelang nur mittels des QIAamp DNA Mini Kits. Diese Methode erwies sich sowohl für unsere vorbehandelten als auch eingefrorenen Sputen als am besten geeignet. Deswegen wurde bei den weiteren Untersuchungen dieses Verfahren angewandt.

Weiterhin war kein Unterschied zwischen Amplifikationen mit 3 µl DNA und 30 µl DNA im PCR-Ansatz nachzuweisen. Um mehr DNA-Lösung für eventuelle spätere Diagnostik zur Verfügung zu haben, wurden aus diesem Grund die weiteren Untersuchungen mit 3 µl DNA im PCR-Ansatz durchgeführt.

5.1.2 Unterscheidung zwischen Wildtyp, mutiertem Genotyp und Heteroresistenz

In der RFLP des *katG*-Gens wurde bei mehreren Patienten ein Muster nachgewiesen, das als „fraglicher Wildtyp“ bezeichnet wurde. Diese Klassifikation steht für einen Wildtyp, bei dem aufgrund eines Partialverdaus in der RFLP eine Heteroresistenz nicht auszuschließen war. Wie Rinder et al. (2001) in einer Studie nachwies, kann die Ausprägung der Banden in der RFLP unterschiedlicher, parallel durchgeführter PCR-Reaktionen derselben DNA bei Heteroresistenz äußerst unterschiedlich sein. In dieser Studie fanden sich in der RFLP Bandenmuster, die sowohl reine Mutanten-Muster, reine Wildtypen oder den für Heteroresistenz charakteristischen Mischtyp darstellten.

Betrachtet man nun gerade die Patienten, die zu mindestens einem Zeitpunkt einen fraglichen Wildtyp aufwiesen, so fällt auf, dass für diese in der Kultur sowohl resistente als auch sensible Ergebnisse zu finden sind. Dies spricht umso mehr für eine eigene Klassifikation, da es wahrscheinlicher ist, dass heteroresistente Stämme zu unterschiedlichen Zeitpunkten

unterschiedliche Ausprägungen der resistenten Keime aufweisen. Zudem stellt die Kodon-315-Mutation die am häufigsten auftretende Mutation bei Isoniazid-Resistenz dar (Zhang, 2004). Betrachtet man diese Ergebnisse nun unter dieser Voraussetzung, verwundert es nicht, dass zu keinem anderen Zeitpunkt ein wirklicher Wildtyp in den Sputen dieser Patienten nachgewiesen wurde. Interessanterweise entwickelten sich bei unseren Patienten aus Abchasien Resistenzen gegen Isoniazid entweder aus einer Heteroresistenz oder aber einem „fraglichen Wildtyp“. Reine Wildtypen waren nicht im Verlauf einer Resistenzentwicklung zu beobachten. Aus diesem Grund wurde der „fragliche Wildtyp“ als eigene Klassifikation aufgeführt.

5.2 Prädiktiver Wert von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen von Resistenzgenen

5.2.1 *katG*

Für die Resistenzentwicklung gegen Isoniazid ist in mehr als 50 % aller Fälle eine Mutation an Kodon 315 des *katG*-Gens von *Mycobacterium tuberculosis* von Bedeutung (Ghiladi et al., 2005). KatG ist das einzige Enzym des Organismus, das eine Katalase-Aktivität besitzt und als Katalase-Peroxidase (ein Enzym mit zwei Aktivitäten) Wasserstoffperoxid inaktiviert. Dieser Vorgang wird benötigt, um Isoniazid, das eine Vorstufe der eigentlichen Wirksubstanz darstellt, zu aktivieren (Smith, 2004). Schätzungsweise 50 - 80 % der Isoniazid-resistenten Mykobakterien haben eine Mutation im *katG*-Gen. Hierbei stellt eine Punktmutation an Kodon 315 die häufigste Variante dar. Diese Mutation führt zu einer Reduktion der Katalase- und Peroxidase-Aktivität um 50 % und zu relativ hohen Toleranzschwellen gegen Isoniazid (MIC = 5 -10 µg/ml) (Zhang, 2004). Allerdings kann nicht anhand der Katalase- und Peroxidase-Aktivität das Maß der Resistenz gegen Isoniazid bestimmt werden (Ghiladi et al., 2005). Eine Mutation an Kodon 315 konnte, im Gegensatz zu anderen Mutationen, die zu einer Resistenz gegen Isoniazid führen, bisher nur in kulturell resistenten Mykobakterien nachgewiesen werden, d.h. diese Mutation wurde bisher noch in keinem sensiblen Mykobakterium nachgewiesen (Rinder et al., 1999). Dies entspricht auch unseren Ergebnissen, bei denen alle Proben, die eine Mutation an Kodon 315 des *katG*-Gens aufwiesen, sich in der Kultur resistent zeigten. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit davon

ausgegangen, dass eine solche Mutation einen hohen prädiktiven Wert für eine Isoniazid-Resistenz besitzt.

Allerdings kann nicht im Umkehrschluss davon ausgegangen werden, dass bei keiner Mutation an dieser Stelle auch keine Resistenz vorliegt. Zwar sind die Proben, die eine Heteroresistenz bzw. einen fraglichen Wildtyp aufweisen, eher sensibel, aufgrund unserer niedrigen Probenzahl kann aber nicht von einem signifikanten Zusammenhang gesprochen werden. Außerdem führen neben der Kodon-315-Mutation in *katG* noch weitere DNA-Mutationen zu einer Resistenz der Mykobakterien gegen Isoniazid. Die veränderten Genprodukte können hierbei sowohl als Transkriptionsfaktoren für *katG* agieren, wie z.B. *FurA*, oder aber in andere Stoffwechselfvorgänge eingreifen (Zhang, 2004).

5.2.2 *embB*

Für die Resistenzentwicklung gegen Ethambutol ist vor allem das *embB*-Gen von *Mycobacterium tuberculosis* verantwortlich. Untersuchungen sprechen dafür, dass das *embB*-Gen neben dem *embA*-Gen die Arabinosylation von Arabinogalactan katalysiert, einem Bestandteil der Zellwand des Bakteriums (Crick et al., 2004). Ethambutol greift direkt an dem Protein EmbB an, weswegen eine Veränderung der Form durch einen Basenaustausch an Kodon 306 die Wirksamkeit des Medikamentes beeinflusst. Aufgrund dessen wird eine Mutation an diesem Kodon des *embB* in Zusammenhang mit einer Resistenz gegen Ethambutol gebracht (Chan et al., 2004). Aus den Daten der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass bei Auftreten einer Mutation an Kodon 306 des *embB*-Gens ohne Ausnahme eine phänotypische Resistenz in der Kultur zu erwarten war.

Allerdings trifft auch hier wiederum der Umkehrschluss nicht zu, dass bei einem Wildtyp in der RFLP keine Resistenz auftreten kann. Bei unseren Ergebnissen waren zwar deutlich mehr dieser Proben in der Kultur sensibel, dennoch traten auch unter diesen phänotypische Resistenzen auf. Ein Grund dafür mag sein, dass nicht nur eine Veränderung in dem Protein EmbB für eine Resistenz sorgt. So scheinen die Gene *embB* und *embA* zusammenspielen. Ein Defekt des einen scheint von dem intakten Protein des anderen kompensiert werden zu können, auch wenn die Bakterien dann langsamer und mit verändertem Aussehen wachsen (Escuyer et al., 2001).

Laut einer Studie aus Südafrika kommt es in Routinelaboreergebnissen im Vergleich zu genotypischen Untersuchungen auf Ethambutolresistenz häufig zu falsch negativen Ergebnissen, so dass eine genotypische Untersuchung die diagnostische Sensitivität erhöhen könnte (Johnson et al., 2006).

Eine Resistenz gegen Ethambutol ist in den meisten Fällen mit zusätzlichen Resistenzen gegen andere Antituberkulotika vergesellschaftet (Pablos-Mendez et al., 1998). Eine Studie der New Jersey Medical School zeigte, dass eine Mutation an Kodon 306 des *embB*-Gens keine Aussage über die Resistenz gegen Ethambutol erbringt, sondern nur mit einer erhöhten Medikamenten-Resistenz im Allgemeinen assoziiert werden kann. So sollte erklärt werden, dass die Gabe von Ethambutol das Risiko weiterer Antituberkulotika-Resistenzen senken kann (Hazbon et al., 2005). Eine fehlende Korrelation zwischen *embB*-Kodon-306-Mutationen und Ethambutol-Resistenz konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Hier waren Mutationen am Kodon 306 des *embB*-Gens stets mit einer Resistenz gegen Ethambutol verbunden.

5.3 Auftreten resistenzverursachender Mutationen unter antituberkulotischer Therapie

Eine Resistenzentwicklung unter antituberkulotischer Therapie stellt ein Problem in der Behandlung der Tuberkulose dar, da unter laufender Therapie eine Umstellung der Medikation erfolgen muss. Zudem erreicht der kulturelle Befund aufgrund des langsamen Wachstums von *M. tuberculosis* den Arzt erst nach mehreren Wochen Verzögerung. Oftmals geben eher Erfolg oder Misserfolg der Therapie Hinweise darauf, ob die medikamentöse Behandlung adäquat ist. In diesem Rahmen ist es notwendig, bereits zu Beginn einer Therapie Anhaltspunkte für eine mögliche spätere Resistenzbildung zu suchen (Cox et al., 2007).

In Abchasien entwickelten insgesamt 8 von 45 Patienten mindestens eine Resistenz im Laufe der Therapie. Ein Patient entwickelte hierbei Resistenzen sowohl gegen Isoniazid als auch Ethambutol. Dieser Anteil von 18 % Resistenzentwicklung stellt bei bereits zu Therapiebeginn hohen Mutations- und Resistenzraten ein großes Problem dar.

In Bulgarien entwickelten 3 Patienten eine Resistenz im Therapieverlauf, 2 davon nach anfänglicher Heteroresistenz, einer aus der Kontrollgruppe von 15 Patienten. Gründe für Resistenzentwicklungen sind auch jenseits der natürlichen Mutationsrate zu suchen, insbesondere wenn eine niedrige Compliance des Patienten vorliegt (Lipsitch et al., 1998). Die Compliance eines Patienten unter der Therapie übt einen großen Einfluss auf diese Entwicklung aus. Durch unterschiedlich lange Halbwertszeiten der einzelnen Medikamente können bei mehreren fehlenden Einnahmen Resistenzen gegen das Antituberkulotikum mit der längsten Halbwertszeit entstehen. Ab einem bestimmten Zeitpunkt sind nicht mehr alle Medikamente wirksam, so dass es zu einer funktionellen Monotherapie mit dem am längsten wirkenden Präparat kommt (Mitchison, 1998). Natürlich kann eine verminderte Resorption eines Medikamentes eine niedrige Compliance vortäuschen.

Weiterhin entstehen Resistenzbildungen durch Superinfektion mit resistenten Keimen (van Rie et al., 2005). Gerade in Gegenden, in denen ein großer Anteil von Patienten bereits mit resistenten Mykobakterien infiziert ist, steigt die Wahrscheinlichkeit für ein solches Geschehen (Rodrigues et al., 2007). Das zeigten auch unsere Ergebnisse in Abchasien. Mindestens 23 % der Patienten waren bereits bei Abgabe des ersten Sputums mit *Mycobacterium tuberculosis* mit einer Mutation an Kodon 315 des *katG*-Gens infiziert sowie

mindestens 6 % mit einer Mutation an Kodon 306 des *embB*-Gens. Wie bereits in 5.2 erläutert, gehen diese Veränderungen praktisch immer mit phänotypischen Resistenzen gegen Isoniazid bzw. Ethambutol einher. In Europa scheint eine frühere Chemotherapie einer Tuberkulose eine deutlich größere Rolle im Rahmen der Resistenzentwicklung zu spielen (Faustini et al., 2006). Im Gegensatz dazu sprechen genetische Untersuchungen der Mykobakterien-Stämme in Regionen der ehemaligen Sowjetunion für eine Übertragung bereits resistenter Bakterien, zumindest bei den gegen Isoniazid und Rifampicin resistenten Keimen (Hillemann et al., 2005). Da die RFLP der Sputen aus Abchasien nur das Vorliegen einer Mutation oder eines Wildtyps untersuchte, konnte damit keine Superinfektion mit neuen Mykobakterien-Stämmen ausgeschlossen werden.

Eine weitere Ursache der hohen Resistenzlage in den Regionen, aus denen unsere Patienten stammten, ist ein Stamm von *Mycobacterium tuberculosis*, der als Beijing-Genotyp bekannt wurde und zu einem großen Anteil zu den Resistenzen beiträgt (Cox et al., 2005). Inwieweit unsere Patienten aufgrund einer Infektion mit dieser Variante von *Mycobacterium tuberculosis* Resistenzen aufwiesen müsste weiter abgeklärt werden.

Ebenso wie gegen Isoniazid entwickelten 4 Patienten in unserer Studie eine Resistenz gegen Ethambutol. Auch das Medikament Ethambutol zählt zu den Antituberkulotika der ersten Wahl. So stellt auch die Resistenzbildung gegen Ethambutol ein besonders großes Problem in der Behandlung der Tuberkulose dar. Wiederum fanden sich 2 von diesen Patienten in Bulgarien, wobei einer bereits zu Therapiebeginn eine Heteroresistenz aufwies. Bei diesem Patienten waren allerdings die Fingerprints des anfangs isolierten heteroresistenten Paares nicht identisch, so dass eine gleichzeitige Infektion mit zwei verschiedenen Stämmen diskutiert werden muss (Niemann et al., 1999). Koinfektionen von resistenten und sensiblen Stämmen von *Mycobacterium tuberculosis* wurden bereits in der Literatur beschrieben (Baldeviano-Vidalon et al., 2005). Der zweite Patient war derjenige aus der Kontrollgruppe, bei dem ebenfalls eine Resistenz gegen Isoniazid auftrat. In Abchasien entwickelten die Patienten 147 und 505 in der Kultur eine Resistenz. Bei beiden Patienten konnte zu keinem Zeitpunkt eine Mutation an Kodon 306 des *embB*-Gens festgestellt werden, so dass eine Mutation an anderer Stelle angenommen werden kann (siehe 5.2.2) Wie schon erwähnt, ist eine naheliegende Erklärung, dass Resistenzen gegen Ethambutol oftmals unabhängig von dieser Mutation auftreten (Escuyer et al., 2001).

Insgesamt zeigen unsere Daten eine relativ hohe Rate an Resistenzentwicklung. Uns ist bewusst, dass es sich hier um Resistenzentwicklungen in einem Hochrisikogebiet und einer Region hoher Prävalenz an antituberkulotikaresistenter Tuberkulose handelt, dennoch stellt sich die Frage, inwiefern man gerade in solchen Regionen die Therapie der Tuberkulose überdenken muss. Knapp jeder fünfte Patient kann unter dem Therapieregime, mit dem seine Therapie begonnen wurde, nicht ausgeheilt werden. Strengere Kontrollen des Therapieverlaufes vermögen vielleicht einen Ansatz in der Lösung des Problems darzustellen. Das Erkennen von Risikofaktoren, die eine Resistenzentwicklung begünstigen, erscheint hierbei hilfreich.

5.4 Tauglichkeit des Nachweises von Heteroresistenz zur Vorhersage von Resistenzentwicklungen

Durch molekularbiologische Methoden ist es möglich, Punktmutationen in gewissen Resistenzgenen von *Mycobacterium tuberculosis* nachzuweisen, die Resistenzen gegen Antituberkulotika bewirken oder mit diesen korreliert sind. Hierbei fällt ein Phänomen auf, das als Heteroresistenz bezeichnet wird. Bei dieser können gemischte Populationen von *Mycobacterium tuberculosis* mit unterschiedlichen Resistenzgen-Genotypen nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit gelang es nun erstmals, auch kulturell Paare resistenter und sensibler Mykobakterien aus den gleichen Patienten zu isolieren.

In unserer Studie in Bulgarien entwickelten 2 von 11 Patienten, bei denen wir zu Therapiebeginn eine Heteroresistenz detektierten, im weiteren Verlauf eine Resistenz gegen das entsprechende Antituberkulotikum. Im Vergleich dazu trat nur bei einem Patienten aus der Kontrollgruppe von 15 Patienten ohne Heteroresistenz-Genotyp eine Resistenz im Therapieverlauf auf.

In unseren Daten aus Abchasien ist die Resistenzentwicklung noch eindrucksvoller. Insgesamt entwickelten hier 8 von 45 Patienten eine Resistenz im Verlauf der Therapie, 3 davon auf der Basis einer Heteroresistenz. Bei 4 weiteren Patienten entstand die Resistenzentwicklung auf der Basis eines fraglichen Wildtyp (siehe 5.1.2). Eine Heteroresistenz konnte hier nicht ausgeschlossen werden.

Ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis einer Heteroresistenz mit einer späteren Resistenzentwicklung scheint demnach wahrscheinlich. Da unsere Studie sich auf sehr geringe Fallzahlen stützt, kann man einen signifikanten statistischen Zusammenhang nicht ableiten, dennoch ist ein Trend unverkennbar. Eine eventuell aggressivere Therapie bei nachgewiesener Heteroresistenz ist somit zu erwägen (Sreevatsan et al., 1998). Allerdings scheint das Auftreten resistenter Keime zu einem geringen Anteil keinen großen Einfluss auf spätere phänotypische Resistenzentwicklungen zu nehmen. Hierfür spricht, dass in der Sensibilitäts-Diagnostik von *Mycobacterium tuberculosis* bei einem Auftreten von bis zu 1 % resistenten Kolonien die Kultur dennoch als sensibel bezeichnet wird, obwohl diese Rate deutlich über der natürlichen Mutationsrate liegt. Dies geschieht, da der klinische Behandlungserfolg dieser Patienten ähnlich gut wie bei rein sensiblen Erregern ist (Canetti et

al., 1969) . Diese Vorgehensweise ist in den deutschen Normen zur Mykobakteriendiagnostik genau festgelegt (DIN 58943-8 (2009)).

Die Detektion einer Heteroresistenz stellt in der Routine-Diagnostik ein großes methodisches Problem dar. Bisher werden hauptsächlich Routine-Untersuchungen zur Resistenztestung von *Mycobacterium tuberculosis* angewandt. Häufig entgehen hierbei Heteroresistenzen, wie auch unsere Studie zeigt. So waren alle Patienten in Bulgarien, bei denen wir auch auf kultureller Basis Heteroresistenzen nachweisen konnten, zuvor in der Routinediagnostik als sensibel eingestuft worden. Molekularbiologische Methoden wie die PCR-RFLP scheinen für einen Nachweis der Heteroresistenz besser geeignet zu sein (Rinder et al., 2001).

Weiterhin zeigen die erhobenen Daten, dass die Heteroresistenz deutlich unterdiagnostiziert wird. Dafür spricht nicht nur, dass alle Patienten in Bulgarien, bei denen wir Heteroresistenzen auch auf kultureller Basis nachweisen konnten, zuvor in der Routine-Testung als rein sensibel diagnostiziert wurden, sondern auch unsere Ergebnisse aus Abchasien zeigen, dass 80 % der Mykobakterien, die in der Untersuchung mittels PCR-RFLP eine Heteroresistenz gegen Isoniazid aufwiesen, in der Kultur als sensibel getestet wurden. Eine mögliche Erklärung mag die Beobachtung sein, dass eine Resistenzentwicklung oft zu einer (zumindest zeitweise bestehenden) Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit führt (Billington et al., 1999; Gillespie, 2001). Hierbei wachsen die sensiblen Organismen in der antituberkulotikafreien Primärkultur schneller als die resistenten. Bei einer späteren Resistenztestung der Primärkultur überwiegen dann zahlenmäßig die sensiblen.

Unsere Daten sprechen weiterhin dafür, dass der Nachweis einer Heteroresistenz ein Risikofaktor für eine spätere Resistenzbildung darstellt. Um eine erfolgreiche Diagnostik dieses Phänomens jedoch zu gewährleisten, müssen neue Methoden, die eine höhere Sensitivität gegenüber der Heteroresistenz aufweisen, in die Routinediagnostik eingeführt werden. Gerade in Ländern mit einer hohen Inzidenz der Tuberkulose stehen allerdings nur einfache und billige Methoden zur Verfügung, so dass eine routinemäßige PCR-RFLP als Diagnostik vermutlich nicht in Frage kommt. Eine direkte kulturelle Sensitivitätstestung aus Sputum ohne Primärkultur mag ein attraktiver und vor allem kostengünstiger Ansatz hierfür sein. Bei nachgewiesener Heteroresistenz könnte durch engmaschigere Kontrollen während der Therapie eine Resistenzentwicklung frühzeitig erkannt und die Therapie angepasst werden.

Des Weiteren könnte eine aggressivere antituberkulotische Therapie bei diesen Patienten den Ausbruch von Resistenzen verhindern.

6 Zusammenfassung

Die antituberkulotikaresistente, insbesondere die multiresistente Tuberkulose stellt heutzutage immer neue Herausforderungen an die Therapie dieser Erkrankung. Knapp ein Drittel der Weltbevölkerung ist mit dem Tuberkuloseerreger infiziert und noch immer zählt die Tuberkulose zu den häufigsten tödlichen Infektionskrankheiten weltweit. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern Resistenzen gegen Antituberkulotika unter Therapie auftreten und ob bestimmte Einflussgrößen, wie das Phänomen der Heteroresistenz, die Entwicklung von Resistenzen unter Therapie begünstigen können. Hierzu wurden molekulargenetische Methoden wie die PCR-RFLP zum Nachweis von Resistenzen an Kodon 315 des *katG*-Gens sowie an Kodon 306 des *embB*-Gens angewendet sowie kulturelle Routine-Sensibilitätstestungen aus Primärkulturen und kulturelle Sensibilitätstestungen direkt aus Sputum.

Zunächst wurde bei 35, beziehungsweise 30 zufällig ausgewählten Patienten untersucht, inwieweit molekulargenetische Befunde einer Genotypisierung in den Resistenzgenen *katG* und *embB* mittels PCR-RFLP mit den Ergebnissen kultureller Resistenztestungen gegen Isoniazid und Ethambutol übereinstimmten. Es bestätigte sich hier, dass Mutationen in den beiden untersuchten Kodons dieser Resistenzgene zwar in allen Fällen mit einer kulturellen Resistenz einhergingen, bei fehlender Mutation jedoch nicht von einer Sensibilität gegen das jeweilige Antituberkulotikum ausgegangen werden konnte. Somit konnte allein das Vorliegen einer Mutation als eindeutige Vorhersage einer Resistenz gewertet werden. Ferner konnten bei einigen Patienten molekulargenetisch Heteroresistenzen im *katG*-Gen nachgewiesen werden, bei denen sich kulturell jedoch eine Resistenz oder eine Sensibilität gegen Isoniazid fand. Dies wurde einerseits mit unterschiedlichen Anteilen beider Populationen im Sputum, andererseits mit unterschiedlicher „Fitness“ und Wachstumsunterschieden während der Kultur der einzelnen Proben erklärt.

Des Weiteren wurden die Resistenz-Genotypen für Isoniazid und Ethambutol zu Therapiebeginn bei 253 Patienten aus Abchasien bestimmt. Hierbei zeigten sich hohe Resistenzprävalenzen in dem untersuchten Gebiet. Schon zu Therapiebeginn hatten 23 % der Patienten eine primäre Resistenz gegen Isoniazid und 6 % gegen Ethambutol. Außerdem fand sich ein hoher Anteil von 14 % der Patienten mit Heteroresistenzen im *katG*-Gen.

Die Untersuchung des Auftretens resistenzverursachender Mutationen unter antituberkulotischer Therapie zeigte einen hohen Anteil an Resistenzentwicklungen von 18 % in Abchasien bzw. 12 % in Bulgarien. In Gebieten mit einer hohen Prävalenz an antituberkulotikaresistenter Tuberkulose können Superinfektionen mit resistenten Mykobakterien unter Therapie nicht ausgeschlossen werden, da bei zunehmenden Resistenzen das Risiko der Übertragung bereits resistenter Mykobakterien steigt. Dennoch spielen weitere Faktoren wie inadäquate Therapie und niedrige Compliance eine Rolle. Auffallend war, dass vermehrt bei Patienten mit nachgewiesener Heteroresistenz eine Resistenzbildung unter Therapie auftrat.

Der Nachweis einer Heteroresistenz kann nach unseren Daten als Einflussfaktor für eine spätere Resistenzbildung unter Therapie gesehen werden. Im Vergleich zu Patienten ohne nachgewiesene Heteroresistenz zeigte sich in der Gruppe der Heteroresistenten ein deutlich vermehrtes Auftreten von Resistenzen unter Therapie. Wegen der geringen zur Verfügung stehenden Fallzahlen ist dieses Ergebnis jedoch noch nicht statistisch signifikant. In der vorliegenden Arbeit wurde die Heteroresistenz nicht allein mit molekulargenetischen Methoden nachgewiesen, sondern es gelang erstmals, direkt aus einzelnen Sputen sowohl resistente als auch sensible Mykobakterien kulturell zu isolieren, und dies, obwohl jedes dieser 11 Sputen vorher in der Routinediagnostik als sensibel getestet worden war. Bisher scheint die Heteroresistenz ein deutlich unterdiagnostiziertes Phänomen zu sein, das in der Zukunft bei der Therapie der Tuberkulose an Bedeutung gewinnen könnte.

7 Ausblick

In Zeiten zunehmender Resistenzentwicklungen unter antituberkulotischer Therapie werden neue Therapiestrategien notwendig. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist die Heteroresistenz eine Einflussgröße, die als Risikofaktor für die Entstehung von Resistenzen unter Tuberkulosetherapie diskutiert werden muss. Es zeigte sich ferner, dass die Heteroresistenz bisher in der Routinediagnostik deutlich unterdiagnostiziert worden zu sein scheint. Die hier diskutierte Studie beruht auf einer relativ geringen Fallzahl. Sollte sich jedoch im Rahmen umfangreicherer Studien mit größerer Fallzahl der aufgezeigte Trend bestätigen, sollten Diagnoseverfahren in der Routinediagnostik diese Einflussgröße mit einbeziehen.

Engmaschigere Therapiekontrollen zur Diagnose von Resistenzen bei Patienten mit nachgewiesener Heteroresistenz könnten eine adäquate Therapie bei neu auftretenden Resistenzen beschleunigen. Gerade in Regionen mit hoher Resistenzentwicklung wäre damit inadäquaten Behandlungen vorgebeugt und die Übertragung resistenter Mykobakterien könnte minimiert werden. Falls regelmäßige Sputum-Kontrollen nicht durchführbar sind, ist eine aggressivere antituberkulotische Therapie bei Patienten mit anfangs nachgewiesener Heteroresistenz zu diskutieren.

Hierzu müssten jedoch auch neue diagnostische Verfahren entwickelt werden, um dieses Phänomen zuverlässig und kostengünstig nachzuweisen. Da Regionen mit hoher Prävalenz von (antituberkulotikaresistenter) Tuberkulose oftmals in den armen oder ärmsten Regionen dieser Welt liegen, sind molekulargenetische Untersuchungen wie die PCR-RFLP kritisch zu sehen. Kostengünstigere Diagnoseverfahren, wie der direkte kulturelle Nachweis von resistenten und sensiblen Mykobakterien direkt aus Sputum, wie er erstmals in dieser Arbeit gelang, könnten eine attraktive Alternative darstellen.

8 Literaturverzeichnis

Adjers-Koskela, K. and Katila, M. L. (2003). "Susceptibility testing with the manual mycobacteria growth indicator tube (MGIT) and the MGIT 960 system provides rapid and reliable verification of multidrug-resistant tuberculosis." J Clin Microbiol **41**(3): 1235-9.

Altrichter, T. and Heizmann, W. R. (1994). "[Gardnerella vaginalis: transport, microscopy, testing resistance]." Geburtshilfe Frauenheilkd **54**(11): 606-11.

Aziz, M. A., Wright, A., Laszlo, A., De Muynck, A., Portaels, F., Van Deun, A., Wells, C., Nunn, P., Blanc, L. and Raviglione, M. (2006). "Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis." Lancet **368**(9553): 2142-54.

Baldeviano-Vidalon, G. C., Quispe-Torres, N., Bonilla-Asalde, C., Gastiaburu-Rodriguez, D., Pro-Cuba, J. E. and Llanos-Zavalaga, F. (2005). "Multiple infection with resistant and sensitive M. tuberculosis strains during treatment of pulmonary tuberculosis patients." Int J Tuberc Lung Dis **9**(10): 1155-60.

Banner, A. S. (1979). "Tuberculosis. Clinical aspects and diagnosis." Arch Intern Med **139**(12): 1387-90.

Benevolo-de-Andrade, T. C., Monteiro-Maia, R., Cosgrove, C. and Castello-Branco, L. R. (2005). "BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis--review." Mem Inst Oswaldo Cruz **100**(5): 459-65.

Billington, O. J., McHugh, T. D. and Gillespie, S. H. (1999). "Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in Mycobacterium tuberculosis." Antimicrob Agents Chemother **43**(8): 1866-9.

Brothwell, D. and Sandison, A. T. (1968). Diseases in antiquity. Springfield, Illinois.

Brown, L. (1941). The Story of Clinical Pulmonary Tuberculosis. Baltimore, Williams & Wilkins.

Canetti, G., Fox, W., Khomenko, A., Mahler, H. T., Menon, N. K., Mitchison, D. A., Rist, N. and Smelev, N. A. (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.

CDC (1993). Initial Therapy for Tuberculosis in the Era of Multidrug Resistance-Recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis.

Chan, E. D., Chatterjee, D., Iseman, M. D. and Heifets, L. B. (2004). Pyrazinamide, Ethambutol, Ethionamide and Aminoglycosides. Tuberculosis. W. N. Rom, Garay, S. M., Lippincott, Williams & Wilkins: 773-789.

Chan, E. D. and Iseman, M. D. (2002). "Current medical treatment for tuberculosis." Bmj **325**(7375): 1282-6.

Cooksey, R. C., Morlock, G. P., McQueen, A., Glickman, S. E. and Crawford, J. T. (1996). "Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City." Antimicrob Agents Chemother **40**(5): 1186-8.

Cox, H. S., Kubica, T., Doshetov, D., Kebede, Y., Rusch-Gerdess, S. and Niemann, S. (2005). "The Beijing genotype and drug resistant tuberculosis in the Aral Sea region of Central Asia." Respir Res **6**: 134.

Cox, H. S., Niemann, S., Ismailov, G., Doshetov, D., Orozco, J. D., Blok, L., Rusch-Gerdes, S. and Kebede, Y. (2007). "Risk of acquired drug resistance during short-course directly observed treatment of tuberculosis in an area with high levels of drug resistance." Clin Infect Dis **44**(11): 1421-7.

Crick, D. C., Brennan and P.J., M., M.R. (2004). The cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis. W. N. Rom, Garay, S. M., Lippincott, Williams & Wilkins: 115-134.

Cullen, M. M., Sam, N. E., Kanduma, E. G., McHugh, T. D. and Gillespie, S. H. (2006). "Direct detection of heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* using molecular techniques." J Med Microbiol **55**(Pt 8): 1157-8.

Dannenbergh, A. M. J. (1982). "Pathogenesis of pulmonary tuberculosis." Am Rev Respir Dis **125**(3 Pt 2): 25-9.

Davies, A. P., Billington, O. J., Bannister, B. A., Weir, W. R., McHugh, T. D. and Gillespie, S. H. (2000). "Comparison of fitness of two isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, one of which had developed multi-drug resistance during the course of treatment." J Infect **41**(2): 184-7.

Diel, R., Forßbohm, M., Loytved, G., Haas, W., Hauer, B., Maffai, D., Magdorf, K., Nienhaus, H. L., Schaberg, T., Zellweger, J.-P. and Loddenkemper, R. (2007). "Empfehlungen für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose, Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose." Pneumologie(61): 440-455.

DIN 58943-8:2009-04 (2009). Medizinische Mikrobiologie - Tuberkulosedagnostik - Teil 8: Empfindlichkeitsprüfung von Tuberkulosebakterien gegen Chemotherapeutika, Beuth Verlag Berlin, Wien, Zürich.

Escuyer, V. E., Lety, M. A., Torrelles, J. B., Khoo, K. H., Tang, J. B., Rithner, C. D., Frehel, C., McNeil, M. R., Brennan, P. J. and Chatterjee, D. (2001). "The role of the embA and embB gene products in the biosynthesis of the terminal hexaarabinofuranosyl motif of *Mycobacterium smegmatis* arabinogalactan." J Biol Chem **276**(52): 48854-62.

Faustini, A., Hall, A. J. and Perucci, C. A. (2006). "Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review." Thorax **61**(2): 158-63.

Finken, M., Kirschner, P., Meier, A., Wrede, A. and Bottger, E. C. (1993). "Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot." Mol Microbiol **9**(6): 1239-46.

Garay, S. M. (2004). Pulmonary Tuberculosis. Tuberculosis. W. N. Rom, Garay, S. M., Lippincott, Williams & Wilkins: 345-394.

Ghiladi, R. A., Medzihradzky, K. F., Rusnak, F. M. and Ortiz de Montellano, P. R. (2005). "Correlation between isoniazid resistance and superoxide reactivity in mycobacterium tuberculosis KatG." J Am Chem Soc **127**(38): 13428-42.

Gillespie, S. H. (2001). "Antibiotic resistance in the absence of selective pressure." Int J Antimicrob Agents **17**(3): 171-6.

Haeser (1884). Grundriß der Geschichte der Medizin. Jena.

Hahn, H., Falke, D. and Klein, P. (1991). Medizinische Mikrobiologie. Berlin, Springer Verlag.

Hazbon, M. H., Bobadilla del Valle, M., Guerrero, M. I., Varma-Basil, M., Filliol, I., Cavatore, M., Colangeli, R., Safi, H., Billman-Jacobe, H., Lavender, C., Fyfe, J., Garcia-Garcia, L., Davidow, A., Brimacombe, M., Leon, C. I., Porras, T., Bose, M., Chaves, F., Eisenach, K. D., Sifuentes-Osornio, J., Ponce de Leon, A., Cave, M. D. and Alland, D. (2005). "Role of embB codon 306 mutations in Mycobacterium tuberculosis revisited: a novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance." Antimicrob Agents Chemother **49**(9): 3794-802.

Heep, M., Brandstatter, B., Rieger, U., Lehn, N., Richter, E., Rusch-Gerdes, S. and Niemann, S. (2001). "Frequency of rpoB mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates." J Clin Microbiol **39**(1): 107-10.

Hett, E. C. and Rubin, E. J. (2008). "Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective." Microbiol Mol Biol Rev **72**(1): 126-56, table of contents.

Hillemann, D., Kubica, T., Agzamova, R., Venera, B., Rusch-Gerdes, S. and Niemann, S. (2005). "Rifampicin and isoniazid resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis strains isolated from patients in Kazakhstan." Int J Tuberc Lung Dis **9**(10): 1161-7.

Honore, N. and Cole, S. T. (1994). "Streptomycin resistance in mycobacteria." Antimicrob Agents Chemother **38**(2): 238-42.

Johnson, R., Jordaan, A. M., Pretorius, L., Engelke, E., van der Spuy, G., Kewley, C., Bosman, M., van Helden, P. D., Warren, R. and Victor, T. C. (2006). "Ethambutol resistance testing by mutation detection." Int J Tuberc Lung Dis **10**(1): 68-73.

Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M. and van Embden, J. (1997). "Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology." J Clin Microbiol **35**(4): 907-14.

Kapur, V., Whittam, T. S. and Musser, J. M. (1994). "Is Mycobacterium tuberculosis 15,000 years old?" J Infect Dis **170**(5): 1348-9.

Kaufmann, S. H. and Flesch, I. E. (1988). "The role of T cell--macrophage interactions in tuberculosis." Springer Semin Immunopathol **10**(4): 337-58.

Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J. and Lindenmann, J. (1993). Medizinische Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag.

Kirsten, D. (1999). Tuberkulosetherapie und Antibiotikaresistenz. Tuberkulose. N. Konietzko, Loddenkemper, R. Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 147-161.

Lipsitch, M. and Levin, B. R. (1998). "Population dynamics of tuberculosis treatment: mathematical models of the roles of non-compliance and bacterial heterogeneity in the evolution of drug resistance." Int J Tuberc Lung Dis **2**(3): 187-99.

Mariano, M., Nikitin, T. and Malucelli, B. E. (1977). "Phagocytic potential of macrophages from within delayed hypersensitivity-mediated granulomata." J Pathol **123**(1): 27-33.

Mieskes, K. T. (2002). Molekulare und epidemiologische Charakterisierung von Resistenz-assoziierten Mutationen bei *Mycobacterium tuberculosis*. Berlin, Mensch & Buch Verlag.

Mirsaeidi, S. M., Tabarsi, P., Khoshnood, K., Pooramiri, M. V., Rowhani-Rahbar, A., Mansoori, S. D., Masjedi, H., Zahirifard, S., Mohammadi, F., Farnia, P., Masjedi, M. R. and Velayati, A. A. (2005). "Treatment of multiple drug-resistant tuberculosis (MDR-TB) in Iran." Int J Infect Dis **9**(6): 317-22.

Mitchison, D. A. (1998). "How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis." Int J Tuberc Lung Dis **2**(1): 10-5.

Mondon, P., Petter, R., Amalfitano, G., Luzzati, R., Concia, E., Polacheck, I. and Kwon-Chung, K. J. (1999). "Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*." Antimicrob Agents Chemother **43**(8): 1856-61.

Murray, J. F. (1988). "Tuberculosis and HIV infection: A global perspective." Respiration **65**: 335-342.

Niemann, S., Richter, E. and Rusch-Gerdes, S. (1999). "Stability of IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains." J Clin Microbiol **37**(9): 3078; author reply 3078-9.

Ormerod, L. P. (2005). "Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): epidemiology, prevention and treatment." Br Med Bull **73-74**: 17-24.

Pablos-Mendez, A., Raviglione, M. C., Laszlo, A., Binkin, N., Rieder, H. L., Bustreo, F., Cohn, D. L., Lambregts-van Weezenbeek, C. S., Kim, S. J., Chaulet, P. and Nunn, P. (1998). "Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance." N Engl J Med **338**(23): 1641-9.

Plinke, C., Rusch-Gerdes, S. and Niemann, S. (2006). "Significance of mutations in embB codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates." Antimicrob Agents Chemother **50**(5): 1900-2.

Pursel, S. E. and Lindskog, G. E. (1961). "Hemoptysis. A clinical evaluation of 105 patients examined consecutively on a thoracic surgical service." Am Rev Respir Dis **84**: 329-36.

Raviglione, M. C. and O'Brien, R. J. (2001). Tuberkulose. Harrisons Innere Medizin. D. A. i. Z. m. d. Charité, ABW Wissenschaftsverlag. **15**: 1129-1140.

Reischl, U., Pulz, M., Ehret, W. and Wolf, H. (1994). "PCR-based detection of mycobacteria in sputum samples using a simple and reliable DNA extraction protocol." Biotechniques **17**(5): 844-5.

Rinder, H. (2001). "Hetero-resistance: an under-recognised confounder in diagnosis and therapy?" J Med Microbiol **50**(12): 1018-20.

Rinder, H., Feldmann, K., Tortoli, E., Grosset, J., Casal, M., Richter, E., Rifai, M., Jarlier, V., Vaquero, M., Rusch-Gerdes, S., Cambau, E., Gutierrez, J. and Loscher, T. (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., Mieskes, K. T. and Loscher, T. (2001). "Heteroresistance in Mycobacterium tuberculosis." Int J Tuberc Lung Dis **5**(4): 339-45.

Robert-Koch-Institut (2006). Epidemiologisches Bulletin. Robert Koch Institut

Robert-Koch-Institut (2005). Epidemiologisches Bulletin. Robert Koch Institut: 89-98.

Rodrigues, P., Gomes, M. G. and Rebelo, C. (2007). "Drug resistance in tuberculosis--a reinfection model." Theor Popul Biol **71**(2): 196-212.

Rook, G. A., Taverne, J., Leveton, C. and Steele, J. (1987). "The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis." Immunology **62**(2): 229-34.

Ryffel, C., Strassle, A., Kayser, F. H. and Berger-Bachi, B. (1994). "Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus." Antimicrob Agents Chemother **38**(4): 724-8.

Sheffield, E. A. (1994). The Pathology of Tuberculosis. Clinical Tuberculosis. P. D. O. Davies, Chapman & Hall Medical: 43-54.

Siemon, G. and Kropp, R. (1999). Diagnose und Differentialdiagnose der pulmonalen und extrapulmonalen Tuberkulose. Tuberkulose. N. Konietzko, Loddenkemper, R. Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 90-95.

Smith, I. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* virulence: a genetic analysis. Tuberculosis. W. N. Rom, Garay, S. M., Lippincott, Williams & Wilkins.

Sreevatsan, S., Bookout, J. B., Ringpis, F. M., Mogazeh, S. L., Kreiswirth, B. N., Pottathil, R. R. and Barathur, R. R. (1998). "Comparative Evaluation of Cleavase Fragment Length Polymorphism With PCR-SSCP and PCR-RFLP to Detect Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacterium tuberculosis." Mol Diagn **3**(2): 81-91.

- Sung, S. W., Kang, C. H., Kim, Y. T., Han, S. K., Shim, Y. S. and Kim, J. H. (1999). "Surgery increased the chance of cure in multi-drug resistant pulmonary tuberculosis." Eur J Cardiothorac Surg **16**(2): 187-93.
- Teschner, M. (1999). Geschichte der Tuberkulose. Tuberkulose. N. Konietzko, Lodenkemper, R. Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 1-23.
- van Embden, J. D., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T. M. and et al. (1993). "Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology." J Clin Microbiol **31**(2): 406-9.
- van Rie, A., Victor, T. C., Richardson, M., Johnson, R., van der Spuy, G. D., Murray, E. J., Beyers, N., Gey van Pittius, N. C., van Helden, P. D. and Warren, R. M. (2005). "Reinfection and mixed infection cause changing Mycobacterium tuberculosis drug-resistance patterns." Am J Respir Crit Care Med **172**(5): 636-42.
- Victor, T. C., Lee, H., Cho, S. N., Jordaan, A. M., van der Spuy, G., van Helden, P. D. and Warren, R. (2002). "Molecular detection of early appearance of drug resistance during Mycobacterium tuberculosis infection." Clin Chem Lab Med **40**(9): 876-81.
- WHO (2004). "Tuberculosis fact sheet (revision, March 2004)." Wkly Epidemiol Rec **79**(13): 125-8.
- WHO (2007). "Tuberculosis, Fact Sheet N°104, Revised March 2007."
- Woodford, N. and Ellington, M. J. (2007). "The emergence of antibiotic resistance by mutation." Clin Microbiol Infect **13**(1): 5-18.
- Zhang, Y. (2004). Isoniazid. Tuberculosis. W. N. Rom, Garay, S. M., Lippincott, Williams & Wilkins: 739-758.

9 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1.1: Mögliches Therapie-Regime bei Resistenz gegen Antituberkulotika (Chan et al., 2002)	9
Tabelle 3.1: Primerpaare und deren Zielsequenzen	21
Tabelle 3.2: PCR-Reaktionsbedingungen	22
Tabelle 3.3: Länge der PCR-Produkte	23
Tabelle 4.1: Korrelation von RFLP und Kultur bei Isoniazidresistenz.....	29
Tabelle 4.2: Korrelation von RFLP und Kultur bei Ethambutol-Resistenz.....	33
Tabelle 4.3: Mikrobiologische und molekulare Ergebnisse von 11 Patienten mit heteroresistentem <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	37
Tabelle 4.4: Resistenzentwicklung im Therapieverlauf.....	38
Tabelle 4.5: Untersuchung von <i>katG</i> und <i>embB</i> zu Therapiebeginn.....	46
Abbildung 1.1: Geographische Verteilung der Tuberkuloseerkrankungen 2005.....	3
Abbildung 1.2: Weltweite Tuberkuloseinzidenz 2005 pro 100.000 Einwohner.....	3
Abbildung 3.1: RFLP-Muster von <i>katG</i>	24
Abbildung 4.1: Der Vergleich der getesteten DNA-Isolationsmethoden zeigt den Vorteil des QIAamp DNA Mini Kits.....	28
Abbildung 4.2: Die Korrelation zwischen Kultur und RFLP bei Isoniazidresistenz zeigt Übereinstimmung bei 43 von 46 in der Kultur resistenten Isolaten und keine Mutationen bei 17 in der Kultur sensiblen Isolaten. Heteroresistenz wurde bei einem der in der Kultur resistenten und 9 der in der Kultur sensiblen Sputen nachgewiesen.	31
Abbildung 4.3: Die Korrelation zwischen RFLP und Kultur bei Isoniazidresistenz zeigt, dass alle mutierten Genotypen phänotypisch resistent waren. 2 der 10 heteroresistenten Genotypen zeigten in der Kultur Isoniazidresistenz, 8 waren sensibel.	32
Abbildung 4.4: Die Korrelation zwischen Kultur und RFLP bei Ethambutolresistenz zeigt Übereinstimmung bei 11 von 20 in der Kultur resistenten Isolaten und keine Mutationen bei 21 in der Kultur sensiblen Isolaten. Heteroresistenz wurde bei einem der in der Kultur resistenten Sputen nachgewiesen.	34

Abbildung 4.5: Die Korrelation zwischen RFLP und Kultur bei Ethambutolresistenz zeigt, dass alle mutierten Genotypen phänotypisch resistent waren, ebenso 11 der 35 Wildtypen. Das Sputum mit den heteroresistenten Genotypen zeigte in der Kultur Ethambutolresistenz.	35
Abbildung 4.6: Verteilung der RFLP-Muster von <i>katG</i> zu Therapiebeginn.....	49
Abbildung 4.7: Verteilung der RFLP-Muster von <i>embB</i> zu Therapiebeginn	49

10 Abkürzungsverzeichnis

AM	Amikacin
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CPX	Ciprofloxacin
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (=DNS)
DTT	Dithiothreitol
EMB	Ethambutol
INH	Isoniazid
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
NaOH	Natronlauge
OFX	Ofloxacin
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaktion)
PZA	Pyrazinamid
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (restriction fragment length polymorphism)
RMP	Rifampicin
rpm	rounds per minute
SM	Streptomycin
s.u.	siehe unten
Tris-HCL	Tris[hydroxymethyl]methylaminhydrochlorid
z.B.	zum Beispiel

11 Lebenslauf

Name: Anja Birgitta Trumm

Geburtsdatum: 02.10.1980

Geburtsort: München

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1987-1991 Grundschule Martin-Kneidl-Schule Grünwald

1991-1996 Albert-Einstein-Gymnasium München

1996 fünfmonatiger Schüleraustausch, Broughton High School, Raleigh, NC, USA

1997-2000 Albert-Einstein-Gymnasium München, Abitur Juni 2000

Studium:

Okt. 2000-April 2001 Studium der Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Mai 2001-Mai 2007 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, II. Staatsexamen: 10.05.2007

Auslandsaufenthalte:

August 2004 Famulatur in Allgemeinmedizin, Vunisea Hospital, Vunisea, Fiji Islands

März 2005 Famulatur in Pädiatrie, Tygerberg Children's Hospital, University of Stellenbosch, Südafrika

August 2005 Famulatur in Pädiatrie, Tauranga Hospital, Tauranga, Neuseeland

Feb.-Juni 2006 Praktisches Jahr in der Inneren Medizin, Karl-Bremer-Hospital, University of Stellenbosch, Südafrika

Arbeitgeber:

Seit 1. Okt. 2007 Abteilung für Kinder- und Jugendheilkunde Klinikum Traunstein

12 Danksagungen

Zum Ende dieser Dissertation möchte ich nicht missen, mich bei einigen Personen, die mich auf meinem medizinischen Werdegang begleitet haben, zu bedanken.

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Löscher für die Gelegenheit bedanken, an seinem Lehrstuhl promovieren zu dürfen.

Besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. med. Dr. rer. nat. Heinz Rinder für die Bereitstellung dieser interessanten Arbeit und die gute Betreuung im Labor und während des Schreibens.

Ferner gilt mein Dank den Mitarbeitern des Tropeninstitutes der Universität München sowie den Mitarbeitern des Tuberkulose-Labors des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim, die mich in meinen Stunden im Labor immer unterstützt haben, insbesondere Frau Dr. Ludmila Naumann.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Nadya Markova sowie Frau Waltraud Berger danken, deren erhobene Daten ich in dieser Arbeit mit auswerten durfte.

Mein größter Dank geht an meine Familie, die mich auch in den schwierigsten Zeiten immer begleitete.