

## Diagnostik auf Mykobakterien und Tuberkulose

Mykobakterien sind langsam wachsende Bakterien, deren kulturelle Anzucht spezielle Bedingungen erfordert. Zu den Mykobakterien gehören die Tuberkulose-Erreger (***Mycobacterium tuberculosis*-Komplex** bestehend aus *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*) und mehr als 100 weitere Mykobakterien-Arten, die in der Umwelt weit verbreitet sind.

Erregernachweis erfolgt in der Regel aus

- Proben des Respirationstraktes  
(*Sputum, bronchoalveoläre Lavage (BAL), Bronchialsekret oder Trachealsekret*)
- Magensaft (vor allem bei Kindern, wenn keine repräsentative Probe aus Resp.-Trakt gewonnen werden kann)
- Urin
- Pleuraexsudat
- Liquor
- Punktionsproben bzw. Biopsien

(siehe auch Tabelle: Übersicht geeigneter Patientenproben S.3)

### Ablauf der Diagnostik

#### V.a. Lungentuberkulose:

- Probengewinnung:  
von **3 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils eine repräsentative Probe des Respirationstraktes bzw.** alternativ vor allem bei kleinen Kindern: Magennüchtersekret/-spülwasser
- Proben mit Untersuchungsauftrag „**Mykobakterien**“ einsenden
- **Entnahmedatum und Art der Probe** angeben
- möglichst als gesonderte Probe einsenden

#### V.a. Organtuberkulose:

Organspezifische Untersuchungsproben gezielt einsenden

(siehe auch Tabelle: Übersicht geeigneter Patientenproben S.3)

z.B. bei Urogenitaltuberkulose 3 voneinander unabhängige Urinproben (jeweils mind. 30ml)

**Anforderungsschein „Bakteriologie“**

**Auftrag Kultur auf Mykobakterien:**

**Auftrag Molekularbiologischer Schnelltest (PCR) aus geeigneten Proben (nur *M. tuberculosis*-Komplex)**

Untersuchungsauftrag		Molekularbiologie (PCR)	
<b>Bakteriologie</b> <input type="checkbox"/> Allgemeine Bakteriologie <small>(inkl. Mikroskopie, Kultur, Resistenzprüfung, teils indiziert)</small> <b>Spez. Untersuchungen</b> <input type="checkbox"/> Angina Plaut-Vincent <input type="checkbox"/> Aktinomyzeten <input type="checkbox"/> Brucella <input type="checkbox"/> Helicobacter pylori <input type="checkbox"/> Legionella/Kultur <input type="checkbox"/> Legionella Antigen-Nachweis (Urin) <input type="checkbox"/> Mycoplasma hominis/Ureaplasmen <input type="checkbox"/> Neisseria gonorrhoeae <input type="checkbox"/> Nocardia <input checked="" type="checkbox"/> <b>S. pneumoniae Antigen-Nachweis (Urin)</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Mykobakterien (möglichst als gesondertes Material einsenden)</b>	<b>Allgemeine Stuhlidiagnostik</b> Salmonellen, Shigellen, Campylobacter, Yersinien <small>(evtl. weitere Erreger bei besonderen klinischen/anamnestischen Angaben)</small> <b>Spez. Stuhlidiagnostik</b> <input type="checkbox"/> Salmonellen/Shigellen <input type="checkbox"/> Campylobacter <input type="checkbox"/> Yersinien <input type="checkbox"/> EHEC <input type="checkbox"/> Aerobes Keimspektrum <input type="checkbox"/> Clostridium difficile-Toxin <small>(kulturellen Nachweis des hypervirulenten Ribotyps 027 bitte in Feld Zusatzinformation gezielt anfordern!)</small> <input type="checkbox"/> Clostridium perfringens-Toxin <input type="checkbox"/> Helicobacter Antigen-Nachweis	<b>Pilzdiagnostik</b> <input type="checkbox"/> Pilzkultur (Hefepilze/Schimmelpilze) <input type="checkbox"/> Cryptococcus Antigen-Nachw. (Liquor u. Ser.) <b>Parasitologie</b> <input type="checkbox"/> Amöben <input type="checkbox"/> Lamblien <input type="checkbox"/> Kryptosporidien <input type="checkbox"/> Wurmteiler <input type="checkbox"/> Wurmtelle <input type="checkbox"/> Malaria <input type="checkbox"/> Trichomonaden <input type="checkbox"/> <b>Anderer/ungewöhnlicher V.a. Darmparasitose (Stuhl in SAF und nativ erforderlich! Zusatzinformationen unbedingt angeben!)</b> <b>Sonstiger Untersuchungsauftrag</b> (ggf. tel. Absprache im Labor)	<input type="checkbox"/> 16S-r DNA (bakterielles Genom) <input type="checkbox"/> 18S-r DNA (mykot. Genom) <input checked="" type="checkbox"/> <b>Mycobacterium tub.-Komplex</b> <input type="checkbox"/> Bordetella pertussis/parapertussis <input type="checkbox"/> Legionella (Respirationssekrete) <input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes <input type="checkbox"/> Mycoplasma pneumoniae (Respirationssekrete) <input type="checkbox"/> Chlamydia pneumoniae (Resp.-Sekr.) <input type="checkbox"/> Pneumocystis jirovecii (Respirationssekrete) <input type="checkbox"/> Chlam. trachomatis (spez. Tupfer) <input type="checkbox"/> Tropheryma whippelii <input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophilum
<b>Klinische Angaben</b>			

## Bestandteile der Diagnostik auf Mykobakterien:

### 1) Mikroskopische Untersuchung auf säurefeste Stäbchen (**Ziehl-Neelsen-Färbung**)

- Voraussetzung für pos. Ergebnis ist eine Bakterienzahl von etwa  $10^3 - 10^4$  Keimen/ml (Sensitivität ca. 30% im Vergleich zur Kultur)
- wichtig zur Abklärung der Infektiosität (krankenhaushygienische Relevanz)
- unterscheidet nicht zwischen lebenden und toten Bakterien
- Spezieszuordnung mittels Mikroskopie nicht möglich
- nicht aus Urin- oder Stuhlproben
- *Routineuntersuchung (werktags Ergebnis nach spätestens 24 h)*

- **Pos. mikroskopische Ergebnisse** aus Proben des Respirationstraktes /Magensaft indizieren zusätzliche krankenhaushygienische Schutzmaßnahmen  
**Anmerkung: Bereits der begründete klinische Verdacht auf eine Lungentuberkulose indiziert krankenhaushygienische Schutzmaßnahmen (Isolierung des Pat. und Atemschutz-Masken (FFP2/3) für das Personal), diese bereits vor Erhalt mikrobiologischer Untersuchungsergebnisse umgesetzt werden sollen.**
- **Neg. mikroskopische Ergebnisse** aus Proben des Respirationstraktes/Magensaft schließen eine „offene Lungentuberkulose“ nicht aus

### 2) Molekularbiologischer „Schnellnachweis“ (Sensitivität ca. 80-90% im Vergleich zur Kultur)

- Diagnostik von *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex mittels PCR aus Patientenproben (**ggf. zusätzlich anfordern s.o.**)
- indiziert bei
  - begründetem Verdacht
  - mikroskopisch negativem Sputum bei AIDS-Patienten, Kleinkindern, schweren Krankheitsbildern wie generalisierte Erkrankungen oder tuberkulöser Meningitis
  - mikroskopisch positivem Sputum („säurefeste Stäbe nachgewiesen“ )
- Unterscheidung zwischen Tuberkulose-Erregern und nichttuberkulösen Mykobakterien (NTM)
- *Ergebnis liegt innerhalb von 1-2 Werktagen vor*

### 3) Kulturanlage

- Kombination von speziellen Flüssig- und Festmedien
- Methode höchster Sensitivität und Grundlage für klassische Resistenztestung
- 8 Wochen Bebrütungsdauer (Generationszeit von Mykobakterien: 16 – 20 h)
- *im pos. Falle oft Nachweis innerhalb 1-2 Wochen*
- *Dauer der Speziesidentifizierung ab detektiertem Wachstum: weitere 1-2 Tage*

#### Empfindlichkeitsprüfung/ Resistenztestung:

- gegenüber Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid, Ethambutol, Streptomycin. (ggf. gegenüber weiteren)
- aus jedem Erstisolat
- Wiederholung der Empfindlichkeitsprüfung nach ca. 2 – 3 Monaten
- *Resistenzbestimmung für *M. tuberculosis* – Komplex: 1-2 Wochen*

#### Molekularbiologische Schnellresistenzverfahren bei pos. PCR bzw. pos. Kultur:

- liefern Informationen über eine Resistenz gegenüber Rifampicin und Isoniazid
- obligat mit konventioneller Sensibilitätsprüfung zu bestätigen (aufgrund falsch neg./falsch pos. Ergebnisse)

#### **Nichttuberkulöse Mykobakterien (NTM) werden in unserem Labor ebenfalls kulturell nachgewiesen.**

Eine molekularbiologische Diagnostik (PCR) aus Mykobakterien, die auch NTM beinhaltet, ist auf Anfrage möglich allerdings ist deren Aussagekraft limitiert und der Test nicht validiert. **Resistenztestungen bei NTM bieten wir nicht an;** ggf. übernimmt dies das **NRZ für Mykobakterien in Borstel** (Tel.: 04537 / 188 – 2110).

Zum Ablauf der Diagnostik bei Verdacht auf eine Infektion mit *Mycobacterium leprae* bitten wir um Kontaktaufnahme mit dem diensthabenden Mikrobiologen. (Tel.: 06131 / 17-0)

## Übersicht geeigneter Patientenproben für die kulturelle Diagnostik

\*\*\* = von 3 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils eine repräsentative Probe einsenden

Sputum ***	2-5 ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vor der Sputum-Abgabe nicht den Mund spülen</li> <li>• Abhusten aus den tiefen Atemwegen</li> <li>• möglichst erstes Morgensputum</li> <li>• Kontamination durch Speichel möglichst vermeiden</li> <li>• kein Sammelsputum (<i>nicht länger als 1 Stunde sammeln</i>)</li> <li>• wenn kein Sputum abgehustet werden kann:                         <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sputum-Induktion durch 5-10%ige NaCl-Inhalation</li> <li>- Bronchoskopie (bei Erwachsenen)</li> </ul> </li> <li>• bei kleinen Kindern: Magennüchternsekret/-spülwasser</li> </ul>
Bronchialsekret ***	2-5ml	<p><b>Bronchoskopisch unverdünnt gewinnen</b>  <i>Cave: lokal wirksame Anästhetika können aufgrund ihrer bakteriziden Wirksamkeit Untersuchungsergebnis verfälschen</i></p>
Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	10-30ml	Möglichst gezielt das betroffene Segment lavagieren
Bronchoskopisch gewonnene Biopsien		max. 1-2ml sterile physiologische Kochsalzlösung zusetzen
Magennüchternsekret***	2-5ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vor allem bei kleinen Kindern                          → <b>besondere Transportmedien mit Pufferzusatz benutzen</b></li> </ul>
Magenspülwasser***	20-30ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ansonsten Sputum / bronchoskop. gewonnene Proben vorziehen</li> </ul>
Urin***	mind. 30ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bevorzugt Morgenurin                          (<i>nach Einschränkung der Flüssigkeitszufuhr am Vorabend</i>)</li> <li>• Kein Mittelstrahlurin, möglichst nicht aus Urinauffangbeuteln (Ausnahme: Säuglinge / Kleinkinder)</li> <li>• Kontaminationen vermeiden</li> </ul>
Menstrualblut		<ul style="list-style-type: none"> <li>• gynäkologisch gewinnen</li> <li>• (<i>zu gleichen Teilen mit sterilem Wasser versetzen</i>)</li> </ul>
Sperma bzw. Prostatasekret		<ul style="list-style-type: none"> <li>• in sterilen Behältnis und ohne Zusatz versenden</li> </ul>
Stuhl ***	ca. 1-2g	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nur bei Patienten mit zellulärem Immundefekt sinnvoll</li> <li>• bevorzugt endoskopisch gewonnene Biopsien</li> </ul>
Gewebe, Biopsien		<ul style="list-style-type: none"> <li>• so viel Probenmenge wie möglich; mit max. 1-2ml steriler, physiologischer Kochsalzlösung versetzen</li> <li>• <b>kein Formalin</b></li> </ul>
Liquor	3-5ml	<b>möglichst große Probenmengen anstreben</b>
alle anderen Körperflüssigkeiten (Punktionen, Aspirate, Exsudate)	10-50ml	
Heparin-Blut	10ml Heparin-Blut	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nur bei Patienten mit zellulärem Immundefekt sinnvoll</li> <li>• Heparin-Blut <i>eilig in mikrobiolog. Labor senden</i></li> <li>• <b>kein Serum, kein EDTA-Blut, keine normalen Blutkulturen</b></li> </ul>
Knochenmark -biopsate / -aspirate		<i>wie Blutproben behandeln</i>
Abstrich Tupfer	-	<b>nicht geeignet - alternative Proben vorziehen</b>

## QuantiFERON-TB-Gold PLUS Test (mit Luer/Sarstedt Adapter)

Es handelt sich um einen Test zur *in vitro* Diagnostik einer latenten Infektion mit Mykobakterien des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes durch Nachweis einer zellvermittelten Immunantwort gegen dessen spezifische Antigene.

Im Blut von Personen, die mit *M. tuberculosis*-Komplex infiziert sind, finden sich CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die *M. tuberculosis*-Komplex-spezifische Antigene (ESAT-6, CFP-10) erkennen und dadurch zur Bildung von Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) stimuliert werden können. Der QFT-Plus Test beruht auf der Stimulation der T-Lymphozyten des peripheren Bluts mit den in den Teströhrchen fixierten definierten Antigenen und dem anschließenden Nachweis des freigesetzten IFN- $\gamma$  mittels ELISA.

### Indikationen

- Verdacht auf eine latente Infektion mit Erregern des *M. tuberculosis*-Komplex
- Vor geplanter Therapie mit bestimmten Immunsuppressiva (z.B. einige Biologicals )
- Zum Screening von Kontaktpersonen von Patienten mit offener Tuberkulose (Erfassung des Ausgangsstatus sowie einer möglichen Konversion)

#### Der QuantiFERON®-TB Gold PLUS Test

- ist eine Alternative zum Tuberkulin-Hauttest nach Mendel-Mantoux.
- ist **NICHT** als Therapie-Verlaufskontrolle geeignet.
- soll **in der Diagnostik einer aktiven Tuberkulose nicht eingesetzt werden.**

### Vorteile (z.B. gegenüber dem Tuberkulin-Hauttest)

- Keine Kreuzreaktion mit dem Tuberkulose-Impfstamm (BCG): *BCG-geimpfte Patienten sind negativ*
- Keine Kreuzreaktion mit den meisten ubiquitären Mykobakterien (NTM) (*Ausnahmen: M. kansasii, M. marinum, M. szulgai*)
- Überprüfung der prinzipiellen T-Zellreaktivität durch Mitführen einer Mitogenkontrolle

### Bewertung

Jeder Patienten-Test wird durch zwei **interne Kontrollen** validiert:

- **Nullkontrolle** (unstimulierte Patientenprobe):  
(*Unspezifisch produziertes IFN- $\gamma$  sollte nicht oder nur in geringen Mengen nachweisbar sein*)
- **Mitogenkontrolle = Positivkontrolle** (Mitogen-stimulierte Patientenprobe):  
(*Unabhängig vom Tuberkulosestatus sollte IFN- $\gamma$  produziert werden*)

### Positives Ergebnis:

Eine klinisch akute oder eine zurückliegende (latente) Infektion (*M. tuberculosis*-Komplex) ist sehr wahrscheinlich. Bei klinischem Verdacht auf eine akute, behandlungsbedürftige Tuberkulose sind weitere diagnostische Verfahren erforderlich (z.B. bildgebende Verfahren, mikrobiologische Untersuchung von Sputum, etc.).

→ **Der Test ersetzt nicht Mikroskopie, PCR, Kultur und Resistenztestung.**

→ **Eine sichere Unterscheidung zwischen latenter und aktiver Tuberkulose ist nicht möglich.**

### Negatives Ergebnis:

Eine Infektion mit Bakterien des *M. tuberculosis*-Komplex ist unwahrscheinlich.

→ **Eine latente Tuberkulose kann für die o.g. Routinefragestellungen mit ausreichender Sicherheit als ausgeschlossen gelten.**

→ **Eine (fortgeschrittene) aktive Tuberkulose kann mit einem falsch negativen Ergebnis einhergehen.**

Infektionen durch ubiquitäre (atypische) Mykobakterien werden durch den Test nicht erfasst.

### Nicht auswertbar:

- Hohe unspezifische IFN- $\gamma$  Produktion in Nullkontrolle
- Mitogenkontrolle (Positivkontrolle) negativ: keine ausreichend funktionstüchtigen T-Lymphozyten vorhanden

**QuantiFERON-Plus Single Patient Pack**“ enthält folgende Vacutainer Blutentnahmeröhrchen:

- Grau: Negativ** Nullkontrolle
- Grün: TB1** enthält *M. tuberculosis*-Komplex-spezifische Antigene (ESAT-6 und CFP-10), die zellvermittelte Immunreaktionen von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Lymphozyten auslösen
- Gelb: TB2** enthält *M. tuberculosis*-Komplex-spezifische Antigene und eine zusätzliche Kombination von Peptiden, die zellvermittelte Immunreaktionen von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten auslösen können
- Lila: Mitogen** Mitogenkontrolle



Entnahmedatum											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31					
JAN	FEB	MAR	APR	MAI	JUN	JUL	AUG	SEPT	OKT	NOV	DEZ
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

Bitte pro Material einen separaten Anforderungsschein anstellen. Bitte Rücklauf beachten!

<b>Tuberkulose</b>	
Quantiferon®-Test (gesondertes Abnahmeset!)	
Abnahme-Uhrzeit (zwingend)	12:00
<b>Pilze</b>	
<input type="checkbox"/> Candida	

## Anleitung

### 1) Jedes Blutentnahmeröhrchen muss mit 1 ml Blut gefüllt werden

- schwarze Markierung seitlich am Röhrchen zeigt die 1 ml-Fülllinie an.
- Die Röhrchen nehmen das Blut nur relativ langsam auf: daher dieses - nach dem scheinbaren Erreichen des Füllstandes - noch 2-3 sec. auf der Nadel belassen
- Bei Verwendung eines Butterfly-Systems: Schlauchverbindung muss zuerst gefüllt sein, bevor das QFT-Röhrchen angestochen wird (sonst zu geringes Volumen in Röhrchen!). Dieses erforderliche sog. "Priming" des Butterflys ist durch Befüllung einer normalen Blutentnahme-Monovette zu erreichen.

### 2) Röhrchen 8- 10mal schwenken (gesamte Innenwand des Röhrchens muss mit Blut benetzt sein)

- Korrekte Beschriftung aller Röhrchen sicherstellen.
- Auf Anforderungsschein Serologie Datum der Abnahme und Uhrzeit angeben (s.o.)
- Unverzüglich in das Mikrobiologische Labor senden. Nicht kühl, sondern bei Raumtemperatur lagern/transportieren.  
Möglichst keine Probengewinnung spätnachmittags, am Wochenende oder an Feiertagen!  
Ggf. gesonderte Beauftragung des Probentransportdienstes und telefonische Anmeldung in unserem Institut.

## Bestellung:

- für unsere internen Einsender: Ausgabe über unsere Apotheke: **SAP Nummer 53511965**