

**Kurstag 7**

**Tuberkulose,**

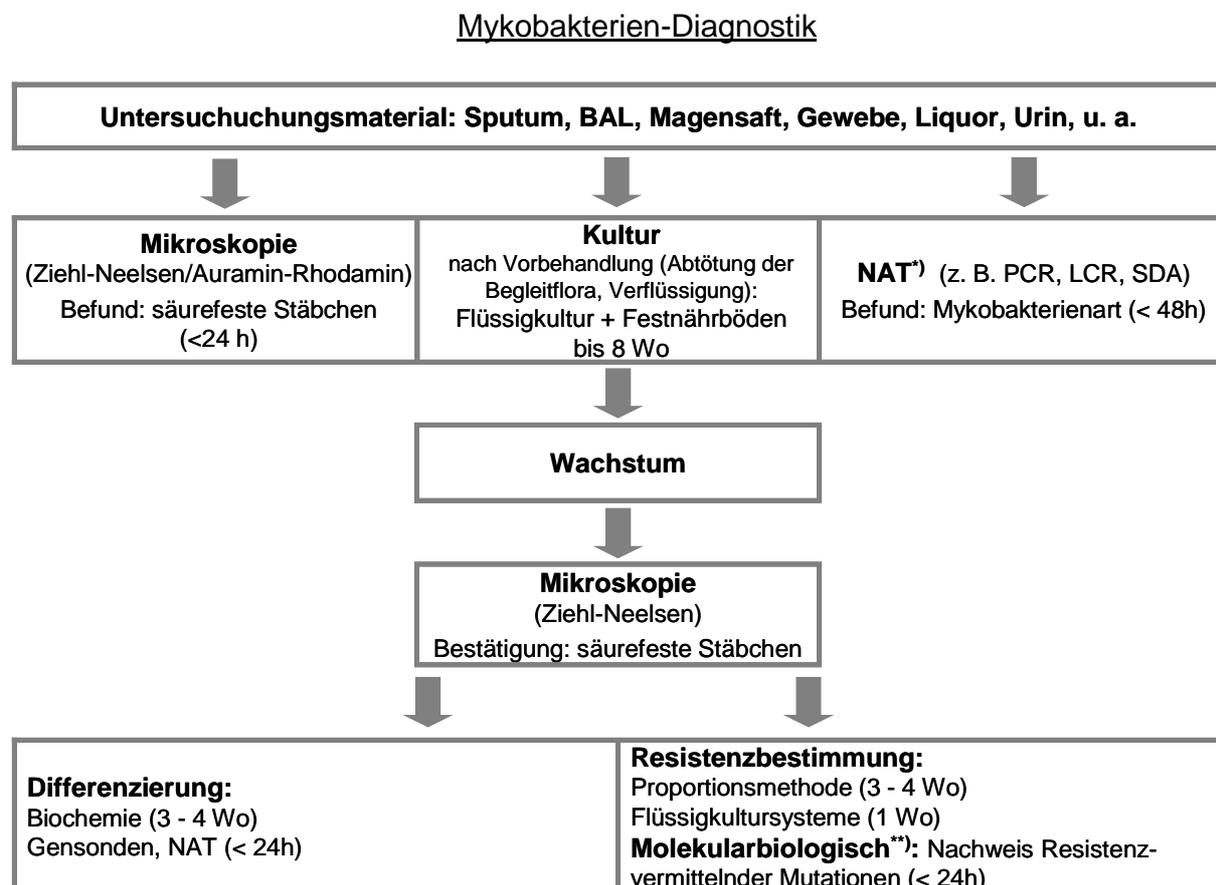
**granulomatöse Entzündungen**

# KURSTAG 7: TUBERKULOSE UND ANDERE GRANULOMATÖSE ENTZÜNDUNGEN

## 1 Mykobakterien

Mykobakterien erfordern aufgrund besonderer Eigenschaften (lipid- und wachsreiche Zellwand, Säurefestigkeit, langsames Wachstum) spezielle diagnostische Methoden. Die Erreger der Tuberkulose = **Mykobacterium-tuberculosis-Komplex** (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*) müssen von den nicht-tuberkulösen Mykobakterien (NTM, z. B. *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*) abgegrenzt werden. Auch letztere können Erkrankungen auslösen, sind aber bei Immunsupprimierten sehr viel häufiger als bei Immungesunden.

Eines der wichtigsten diagnostischen Charakteristika vieler Mykobakterien (einschließlich *M. tuberculosis*) ist ihr langsames Wachstum: kulturelle Anzucht dauert i. allg. mehrere Wochen. Entsprechend wichtig sind die Direkt-nachweise durch Mikroskopie und Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT: z. B. PCR).



\*) NAT (Nukleinsäureamplifikationstechniken), PCR (Polymerase chain reaction), LCR (Ligase chain reaction), SDA (Strand displacement amplification)

\*\*) Da jedoch nicht alle Resistenzen durch Mutationen an bekannten Stellen verursacht werden, können mit diesen Methoden nicht alle resistenten Stämme erkannt werden. Mit einigen Testverfahren ist es auch möglich, Resistenz-vermittelnde Mutationen direkt in mikroskopisch positiven Patientenproben nachzuweisen.

**Abb. 1:** Mykobakterien-Diagnostik-Schema

## Praktische Übungen:

### 1.1 Mikroskopie eines Dauerpräparates

Sie erhalten ein Sputumpräparat **nach Ziehl-Neelsen** gefärbt (s. Arbeitsvorschrift „Einführung“ 4.2.3 Seite 9) von einem Patienten mit Verdacht auf offene Lungentuberkulose. Im mikroskopischen Präparat sind „**säurefeste**“ Stäbchen (SF) als zarte, rot gefärbte Stäbchen auf blauem Hintergrund sichtbar. Ein negativer Befund mit der Aussage „**keine säurefesten Stäbchen**“ setzt voraus, dass mindestens 5 Min. lang mikroskopiert wurde bzw. 100 Gesichtsfelder (1000-fache Vergrößerung) durchgemustert wurden. Die mikroskopische Nachweisgrenze beträgt ca. 10.000 SF pro ml Sputum, d. h. es können nur größere Erregermengen sicher mikroskopisch nachgewiesen werden.

***M. tuberculosis* (Ziehl-Neelsen-Färbung), Sputum**

Skizzieren Sie Ihre Beobachtungen.

### 1.2 Kulturen von Mykobakterien

Zur Anzucht von Mykobakterien werden flüssige und feste Nährmedien verwendet. Es stehen Festmedien auf Eierbasis (z. B. **Löwenstein-Jensen-Agar**) und auf Agarbasis zur Verfügung.

*M. tuberculosis* und einige ubiquitäre Mykobakterien wachsen sehr langsam. Erst nach 3–6 Wochen ist je nach Keimzahl und Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials auf festen Nährböden Koloniewachstum zu erkennen. Die Kulturen werden insgesamt 8 Wochen lang auf Wachstum kontrolliert. Ein negativer Befund kann frühestens nach 6 Wochen mitgeteilt werden.

**In flüssigen Medien** kann Wachstum häufig früher festgestellt werden. Zur Verfügung stehen verschiedene kommerzielle manuelle und automatisierte Systeme, z. B. BACTEC 460TB System (BD Diagnostics), BACTEC MGIT 960 (BD Diagnostics), BacT/ALERT (bioMérieux). Die Systeme detektieren die metabolische Aktivität der Bakterien in der Kultur (durch Sauerstoffverbrauch und einen Fluoreszenzsensor). Andere Bakterien können ebenfalls ein Signal geben (falsch-positiver Befund), daher müssen nicht primär sterile Patientenproben vorbehandelt werden. Die Vorbehandlung bezweckt eine Homogenisierung und gleichzeitige Dekontamination der Probe, bei der die Begleitflora abgetötet wird.

#### Demonstration am Tischende:

Löwenstein-Jensen-Agar unbeimpft

Flüssige Nährmedien (z. B. MGIT™ = Mycobacteria Growth Indicator Tube)

#### Bildtafel:

Löwenstein-Jensen-Agar mit *Mycobacterium tuberculosis*

Löwenstein-Jensen-Agar mit *Mycobacterium bovis*

**Auf dem Demotisch an der Tafel** werden Ihnen verschiedene NTM-Stämme auf Löwenstein-Jensen-Agar vorgestellt.

### 1.3 Nachweis der früheren Exposition

Ein hilfreiches Kriterium bei der Diagnostik einer Tuberkulose ist der Nachweis der Immunreaktion auf die Mykobakterien als Hinweis auf früheren Kontakt. Anders als bei vielen anderen Infektionen ist der Nachweis von Antikörpern bei der Tuberkulose nicht hilfreich. Bisher entwickelte Antikörpernachweise gegen einzelne bzw. mehrere Targetantigene zeigten keine ausreichende Sensitivität und Spezifität, die eine klinische Anwendung

erlauben würden. Bei der Infektion mit *M. tuberculosis* ist der Nachweis einer T-Zell-Reaktion diagnostisch bedeutsam. Bei einem Kontakt des Immunsystems mit *M. tuberculosis* werden T-Gedächtnis-Zellen gebildet, die auf eine Re-Exposition schnell reagieren können. Falls noch kein Kontakt mit dem Erreger bestand, sind nur wenige *M. tuberculosis*-spezifische Zellen (keine Gedächtniszellen) vorhanden; in diesem Fall erfolgt keine relevante Reaktion bei einer Exposition gegenüber *M. tuberculosis*.

Die folgenden Tests weisen diese Reaktion nach. **WICHTIG:** Diese Tests weisen nur eine stattgehabte Exposition nach; sie geben keinen Hinweis auf eine aktive Erkrankung! Der Zeitpunkt der Exposition und das Krankheitsstadium (vollständig abgeheilte Infektion vs. akute, aktive Erkrankung) können nicht vom Ergebnis dieser Tests abgeleitet werden.

### 1.3.1 Tuberkulin-Test

Der **Tuberkulintest** ist ein Hauttest mit aufgereinigtem **Tuberkulin** (purified protein derivative, PPD). Tuberkulin ist eine Mischung niedermolekularer Proteine, die aus dem Überstand flüssiger Mykobakterienkulturen gewonnen wird. Tuberkulin ruft beim Einbringen in die Haut eine Immunreaktion hervor, wenn zuvor ein Kontakt mit *M. tuberculosis* stattgefunden hat (verzögerte Immunreaktion vom Typ IV). T-Lymphozyten wandern an den Injektionsort und rufen eine sichtbare Schwellung hervor.

#### Tuberkulintest als Intrakutantest nach Mendel-Mantoux

Der Mendel-Mantoux-Test ist durch die dosisgenaue, intrakutane Verabreichung der Tuberkulinmenge zuverlässiger als der inzwischen nicht mehr verwendete Stempelttest (Tine-Test). Verwendet wird Tuberkulin PPD RT 23 SSI (Statens Serum Institut, Kopenhagen, in Deutschland seit 2009 zugelassen). Verabreicht werden 2 TE (Tuberkulin-Einheiten) streng intrakutan (in die Epidermis).



**Abb. 2:** Injektionstechnik

Es werden 0,1 ml (100 µl) der Tuberkulin-Lösung gespritzt (**Abb. 2**). Die Injektion muss **unbedingt intrakutan** erfolgen, da eine eventuelle positive Reaktion bei einer tiefen Injektion schwierig zu beurteilen ist und unter Umständen eine Wiederholung des Tests erforderlich wird.

Wird die Injektion korrekt durchgeführt, bildet sich unmittelbar danach eine weiße Papel mit einem Durchmesser von etwa 10 mm, die rund 10 Minuten lang sichtbar bleibt. Nach der Injektion darf die Teststelle nicht gerieben oder übermäßiger UV-Strahlung ausgesetzt werden.

#### Ablesung und Bewertung

Die Reaktion wird nach **3 Tagen** abgelesen. Bei einer positiven Reaktion ist eine flache, unregelmäßige Induration (verhärtete Schwellung) tastbar, die von einer mehr oder weniger abgegrenzten Rötung umgeben ist. Es wird nur die Größe der Induration gemessen (**Abb. 3**).



**Abb. 3:** Messung der Induration

Bei Immungesunden ist eine Induration ab 6 mm als hochverdächtig einzustufen. Bei Immunsupprimierten und Kleinkindern ist der Verdachtsfall bereits bei einer Induration von unter 6 mm gegeben.

Eine positive Reaktion kann Folge einer latenten Infektion, einer früheren BCG-Impfung oder einer aktuell bestehenden Tuberkulose sein.

Falsch-negative Testergebnisse treten auf z. B. bei Immunsuppression, akuten Infektionskrankheiten (z. B. Masern), konsumierenden Erkrankungen, Kachexie, Patienten mit aktiver Tuberkulose und schwerem Krankheitsverlauf (Miliartuberkulose!).

### 1.3.2 Interferon- $\gamma$ -Induktionstests (IGRA-Tests)

Diese Tests beruhen auf dem Nachweis einer IFN- $\gamma$ -Produktion von T-Lymphozyten, die durch *M.-tuberculosis*-spezifische Antigene stimuliert werden.

Das Testkit beinhaltet 3–4 spezielle Röhrchen, die mit Vollblut befüllt werden:

- **Positivkontrolle (Mitogen):**  
enthält ein unspezifisches Mitogen, das zu einer polyklonalen T-Zell-Stimulation führt (weist das Vorhandensein stimulierbarer T-Lymphozyten bei dem Pateinten nach)
- **Negativkontrolle:**  
enthält kein Stimulans (weist die unspezifische IFN-  $\gamma$ -Produktion im Blut nach)
- 1-2 Röhrchen mit synthetisch hergestellten Peptiden, die ***M.-tuberculosis*-spezifische Antigene** repräsentieren (ESAT-6, CFP-10):  
Hatte ein Patient im Laufe seines Lebens Kontakt mit *M.-tuberculosis*-Komplex, kommt es zu einer IFN-  $\gamma$ -Freisetzung durch die sensibilisierten T-Lymphozyten.

Nach einer Inkubation der Röhrchen für 16–24 h erfolgt mittels ELISA die Quantifizierung des freigesetzten Interferon  $\gamma$ .

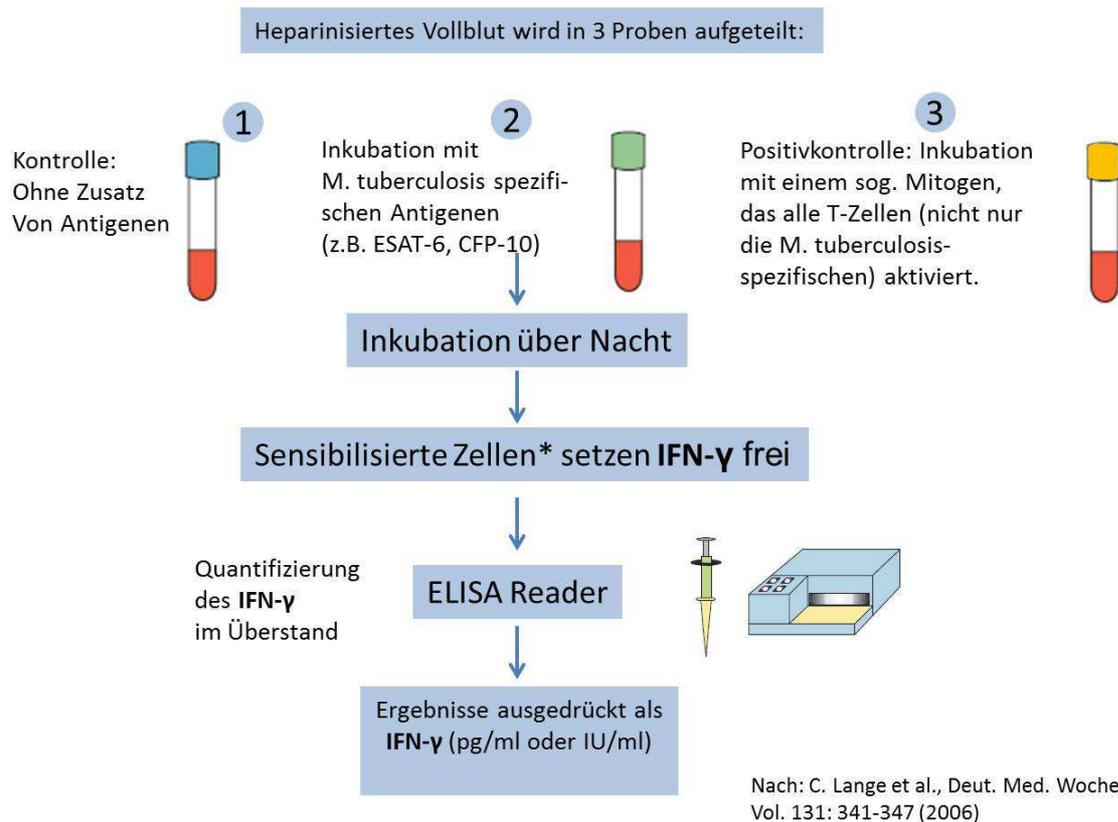
Der Testablauf und das Auswertungsschema sind in Abb. 4 bzw. Tab. 1 dargestellt.

#### Indikationen:

- Verdacht auf latente oder behandlungsbedürftige Infektion mit *M. tuberculosis*
- Untersuchung von Kontaktpersonen von Patienten mit offener Tuberkulose (zu beachten ist die Latenzzeit von 6–8 Wochen nach stattgehabter Exposition!)
- Screeningverfahren zum Ausschluss einer latenten Tuberkulose vor einer geplanten Immunsuppression (z. B. bei Patienten mit rheumatologischen Erkrankungen)

#### Vorteile:

- keine Kreuzreaktion mit BCG oder atypischen Mykobakterien (**Ausnahme:** *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*)
- hohe Sensitivität und Spezifität



**Abb. 4:** Testablauf des **Interferon- $\gamma$** -Induktionstests mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

\* sensibilisierte Zellen sind *M. tuberculosis*-spezifische T-Gedächtniszellen, also T-Lymphozyten, die bereits Kontakt zu Antigenen von *M. tuberculosis* hatten

**Positives Ergebnis:** Eine klinisch akute **oder** eine zurückliegende (latente) Infektion mit Bakterien des *M. tuberculosis*-Komplexes 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.).

**Negatives Ergebnis:** Eine Infektion mit Bakterien des *M. tuberculosis*-Komplexes ist unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen.

**Nicht auswertbares Ergebnis:** Die Positivkontrolle (hierbei werden die T-Zellen mit einem sog. Mitogen inkubiert, das alle T-Zellen (nicht nur die *M. tuberculosis*-spezifischen) aktiviert) fällt negativ aus. Dies ist beispielweise der Fall, wenn der Patient aufgrund einer bestehenden Immunsuppression keine (funktionstüchtigen) T-Lymphozyten besitzt.

### 1.3 Resistenztestung von Mykobakterien

Resistente *M. tuberculosis*-Stämme sind ein zunehmendes Problem. Man unterscheidet insbesondere zwei Resistenzmuster (andere Resistenzen kommen auch vor):

1. **MDR-Stämme** (*multidrug resistance*): Resistenz gegen Isoniazid und Rifampicin
2. **XDR-Stämme** (*extensive drug resistance*): Resistenz gegen Medikamente der 1. Wahl (Isoniazid und Rifampicin) und Fluorchinolone und mindestens eines der drei injizierbaren Medikamente der 2. Wahl (Capreomycin, Kanamycin und Amikacin)

Für die konventionelle Resistenztestung mittels Flüssigkultursystem muss das Mykobakterienisolat in der Kultur anwachsen. Dies kann mehrere Wochen in Anspruch nehmen. In dieser Zeit besteht die Gefahr, dass der Patient, wenn Resistenzen vorliegen, mit unwirksamen Medikamenten behandelt wird.

Der molekulargenetische Nachweis von Resistenzen direkt aus der Patientenprobe kann innerhalb von 4 h Hinweise auf das Vorliegen von Resistenzen geben. Diese Resistenzen gegen Tuberkulostatika entstehen in Stämmen des *M.-tuberculosis*-Komplexes durch resistenzvermittelnde Mutationen in den Genen, die als Angriffspunkt der Tuberkulostatika dienen. Zum raschen Nachweis dieser Mutationen wird die genomische DNA der Bakterien isoliert und untersucht. Diese DNA-Isolierung kann sowohl aus Kulturmateriale als auch aus mikroskopisch positivem Direktmaterial (z. B. Sputum eines Patienten) erfolgen. Technisch benutzt man meist eine Kombination aus PCR und nachfolgender Hybridisierung mit membrangebundenen Sonden zum Nachweis der resistenzvermittelnden Mutationen oder des unveränderten Gens. Der Vorteil dieser Testung gegenüber der sog. phänotypischen Testung (die übliche Testung, bei der die Bakterien den Antibiotika ausgesetzt werden und das Wachstum beobachtet wird; s. frühere Stunde) ist die Geschwindigkeit und die Möglichkeit, dies bereits aus dem Primärmaterial des Patienten durchzuführen.

Wir kennen die meisten Mutationen in den entsprechenden Zielgenen. Der Nachweis dieser Mutationen wird nun auf folgende Weise geführt:

Ein Fragment der mykobakteriellen genomischen DNA wird amplifiziert (PCR), und zwar das Stück, auf dem die Mutation liegt - falls vorhanden. Das amplifizierte Stück DNA muss nun daraufhin untersucht werden, ob die Sequenz „normal“ ist (also genau dem Gen entspricht, wie es die Bakterien normalerweise tragen) oder eine Mutation hat. Technisch wird das durch „Hybridisierung“ gemacht: Das amplifizierte Fragment wird mit einem Streifen inkubiert, auf dem an einer Stelle (s. Abb. 5) das gleiche Fragment (z. B. aus dem *rpoB*-Gen) aufgetragen ist. Die amplifizierte DNA hybridisiert, d. h. bindet an das immobilisierte Fragment, und diese Bindung ist stärker, wenn die Sequenz genau übereinstimmt. Durch die richtige Wahl der Bedingungen kann der Test so eingestellt werden, dass das Amplifikat nur dann bindet, wenn die Sequenz genau stimmt.

Auf den Streifen ist nun an einer Stelle *M.-tuberculosis*-DNA mit Normalsequenz, an einer anderen Stelle das gleiche DNA-Fragment mit mutierter Sequenz aufgetragen. Dieser Streifen wird mit dem Amplifikat aus Patientenprobe oder -stamm inkubiert. Dann bindet unveränderte Sequenz (falls amplifiziert, also falls der Stamm die unveränderte Sequenz trägt) an unveränderte Sequenz, und ggf. mutierte Sequenz an mutierte Sequenz. Das gebundene Amplifikat wird dann sichtbar gemacht und erscheint als Bande auf dem Streifen (hierfür gibt es verschiedene Techniken; z. B. kann während der PCR ein Biotinmolekül eingeführt werden, das später durch ein enzymatisch markiertes Avidin und eine Enzymreaktion (Farbumschlag) nachgewiesen wird). Man bekommt also ein Signal (eine sichtbare Bande) an der Stelle, wo unmutierte Sequenz aufgetragen ist, falls die Mykobakterien im Patientenmaterial keine Mutation tragen (und empfindlich sind); falls die Bakterien mutiert sind (und dann resistent im Beispiel gegen Rifampicin), bekommt man ein Signal an der Stelle, wo die mutierte Sequenz aufgetragen ist.

Diese Methode ist deutlich schneller als die kulturelle Resistenzbestimmung (s. o., Flussdiagramm), jedoch weniger umfassend. Sie kommt insbesondere zum Einsatz, wenn bereits der Verdacht auf eine Resistenz besteht (z. B. erfolglose Vorbehandlung, Patient aus Hochrisikogebieten).

**Ihnen wird der Test am Beispiel der Bestimmung einer Rifampicin- und/oder Isoniazid-Resistenz demonstriert:**

- **Rifampicin** hemmt die RNA-Polymerase durch Bindung an deren  $\beta$ -Untereinheit. Der Nachweis einer **Rifampicin-Resistenz** wird durch die Analyse der wichtigsten Mutationen des ***rpoB*-Gens** (kodiert für die  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase) geführt.
- **Isoniazid** hemmt die Mycolsäuresynthese durch Hemmung der Enoyl-ACP-Reduktase. Isoniazid muss zunächst in der Mykobakterienzelle durch die Katalase/Peroxidase aktiviert werden. Zur Identifizierung einer „**High-level**“-**Isoniazid-Resistenz** wird das ***katG*-Gen** (kodiert für die Katalase-Peroxidase) untersucht. Zur Identifizierung einer „**Low-level**“-**Isoniazid-Resistenz** wird die Promoterregion des ***inhA*-Gens** (codiert für die NADH-Enoyl-ACP-Reduktase) untersucht. Bei Mutationen in der Promoterregion kommt es zu einer Überexpression der Reduktase.

Der Streifen zeigt, ob das Gen in der nicht mutierten, normalen Form vorliegt („Wildtyp“, WT) oder mutiert ist (MUT).

**Praktische Übung:**

Ihnen werden Membranstreifen bereitgestellt, die Sie mit Hilfe der untenstehenden Abbildung auf Rifampicin- und Isoniazid-Resistenzen untersuchen. Protokollieren Sie das Ergebnis in der Tabelle und bewerten Sie die Resistenz gegenüber Isoniazid („high level“, „low level“) und Rifampicin.

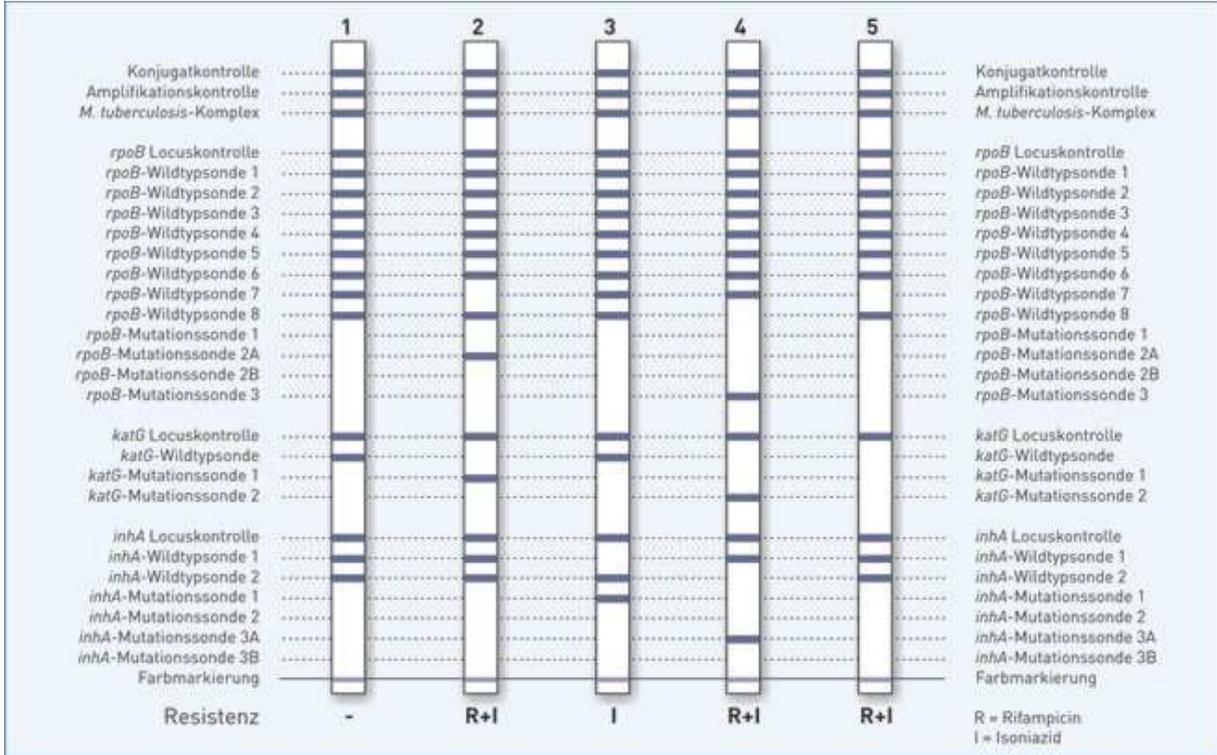


Abb. 5: Ergebnisbeispiele mit dem GenoType® MTBDRplus der Firma Hain

Werten Sie die Untersuchung von 3 Patientenmaterialien aus und interpretieren Sie den Ausfall des Testes:

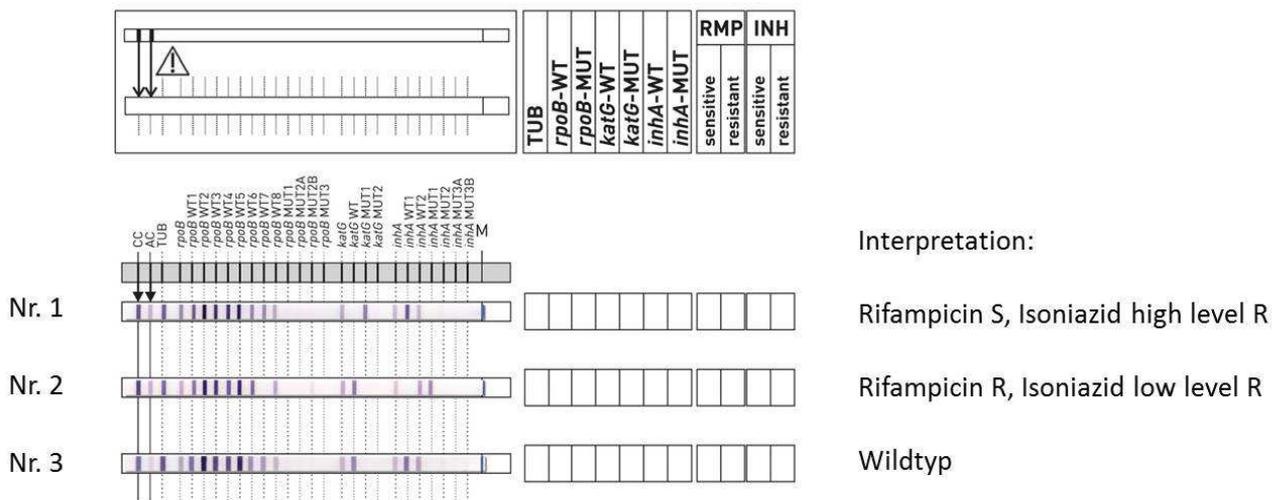


Abb. 6: Ergebnisse des GenoType® MTBDRplus der Firma Hain bei 3 Patientenproben

## 2 Aktinomyzeten

„Strahlenpilze“, griech. *aktis* = Strahl; *mykes* = Pilz; **grampositive Fadenbakterien**, die mit **verzweigten Geflechten** wachsen.

Einteilung der humanmedizinisch bedeutsamen Aktinomyzeten in 2 Gruppen:

1. Aktinomyzeten mit fermentativem Kohlenhydratstoffwechsel (***Actinomyces species***)
2. Aktinomyzeten mit oxidativem Kohlenhydratstoffwechsel (***Nocardia species***)

### 2.1 Aktinomyzeten mit fermentativem Kohlenhydratstoffwechsel

Natürlicher Standort: Schleimhautoberflächen von Warmblütern

Obligat bzw. fakultativ anaerobes Wachstum

Arten: *Actinomyces israelii*, *A. odontolyticus*, *A. naeslundii* u.a.

Krankheitsbilder: endogene Infektionen wie Karies, Parodontitis (*A. viscosus*, *A. naeslundii*), Entzündung der Tränenkanälchen, Aktinomykose (*A. israelii*, *A. gerencseriae*)

**Aktinomykosen**: granulomatös-eitrige Entzündungen, langsame Ausbreitung, multiple Abszedierung + Fistelbildung, dünnflüssiger Eiter mit Drusen (harte Körnchen, z. T. makroskopisch erkennbar); Rezidivneigung!

Pathogenese: Lokale Herabsetzung der O<sub>2</sub>-Spannung durch mangelhafte Blutversorgung (Gefäßerkrankung, Verletzung, Fremdkörper, andere Mikroorganismen); Echte Aktinomykosen = **Mischinfektionen**, Aktinomyzeten = Leitkeime; Funktion der Begleitbakterien: O<sub>2</sub>-Zehrer, Bildung von Enzymen, Toxinen

Lokalisation: In schleimhautnahen Geweben ⇒ Ausbreitung *per continuitatem* oder hämatogen ⇒ Absiedlungen im Körper

**60 % cervicofacial**: Ursachen: Zahnextraktion, Kieferbruch, periodontaler Abszess, Fremdkörper, z. B. Knochensplitter, Fischgräte, vereiterte Tonsillenkrypten

**15 % thorakal**: Ursachen: Aspiration erregerehaltigen Materials; fortgeleitet aus dem Halsbereich; hämatogen

**20 % abdominal**: Ursachen: Verletzungen (Fischgräten, Knochensplitter), Entzündungen der Darmschleimhaut (Appendizitis, Sigmadiverticulitis); ausgehend vom weibliche Genitale (Intrauterinpeppar!)

### Praktische Übungen:

#### 2.1.1 Grampräparat Aktinomyzeten-Eiter

Suchen Sie zuerst mit dem 10er-Objektiv in der Übersicht ein blaues „Aktinomyzetenengeflecht“, dann schwenken Sie auf das 100er-Objektiv.

Achten Sie auf die Begleitflora und die Entzündungszellen. Aktinomyzeten erscheinen als grampositive Geflechte, aber auch als sehr kurze pleomorphe Fäden, die gramlabil bis gramnegativ reagieren können.

Skizzieren Sie ihre Beobachtungen!

Aktinomyzeten-Eiter, 10er-Objektiv Übersicht: Aktinomyzeten mit Entzündungszellen	Aktinomyzeten-Eiter, 100er-Objektiv „Geflecht“ und Begleitkeime

Welche Bakterienarten werden als Begleitflora bei Aktinomykosen nachgewiesen?

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Anaerobier (*Bacteroides* spp., Fusobakterien), fakultative Anaerobier (Enterobacteriaceae, Staphylokokken, Streptokokken)

---

Was ist bei Verdacht auf Aktinomykose bei der Entnahme von Untersuchungsmaterial zu beachten?

Untersuchungsmaterial von Schleimhautoberflächen ist häufig schwierig zu beurteilen, da zwischen Standortflora und pathogenetisch relevanten Keimen nicht sicher unterschieden werden kann; Anaerobierdiagnostik!

---

Wie wird eine Aktinomykose behandelt?

- Antibiotische Therapie: Penicillin G bzw. Amoxicillin (Aktinomyzeten) und angepasst an Begleitkeime
  - Chirurgische Therapie: Fistelgänge, Abzessdrainage u.a.
- 

## 2.1.2 Aktinomykose beim Rind

Es wird der Unterkiefer eines Rindes mit Aktinomykose demonstriert. Sie können „Drusen“ (1–2 mm große verkalkte Körnchen) erkennen.

## 2.2 Nokardien (Aktinomyzeten mit oxidativem Kohlenhydratstoffwechsel)

Natürlicher Standort: freie Natur, v. a. Erdreich

Grampositive verzweigte Fadenbakterien, die in stäbchenförmige bis kokkoide Elemente zerfallen können. Nokardien sind **katalasepositive, obligate Aerobier** mit **oxidativem Kohlenhydratstoffwechsel**.

Arten: *Nocardia farcinica*, *N. asteroides*, *N. brasiliensis* u.a.

Nokardiosen treten typischerweise bei Immunsuppression, seltener bei Immungesunden, auf.

Verlaufsformen: pulmonal (Abszesse, Kavernenbildung), systemisch (Absiedlung in verschiedene Organe, besondere Affinität zum ZNS), kutan

### Praktische Übungen:

#### 2.2.1 Nokardien-Kulturen

Sie erhalten eine Blutplatte, deren eine Hälfte mit *Nocardia asteroides* und deren andere Hälfte mit *Nocardia farcinica* beimpft wurde. Beschreiben Sie die Nokardien-Kolonien (Farbe, Koloniemorphologie).

#### 2.2.2 Grampräparat von Nokardien-Kultur

Skizzieren Sie Ihre Beobachtungen!

Koloniefarbe und -morphologie:

***N. asteroides*:**

***N. farcinica*:**

**Nokardien, Gram, 100er-Objektiv**

### 3 Brucellen

Die Brucellose ist eine klassische Zooanthroponose. Der Mensch infiziert sich durch direkten oder indirekten Kontakt (Milch und Milchprodukte) mit kranken Tieren.

Humanpathogene Arten: *Brucella abortus* (Morbus Bang), *B. melitensis* (Maltafieber)

Das akute Krankheitsbild wird aufgrund der charakteristischen Fieberkurve auch als „undulierendes Fieber“ bezeichnet. Beim chronischen Verlauf kommt es zu Organmanifestationen (Hepatitis, Orchitis, Arthritis) mit granulomatöser Entzündung.

Untersuchungsmaterial: Blut, Knochenmark (sensitiver als peripheres Blut), Abszesseiter, Lymphknoten, Leber- und Milzbiopsien (Verdachtsdiagnose mitteilen, da Bebrütungsdauer 21 Tage)

Serologie: spezifischer Antikörpernachweis, da der Direktnachweis häufig nicht gelingt

Der Nachweis ist nach dem Infektionsschutzgesetz meldepflichtig.

#### Praktische Übung:

##### 3.1 Grampräparat *Brucella abortus* (Kultur)

***Brucella abortus*, Gram, 100er-Objektiv**

Skizzieren Sie Ihre Beobachtungen!

Welches Gramverhalten zeigt *B. abortus*?

Gramnegative Stäbchen

## 4 Kasuistik

Eine 83-jährige Patientin wird am 19. Mai im Krankenhaus Schopfheim wegen einer Pneumonie stationär aufgenommen. Röntgenologisch finden sich eine ausgedehnte Verschattung des rechten Oberlappens und multiple vergrößerte Lymphknoten, z. T. mit Verkalkung (siehe Abb. 7). Bei der Anamnese gibt die Patientin an, sich bereits seit Wochen müde und schwach zu fühlen. Sie habe an Gewicht verloren. Das Treppensteigen falle sehr schwer. Sie habe Husten und Auswurf, der manchmal auch blutig tingiert sei. Nachts schwitze sie stark.



Abb. 7: Thoraxröntgenbild

Bekannt sind bei der Patientin ein Mammakarzinom (mit Z. n. Ablatio), ein Diabetes mellitus Typ II seit 3 Jahren, diabetische Ulzera am Fuß und eine ausgeprägte periphere arterielle Verschlusskrankheit (Stadium IV) sowie eine dialysepflichtige terminale Niereninsuffizienz bei diabetischer Nephropathie.

### 4.1 Welche Verdachtsdiagnosen ergeben sich aus der Anamnese und der Bildgebung?

- Maligne Raumforderung (primärer Lungentumor, Metastase)
- Chronische Lungeninfektion

Ohne mikrobiologische Diagnostik wird eine Therapie mit Ampicillin/Sulbactam gestartet, die nach einer Woche mit Vancomycin ergänzt wird. Unter dieser Therapie verschlechtern sich die Lungenbefunde. Eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) am 21. Juni, welche allgemein-bakteriologisch (Gram-Färbung, Kulturen auf Blut- und Kochblutplatten) und zytologisch (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) untersucht wurde, ergab „zahlreich Enterokokken, *Stenotrophomonas maltophilia* und *Candida albicans*“ sowie „eine geringgradige chronisch-lymphozytäre Entzündung ohne Hinweis auf maligne Zellen“.

### 4.2 Welche Pneumonieerreger wurden bisher bei der allgemein-bakteriologischen Diagnostik berücksichtigt?

- Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie, die auf aerob bebrüteten Nährböden wachsen, wie *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. aureus*, Enterobakterien, *P. aeruginosa*, u. a. Nonfermenter

### 4.3 Beurteilen Sie die durchgeführte Antibiotikatherapie hinsichtlich ihrer Sinnhaftigkeit bei der ambulant erworbenen Pneumonie. Wie ist der mikrobiologische Befund bei der durchgeführten BAL einzuschätzen?

- Ampicillin/Sulbactam: OK für die Therapie einer ambulant erworbenen Pneumonie (Erregerspektrum *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. aureus* (nicht MRSA), z. T. Enterobakterien); Aspirationspneumonie (Anaerobier-wirksam)
- Vancomycin: nicht indiziert (kein MRSA-Nachweis)

- Enterokokken, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Candida albicans* in der BAL sind Ersatzflora (nach Antibiotikagabe)

Am 9. Juli wird die Patientin in die Medizinische Klinik des Universitätsklinikums Freiburg aufgenommen. Bei der Aufnahme wird ein Rachenabstrich in der Multiplex-PCR für respiratorische Erreger (Influenza A + B, RSV, humanes Metapneumovirus (HMPV), humanes Bocavirus, Parainfluenzavirus 1-4, Coronaviren, Rhinoviren, Enteroviren/Parechoviren, Adenoviren, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* und *Bordetella pertussis*) untersucht. Die Multiplex-PCR ist negativ. Im Urin wird kein *Legionella*-Antigen nachgewiesen.

#### 4.4 Beurteilen Sie die Diagnostik hinsichtlich ihrer Sinnhaftigkeit in diesem Fall!

- Das untersuchte Erregerspektrum verursacht akute Infektionen, die klinisch als atypische Pneumonien imponieren und radiologisch ein interstitielles Verschattungsmuster zeigen.

Die Patientin wird mit Clarithromycin (Makrolid) und Meropenem (Carbapenem) behandelt. Am 10. Juli wird Fluconazol (ein Azol) zur Therapie einer möglichen Pilzinfektion ergänzt. Am 23.7. wird auf Levofloxacin (Fluorchinolon) und Caspofungin (neues Breitspektrum-Antimykotikum) umgesetzt. Unter dieser Therapie hat die Patientin weiterhin ansteigende Konzentrationen von C-reaktivem Protein (CRP 136 am 24.7.) und Temperaturen zwischen 37 °C und 38,6 °C.

Vom 9. bis zum 25. Juli waren 11 Blutkulturen und 2 Pleurapunktate (in Blutkulturflaschen) allgemeinbakteriologisch untersucht worden, ohne positives Ergebnis.

#### 4.5 Welches Erregerspektrum wird nun von der Therapie erfasst?

- Makrolid: Therapie der interstitiellen („atypischen“) Pneumonie (Mykoplasmen, Chlamydien, Legionellen)
- Carbapenem: Nosokomial erworbene Pneumonieerreger (Enterobakterien, *P. aeruginosa* u. a. Nonfermenter); Aspirationspneumonie (Anaerobier-wirksam); z. T. Nokardien
- Ist bei der Patientin aufgrund ihrer diabetischen Grunderkrankung eine „Blindtherapie“ (ohne Erregernachweis) mit Antimykotika indiziert? Nein; typischer Risikofaktor für eine Fadenpilz-Pneumonie ist die Neutropenie; Risikofaktor für eine Pneumonie mit *Cryptococcus neoformans* bzw. *P. jirovecii* ist der Mangel an T-Lymphozyten; *Cryptococcus gattii* kommt auch bei Immungesunden vor; Pneumonien durch Hefepilze (*Candida*) sind extrem selten; Diabetes mellitus ist ein Risikofaktor für eine Infektion mit Mucorales (hier wären Fluconazol bzw. das Echinocandin Caspofungin nicht wirksam). Eine Infektion mit dimorphen Pilzen kommt bei einer entsprechenden Auslandsanamnese in Betracht.

Der PJ-ler wird vom Stationsarzt beauftragt, die Patientin und die Frage von Therapieresistenz und Ausbleiben eines Erregernachweises in der Fallkonferenz der Abteilung vorzustellen. Mit Enthusiasmus recherchiert er in seinem alten Lehrbuch Mikrobiologie und seinem arg zerlesenen Kursskript Mikrobiologie.

#### 4.6 Welche Erreger/Ursachen wurden bisher bei der Diagnostik nicht berücksichtigt? Welche Untersuchungsmaterialien und -methoden sind sinnvoll, um Infektionen mit diesen Erregern zu bestätigen oder auszuschließen?

- Tuberkulose
- Lungenabszess, Ursachen:
  - Aspiration (Anaerobier)
  - hämatogene Streuung, z. B. bei Rechtsherzendokarditis
  - Komplikation einer bakteriellen Pneumonie, z. B. durch *S. aureus*
  - Amöbenabszess (selten), z. B. durch Penetration eines Leberabszesses
- Aktinomykose

- Nokardiose
- Melioidose (Auslandsanamnese!)
- Endemische Pilzinfektionen, z. B. durch dimorphe Pilze (Histoplasmose, Kokzidioidomykose), Kryptokokkose
- Opportunistische Fadenpilzinfektionen (Risikofaktoren!), z. B. Aspergillose, Mucoralesinfektion
- Echinokokkose (zystischer Prozess)
- nicht-infektiöse Ursachen: Bronchial-Carcinom, Lungenmetastasen, Wegener-Granulomatose, Rheumaknoten, Sarkoidose, Lymphom

Auf Anraten von Mikrobiologen und Infektiologen werden zwei diagnostische Maßnahmen, nämlich ein **IFN- $\gamma$ -Induktionstest** und eine weitere **BAL** durchgeführt. Eigentlich hatte der PJ-Iler die Ideen, aber daran erinnert sich niemand mehr:

#### 4.7 Welches Untersuchungsmaterial muss für den Interferon- $\gamma$ -Induktionstest von der Patientin gewonnen werden?

- heparinisiertes Vollblut

Der Interferon- $\gamma$ -Induktionstest fällt wie folgt aus (in der Tabelle unten sehen Sie die Kriterien, die für die Interpretation angewendet werden):

IE / ml				
Nullwert	Tb-Antigen-stimulierte Probe	Mitogen-stimulierte Probe	Tb-Antigen minus Nullwert	Mitogen minus Nullwert
0,65	1,65	> 10	1,00	> 10

Tab. 1: Interpretationskriterien des Interferon- $\gamma$ -Induktionstests:

Null (IE/ml)	TB-Antigen minus Null (IE/ml)	Mitogen minus Null (IE/ml)	Interpretation
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	negativ
	≥ 0,35 (und ≥ 25 % des Nullkontrollwertes)	beliebig	positiv
	< 0,35	< 0,5	unschlüssig
> 8	< 0,35	beliebig	unschlüssig

Wie oben ausgeführt (s. Einleitung), werden bei diesem Test für jeden Patienten eine Negativkontrolle („Null“) und eine Positivkontrolle (Mitogen) mitgeführt. Nur wenn beide Kontrollen im Sollbereich liegen (Nullwert unter 8,0, Mitogenwert über 0,5), ist der Test auswertbar. Zum Beispiel können lange Transportzeiten den Test beeinträchtigen.

#### 4.8 Wie interpretieren Sie das Testergebnis der Patientin?

- Positiv (ist allerdings nicht beweisend für akute Infektion)

#### 4.9 Welche Untersuchungen werden in der Mikrobiologie aus der BAL angefordert?

- Pathogene Keime (übliche Erreger)
- Pilze (Auslandsanamnese angeben)
- Tbc / Mykobakterienkultur

- Aktinomyzeten / Nokardien

Von der BAL mit der Anforderung „Tbc / Mykobakterienkultur“ werden Spezialfärbungen durchgeführt (Auramin-Rhodamin, Ziehl-Neelsen-Färbung). Ergebnis der Ziehl-Neelsen-Färbung siehe Abb. 8.

#### 4.10 Wie ist dieser Befund zu interpretieren?

- Säurefeste Stäbchen (nicht beweisend für Mtb)

#### 4.11 Was bedeutet der Begriff der „Säurefestigkeit“?

- Keine Entfärbung nach Behandlung mit Säure-Alkohol

#### 4.12 Welche Bakterien weisen eine „Säurefestigkeit“ auf?

- Mykobakterien (partiell säurefest: *Nocardia* spp.)

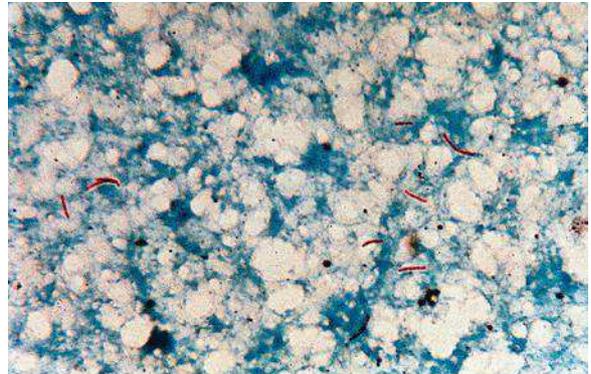


Abb. 8: BAL, Ziehl-Neelsen-Färbung

#### 4.13 Klinisch besteht nun der Verdacht auf eine offene Tuberkulose. Was ist darunter zu verstehen? Wie wird der Verdacht bestätigt? Beschreiben Sie das weitere Vorgehen! Welche Schritte werden unternommen, um frühere Kontaktpersonen, Mitpatienten und das Personal zu schützen?

- Bei der offenen Lungentuberkulose scheiden Erkrankte den Erreger aus. Das Risiko für eine Ansteckung hängt von den Umständen der Exposition ab (Konzentration der Erreger in der Umgebungsluft, Virulenz des Erregers, Expositionsdauer und -intensität). Die Ansteckungsfähigkeit ist am höchsten, solange säurefeste Stäbchen mikroskopisch, als Zeichen einer hohen Keimzahl, in respiratorischen Sekreten nachweisbar sind (Nachweisgrenze  $10^3$ – $10^4$  Bakterien pro ml). Die Ansteckungsfähigkeit von Patienten, bei denen lediglich ein kultureller oder molekularbiologischer Keimnachweis gelingt, ist demgegenüber deutlich geringer.
- NAT zur Unterscheidung *M. tuberculosis*-Komplex/ubiquitäre Mykobakterien → Infektionspräventionsmaßnahmen, Wahl der Therapie
- Entscheidung, ob molekulargenetische Resistenztestung durchgeführt wird (Patient aus Risikogebiet oder Kontakt zu Risikopatienten; Vortherapie); in diesem Fall wahrscheinlich Reaktivierung
- Infektionsprävention: räumliche Isolierung; Mund-Nasen-Schutz für den Patienten; Atemschutzmaske (FFP2) für Personal und Besucher; Umgebungsuntersuchungen, die nach erfolgter Meldung durch das zuständige GA veranlasst werden
- § 6 IfSG: ärztliche Meldepflicht: Erkrankung oder Tod an behandlungsbedürftiger Tuberkulose  
§ 7 IfSG: Meldepflicht des Labors: Nachweis von säurefesten Stäbchen im Sputum; direkter Erregernachweis aller zum *M. tuberculosis*-Komplex gehörenden Spezies außer BCG; Ergebnis der Resistenzbestimmung

#### 4.14 Wie würden Sie die antimikrobielle Therapie umstellen? Warum wird eine Kombinationstherapie durchgeführt?

- Tuberkulose-spezifische Therapie (2 Monate 4-fach, 4 Monate 2-fach)
- Die Behandlung der Tuberkulose erfolgt ausschließlich mit einer Kombination von Medikamenten. Zwei Gründe: Die Tuberkulosebakterien können innerhalb der tuberkulösen Läsionen in biologisch sehr verschiedenen Populationen vorkommen, zu deren optimaler Bekämpfung je nach pH-Wert und Wachstumsgeschwindigkeit verschiedene Antituberkulotika jeweils am besten geeignet sind. Die Medikamente unterscheiden sich in ihren Wirkmechanismen und Wirkorten (Zytosol, Lysosom, etc.), so dass die Erre-

ger auf unterschiedlichen Stufen abgetötet oder in ihrer Vermehrung gestoppt werden. Der zweite wichtige Grund für eine Kombinationsbehandlung ist die Vermeidung der Selektion oder Entwicklung resistenter Keime, denn bei einer Erkrankung an Tuberkulose sind immer Erreger vorhanden, die gegen ein bestimmtes Medikament durch Mutation resistent werden und die bei einer inadäquaten Therapie selektiert werden würden.

Nach drei Wochen werden die Bakterien im Flüssigkultursystem angezüchtet. Es erfolgen die Identifikation der Spezies innerhalb des *M.-tuberculosis*-Komplexes und eine konventionelle, phänotypische Resistenztestung (Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid, Ethambutol, Streptomycin).

## 5 Vorbereitung für die nächste Kursstunde

In der nächsten Kursstunde werden Sie die Diagnostik von Harnwegsinfektionen kennenlernen. Hierfür sollen Sie Ihren eigenen Mittelstrahlurin mitbringen (pro Tisch mindestens ein Student, max. fünf Studenten). Sie erhalten von uns einen Urinbecher sowie eine Urinmonovette für den Transport. Mittelstrahlurin sollte nach einer Miktionspause von mindestens 3 h gewonnen werden. Um eine Kontamination Ihres Urins mit Keimen der Urethral- und Umgebungsflora zu vermeiden, beachten Sie bitte folgende Anleitung für die Uringewinnung:

Frauen:

- Hände mit Wasser und Seife waschen
- Labien mit einer Hand spreizen (bis zum Abschluss der Uringewinnung)
- Vulva mit der anderen Hand dreimal von vorn nach hinten mit in lauwarmes Wasser getauchten Tupfern reinigen (jeweils frischen Tupfer verwenden)
- Harnröhrenöffnung mit Tupfern trocknen und einen Tupfer in den Scheideneingang einlegen

Männer:

- Hände mit Wasser und Seife waschen
- Vorhaut vollständig zurückziehen
- Eichel zweimal mit einem Tupfer und warmem Wasser reinigen (jeweils frischen Tupfer verwenden)
- mit einem dritten Tupfer Eichel und Harnröhrenöffnung trocknen

Drei Sekunden nach Beginn der Miktion (der Erststrahlurin wird nicht für die mikrobiologische Untersuchung verwendet) werden ohne Unterbrechung des Harnstrahls 10–20 ml Urin im sterilen Becher aufgefangen. Anschließend füllen Sie den Urin in die Monovette um und bringen diese in der nächsten Kursstunde mit. Idealerweise sollten zwischen Uringewinnung und -verarbeitung nicht mehr als 4 h liegen, bei längerer Lagerungszeit empfiehlt sich eine Aufbewahrung bei 2–8 °C.