

**Histochemische, molekularpathologische und
mikrobiologische Diagnostik typischer und atypischer
Mykobakterien an Paraffin-eingebetteten
Gewebeproben**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Hanna Margareta Zhou

aus Bonn

2020

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Hans-Peter Fischer
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Achim Hörauf

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.03.2020

Aus dem Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Glen Kristiansen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1 Historischer Hintergrund.....	9
1.1.1 BCG-Impfung = <i>Bacillus Calmette-Guérin</i> -Impfung.....	10
1.1.2 Systematik und Unterteilung der Mykobakterien	10
1.2 <i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplex.....	11
1.2.1 Bakteriologie.....	11
1.2.2 Übertragung	11
1.2.3 Pathogenese	12
1.2.4 Meldepflicht der Tuberkulose	14
1.2.5 Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland (RKI)	14
1.2.6 Besonderheiten der Tuberkulose im Kindesalter	18
1.3 NTM (nichttuberkulöse Mykobakterien)	20
1.3.1 Übertragung	20
1.3.2 Pathogenität	20
1.3.3 Epidemiologie.....	21
1.4 Diagnostik der Mykobakteriosen	22
1.4.1 Klinische Symptomatik und Untersuchung	22
1.4.2 Radiologische Diagnostik	22
1.4.3 Mikrobiologische Diagnostik	23
1.4.4 Pathologische Diagnostik	24
1.5 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit.....	30
2. Material und Methoden	31
2.1 Patientengut	31
2.2 Histologische Diagnostik	32
2.2.1 HE-Färbung.....	32
2.2.2 Histochemische Diagnostik	32
2.3 Molekularpathologische Diagnostik.....	33
2.3.1 DNA-Extraktion.....	33

2.3.2	DNA-Extraktionsüberprüfung.....	34
2.3.3	Nachweis von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mittels ELISA	34
2.3.4	Nachweis von nichttuberkulösen Mykobakterien mittels Sequenzierung	35
2.3.5	Nachweis von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> und nichttuberkulösen Mykobakterien mittels CHIP	35
2.4	Datenerfassung	36
2.5	Statistische Auswertung	37
2.5.1	Definitionen	37
3.	Ergebnisse	39
3.1	Histologische Fallbeispiele	39
3.1.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	39
3.1.2	Atypische Mykobakteriosen.....	46
3.2	Nachweis der Beständigkeit der Färbungen.....	48
3.3	Statistische Auswertung	50
3.4	Kollektiv A (n = 1173)	51
3.4.1	Geschlechterverteilung.....	51
3.4.2	Altersverteilung.....	53
3.4.3	Verteilung und Größe der Gewebeproben.....	54
3.4.4	Nichttuberkulöse Mykobakterien (NTM)	56
3.4.5	HE-Diagnose	59
3.4.6	Vergleich: Ziehl-Neelsen-Färbung und negative Molekularpathologie	60
3.4.7	Vergleich: Ziehl-Neelsen-Färbung und positive Molekularpathologie	61
3.4.8	Vergleich: Auramin-Färbung und negative Molekularpathologie	62
3.4.9	Vergleich: Auramin-Färbung und positive Molekularpathologie.....	62
3.4.10	Kombinierte Sensitivität und Spezifität	63
3.5	Kollektiv B (n = 681)	64
3.5.1	Geschlechterverteilung.....	65
3.5.2	HE-Diagnose	66
3.5.3	Vergleiche zwischen Primär- und Sekundärbefunder.....	67
3.5.4	Unterschiede zwischen Primär- und Sekundärbefunder	71
3.5.5	Vollständiges Kollektiv.....	73
3.6	Kollektiv C (n = 150).....	80

3.6.1	Altersverteilung.....	80
3.6.2	Geschlechterverteilung.....	81
3.6.3	Organverteilung.....	83
3.6.4	Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung vs. Molekularpathologie.....	84
4.	Diskussion	86
4.1	Kritische Bewertung der retrospektiven Datenanalyse	86
4.2	Vergleich mit der aktuellen Literaturlage	87
4.3	Vergleiche bezüglich Zeiteffizienz und Kostenaufwand.....	89
4.3.1	Mikroskopie	89
4.3.2	Nukleinsäure-Amplifikations-Technik	90
4.3.3	Kultur.....	92
4.4	Nichttuberkulöse Mykobakterien	92
4.5	Ausblick und Fazit	93
5.	Zusammenfassung.....	95
6.	Anhang.....	97
6.1	Nichttuberkulöse Mykobakterien - Gruppeneinteilung nach Runyon	97
6.2	Erläuterungen der Filter.....	97
6.3	HE - Färbeprotokoll	98
6.4	Ziehl-Neelsen-Färbung modifiziert nach Fite - Färbeprotokoll.....	99
6.5	Auramin - Färbeprotokoll.....	99
6.6	Molekularpathologische Methoden.....	99
6.6.1	Nachweis von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	99
6.6.2	Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken der atypischen Mykobakteriosen	102
6.7	Kollektiv A.....	104
7.	Abbildungsverzeichnis	106
8.	Tabellenverzeichnis	109
9.	Literaturverzeichnis	111
10.	Danksagung.....	118

Abkürzungsverzeichnis

Abb. = Abbildung

Abs. = Absatz

AIDS = Acquired Immune Deficiency Syndrome

AML = Akut myeloische Leukämie

BCG-Impfung = *Bacillus Calmette-Guérin*-Impfung

bp = Basenpaar

Ca. = Karzinom

COPD = Chronisch obstruktive Lungenerkrankung

CT = Computertomographie

DD = differentialdiagnostisch

EBM = Einheitlicher Bewertungsmaßstab

ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Fa. = Firma

FFPE = Formalin-fixiertes paraffin-eingebettetes Gewebe

FM = Fluoreszenzmikroskopie

FM-Auramin = Fluoreszenzmikroskopie nach Auramin-Färbung

HIV = Humanes Immundefizienz Virus

HNO = Hals-Nasen-Ohren

Ifms = Institut für medizinische Software

IfSG = Infektionsschutzgesetz

IGRA = Interferon Gamma Release Assay

GOÄ = Gebührenordnung für Ärzte

IUATLD = International Union against Tuberculosis and Lung Disease

KBV = Kassenärztliche Bundesvereinigung

LED = Light-emitting diode

LM = Lichtmikroskopie

LPSN = List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature

LTBI = Latente Tuberkulose Infektion

M. = Mycobacterium

MALDI-TOF MS = Matrix Assistierte Laser Desorptions Ionisierung – Time of Flight
Massenspektrometrie

MOTT = „Mycobacteria other than tuberculosis“ (Atypische Mykobakterien)

MRT = Magnetresonanztomographie

n = Anzahl

NAT = Nukleinsäure-Amplifikations-Technik(en)

NCBI = National Center for Biotechnology Information

NTM = Nichttuberkulöse Mykobakterien; nichttuberkulöse Mykobakteriosen

P = Primärbefunder

PCR = Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)

PPD = purified protein derivative

RFLP = Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

RKI = Robert Koch Institut

RT = Röntgen Thorax

S = Sekundärbefunder

STIKO = Ständige Impfkommission

Tab. = Tabelle

TB = Tuberkulose

THT = Tuberkulin-Hauttest

UKB = Universitätsklinikum Bonn

v. Chr. = vor Christus

WHO = World Health Organization

Ziehl-Neelsen = Ziehl-Neelsen modifiziert nach Fite

ZNS = Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Die Tuberkulose (TB) gehört zu den häufigsten Infektionskrankheiten weltweit. Verursacht wird sie durch den *Mycobacterium-(M.)-tuberculosis*-Komplex. Sie ist auch heute noch aktuell, mit 10,4 Millionen Neuerkrankungen und 1,3 Millionen Todesfällen plus 374.000 TB-Todesfällen bei Personen mit Humanem Immundefizienz Virus (HIV) (TB-Todesfälle bei HIV-Infektion werden im World-Health-Organization (WHO)-Report als HIV-Todesfälle erfasst) im Jahr 2016. Sie gehört damit weltweit zu den 10 führenden Todesursachen (Platz 9), noch vor dem erworbenen Immunschwächesyndrom (engl. Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)) (World Health Organization (WHO), 2017). Auch in Deutschland nimmt die TB in den letzten Jahren im Zuge der Flüchtlingswelle wieder deutlich zu (Loddenkemper et al., 2017).

1.1 Historischer Hintergrund

Nach Schätzungen von Molekularbiologen liegt das Alter von humanpathogenen Mykobakterien (*Mycobacterium africanus* aus dem *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex) inzwischen bei 2 - 2,5 Millionen Jahren, wobei erste dokumentierte Tuberkulosen als Knochentuberkulosen bei präkolumbianischen und altägyptischen Mumien belegt sind (Ewig et al., 2016). Zu Zeiten von Hippokrates (460 - 370 v. Chr.) und Aristoteles (384 - 322 v. Chr.) wurde die Tuberkulose als „Phthisis“ bezeichnet (Groß, 2009; Daniel, 2006). Es wird vermutet, dass die Tuberkulose ihren Ursprung in Ost-Afrika nahm und sich von dort aus in die ganze Welt verbreitete (Daniel, 2006).

Zu Zeiten der Industrialisierung wurde die Tuberkulose noch als „Schwindsucht“ oder „weiße Pest“ bezeichnet (Groß, 2009). Der Begriff „Tuberkulose“ wurde erst im Jahr 1839 von Johann Lucas Schönlein (aus Zürich) für alle Manifestationen der „Phthise“ eingeführt. Grundlage hierfür war das allen Fällen gemeinsame Vorliegen von sogenannten „Tuberkeln“ (organische Manifestation der Tuberkulose) (Ewig et al., 2016; Schönlein, 1834).

Der Erreger der Tuberkulose wurde im Jahre 1882 von Robert Koch in Berlin entdeckt und präsentiert (Ewig et al., 2016; Groß, 2009; Daniel, 2006; Kayser et al., 2010). Hierfür erhielt er 1905 den Nobelpreis für Medizin oder Physiologie (Daniel, 2006). Er war auch der Erste, der einen Impfstoff, das sogenannte „Tuberkulin“ entwickelte, allerdings ohne erfolgreiche Wirkung. Der Impfstoff wurde später durch Clemens Freiherr von Pirquet, Charles Mantoux und Florence Seibert weiterentwickelt und findet auch heutzutage noch in Form von gereinigtem Protein Derivat „purified protein derivative (PPD)“ im Tuberkulin-Hauttest (THT) Anwendung (Daniel, 2006).

1.1.1 BCG-Impfung = *Bacillus Calmette-Guérin*-Impfung

Den ersten echten Impferfolg gegen Tuberkulose hatten 1906 Albert Calmette und Camille Guérin mit ihrem BCG-Impfstoff, welcher sich aus attenuierten Erregern zusammensetzte. Er wurde erstmalig 1921 in Frankreich erfolgreich bei Menschen eingesetzt (Luca und Mihaescu, 2013). Seit 1998 wird er allerdings von der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert-Koch-Institut (RKI) in Deutschland nicht mehr empfohlen (Robert Koch Institut (RKI)). Verwendet wurden früher flüssige Bakteriensuspensionen, später gefriergetrocknete Suspensionen von attenuierten *Mycobacterium bovis*-Stämmen. Die tatsächliche Effektivität ist bis heute umstritten und liegt in verschiedenen Studien zwischen 0 - 80 % (Ewig et al., 2016).

1.1.2 Systematik und Unterteilung der Mykobakterien

Mykobakterien lassen sich in drei Gruppen einteilen. Dazu gehören der *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex, das *Mycobacterium leprae* und die nichttuberkulösen Mykobakterien (NTM), auch als atypische Mykobakterien oder MOTT (engl. Mycobacteria other than tuberculosis) bezeichnet (Ewig et al., 2016).

1.2 *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex

Die Erreger der Tuberkulose gehören dem *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex an, und werden auch als sogenannte „typische“ Mykobakterien bezeichnet. (Groß, 2009). Zu ihnen gehören folgende Stämme (Tab. 1):

Tab. 1: Übersicht *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (nach Ewig et al., 2016)

Spezies	Vorkommen
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Mensch
<i>Mycobacterium africanum</i>	Mensch
<i>Mycobacterium bovis</i> und <i>caprae</i>	Rind
<i>Bacillus Calmette-Guérin</i> (BCG)	Impfstamm
<i>Mycobacterium carnetti</i>	Mensch (Vorwiegend in Nordostafrika)
<i>Mycobacterium pinnipedii</i>	i.d.R. bei Robben und Seelöwen, in sehr seltenen Einzelfällen auch beim Menschen

1.2.1 Bakteriologie

Die Mykobakterien des *M.-tuberculosis*-Komplex sind schlanke, ca. 0,4 µm breite und 3-4 µm lange aerobe, säurefeste Stäbchen. Sie bilden keine Sporen und sind unbeweglich (Kayser et al., 2010). Sie gehören zwar zu den grampositiven Stäbchen, ihre Anfärbbarkeit nach Gram ist jedoch aufgrund des hohen Lipidanteils in der Zellwand nur schwach ausgeprägt (Groß, 2009).

1.2.2 Übertragung

Die Übertragung der Mykobakterien kann auf drei verschiedenen Wegen geschehen: Zum einen erfolgt sie aerogen, von Mensch zu Mensch, als Tröpfchenkerninfektion. Zum anderen über den Kontakt mit Rindern und den Verzehr von Rohmilch und ihren Produkten. Letztere tritt allerdings seit Einführung der Pasteurisierung und der aktiven Bekämpfung der Rindertuberkulose durch Schlachtung Tuberkulin-positiver Rinder in den entwickelten Ländern nur noch sehr selten auf. Ebenso ist eine Übertragung durch direkte Inokulation erregerehaltigen Materials selten, aber möglich. Dabei reichen zur primären

Infektion wahrscheinlich schon 10 Mykobakterien aus. Jedoch ist zur Tröpfcheninfizierung meist ein enger Kontakt über mindestens 8 Stunden zur Übertragungsperson erforderlich (Ewig et al., 2016).

1.2.3 Pathogenese

„Die Pathogenität der Mykobakterien beruht auf ihrer Fähigkeit, innerhalb von nicht spezifisch aktivierten Makrophagen zu überleben und sich vermehren zu können. Dabei wird die intrazelluläre Abtötung durch Verhinderung der Fusion des Phagosoms mit den Lysosomen erreicht. Eine Zerstörung der Bakterien ist nur durch T-Zell aktivierte Makrophagen (γ -Interferon) möglich“ (Ewig et al., 2016; Riede, 2004).

Entsprechend ist der Immunstatus des Patienten ein wichtiger Faktor für das Risiko einer manifesten Tuberkulose-Erkrankung. Alle Faktoren, die das Immunsystem schwächen, begünstigen die Entstehung der Tuberkulose-Erkrankung. Hierzu gehören u.a. junges und hohes Alter, Schwangerschaft, Immunsuppression (durch Diabetes mellitus, Autoimmunerkrankungen, Neoplasien, HIV-Infektion, sowie jede Form der iatrogenen Immunsuppression, insbesondere auch durch Steroide und TNF- γ -Inhibitoren), Unterernährung, Silikose, chronische Niereninsuffizienz und verschiedene Karzinome (Lungen- und HNO-Tumore; Leukämien und Lymphome) (Ewig et al., 2016).

Der weitere Krankheitsverlauf der Tuberkulose wird durch das Verhältnis von Vermehrung und Abtötung der TB-Bakterien bestimmt. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen Erstinfektion, Primärtuberkulose und Postprimärtuberkulose (Ewig et al., 2016).

1.2.3.1 Erstinfektion

In ca. 90 % der Fälle gelingt dem Körper eine primäre Kontrolle der Erstinfektion. In verkalkten Narben jedoch können die Bakterien über Jahrzehnte hinweg überleben und sich bei entsprechender Immunlage reaktivieren (Ewig et al., 2016; Hauer et al., 2006; Diel und Nienhaus, 2015).

1.2.3.2 Primärtuberkulose

„Von einer Primärtuberkulose wird gesprochen, wenn die initiale Kontrolle der tuberkulösen Erstinfektion nicht gelingt und eine entsprechende Erkrankung manifest wird“ (Ewig et al., 2016). Dabei ist sowohl bei Erwachsenen, besonders aber bei Kindern, die Lunge das am häufigsten betroffene Primärorgan (Robert Koch Institut (RKI), 2017).

Die primäre pulmonale TB ist durch eine lokale granulomatöse Entzündung in der Lungenperipherie charakterisiert, welche meist mit einer ipsilateralen Lymphknotenbeteiligung einhergeht (Primärkomplex) (Loddenkemper et al., 2017). Klinisch verläuft sie meist unauffällig. Jedoch kann sie sich asymptomatisch oder bis hin zu unspezifischer Symptomatik, wie zum Beispiel einem akuten Bronchialinfekt, Fieber oder Gelenkschmerzen, präsentieren. Als wichtigster diagnostischer Hinweis dient der enge Kontakt mit einem infektiösen TB-Patienten, da auch der Tuberkulin-Hauttest und Interferon Gamma Release Assays (IGRAs) in der Regel erst 3 - 8 Wochen nach der Infektion positiv werden (Loddenkemper et al., 2017; Ewig et al., 2016). Radiologisch kann im Röntgen-Thorax ein kleines Infiltrat und später eine ipsilaterale Lymphknotenvergrößerung auffallen (Loddenkemper et al., 2017).

1.2.3.3 Postprimärtuberkulose

Die postprimäre Tuberkulose ist eine sogenannte „Reaktivierungs-Tuberkulose“, die Jahre bis Jahrzehnte nach der Erstinfektion aus den „schlummernden“ Mykobakterien hervorgehen kann. Dies geschieht aufgrund einer fehlenden immunologischen Kontrolle, bei etwa 5 - 10 % der erst-infizierten Personen (Diel und Nienhaus, 2015).

Die Lunge ist auch hier mit etwa 80 % der häufigste Ort der TB-Manifestation. Meist tritt sie im Rahmen einer erworbenen Immunschwäche auf, dabei sind Männer fast doppelt so oft betroffen wie Frauen (Robert Koch-Institut (RKI), 2016b, zitiert in Loddenkemper et al., 2017).

Die führenden Symptome sind ebenfalls vorwiegend unspezifischer Natur: Fieber, Appetitlosigkeit, Gewichtsabnahme, Nachtschweiß und chronischer Husten. Länger als 14 Tage andauernder produktiver Husten mit eitrigem, eventuell blutig tingiertem Auswurf

ist dabei ein Hinweis auf eine TB Erkrankung. Lokalisierte Thoraxschmerzen können als Folge einer tuberkulösen Pleuritis auftreten. Je nach Größe des Lungenbefalles oder des Pleuraergusses können die Patienten eine zunehmende Dyspnoe entwickeln. Bei Erosion der Blutgefäße im Zuge der Entwicklung kaverner Läsionen kann es zu Hämoptysen kommen, bei Beteiligung des Larynx zu Heiserkeit. Trotz unauffälligem Röntgen-Thorax (RT) ist bei einem laryngealen oder tracheobronchialen Befall ein Mykobakterien-Nachweis im Auswurf möglich (Loddenkemper et al., 2017).

1.2.4 Meldepflicht der Tuberkulose

Laut Infektionsschutzgesetz (IfSG) der Bundesrepublik Deutschland § 6 Abs. 1 Nr.1 besteht für die Tuberkulose eine namentliche Meldepflicht beim Gesundheitsamt innerhalb von 24 Stunden nach Diagnosestellung. Meldepflichtig sind die Erkrankung und der Tod eines behandlungsbedürftigen Tuberkulose-Patienten, auch wenn kein Erregernachweis vorliegt. Nach § 7 Abs.1 besteht für *Mycobacterium tuberculosis/africanum* und *Mycobacterium bovis* eine namentliche Meldepflicht für den direkten oder indirekten Erregernachweis, sowie das nachfolgende Ergebnis der Resistenzbestimmung. Vorab ist auch der Nachweis säurefester Stäbchen im Sputum meldepflichtig. Darüber hinaus ist dem Gesundheitsamt auch zu melden, wenn Personen, die an einer behandlungsbedürftigen Lungentuberkulose leiden, eine Therapie verweigern oder abbrechen. Die gesammelten Daten werden dem Robert Koch-Institut übermittelt, welches diese infektionsepidemiologisch auswertet (§ 4 Abs. 1-3) (Infektionsschutzgesetz (IfSG), 2017).

1.2.5 Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland (RKI)

Wie dem Bericht des Robert Koch-Instituts zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland 2016 (Robert Koch-Institut (RKI), 2016b) zu entnehmen ist, wurden im Jahr 2016 insgesamt 5915 Tuberkulosefälle registriert. Dies entspricht einer Inzidenz von 7,2 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Die Inzidenz war im Vorjahr (7,1) ähnlich hoch, jedoch ließ sich ein deutlicher Inzidenzanstieg zum Jahr 2014 feststellen (5,6). Von 2014 zu 2016 war somit eine Steigerung der Fallzahlen um ca. 30,5 % zu beobachten. Das Niveau ist also mittlerweile ähnlich hoch wie zuletzt vor etwa 10 Jahren (Abb.

1). (Robert Koch Institut (RKI), 2017). An dieser Stelle sei erwähnt, dass sich die nachfolgenden Daten auf dem Stand von Ende 2017 befinden, der neu herausgebrachte Bericht des Robert Koch Instituts wurde hiernach nicht mehr aktualisiert.

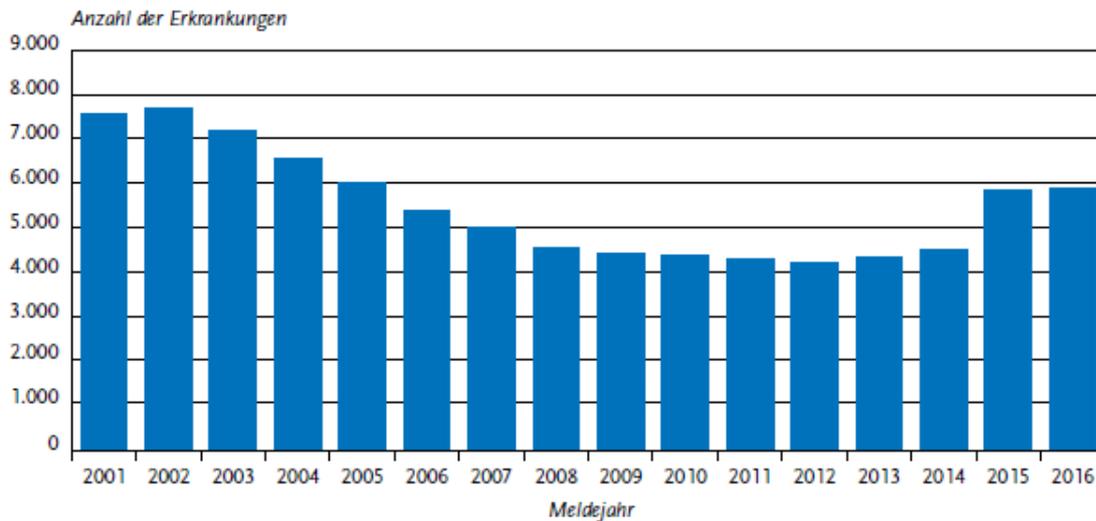


Abb. 1: TB-Fallzahlen in Deutschland 2001-2016 (Robert Koch Institut (RKI), 2016a)

1.2.5.1 Demografische Daten

Die Analyse der demografischen Daten der Tuberkulosefälle in Deutschland 2016 ergab, dass Männer gegenüber Frauen häufiger an einer Tuberkulose erkrankten. 2016 betrug die Inzidenz bei Männern 9,9 und bei Frauen 4,6 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern (2,2-mal höher), wobei sich die höchste Inzidenz (18,3) bei jungen Erwachsenen in der Altersgruppe der 20 bis 24-jährigen (Männer 25,9; Frauen 9,7) fand (Abb. 2) (Robert Koch Institut (RKI), 2017).

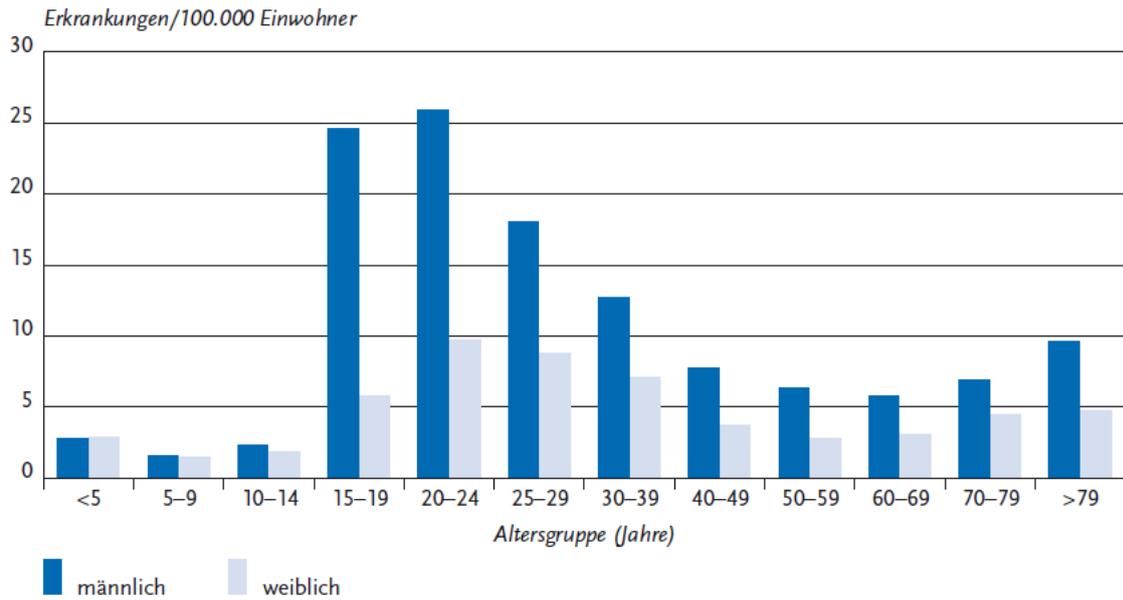


Abb. 2: Tuberkulose-Inzidenz (Erkrankungen pro 100.000 Einwohner) nach Altersgruppe und Geschlecht (n = 5.904) (Robert Koch Institut (RKI), 2017)

1.2.5.2 Staatsangehörigkeit und Geburtsland

„Die Analyse nach Staatsangehörigkeit ergab insgesamt deutliche Unterschiede im Erkrankungsrisiko: Bei ausländischen Staatsbürgern betrug die Inzidenz 42,6 pro 100.000 Einwohner und war somit 19-mal so hoch wie in der deutschen Bevölkerung (Inzidenz 2,2)“ (Robert Koch Institut (RKI), 2017). 2016 hatte ein Drittel aller Erkrankten die deutsche Staatsangehörigkeit, zwei Drittel waren ausländische Staatsbürger, wobei letztere eine wesentlich jüngere Altersstruktur aufwiesen (Altersmedian 28 vs. 58 Jahre) (Abb. 3 und Abb. 4) (Robert Koch Institut (RKI), 2017).

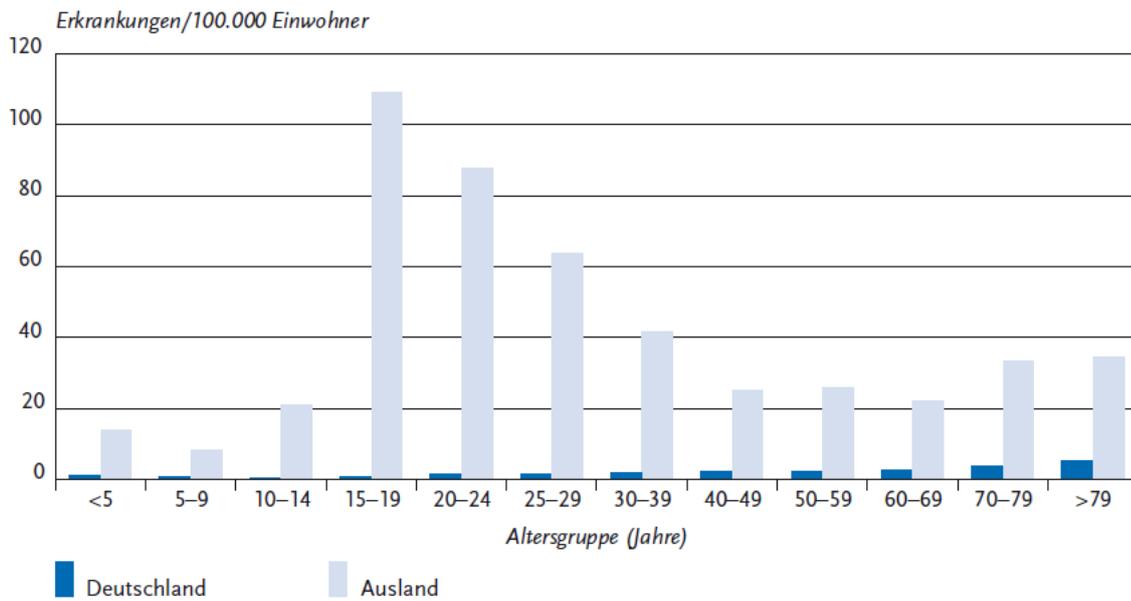


Abb. 3: Tuberkulose-Inzidenz (Erkrankungen pro 100.000 Einwohner) nach Altersgruppe und Staatsangehörigkeit (n = 5.332) (Robert Koch Institut (RKI), 2017)

Der Anteil der im Ausland geborenen Patienten machte im Jahr 2016 mit 74,3 % knapp drei Viertel aller registrierten Fälle aus. Es ließ sich ein kontinuierlicher Anstieg feststellen (2014: 62,2 %) (Abb. 4) (Robert Koch Institut (RKI), 2017). „Zu den 2016 am häufigsten angegebenen Geburtsländern zählten Somalia, Eritrea und Afghanistan, Syrien und Rumänien“ (Robert Koch Institut (RKI), 2017). In Anbetracht der Daten zur Staatsangehörigkeit lässt sich feststellen, dass durch eine alleinige Erfassung der Staatsangehörigkeit der Anteil von Tuberkulose-Patienten mit Migrationshintergrund nicht vollständig erfasst und folglich unterschätzt wird (Loddenkemper et al., 2017).



Abb. 4: Anteil im Ausland geborener Personen unter den übermittelten Tuberkulose-Erkrankten – Vergleich der Jahre 2002–2016 (Robert Koch Institut (RKI), 2017)

1.2.5.3 Organbeteiligung

Im Jahr 2016 war die Lunge mit einem Anteil von 75 % das am häufigsten betroffene Organ. Dabei ließ sich häufiger die offene Form (Erregernachweis im Sputum, da Anschluss des Tuberkuloseherdes an das Bronchialsystem besteht), als die geschlossene Form (kein Erregernachweis im Sputum) diagnostizieren. In 40,3 % der Fälle lag die besonders ansteckende mikroskopisch positive Form vor. Extrapulmonale Tuberkulosen wurden in 25 % der Fälle registriert, dabei waren hier die Lymphknoten am häufigsten betroffen (50,9 %) (Robert Koch Institut (RKI), 2017).

1.2.6 Besonderheiten der Tuberkulose im Kindesalter

Eine steigende Fallzahl von Tuberkuloseerkrankungen in Deutschland wurde vom RKI auch im Kindesalter festgestellt (2015: 196; 2016: 233). Die aktuelle Inzidenz betrug zuletzt 2,1 pro 100.000 Einwohner/Jahr (Erwachsene 8,0) und näherte sich damit Werten, wie sie zuletzt vor ca. 10 Jahren erfasst wurden (2002: 2,8). Die gemeldeten Fallzahlen

sind dennoch relativ gering mit ca. 150 bis 230 aktiven Erkrankungsfällen pro Jahr. Auffällig ist ein erhöhtes Tuberkulose-Erkrankungsrisiko (ca. 20-fach) für Kinder mit ausländischer Staatsangehörigkeit. Vergleicht man die Inzidenz, so betrug sie bei den Kindern mit deutscher Staatsangehörigkeit zuletzt 0,7, bei Kindern mit ausländischer Staatsangehörigkeit 14,2. Weiterhin lassen sich Unterschiede in den verschiedenen Altersklassen feststellen: die höchste Inzidenz (2,9) wurde bei den Kleinkindern festgestellt, gefolgt von der Gruppe der 10- bis 14-Jährigen (2,1) und zuletzt den 5- bis 9-Jährigen (1,5) (Robert Koch Institut (RKI), 2017).

Die Übertragung im Kindesalter erfolgte meist durch den Kontakt mit einem an Tuberkulose erkrankten Erwachsenen. Entsprechend führten Umgebungsuntersuchungen gerade im Kindesalter zu Diagnosen aktiver Tuberkulosen (2016: 37,2 %) (Loddenkemper et al., 2017; Robert Koch Institut (RKI), 2017). In anderen Studien wurde belegt, dass sich sogar bis zu 60 - 80 % der im Haushalt des an Tuberkulose erkrankten Erwachsenen lebenden Säuglinge und Kleinkinder infizieren (Marais et al., 2004, zitiert in Loddenkemper et al., 2017).

Aufgrund der altersbedingt noch eingeschränkten T-Zell-vermittelten immunologischen Abwehrmechanismen besteht in den ersten Lebensjahren das höchste Risiko für die Progression einer latenten Tuberkuloseinfektion (LTBI) zu einer aktiven Tuberkulose. Dabei besteht besonders für Säuglinge und Kleinkinder ein stark erhöhtes Risiko für eine disseminierte Infektion (Loddenkemper et al., 2017), weswegen in Hochinzidenzländern auch die BCG-Impfung weiterhin empfohlen wird (Ewig et al., 2016).

Im Kindesalter ist die häufigste Manifestationsform der Tuberkulose der Befall eines lokalen Lymphknotens und eines kleinen pulmonalen Parenchymherdes (sogenannter Ghon-Komplex). Lokale Komplikationen, wie zum Beispiel durch Lymphknoteneinbruch verursachte Belüftungsstörungen oder Pleuritiden kommen in bis zu 40 % der Fälle vor. Seltener sind dagegen Perikarditiden (1 - 2 % der Fälle) oder kavernöse Veränderungen (Loddenkemper et al., 2017).

In ca. 20 - 30 % der Fälle entwickeln sich durch lymphogene oder hämatogene Streuung extrapulmonale Tuberkulosen, vor allem in den peripheren Lymphknoten (Robert Koch-Institut (RKI), 2016b). Schwere extrapulmonale Manifestationen, wie zum Beispiel tuber-

kulöse Meningitiden und Miliartuberkulosen, treten vor allem bei Säuglingen und Immunsupprimierten auf, sind aber gerade dort aufgrund der Anergie und unspezifischer Symptomatik (THT bis zu 40 % negativ, RT ca. 50 % unauffällig) oft schwer zu diagnostizieren (Sharma et al., 2005, zitiert in Loddenkemper et al., 2017).

1.3 NTM (nichttuberkulöse Mykobakterien)

Die Gruppe der nichttuberkulösen Mykobakterien, früher auch „atypische“ und „ubiquitäre“ Mykobakterien, im Englischen auch als MOTT bezeichnet, umfasst aktuell über 160 einzelne Spezies (LPSN; Schönfeld et al., 2013). Sie kommen weltweit in der Umwelt vor, besonders in der Erde und im Wasser, aber auch in Nahrungsmitteln wie zum Beispiel roher Milch (Schönfeld et al., 2013; Ewig et al., 2016). Dabei sind für manche Erreger die natürlichen Habitate noch nicht bekannt. *M. gordonae* und *M. xenopi* zum Beispiel wurden bisher ausschließlich in künstlichen Habitaten wie Trinkwasser gefunden. Im Gegensatz zu *M. tuberculosis* benötigen die meisten NTM keinen menschlichen Wirt, da sie sich von organischem Material ernähren (Ewig et al., 2016).

1.3.1 Übertragung

Infektionen mit NTM erfolgen vorwiegend über Aerosole oder durch Staubpartikel, können aber auch über kontaminierte Erde und Nahrungsmittel, z. B. rohe Milch, Wasser oder Fleisch, aufgenommen werden (Griffith et al., 2007, zitiert in Schönfeld et al., 2013; Ewig et al., 2016). Eine direkte Übertragung vom Tier auf den Menschen ist in Ausnahmefällen möglich, z. B. vom Fisch auf den Menschen durch *Mycobacterium marinum*, wohingegen eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch bislang noch nicht festgestellt werden konnte (Ewig et al., 2016; Schönfeld et al., 2013).

1.3.2 Pathogenität

Die Pathogenität der NTM ist relativ gering, „dennoch können sie beim Menschen sowohl asymptomatische Infektionen als auch Erkrankungen verursachen“ (Ewig et al.,

2016). Prädisponierende Faktoren für eine NTM Erkrankung werden unterteilt in lokale und systemische Risikofaktoren (Schönfeld et al., 2013). Zu den lokalen Risikofaktoren zählen vorbestehende Lungenerkrankungen, wie z. B. COPD und Asthma. Bei der Mehrheit der HIV-negativen Patienten kommt ihnen eine zentrale Bedeutung zu (Chan und Iseman, 2013, zitiert in Schönfeld et al., 2013).

Zu den systemischen Risikofaktoren gehören Störungen der systemischen Immunität, wie z. B. die HIV-Infektion und der Zustand nach Transplantation mit konsekutiver Immunsuppression. Weiterhin gibt es auch eine genetisch bedingte erhöhte Empfänglichkeit für die NTM Infektion infolge von Mutationen verschiedener Gene (Schönfeld et al., 2013).

1.3.3 Epidemiologie

Für die nichttuberkulösen Mykobakterien besteht keine Meldepflicht, infolgedessen ist die exakte Inzidenz der NTM nicht genau bekannt. Allgemein besteht der Eindruck, dass NTM in den letzten Jahren deutlich zugenommen haben (Kendall und Winthrop, 2013, zitiert in Schönfeld et al., 2013; Ewig et al., 2016). Zu den am häufigsten beobachteten Bakterien gehört dabei *Mycobacterium avium*, gefolgt von *Mycobacterium kansasii*, *xenopi* und *malmoense* (Ewig et al., 2016; Schönfeld et al., 2013).

Sollte dies zutreffen, sind neben einer alternden Bevölkerung mit vermehrten Komorbiditäten, HIV-Infektionen und häufigerer Anwendung von Immunsuppressiva, in erster Linie die verbesserten Nachweisverfahren dafür verantwortlich zu machen (Ewig et al., 2016; Schönfeld et al., 2013; Griffith et al., 2007; van Ingen und Wagner, 2011; Kendall und Winthrop, 2013; Schönfeld et al., 2013).

Nichttuberkulöse Mykobakterien verursachen am häufigsten pulmonale Infektionen (> 90 %). Es wurden aber auch Erkrankungen von Lymphknoten, Haut- und Weichteilgewebe, sowie ein disseminierter Organbefall beobachtet. Dabei waren immunsupprimierte, vor allem HIV-infizierte Patienten häufiger betroffen als Immungesunde (Ewig et al., 2016).

1.4 Diagnostik der Mykobakteriosen

Die Diagnostik der Mykobakteriosen basiert auf verschiedenen Säulen, dazu zählen die klinische Symptomatik und Untersuchung, die radiologische, pathologische und mikrobiologische Diagnostik.

1.4.1 Klinische Symptomatik und Untersuchung

Sowohl die Tuberkulose als auch nichttuberkulöse Mykobakteriosen zeichnen sich durch eine sehr unspezifische, teilweise sogar asymptomatische Klinik aus. Wichtig ist die Einbeziehung der Tuberkulose in differentialdiagnostische Überlegungen bei folgender Symptomatik:

- B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust)
- Husten, Auswurf, ggf. Hämoptysen
- Thoraxschmerz, Kurzatmigkeit (bei tuberkulöser Pleuritis)
- Symptome extrapulmonaler Herde (Ewig et al., 2016).

Die klinische Untersuchung ist meist ebenso wenig ergiebig wie die klinische Symptomatik. Mögliche Befunde umfassen inspiratorische Rasselgeräusche, vor allem nach einem Hustenstoß, physikalische Zeichen eines Pleuraergusses, eventuell vergrößerte Halslymphknoten und selten ein Erythema nodosum (Ewig et al., 2016).

Zur klinischen Diagnostik gehören auch der THT und der sogenannte Quantiferon-Test auch IGRA genannt, die in dieser Arbeit aufgrund des fehlenden Bezuges zur Studie nicht genauer erläutert werden.

1.4.2 Radiologische Diagnostik

„Bei klinischem Verdacht auf eine Tuberkulose hat die Durchführung einer Röntgen-Thorax-Aufnahme oberste Priorität. Röntgenkontrollen zwei Monate nach Therapiebeginn (Ende der Initialphase) und nach Abschluss der Behandlung werden als Minimum gefordert“ (Ewig et al., 2016). Zur weiteren Abklärung und Differenzierung zu anderen

Krankheitsbildern kann auch eine Computertomographie (CT) - und/oder Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) -Diagnostik durchgeführt werden.

1.4.3 Mikrobiologische Diagnostik

„Der Erregernachweis erfolgt in der Regel aus Sputum, Bronchialsekret oder Trachealsekret, ist aber auch aus Magensaft, Urin, Pleuraexsudat, Liquor und anderen Punktions- bzw. Biopsieproben je nach Lokalisation der Erkrankung möglich. Die Wahl des geeigneten Probenmaterials, die korrekte Art der Gewinnung, des Transports und der Weiterverarbeitung sind dabei von entscheidender Bedeutung“ (Richter, 2010, zitiert in Robert Koch Institut (RKI), 2013).

In der mikrobiologischen Diagnostik werden ebenso wie in der pathologischen Diagnostik Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbungen angefertigt und mikroskopisch ausgewertet. Vorwiegend wird hier jedoch mit Ausstrichen von Sputumproben oder anderer Sekrete und nicht mit Biopsieproben von Geweben gearbeitet.

Auch die mikrobiologische Diagnostik bedient sich zunehmend der Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT). Die detaillierten Färbemethoden der Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung sowie der in dieser Studie verwendeten NAT finden sich unter dem Punkt „Pathologische Diagnostik (1.4.4)“.

1.4.3.1 Kulturelle Anzucht

„Die kulturelle Untersuchung ist der „Goldstandard“ in der Mykobakterien-Diagnostik, sodass bei Verdacht auf eine Tuberkulose eine kulturelle Untersuchung angestrebt werden muss“ (DIN Deutsches Institut für Normung e.V., 2011a, zitiert in Loddenkemper et al., 2017; Schönfeld et al., 2013). „Wachstum von TB-Bakterien in einer Kultur beweist das Vorliegen vermehrungsfähiger Keime und ist die Voraussetzung für die benötigte Resistenztestung, für die genaue taxonomische Identifizierung und eventuell weitergehende Analysen bei epidemiologischen Fragestellungen“ (Loddenkemper et al., 2017).

Mit einer Nachweisgrenze von etwa 10 - 100 Bakterien pro ml Patientenprobe, ist die kulturelle Untersuchung zur Zeit das sensitivste Verfahren zur Detektion von Mykobakterien (Loddenkemper et al., 2017)

Die für die Kultivierung gewonnenen Proben sind in der Regel nicht steril und müssen „mit einer speziellen Vorbehandlung, zum Beispiel mit N-Acetyl-L-Cystein-NaOH, dekontaminiert, homogenisiert und konzentriert werden“ (Loddenkemper et al., 2017). Der Nachweis erfolgt durch Anzucht in einer Flüssig- und auf zwei Festkulturen, wobei die Kultivierung der Flüssigkulturen schneller und sensitiver ist. Die Anzucht dauert im Durchschnitt ca. 1 - 3 Wochen (Generationszeit ca. 12 - 18 Stunden (Kayser et al., 2010)), jedoch gilt eine Kultur erst nach 8 Wochen als negativ (Loddenkemper et al., 2017). „Keimarme und schwierig zu gewinnende Proben können bis zu 12 Wochen bebrütet werden“ (Loddenkemper et al., 2017; Schönfeld et al., 2013).

Die Identifizierung der Mykobakterien erfolgt „sehr schnell mit immunchromatografischen („Lateral Flow Assays“), massenspektrometrischen (MALDI-TOF) oder molekularbiologischen Methoden (Streifenhybridisierungsverfahren, PCR-Analysen, Sequenzierungen)“ (Loddenkemper et al., 2017).

1.4.4 Pathologische Diagnostik

1.4.4.1 Histologische Diagnostik

In der pathologischen Diagnostik einer Mykobakteriose erfolgt als erstes eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung der Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebeproben (FFPE). Sollte sich hier der histologische Verdacht auf eine Mykobakteriose erhärten, so werden weitere histochemische Färbungen, i.e. Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbungen, angefertigt. Im Anschluss hieran erfolgt erst eine weitere Diagnostik mittels molekularpathologischer Nachweisverfahren zwecks Bestätigung und Identifizierung bereits gesehener Bakterien oder zwecks Ausschluss einer Mykobakteriose bei histochemisch nicht gelungenem Nachweis von Mykobakterien.

Dabei ist die mikroskopische Untersuchung eines der schnellsten und wohl auch das kostengünstigste Verfahren in der Diagnostik der Mykobakteriosen (DIN Deutsches Institut für Normung e.V., 2011b, zitiert in Loddenkemper et al., 2017).

Der histochemische Nachweis von Mykobakterien gelingt mittels zwei verschiedener Färbungen. Beide beruhen auf dem hohen Lipid- und Wachsanteil, den Mykobakterien in ihrer Zellwand besitzen. Dieser sorgt dafür, dass die üblichen Farbstoffe nur sehr langsam oder sogar überhaupt nicht aufgenommen werden. „Um eine Anfärbung der Mykobakterien durch die Bildung eines Farbstoffkomplexes zu beschleunigen, muss die Farblösung bis zur Dampfbildung erhitzt werden („Schmelzen der Wachshülle und Eindringen des Farbstoffes“). Haben sich Mykobakterien einmal angefärbt, lassen sie sich selbst mit intensiven Differenzierungsmitteln wie Salzsäure-Ethanol nicht wieder, oder kaum entfärben (daher die färberische Bezeichnung säurefest)“ (Mulisch und Welsch, 2015).

Die Sensitivität der mikroskopischen Färbungen ist sehr variabel (20 - 80 %) und im Vergleich zur Kultur geringer. Weiterhin kann nicht zwischen TB-Bakterien und NTM sowie zwischen lebenden und toten Bakterien unterschieden werden (Loddenkemper et al., 2017). Allerdings gelingt der Nachweis säurefester Stäbchen besonders in der Auramin-Färbung sehr schnell, sodass hochinfektiöse Patienten schnell erkannt werden können und einer entsprechenden Therapie zeitnah zugeleitet werden können.

Histologisch zeigt sich sowohl bei *Mycobacterium tuberculosis* als auch bei NTM das typische Bild einer epitheloidzelligen Granulomatose, mit oder ohne Nekrosen (Schönfeld et al., 2013). Die meist verkäsende Nekrose (bei guter Immunlage keine Verkäsung, bei Hyperergie verkäsende Granulome, bei Anergie areaktive käsige Gewebenekrosen) im Zentrum des Granuloms enthält zum Teil abgetötete Erreger und Reste von Makrophagen. Umhüllt ist sie von einem abdichtendem Wall aus bakteriziden Makrophagen (= Epitheloidzellen), die zum Teil zu mehrkernigen geordneten Riesenzellen vom Langhans-Typ verschmolzen sind. Außen befindet sich schließlich ein Lymphozytensaum, der die Makrophagen zur Abwehr stimuliert (Riede, 2004).

Eine sichere Unterscheidung zwischen *M. tuberculosis* und NTM gelingt nicht. Allerdings sind einige NTM Spezies durch eine mehr kokkoide Morphologie oder auffällige Bände-

nung charakterisiert, sodass in einigen Fällen ein erster Hinweis auf ihr Vorliegen gegeben werden kann (Schönfeld et al., 2013). Bildbeispiele zu den verschiedenen Färbungen finden sich unter „Histologische Fallbeispiele“ (3.1).

1.4.4.1.1 Ziehl-Neelsen-Färbung und ihre Modifikation nach Fite

Die Ziehl-Neelsen-Färbung dient dem Nachweis säurefester Bakterien im Schnittpräparat. Eine Differenzierung zwischen vermehrungsfähigen oder bereits abgestorbenen Mykobakterien ist nicht möglich. Die säurefesten Bakterien stellen sich hier rot dar, andere Bakterien und Mikroorganismen blau, Gewebe hellblau und Erythrozyten rötlich (Mulisch und Welsch, 2015). Entsprechende Bildbeispiele finden sich unter „Histologische Fallbeispiele“ (3.1), das entsprechende, nach Fite modifizierte Färbeprotokoll im Anhang unter Punkt (6.4).

1.4.4.1.2 Auramin-Färbung

Die Auramin-Färbung ist eine Fluoreszenzmethode zum Nachweis säurefester Bakterien im histologischen Schnittpräparat. Fluoreszenz entsteht, wenn die Elektronen eines Moleküls, in diesem Fall eines sogenannten Fluorochroms (i.e. Auramin O), durch die Bestrahlung mit Licht einer definierten Wellenlänge in einen angeregten, instabilen, Zustand gehoben werden. Beim Rückfallen der Elektronen in die ursprüngliche Schale kommt es dann zu einer Emission der absorbierten Energie in Form von Wärme und Licht (Mulisch und Welsch, 2015; Sanderson et al., 2014).

Lichtquellen sind hierbei meist Hochdruckmetалldampflampen wie zum Beispiel Quecksilber und/oder Xenon oder LED Lichtquellen. Das von ihnen ausgesendete Licht hat eine kürzere Wellenlänge, als die vom erregten Fluorochrom ausgesendete Emission, da ein Teil der Energie immer in Form von Wärme verloren geht (Mulisch und Welsch, 2015; Sanderson et al., 2014).

Die Fluorochrome in der Diagnostik der Mykobakterien sind zum einen der Farbstoff Auramin O und zum anderen Rhodamin B. Dabei kann Auramin O auch mit Rhodamin B kombiniert werden (Mulisch und Welsch, 2015). Auramin O hat ein Absorptionsmaxi-

mum von 460 nm und ein Emissionsmaximum von 550 nm (Mulisch und Welsch, 2015). Rhodamin B hat ein Absorptionsmaximum bei 550 nm und ein Emissionmaximum von 580 nm. Je nach Wellenlänge der anregenden Lichtquelle zeigt sich ein Farbspektrum von grün bis rot (Bancroft und Gamble, 2008).

Wichtig ist, dass die Beurteilung der Schnitte innerhalb von 24 Stunden erfolgt, da die Fluoreszenz schwächer wird und schließlich gänzlich verloren gehen kann (Mulisch und Welsch, 2015). Entsprechende Bildbeispiele siehe „Histologische Fallbeispiele“ (3.1), das Färbeprotokoll befindet sich im Anhang unter Punkt (6.5).

1.4.4.2 Molekularpathologische Nachweismethoden

Die Nukleinsäure-Amplifikations-Technik ist eine neuerlich etablierte, sensible und auch recht spezifische Nachweismethode zur Detektion der Mykobakteriosen. Sie wird sequentiell nach einer histologischen Diagnose durchgeführt. Vom selben Paraffinblock schneidet man 10 µm dicke Schnitte zwecks Gewinnung bakterieller DNA ab. Dabei erfolgt die Untersuchung auf *M. tuberculosis* und NTM durch Amplifikation eines Fragmentes der für *M. tuberculosis* spezifischen Insertionssequenz (IS) 6110 oder einer spezifischen ribosomalen Ribonukleinsäure (rRNA)-Region für verschiedene NTM mit anschließendem Spezifitätsnachweis durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR).

Eine Insertionssequenz ist ein kurzes, bewegliches DNA-Stück mit sich gegenläufig wiederholenden Endsequenzen (sog. inverted repeats), welche spezifisch für verschiedene Bakterienfamilien sind. Primär entdeckt wurden sie Mitte der 1960er Jahre in Studien, die sich mit der Gen-Expression von *Escherichia coli* beschäftigten (Chandler, 2002). Über die weitere Sequenzierung von verschiedenen bakteriellen Genomen wurden dabei Insertionssequenzen eruiert, durch die Bakterien phylogenetisch verschiedenen Familien zugeordnet werden können. Dabei gehört die für *M. tuberculosis* spezifische IS6110 zur Kategorie der IS3, in der Mykobakterien-spezifische Insertionssequenzen zusammengefasst sind (Mahillon und Chandler, 1998). IS6110 ist eine 1361 bp lange Sequenz, in der verschiedene Regionen als Zielorte zur Identifikation von *M. tuberculosis* verwendet werden können (Sankar et al., 2011). Der sogenannte DNA-

Fingerabdruck des *M. tuberculosis* kann schließlich durch einen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) analysiert werden (Roychowdhury et al., 2015).

Ein Problem hierbei ist, dass verschiedenen *M. tuberculosis* Stämme unterschiedlich viele Kopien dieser IS besitzen, sodass bei niedriger Kopienzahl der NAT Nachweis von *M. tuberculosis* nicht gelingt (Huyen et al., 2013 und Steensels et al., 2013, zitiert in Roychowdhury et al., 2015).

Für NTM werden 16 Svedberg (S) rRNA Elemente zur Identifikation der verschiedenen Bakterienarten verwendet. Die Größe prokaryotischer rRNA wird nach ihrem Sedimentationsverhalten in Svedberg eingeteilt. Die 16S rRNA ist hierbei ein Teil der kleineren Untereinheit der prokaryotischen Ribosomen. Sie kann zur Identifikation verschiedener NTM herangezogen werden, deren spezifische 16S rRNA Sequenzen in einer allgemeinen Datenbank gespeichert sind und gegen welche man die identifizierten Sequenzen vergleichen kann. (Goodfellow und Zomerdijs, 2013). Im Falle dieser Studie wurde als Referenzdatenbank das „Basic Local Alignment Search Tool“ des National Center for Biotechnology Information (NCBI) verwendet.

Die genauere Beschreibung der Methodik der in dieser Studie angewandten molekularpathologischen Nachweisverfahren findet sich unter „Material und Methoden – Molekularpathologie“ (2.3), das genaue Ablauf-Protokoll im Anhang (6.6).

Liegt das typische Bild einer verkäsenden granulomatösen Entzündung am Gewebe vor, kann mit Hilfe der NAT ein schneller Nachweis von Mykobakterien gelingen. Dies ist besonders bei stark gefährdeten Patienten (AIDS, Kleinkinder) und schwerwiegenden Erkrankungen (v.a. generalisierte Erkrankung oder tuberkulöse Meningitis) von Vorteil. Allerdings sind NAT nicht zur Therapiekontrolle geeignet, da sowohl DNA von toten oder nicht mehr vermehrungsfähigen Bakterien, als auch aktiven Bakterien, detektiert werden kann (Loddenkemper et al., 2017; Robert Koch Institut (RKI), 2013).

Die überwiegende Mehrheit der Studien, die molekularpathologische Methoden zur Detektion von Mykobakteriosen auswerten, befasst sich mit der Auswertung von Sputumproben. Nur wenige Studien betreffen Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Gewebeproben. In einer Studie die 110 Gewebeproben aus dem Jahre 2014 auswertete, lag

die Sensitivität einer nested-PCR bei 87,5 % bei einer Spezifität von 100 % (Seo et al., 2014).

In Bezug auf Sputumproben gibt es sogar mehrere Metaanalysen. Ein neueres Review aus dem Jahre 2017 (Li et al., 2017; Li et al., 2000) wertete 106 sputumbasierte Studien aus. Als Referenzstandard galt dabei die mikrobiologische Kultur. Beschrieben wurde hier eine Sensitivität der NAT mit 82 - 88 % bei einer Spezifität von ca. 98 %. Es lässt sich also folgern, dass NAT in Bezug auf Sputum- und Gewebeproben ähnliche Sensitivitäten und Spezifitäten erzielen.

Eine Diagnostik ausschließlich mit Hilfe der NAT sollte nicht erfolgen, besonders in Anbetracht der Tatsache, dass die Sensitivität der NAT bei mikroskopisch negativ ausgewerteten Sputumproben noch niedriger ausfällt als bei positiven Sputumproben. In Bezug auf Gewebeproben, gibt es hierzu noch keine genaueren Studien. Es sollte in jedem Fall zusätzlich eine kulturelle Anzucht durchgeführt werden, insbesondere auch um den Erreger für eine Empfindlichkeitsprüfung zu isolieren (Robert Koch Institut (RKI), 2013).

1.5 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Die überwiegende Mehrheit der Fachliteratur befasst sich mit der Auswertung der mikrobiologischen, aber nicht der histopathologischen Diagnostik der Mykobakteriosen. Dabei haben bereits viele Studien die Vor- und Nachteile der verschiedenen Nachweismethoden wie der Ziehl-Neelsen-Färbung, der Auramin-Färbung, der Kultur und verschiedener molekularpathologischer Methoden erörtert. Nach ausführlicher Recherche in der Datenbank PubMed gab es jedoch bis zum Abschluss dieser Dissertationsschrift (Ende 2017) noch keine, diese Größenordnung betreffende, histopathologische Vergleichsstudie zur Sensitivität und Spezifität der histochemischen (i.e. Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung) und molekularpathologischen (NAT-basierten) Methoden am Formalinfixierten, Paraffin-eingebetteten menschlichen Untersuchungsmaterial. Diese Lücke soll durch die hier vorliegende Studie geschlossen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Patientengut

Bei der vorliegenden Dissertation handelt es sich um eine retrospektive Studie mit einem Patientenkollektiv von insgesamt 1234 Patienten, deren Gewebeproben in den Jahren 2000 - 2017 am Institut für Pathologie des Uniklinikum Bonns (UKB) untersucht wurden und histomorphologisch aufgrund einer epitheloidzellig-granulomatösen Entzündung der Verdacht auf eine mykobakterielle Infektion geäußert wurde.

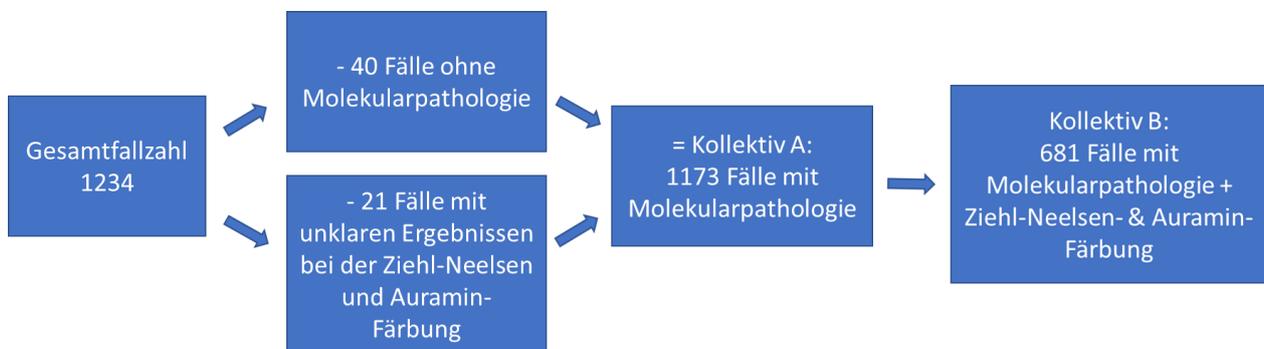


Abb. 5 Patientenkollektiv

Bei 40 dieser 1234 Fälle wurde keine molekularpathologische Untersuchung durchgeführt, sodass diese aus der Auswertung herausgenommen wurden. Zu weiteren 21 Fällen wurde histologisch keine eindeutige diagnostische Entscheidung anhand der Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung getroffen, diese wurden ebenfalls nicht berücksichtigt. Zur Auswertung für diese vorliegende Studie kommen somit nach Abzug der oben beschriebenen Fälle insgesamt 1173 Fälle zur Auswertung (Abb. 5).

Bei 681 der 1173 Fälle wurde eine vollständige histomorphologische (Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung) und molekularpathologische Untersuchung durchgeführt. Sie bilden die Grundlage der nachfolgenden Auswertungen. Bei den restlichen 492 Fällen, ließen sich retrospektiv keine histochemischen Untersuchungen mehr durchführen, da die zumeist konsilmäßig eingesandten auswärtigen Blöcke nicht mehr zur Verfügung standen.

Referenzstandard in dieser Studie sind die molekularpathologischen Ergebnisse, folglich finden sich unter der Annahme, dass die Nukleinsäure-Amplifikationstechniken immer richtig liegen, keine falsch positiven Fälle. Es wurden lediglich molekularpathologisch negative Fälle durch Hinzunahme der mikrobiologischen Kultur als falsch negativ demaskiert.

2.2 Histologische Diagnostik

Das eingeschickte Gewebe wurde primär in 4% gepuffertem Formalin fixiert und je nach Größe in Blöcke von maximal 25 x 30 mm zugeschnitten und durch weitere Prozessierungen in Paraffin eingeblockt. Anschließend wurden die Paraffinblöcke mit einem Schlittenmikrotom 1400 der Firma Leitz für die HE-Färbung in Schnitte von 3 µm Dicke geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht.

2.2.1 HE-Färbung

Zunächst erfolgte die Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Hämatoxylin ist ein Naturfarbstoff, der durch Ätherextraktion aus dem zerkleinerten roten Kernholz des in Mittelamerika heimischen Campechebaumes (Blauholz, *Haematoxylon campechianum*) gewonnen wird. Dabei ist der Farbstoff nicht das Hämatoxylin selbst, sondern sein Oxidationsprodukt das Hämatein. Eosin gehört zu den Cytoplasmafarbstoffen, es färbt das Cytoplasma rosa. Zeigt sich in dieser Färbung der histologische Verdacht auf eine Mykobakteriose, wird eine histochemische Diagnostik mittels Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung angeschlossen. Das in unserem Institut verwendete Protokoll befindet sich im Anhang unter Punkt (6.3).

2.2.2 Histochemische Diagnostik

2.2.2.1 Ziehl-Neelsen nach Fite und Auramin-Färbung

Die Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbungen erfolgten im Universitätsklinikum Bonn (UKB) nach standardisierten Protokollen (s. Anhang 6.4 und 6.5). Dabei erfolgte die

Ziehl-Neelsen-Färbung nach einer Modifikation nach Fite. In der vorliegenden Arbeit wird zur Vereinfachung die Bezeichnung „Ziehl-Neelsen-Färbung“ anstelle von „Ziehl-Neelsen-Färbung modifiziert nach Fite“ verwendet. Der zeitliche Aufwand für die Ziehl-Neelsen-Färbung betrug ca. 60 Minuten und für die Auramin-Färbung ca. 30 Minuten. Zu jeder Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung wurde jeweils eine positive Kontrolle mitgefärbt, um die Qualität der Färbung zu überprüfen. Hierzu wurde ein Schnitt aus einem nachweislich positiven Tuberkulose-Fall mit einer hohen Mykobakterienanzahl zusätzlich zum neuen prospektiven Fall mitgefärbt.

Die Auswertung der Auramin-Färbung erfolgte durch ein Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica (Geräte Typ: DM-R-HC; Serien-Nr.221410). Der zeitliche Aufwand für die Begutachtung der Färbungen ist variabel und vom jeweiligen Erfahrungsgrad des Mikroskopierenden abhängig, jedoch ließ sich feststellen, dass die Auswertung der Auramin-Färbung in der Regel wesentlich kürzer dauerte, als die der Ziehl-Neelsen-Färbung.

Für die fluoreszenzmikroskopischen Auswertungen kamen folgende Filter zur Anwendung: Filter N2.1 (Leica-Nr. 513812) für das grüne Fluoreszenzlicht und Filter H3 (Leica-Nr. 513807) für das violette Fluoreszenzlicht. Genauere Erläuterungen zu den verwendeten Filtern finden sich im Anhang unter Punkt (6.2).

2.3 Molekularpathologische Diagnostik

Der molekularpathologische Nachweis von Mykobakterien erfolgte im UKB ebenfalls nach standardisierten Protokollen. Die Durchführung der Molekularpathologie wurde von der Abteilung für molekularpathologische Diagnostik am Institut für Pathologie der Universitätsklinik Bonn übernommen. Der Zeitaufwand belief sich hierbei auf ca. 3 Tage. Die Protokolle für die hier verwendeten NAT befinden sich im Anhang unter Punkt (6.6).

2.3.1 DNA-Extraktion

Für die molekularpathologische Untersuchung wurden 10 µm dicke Schnitte vom Paraffinblock mit dem histologisch verdächtigen Gewebe zwecks DNA-Extraktion gewonnen. Die Schnitte wurden entparaffiniert, rehydriert und anschließend über Nacht verdaut. Ein

alleiniger Proteinase K-Verdau ist für die Extraktion der DNA aus grampositiven Bakterien, zu denen die Mykobakterien gehören, nicht ausreichend. Daher kamen hier weitere Aufschlussmethoden zum Einsatz. Der weitere Aufschluss wurde entweder enzymatisch mittels Lysozym-Verdau, thermisch mittels Hitze-Kälte-Schock oder mechanisch mittels spezieller „Schredder“-Tubes, welche Kügelchen enthalten und in einer Rüttelzentrifuge genutzt wurden, durchgeführt.

Die Extraktion und Aufreinigung der DNA aus dem Ansatz erfolgte entweder händisch mittels dem „QIAamp DNA Mini Kit“ (Firma (Fa.) Qiagen) oder automatisiert mittels „M48“ und „MagAttract DNA Mini M48 Kit“ (Fa. Qiagen) und „Maxwell RSC“ und „Maxwell RSC DNA FFPE Kit“ (Fa. Promega) jeweils nach Angaben der Hersteller.

2.3.2 DNA-Extraktionsüberprüfung

Zur Qualitätskontrolle der extrahierten DNA wurde diese auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die Verteilung des DNA-Schmiers auf dem Agarosegel zeigt die Degradation der DNA. Zudem wurden die Konzentration und Reinheit der DNA-Proben mittels „Quantus“ (Fa. Promega) und „NanoQuant am M200Pro“ (Fa. Tecan) gemessen. Um sicherzustellen, dass die extrahierte DNA amplifizierbar ist, wurde eine Qualitäts-PCR durchgeführt. Hierbei wurde ein Produkt mit 265bp Länge generiert. Dies gab die Sicherheit, dass die Probe amplifizierbare DNA zur Generierung entsprechend großer DNA-Fragmente enthielt und minimierte so das Risiko für falsch negative Ergebnisse.

2.3.3 Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* mittels ELISA

Zum Nachweis von TB-DNA wurde eine konventionelle Endpunkt-PCR durchgeführt und das Endprodukt zur Steigerung der Sensitivität in einen PCR-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) eingesetzt. Die Endpunkt-PCR wurde nach einem Homebrew-Protokoll mit Primern der Insertionssequenz IS6110 durchgeführt.

Das PCR-Produkt wurde zur Überprüfung der PCR auf der Kapillarelektrophorese „Qiaxcel“ (Fa. Qiagen) oder einem 2 %igen Agarosegel dargestellt. Stellten sich die

Kontrollen richtig dar (Wasser-Kontrolle negativ und Positivkontrolle mit einem 123bp langen Fragment), wurden alle Proben mit dem „PCR-ELISA (DIG Detection) 5-Pack“ (Fa. Roche) aufgearbeitet. Die hierfür verwendete Sonde liegt innerhalb des amplifizierten Bereichs der Insertionssequenz IS6110. Bei Anwesenheit eines PCR-Produktes kam es zur Bindung mit der Sonde und in den Folgeschritten des Versuchs zum farblichen Umsatz eines zugegebenen Substrates, welches den visuellen Nachweis von TB-DNA darstellt. Zum Abschluss wurde das Ergebnis in einem Photometer bei 405 nm gemessen. Lag der Messwert einer Probe über dem 4fachen Messwert der Wasserkontrolle, wurde diese Probe als positiv bewertet.

2.3.4 Nachweis von nichttuberkulösen Mykobakterien mittels Sequenzierung

Zum Nachweis von NTM wurde eine nested Endpunkt-PCR durchgeführt und das Endprodukt zur Typisierung sequenziert. Die Endpunkt-PCR wurde nach einem Homebrew-Protokoll durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde zur Überprüfung der PCR auf der Kapillarelektrophorese „Qiaxcel“ (Fa. Qiagen) oder einem 2 %igen Agarosegel dargestellt. Stellten sich die Kontrollen richtig dar (Wasser-Kontrolle negativ und Positivkontrolle mit einem 294 bp langen Fragment), wurden alle Proben aufgereinigt und in eine Sequenzier-PCR gegeben. Durch die Sequenzier-PCR wurden die Proben für die Sanger-Sequenzierung vorbereitet, indem Strangabbrüche mit den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen an jedem Strangende eingefügt wurden. Diese PCR-Produkte wurden erneut aufgereinigt und dann mit dem „ABI 3130“ (Fa. Thermo Fisher) aufgetrennt. Die so gewonnenen Sequenzen wurden mittels der Datenbank „Basic Local Alignment Search Tool“ (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) gegen die Referenzsequenzen der NTM verglichen. Positive Proben zeigten hier eine Übereinstimmung von 100 % mit einem in der Datenbank aufgeführten NTM.

2.3.5 Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* und nichttuberkulösen Mykobakterien mittels CHIP

Ab dem Jahre 2009 erfolgte die Umstellung der NAT auf das „Myco Direct 1.7“ Kit (Fa. Chipron). Von jeder zu untersuchenden Probe wurden zwei Endpunkt-PCRs durchge-

führt. Mix A enthielt Primer, die gegen hoch konservierte Bereiche der 16S rRNA gerichtet waren, und Mix B enthielt Primer, die gegen die Insertionssequenz IS6110 gerichtet waren. Das PCR-Produkt wurde zur Überprüfung der PCR auf der Kapillarelektrophorese „Qiaxcel“ (Fa. Qiagen) oder einem 2 %igen Agarosegel dargestellt. Stellten sich die Kontrollen richtig dar (Wasser-Kontrolle negativ und Positivkontrolle mit einem 127bp oder 200-300 bp langen Fragment), wurden alle Proben nach Anleitung der Firma Chipron auf den im Kit enthaltenen CHIP hybridisiert. Auf dem CHIP sind spezifische Sonden der zu untersuchenden Mykobakterien gebunden, die bei vorhandenem PCR-Produkt in den Folgeschritten des Versuchs zum farblichen Umsatz eines zugegebenen Substrats führten, welches sich als blauer Punkt auf dem CHIP niederschlug. Die Auswertung erfolgte durch Einlesen der CHiPs mit dem CHIP-Scanner „PF7250“ (Fa. Digital ICE technology) und Analyse mittels der „SlideReader V12“ Software, welche mit dem Kit mitgeliefert wurde.

2.4 Datenerfassung

Als Datenquellen wurden hauptsächlich die Befundungssoftware „Patho Pro“ der Version 8.0.9069 des „lfms“ (Institut für medizinische Software, Saarbrücken, Deutschland) herangezogen, ergänzt durch die Krankenhaus-Informationssysteme „Orbis“ der Firma Agfa Healthcare. Die mikrobiologischen Daten wurden zum einen aus Befunden der Software Orbis und zum anderen auch direkt vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie des UKB in Form einer tabellarischen Datenbereitstellung durch Herrn Dr. Molitor ergänzt.

Die Daten wurden tabellarisch in einer Microsoft-Excel-Datei zusammengetragen. Diese umfasste unter anderem folgende Spalten: E-Nummer und Jahr der Untersuchung der Software PathoPro, das Geburtsdatum, das Alter, das Geschlecht, das vermutete Herkunftsland der Patienten, die mikrobiologischen Ergebnisse, die Organbezeichnung, den histologischen Befund der HE-Färbung, die Größe der Probe in mm², den Einsender, die Beurteilung der Ziehl-Neelsen- und Auramin Färbung des Primär- und Sekundärbefunders, die molekularpathologischen Ergebnisse und teilweise klinische Informationen in einer ergänzenden Spalte.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte nach McNemar- und Chi-Quadrat-Test und wurde mit dem IBM SPSS-Statistics Programm (Version 24.0) für Windows durchgeführt. Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse in Form von Balkendiagrammen, Histogrammen und Kreisdiagrammen wurden sämtlich mit SPSS und Microsoft Word (Version 2016) erstellt. Es wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ ($p\text{-Wert} \leq 0,05$) festgelegt. Zudem wurden deskriptive statistische Methoden angewandt.

2.5.1 Definitionen

Primärbefunder (P)

In der folgenden Auswertung steht die Bezeichnung P für den Primärbefunder. Damit ist der Assistenzarzt, Facharzt oder Oberarzt gemeint, der die Befunde zuerst gesehen und in das Programm PathoPro eingetragen hat.

Sekundärbefunder (S)

Die Sekundärbefundung wurde sämtlich durch Prof. Dr. Hui Zhou durchgeführt. Sie bezeichnet eine Zweitmeinung zur Primärbefundung. Ziel ist es, die Diagnostik eines erfahrenen Pathologen, der langjährig mit dem Fluoreszenzmikroskop gearbeitet hat, mit der Befundung durch die anderen Fachpathologen, gemischt aus Assistenz-, Fach- und Oberärzten, zu vergleichen.

Kollektiv A (n = 1173)

Das Kollektiv A umfasst die 1173 Fälle mit konventionell-histologischem Verdacht auf eine Mykobakteriose, zu denen molekularpathologische Ergebnisse vorliegen. Der histologische Verdacht umfasst eine nicht-epitheloidzellige Entzündung, eine epitheloidzellig-granulomatöse Entzündung ohne Nekrosen und eine epitheloidzellige-granulomatöse Entzündung mit Nekrosen. Die Ziehl-Neelsen und Auramin-Färbungen des Primär- und Sekundärbefunders sind hier nicht immer vollständig vorhanden.

Kollektiv B (n = 681)

Das Kollektiv B umfasst 681 molekularpathologisch untersuchte Fälle aus dem Kollektiv A, in denen vollständige Ergebnisse zur Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung entweder des Primärbefunders oder des Sekundärbefunders vorlagen.

Kollektiv C (n = 150)

Das Kollektiv C steht für das Unterkollektiv aus dem Kollektiv A, welches Kinder- und Jugendliche mit einer Altersspanne von 0-20 Jahren umfasst.

Referenz-Standard für die vorliegende Studie:

Es wurde festgelegt, die molekularpathologischen Ergebnisse als Referenzstandard zu nehmen und die jeweiligen Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbungen des Primär- und Sekundärbefunders vergleichend dagegen auszuwerten.

Molekularpathologische Ergebnisse

Die molekularpathologischen Ergebnisse wurden wie folgt kodiert:

1. negativ = es liegt keine Mykobakteriose vor
2. positiv = es liegt eine Tuberkulose oder atypische Mykobakteriose vor
3. TB = positiv, d.h. es liegt eine Tuberkulose vor
4. NTM = positiv, d.h. es liegt eine atypische Mykobakteriose vor

HE-Diagnosen

1. keine Färbung vorhanden, d.h. es wurde keine HE-Färbung angefertigt
2. nicht epitheloidzellige Entzündung
3. epitheloidzellig-granulomatöse Entzündung ohne Nekrosen
4. epitheloidzellig-granulomatöse Entzündung mit Nekrosen

3. Ergebnisse

3.1 Histologische Fallbeispiele

Die vorliegende Doktorarbeit möchte neben einer statistischen Auswertung der gesammelten Fallzahlen auch histologische Fallbeispiele darstellen. Im Folgenden werden einige ausgewählte Beispiele zur histomorphologischen Darstellung von *Mycobacterium tuberculosis* und verschiedenen atypischen Mykobakterien gezeigt.

3.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Im Folgenden finden sich Bildbeispiele zu folgenden Fallkonstellationen (Tab. 2):

Tab. 2: Übersicht Fallkonstellationen Bildbeispiele

Bakterium	HE	Ziehl-Neelsen-Färbung	Auramin-Färbung	Molekularpathologie
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Epitheloidzellig-granulomatös mit Nekrosen	positiv	positiv	positiv
		negativ	positiv	positiv
	Epitheloidzellig-granulomatös ohne Nekrosen	positiv	positiv	positiv
Atypische Mykobakteriose	Epitheloidzellig-granulomatös mit Nekrosen	negativ	positiv	positiv
	Epitheloidzellig-granulomatös ohne Nekrosen	positiv	positiv	positiv

3.1.1.1 Fallbeispiel 1 – TB bei Endometrium-Karzinom

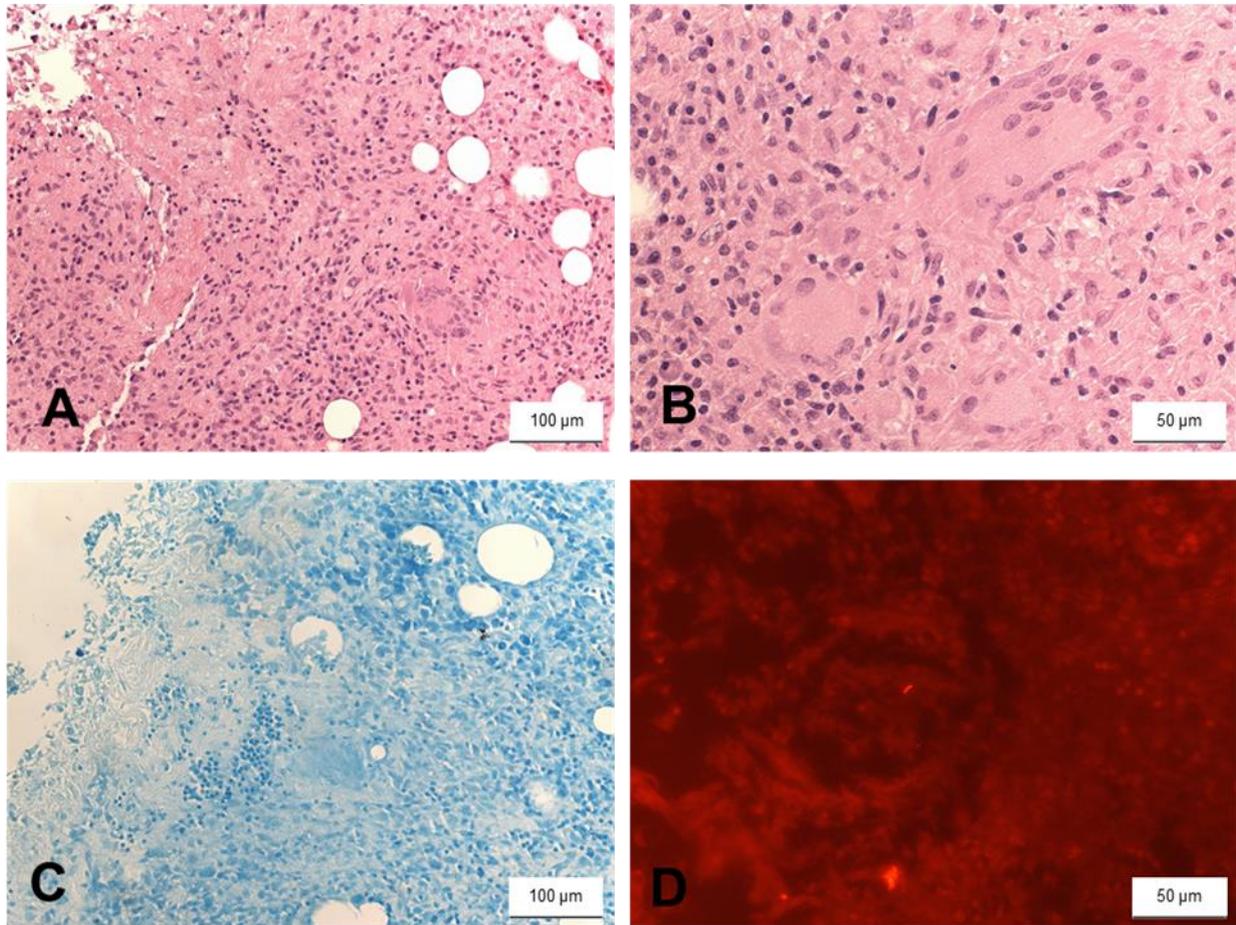


Abb. 6: Fallbeispiel 1 – TB bei Endometrium-Ca.: A&B: HE-Färbung; C: Ziehl-Neelsen-Färbung; D: Auramin-Färbung

Das Fallbeispiel 1 (Abb. 6) zeigt die Gewebeschnitte einer 59-jährigen immunkompromittierten Patientin mit Endometrium-Carcinom und Zustand nach Radiatio. Zu sehen ist lymphozytär durchsetztes Fettbindegewebe mit einer epitheloidzellig granulomatösen und verkäsenden Nekrose, mit mehrkernigen Riesenzellen, die einer Mykobakteriose bzw. Tuberkulose zuzuordnen sind. In der Ziehl-Neelsen-Färbung gelang kein Nachweis säurefester Stäbchen, in der Auramin-Färbung jedoch ein eindeutiger Nachweis vereinzelter fluoreszierender säurefester Stäbchen. In der vergleichenden Molekularpathologie zeigte sich ein positives Ergebnis für *Mycobacterium tuberculosis*.

3.1.1.2 Fallbeispiel 2 – TB bei akuter myeloischer Leukämie (AML)

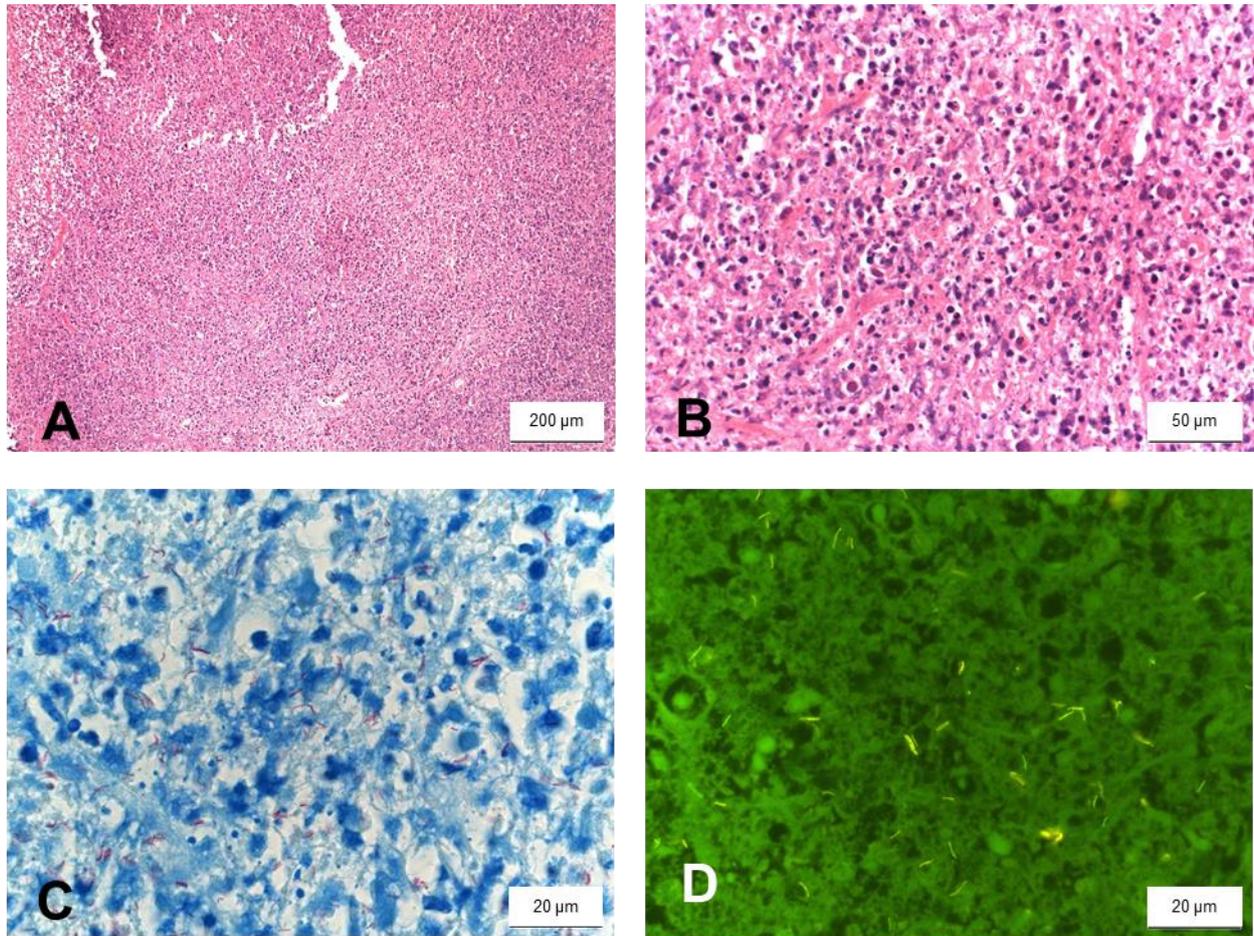


Abb. 7: Fallbeispiel – TB bei AML, Lymphknoten: A&B: HE-Färbung; C: Ziehl-Neelsen-Färbung; D: Auramin-Färbung

Das Fallbeispiel 2 (Abb. 7) zeigt eine Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* bei einem 56-jährigen immunkompromittierten Patienten mit akuter myeloischer Leukämie. Es zeigte sich eine einschmelzende Lymphadenitis colli rechts mit Beteiligung der Glandula submandibularis sowie ein Lymphknoten mit einer ausgedehnten eitrig abszedierenden Entzündungsreaktion. In der Ziehl-Neelsen-Färbung sowie in der Auramin-Färbung fanden sich stäbchenförmige Bakterien. Molekularpathologisch gelang ein positiver Nachweis für *Mycobacterium tuberculosis*.

3.1.1.3 Fallbeispiel 3 – TB des Darmes DD Morbus Crohn

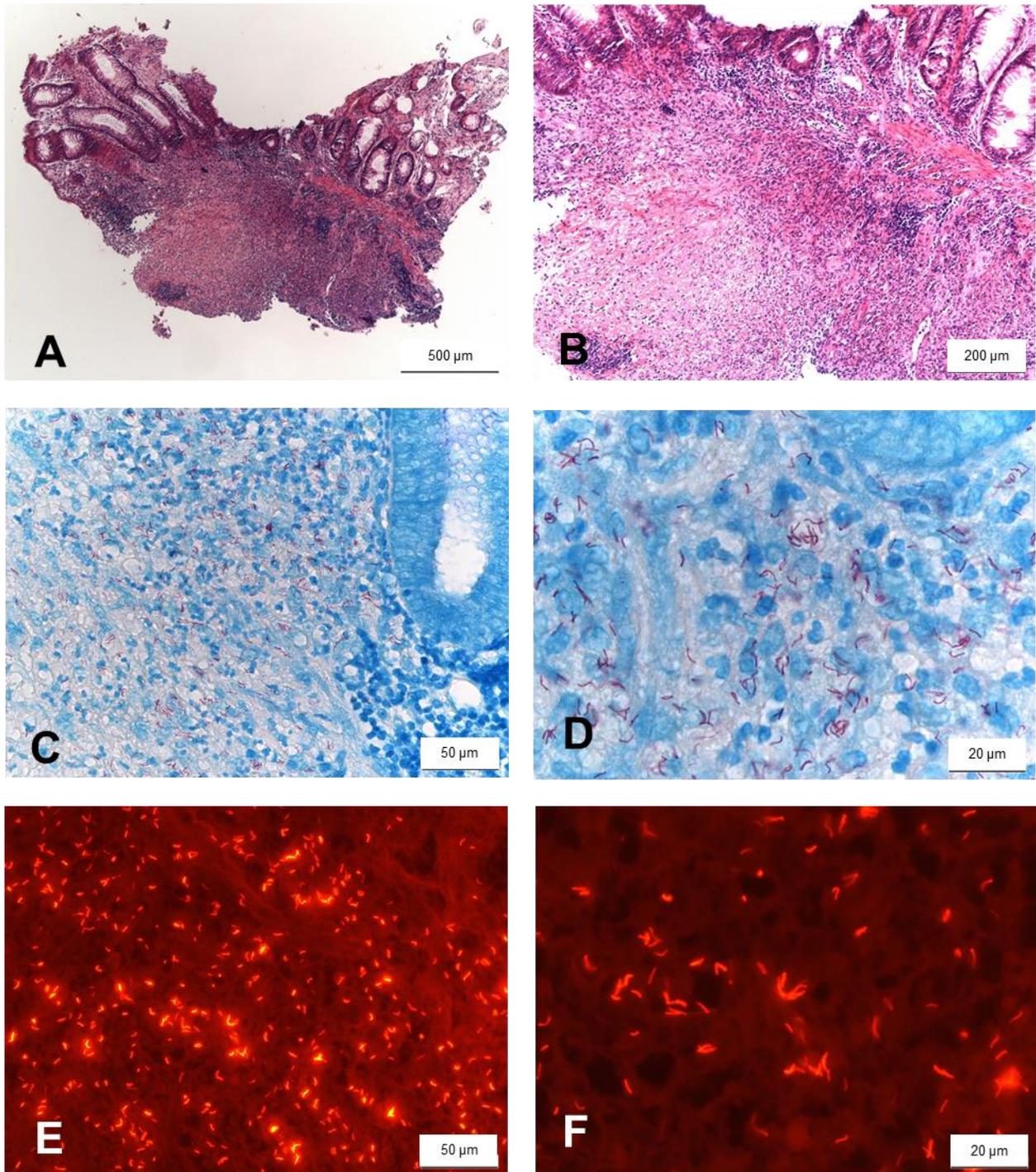


Abb. 8: Fallbeispiel 3 – TB des Darmes DD Morbus Crohn: A&B: HE-Färbung; C&D: Ziehl-Neelsen-Färbung; E&F: Auramin-Färbung

Das Fallbeispiel 3 (Abb. 8) zeigt ein zwar seltenes, jedoch nach wie vor auftretendes Bild einer intestinalen Tuberkulose des Darms. Die Unterscheidung zwischen einem intestinalen Befall mit *Mycobacterium tuberculosis* und Morbus Crohn ist oft nicht einfach, da beide Erkrankungen mit der Bildung von epitheloidzelligen Granulomen einhergehen.

In diesem Fallbeispiel handelte es sich um eine 67-jährige Patientin, bei der im 48. Lebensjahr ein Morbus Crohn erstdiagnostiziert wurde. Aufgrund ihrer Vorgeschichte ging man bei erneutem Auftreten einer Crohn-Symptomatik primär von einem akuten Schub des Morbus Crohn aus und therapierte entsprechend ohne Erfolg. Erst nach einer erneuten Biopsie und anschließender histomorphologischen Untersuchung wurde die Diagnose einer akuten Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* sowohl in der Ziehl-Neelsen- als auch in der Auramin-Färbung gestellt. Diese Diagnose wurde durch die molekularpathologische Untersuchung auch bestätigt.

3.1.1.4 Fallbeispiel 4 – TB der Milz

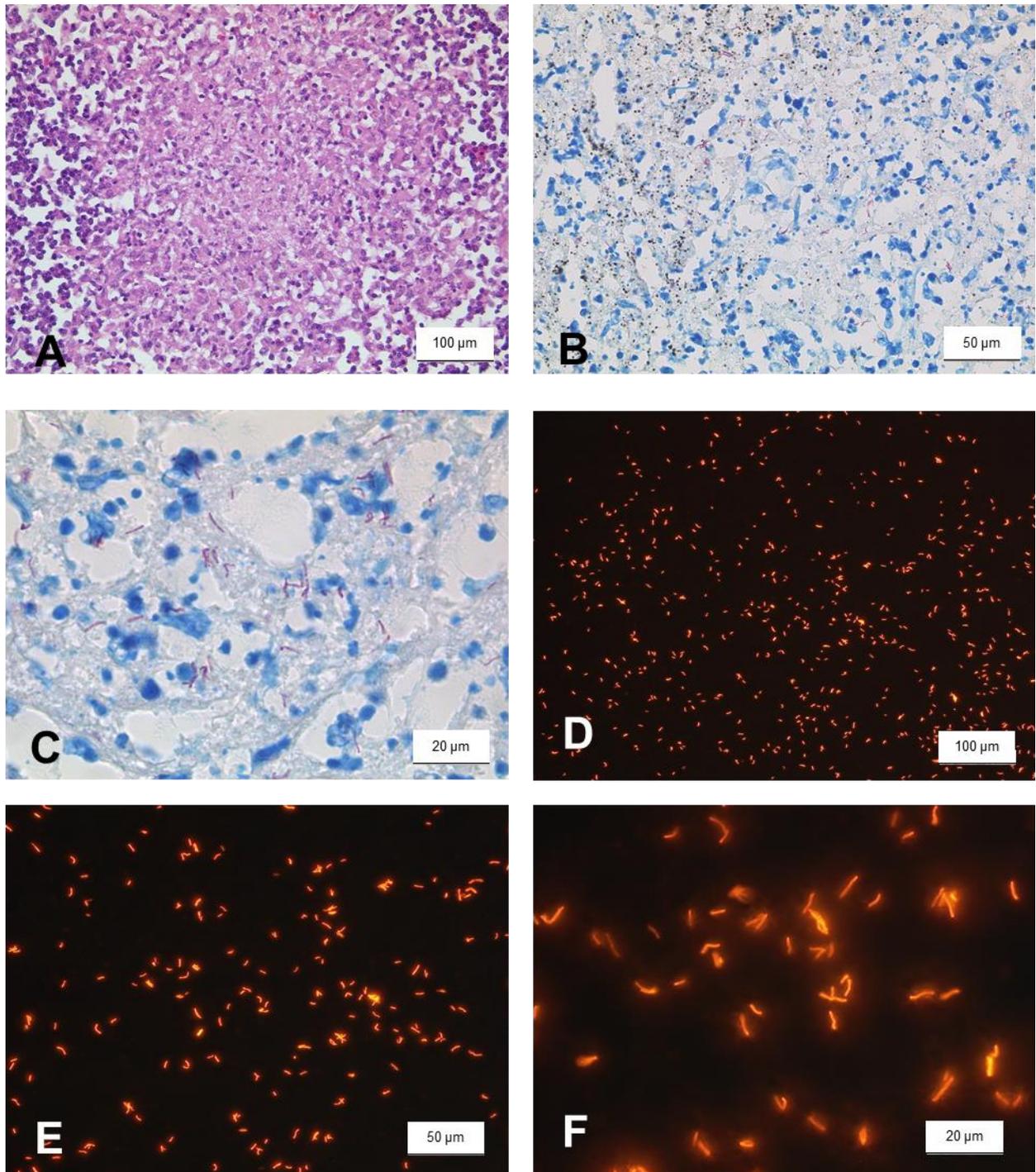


Abb. 9: Fallbeispiel 4 – TB der Milz: A: HE-Färbung; B&C: Ziehl-Neelsen-Färbung; D-F: Auramin-Färbung

Im Fallbeispiel 4 (Abb. 9) handelt es sich um eine 89-jährige Patientin mit der klinischen Symptomatik einer Tuberkulose. Im Schnittpräparat zeigte sich eine granulomatös-nekrotisierende, tuberkulöse Entzündung mit mehrkernigen Riesenzellen. Sowohl in der Ziehl-Neelsen- als auch in der Auramin-Färbung gelang der Nachweis zahlreicher säurefester Stäbchen in den Granulomen. In der Molekularpathologie bestätigte sich eine Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis*.

3.1.2 Atypische Mykobakteriosen

3.1.2.1 Fallbeispiel 5 - *Mycobacterium avium*

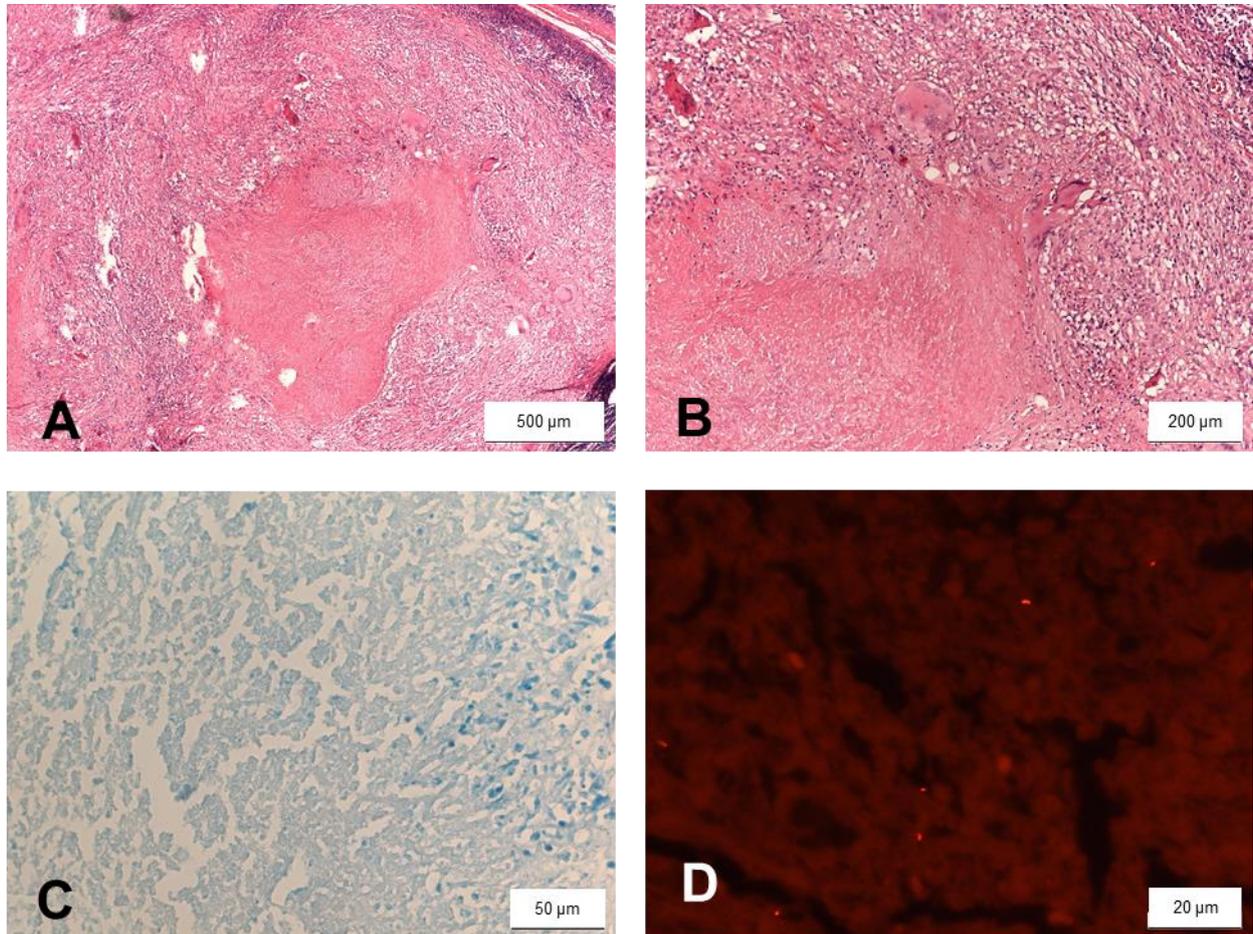


Abb. 10: Fallbeispiel 5 – *Mycobacterium avium*: A&B: HE-Färbung; C: Ziehl-Neelsen-Färbung; D: Auramin-Färbung

Im Fallbeispiel 5 (Abb. 10) zeigte sich eine nekrotisierende granulomatöse Lymphadenitis mit mehrkernigen Riesenzellen bei einem 4-jährigen Patienten. In der Ziehl-Neelsen-Färbung ergab sich kein Hinweis auf säurefeste Stäbchen. In der Auramin-Färbung ließen sich jedoch vereinzelte säurefeste Stäbchen nachweisen. Molekularpathologisch gelang der Nachweis von *Mycobacterium avium*.

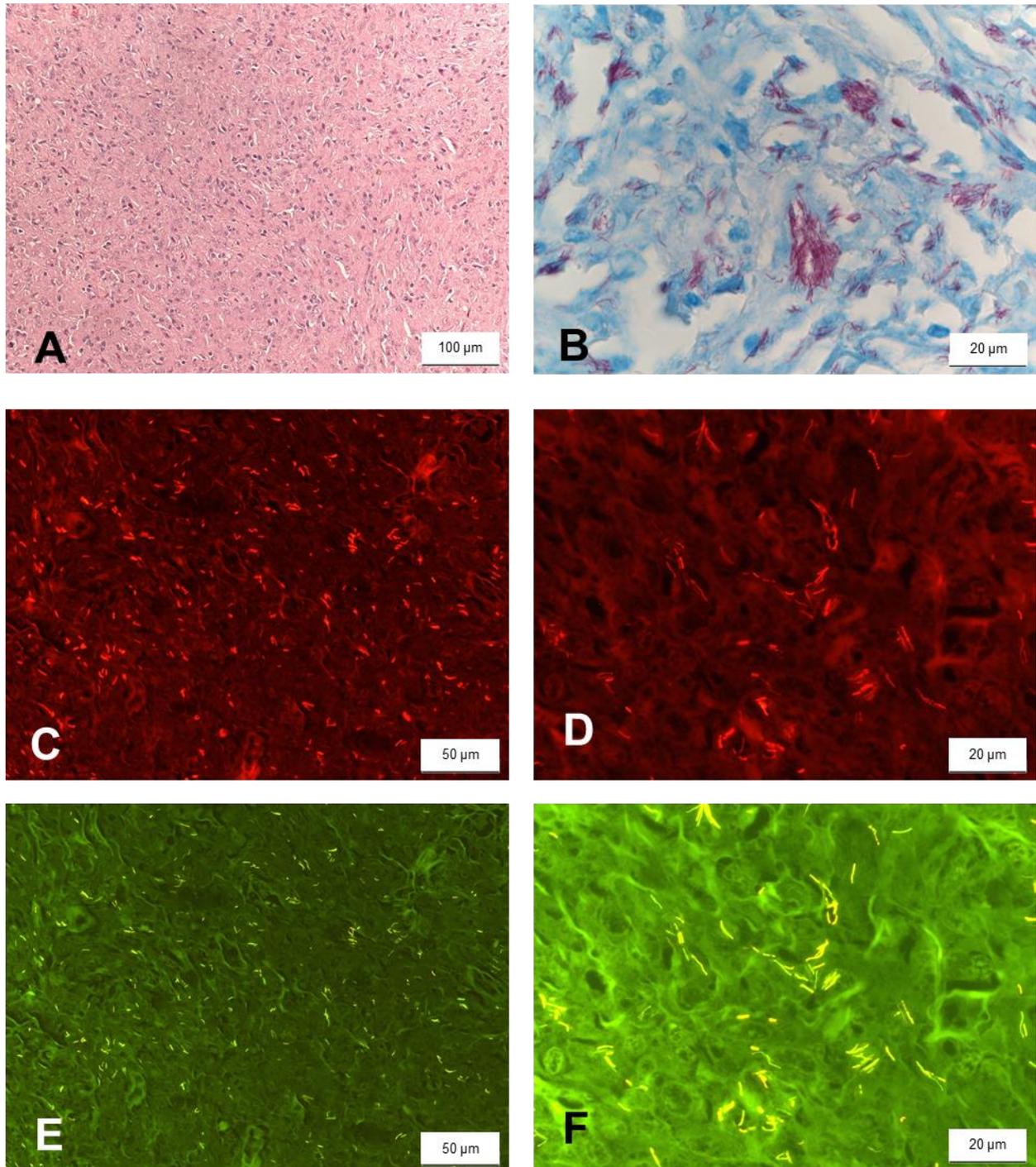
3.1.2.2 Fallbeispiel 6 - *Mycobacterium celatum*

Abb. 11: Fallbeispiel 6 – *Mycobacterium celatum*: A: HE-Färbung; B: Ziehl-Neelsen-Färbung; C-F: Auramin-Färbung

Im Fallbeispiel 6 (Abb. 11) zeigte sich eine mykobakterielle Histiozytose eines Lymphknotens mit Nachweis von atypischen Mykobakterien sowohl in der Ziehl-Neelsen- als auch in der Auramin-Färbung bei einem 51-jährigen immunkompromittierten HIV-

Patienten. Es gelang ein positiver Nachweis von *Mycobacterium celatum* in der Molekularpathologie.

3.2 Nachweis der Beständigkeit der Färbungen

Im Folgenden sieht man alte Schnitte einer Probe von Perikard und mitangeschnittenem Lymphknoten, welche primär am 12.02.2001 bei einem 35-jährigen männlichen Patienten gefärbt wurden. Nach einer Remikroskopierung am 18.03.2018 zeigte sich nachfolgender Befund. Entgegen der allgemeinen Auffassung, dass das Mikroskopieren der Auramin-Färbung aufgrund des Verlustes der Fluoreszenz innerhalb von 24 Stunden erfolgen sollte, da sonst die Fluoreszenz immer schwächer wird (Mulisch und Welsch, 2015), zeigte sich sowohl in der Ziehl-Neelsen-, als auch in der Auramin-Färbung nach wie vor ein positiver Nachweis von säurefesten Stäbchen. Beide Färbungen zeigten eine Beständigkeit von ca. 17 Jahren (Abb. 12).

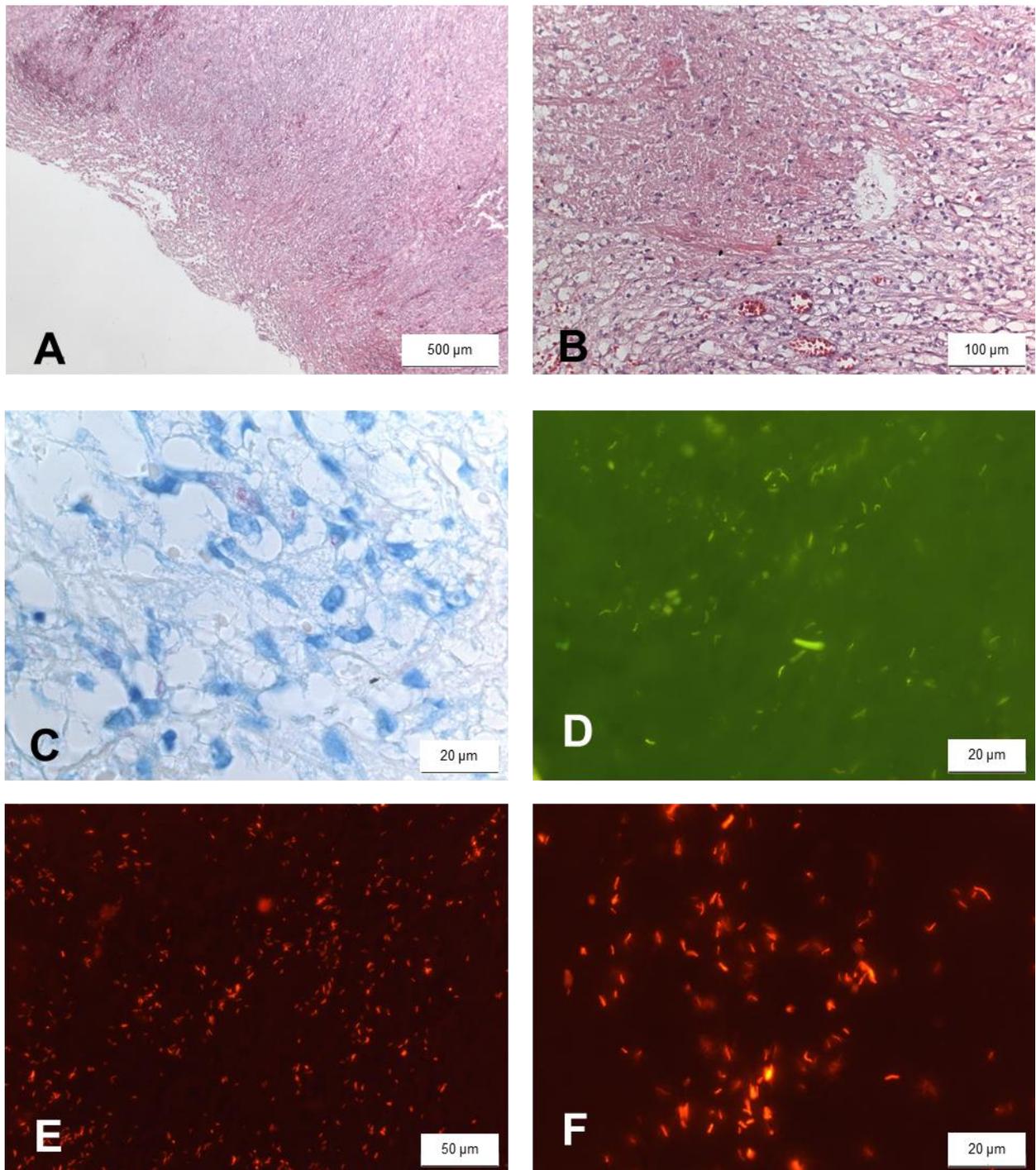


Abb. 12: Nachweis der Beständigkeit der Färbungen: A&B: HE-Färbung; C: Ziehl-Neelsen-Färbung; D-F: Auramin-Färbung

3.3 Statistische Auswertung

Im Zeitraum von Beginn der Datenerfassung im Jahre 2000 bis Ende Juni 2017 wurden insgesamt 1234 Patientenfälle im Institut für Pathologie am UKB auf Mykobakterien untersucht. Die durchschnittliche Fallzahl lag somit bei ca. 68,5 Fällen pro Jahr, wobei das Jahr 2010 mit einem Peak von 230 Fällen deutlich über dem Durchschnitt lag. Dies ist durch eine vermehrte Einsendung konsiliarischen Fremdmaterials begründet. (Abb. 13).

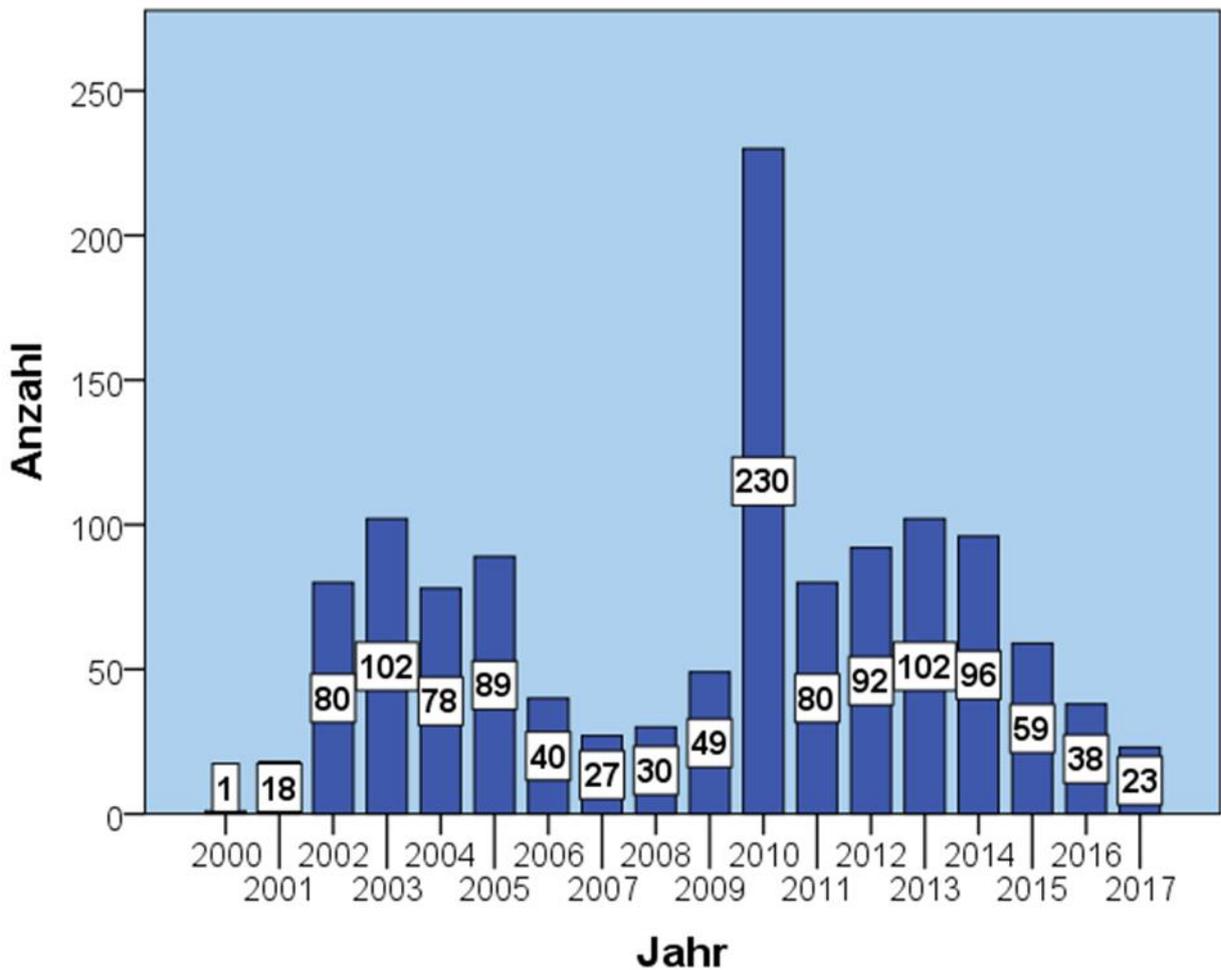


Abb. 13: Fallzahlen von 2000 - 2017 (n = 1234)

3.4 Kollektiv A (n = 1173)

3.4.1 Geschlechterverteilung

Nach Aussortierung der nicht verwertbaren Fälle (s. 2.1 Patientengut) blieb von ursprünglich 1234 Fällen ein Kollektiv von 1173 Fällen übrig. Dieses Kollektiv setzte sich zusammen aus 547 (46,6 %) Männern, 586 (50 %) Frauen und 40 (3,4 %) Personen, deren Geschlecht unbekannt war (Abb. 14).

In der molekularpathologischen Auswertung lagen 70,1 % (822 von 1173 Fällen) negative und 29,9 % (351 von 1173 Fällen) positive Fälle vor. Davon wurden 399 (72,9 %) der Männer negativ und 148 (27,1 %) positiv auf Mykobakterien getestet. Bei den Frauen waren es 404 (68,9 %) negative und 182 (31,1 %) positive Fälle. Die prozentuale Differenz der positiven Fälle betrug somit 4 % (Chi-Quadrat: p-Wert 0,002).

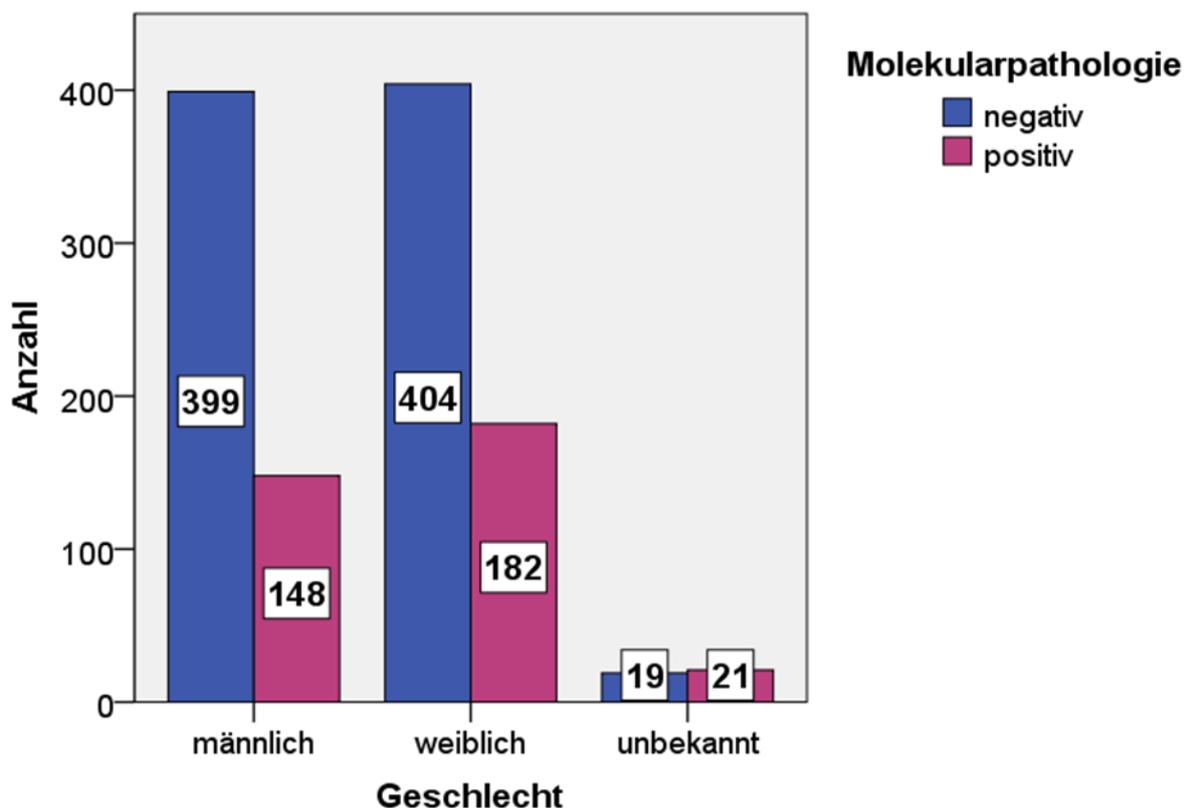


Abb. 14: Molekularpathologische Ergebnisse nach Geschlechterverteilung (n = 1173)

Betrachtet man die molekularpathologischen Ergebnisse genauer und differenziert die positiv getesteten Fälle noch weiter in positiv auf Tuberkulose und positiv auf NTM ge-

testete Fälle, so unterscheiden sich die 148 positiven Fälle bei den Männern in 81,1 % Tuberkulosen (120 von 148 Fällen) und 18,9 % (28 von 148) NTM. Bei den Frauen ist die Verteilung mit 80,2 % (146 von 182 Fällen) Tuberkulosen und 19,8 % (36 von 182 Fällen) NTM fast identisch.

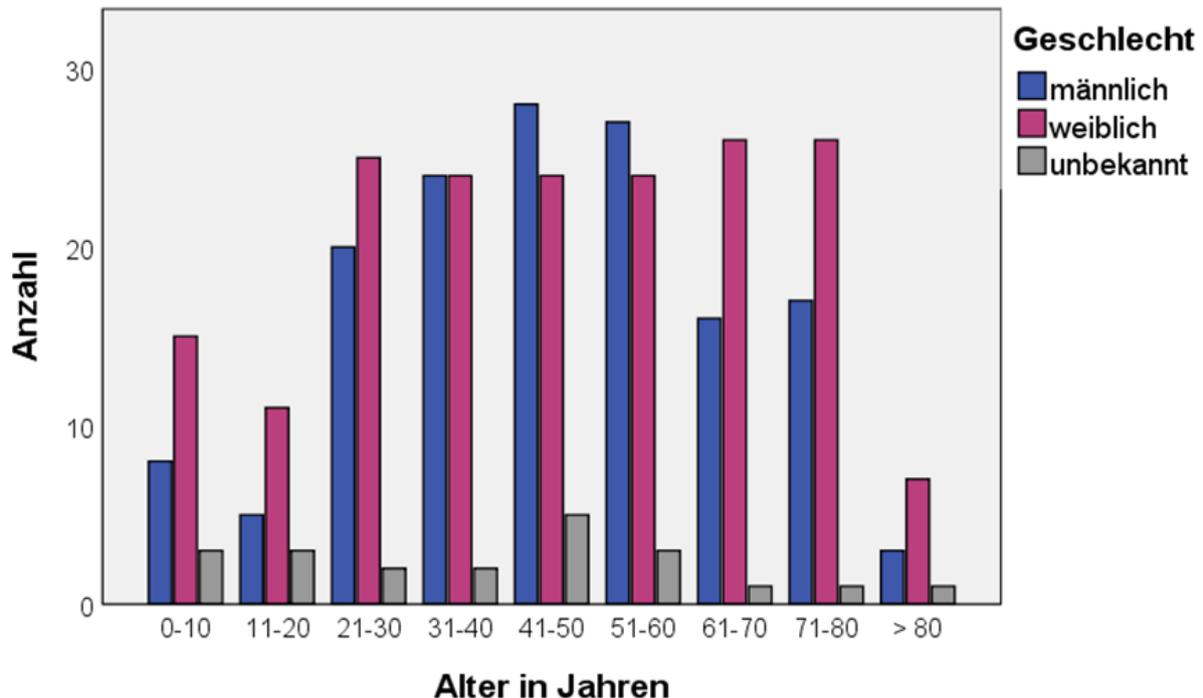


Abb. 15: Geschlechterverteilung nach Altersgruppen; molekularpathologisch positive Fälle (n = 351)

In Bezug auf die molekularpathologisch positiven Fälle (keine Unterscheidung zwischen *M. tuberculosis* und NTM) zeigt sich bei den Männern ein Peak bei den 40-50-Jährigen und bei den Frauen zwischen dem 60.-80.-Lebensjahr. Insgesamt lässt sich feststellen, dass sowohl bei Männern, als auch bei Frauen jünger als 20 Jahre und älter als 80 Jahre die Anzahl der Mykobakteriosen am niedrigsten ist (Abb. 15).

3.4.2 Altersverteilung

Im vorliegenden Kollektiv ($n = 1173$) war der jüngste Patient weniger als ein halbes Jahr alt, der älteste Patient 99 Jahre alt. Der Altersdurchschnitt betrug 46,6 Jahre (Abb. 16). Sowohl bei den Männern, als auch bei den Frauen ließ sich eine ähnliche Verteilungskurve erkennen (Abb. 17).

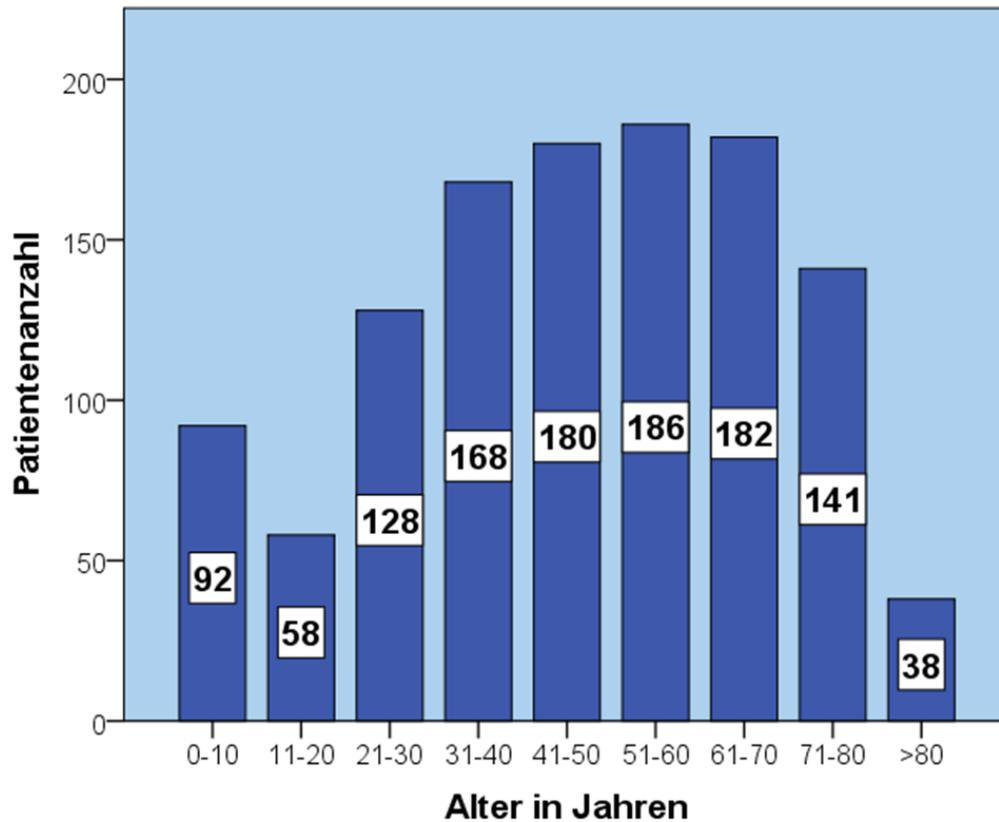


Abb. 16: Altersverteilung ($n = 1173$)

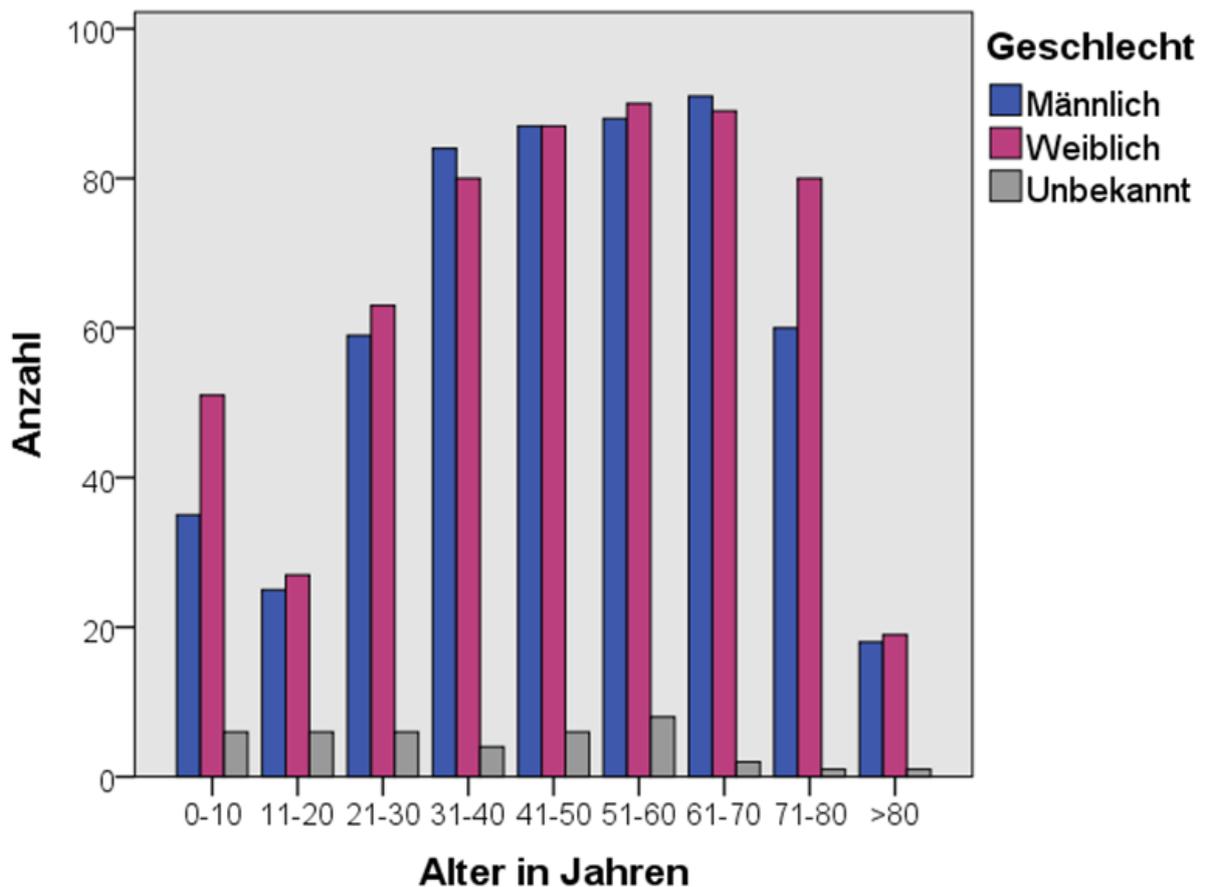


Abb. 17: Geschlechterverteilung nach Alter (n = 1173)

3.4.3 Verteilung und Größe der Gewebeprobe

Die Größen der eingeschickten Proben wurden anhand des mikroskopischen Schnittes in mm² errechnet, um eine Korrelation zwischen Probengröße und Wahrscheinlichkeit einer korrekten molekularpathologischen Diagnose festzustellen. Es zeigte sich eine leichte Tendenz dahingehend, dass mit der Zunahme der Probengröße die Wahrscheinlichkeit für eine richtig positive Diagnose stieg.

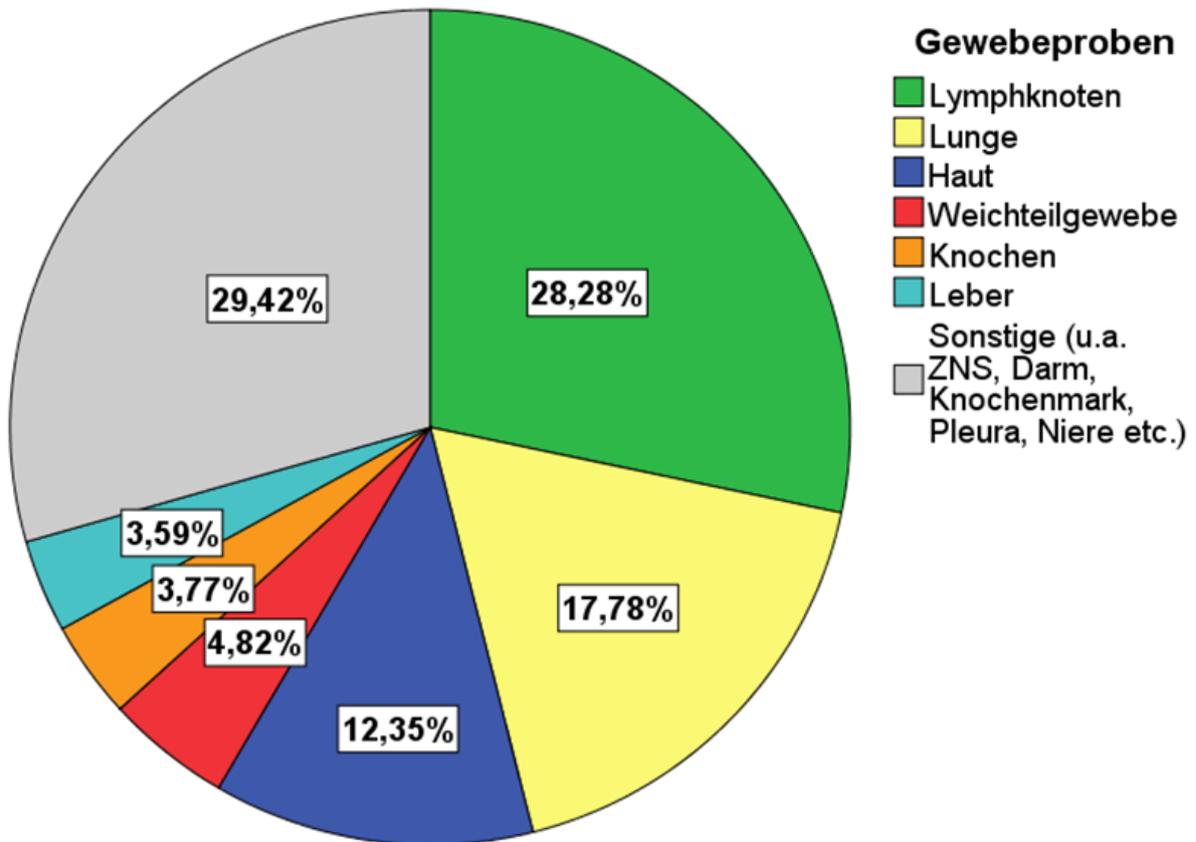


Abb. 18: Organverteilung der Gewebebeob (n = 1173)

Von den zur pathologischen Untersuchung eingeschickten Gewebebeob waren die Lymphknoten mit Abstand am häufigsten betroffen (28,3 %), dicht gefolgt von Biopsien aus der Lunge (17,8 %) und Haut (12,6 %). Mit einem etwas geringeren Anteil waren Weichteilgewebe (4,8 %), Knochen (3,8 %) und Leber (3,6 %) betroffen. Die restlichen Proben waren sehr variabel vertreten, unter anderem wurden Proben des zentralen Nervensystems (ZNS), des Darms, des Knochenmarks, der Pleura, der Niere und noch aus vielen weiteren Geweben eingeschickt (Abb. 18).

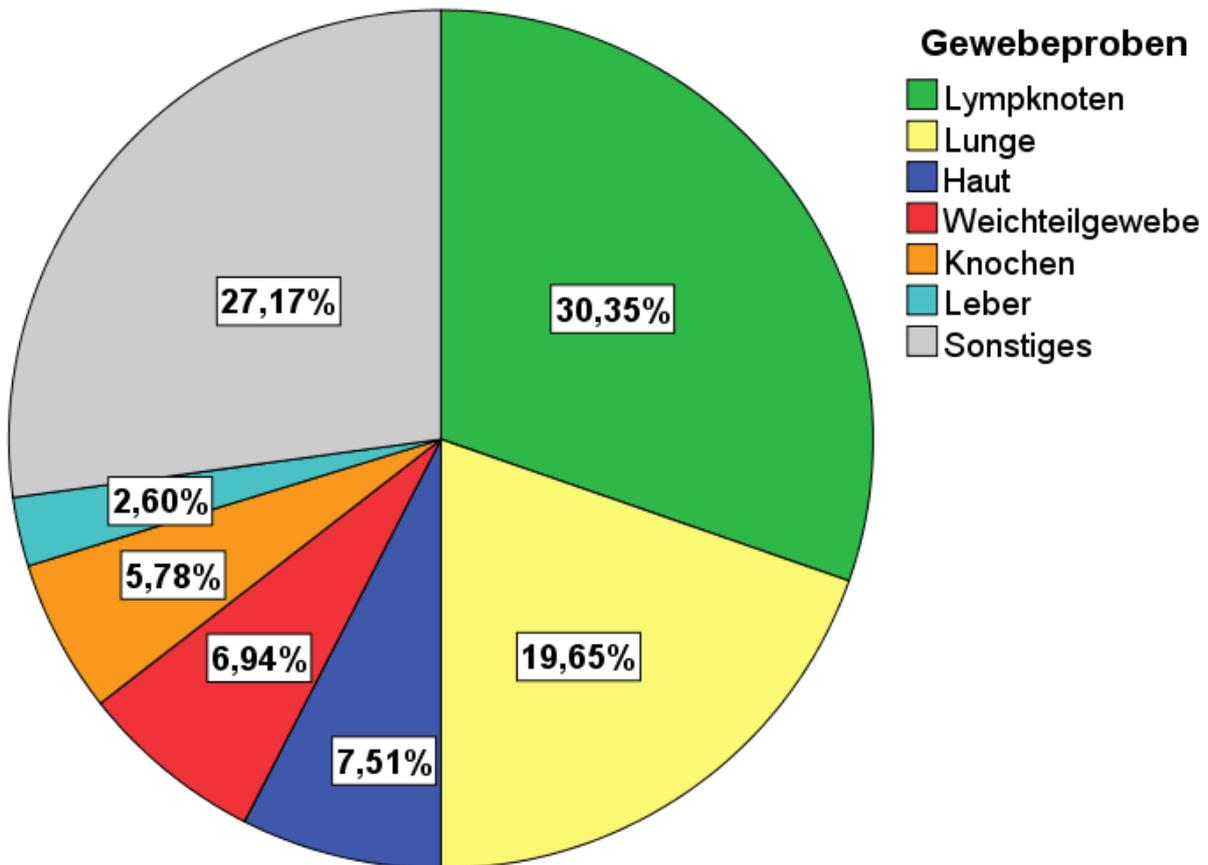


Abb. 19: Organverteilung der Gewebeproben für molekularpathologisch positive Ergebnisse (n = 351)

Die Verteilung der Gewebeproben bei den molekularpathologisch positiven Ergebnissen (n = 351) zeigt, dass fast die Hälfte der Gewebeproben aus Lymphknoten (30,4 %), dicht gefolgt von Lungengewebe (19,7 %), stammte (Abb. 19).

3.4.4 Nichttuberkulöse Mykobakterien (NTM)

Unter den molekularpathologisch positiven Fällen (n = 351) fanden sich 66 Fälle (18,8 %), bei denen NTM diagnostiziert wurden. Bezogen auf das insgesamt untersuchte Kollektiv eine relativ geringe Fallzahl (66 von 1173 Fällen; 5,6 %).

3.4.4.1 Altersverteilung der NTM

Die Altersstruktur der NTM (Abb. 20) ließ eine relativ gleichmäßige Verteilung erkennen, mit einem leichten Schwerpunkt bei den unter 10-jährigen Kindern. Eine vermehrte Fallzahl bei den über 60-jährigen ließ sich allerdings nicht feststellen, obwohl die älter werdende Bevölkerung vor allem in der westlichen Welt gerne als mitverantwortlich für die weltweit steigende Inzidenz der NTM angenommen wird. Aufgrund der jedoch sehr kleinen Fallzahl des Kollektivs lassen sich hier keinerlei evidente Rückschlüsse auf die Verteilung der NTM in der deutschen Bevölkerung, geschweige denn der westlichen Industriestaaten schließen.

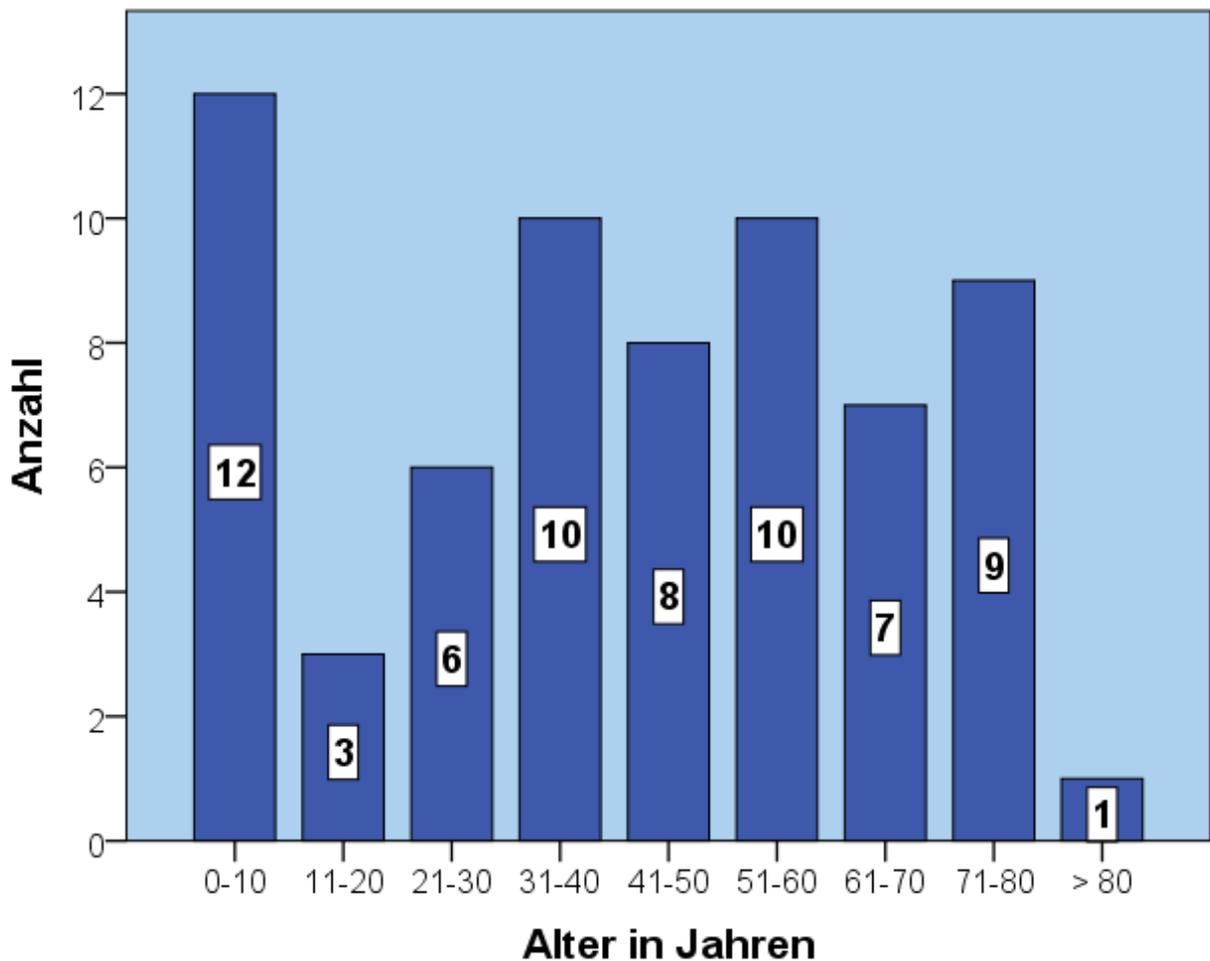


Abb. 20: Altersverteilung der NTM (n = 66)

3.4.4.2 NTM-Verteilung

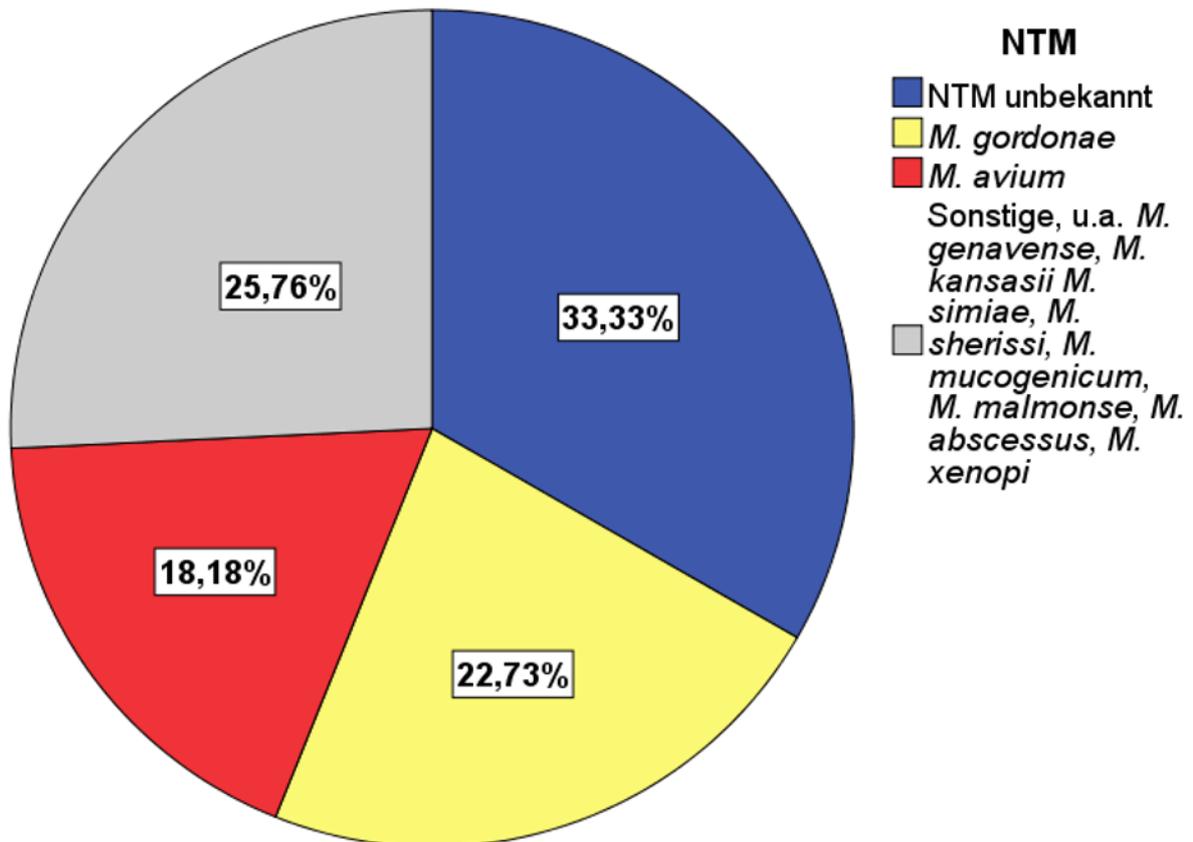


Abb. 21: Verteilung NTM (n = 66)

Die häufigsten Vertreter der NTM waren *M. gordonae* (15) und *M. avium* (12). In 22 Fällen blieben die NTM unbekannt. Weiterhin wurden u.a. *M. genavense*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. mucogenicum*, *M. phocaicum* und noch weitere NTM der Gruppe II und III (Erläuterung s. Anhang (6.1)) identifiziert.

Insbesondere die HIV-Infektion wurde vor Einführung der antiretroviralen Therapie häufig durch die Erkrankung mit *M. avium*-Komplex kompliziert (Schönfeld et al., 2013). Unter den 12 *M. avium* Fällen hier waren allerdings lediglich 3 Patienten mit HIV infiziert (Abb. 21).

3.4.5 HE-Diagnose

Tab. 3: HE-Diagnose vs. molekularpathologische Diagnose (n = 1173)

		Molekularpathologie		
		negativ	positiv	Gesamt
HE-Diagnose	keine HE-Diagnose vorhanden	102	14	116
	nicht-epitheloidzellige Entzündung	251	63	314
	epitheloidzellig-granulomatöse Entzündung mit Nekrosen	229	208	437
	epitheloidzellig-granulomatöse Entzündung ohne Nekrosen	240	66	306
Gesamt		822	351	1173

Bei den 822 molekularpathologisch negativ getesteten Fällen gab es 27,9 % (229 von 822) epitheloidzellig-granulomatöse Entzündungen mit Nekrosen, 29,2 % (240 von 822) epitheloidzellig-granulomatöse Entzündungen ohne Nekrosen und 30,5 % (251 von 822) nicht-epitheloidzellige Entzündungen. Bei 12,4 % (102 von 822) der Fälle war die HE-Diagnose nicht gestellt worden. Dies liegt daran, dass einige externe Einsender ihre Gewebeproben lediglich zur Durchführung einer molekularpathologischen Diagnostik einschicken.

Unter den molekularpathologisch positiv auf *Mycobacterium tuberculosis* getesteten Fällen gab es 59,3 % (208 von 351) epitheloidzellig-granulomatöse Entzündungen mit Nekrosen, 18,8 % (66 von 351) epitheloidzellig-granulomatöse Entzündungen ohne Nekrosen und 17,9 % (63 von 351) nicht-epitheloidzellige Entzündungen. Zu 4 % (14 von 351) der Fälle lag keine HE-Diagnose vor. Die prozentuale Differenz zwischen den epitheloidzellig-granulomatöse Entzündungen mit Nekrosen in Bezug auf molekularpathologisch negative und positive Fälle beträgt 31,4 %. Es zeigte sich also, dass eine epitheloidzellig-granulomatöse Entzündung mit Nekrosen ein valider Hinweis auf eine Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* ist (Tab. 3).

3.4.6 Vergleich: Ziehl-Neelsen-Färbung und negative Molekularpathologie

Die Abb. 22 zeigt die Bewertung der Ziehl-Neelsen-Färbung durch den Primär- und Sekundärbefunder unter den 822 molekularpathologisch negativ getesteten Fällen.

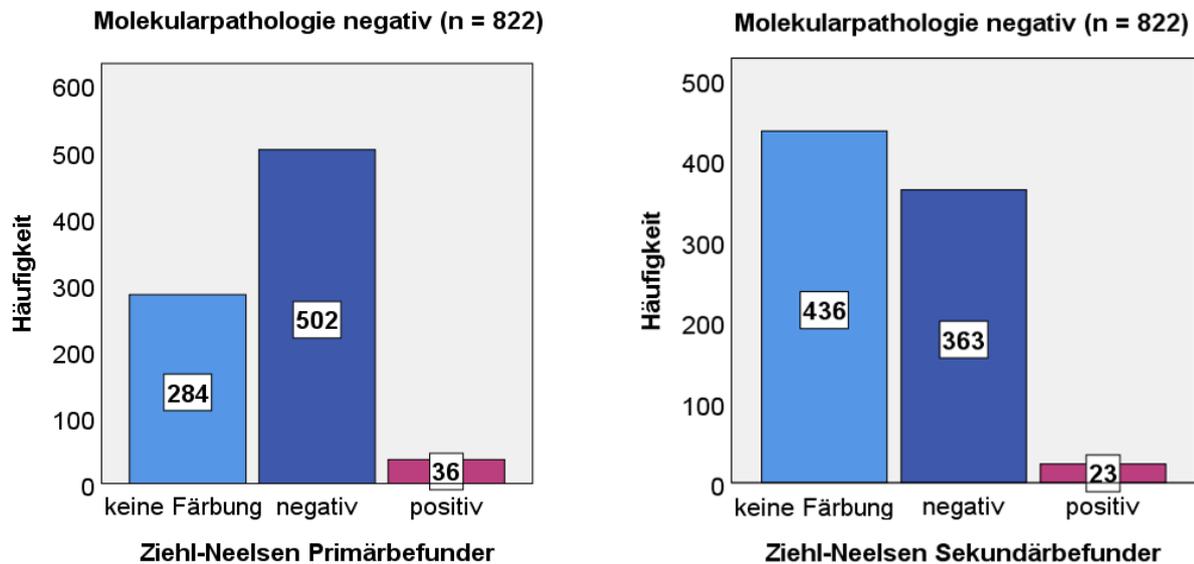


Abb. 22 Links: Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. molekularpathologisch negative Fälle (n = 822). **Rechts:** Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder vs. molekularpathologisch negative Fälle (n = 822)

Von den 822 molekularpathologisch negativ getesteten Fällen lag beim Primärbefunder in 284 Fällen keine Färbung vor. Zieht man diese von den 822 Fällen ab, so bleiben 538 gefärbte Fälle übrig. Hiervon wurden 502 Fälle richtig negativ gewertet. Es zeigte sich also beim Primärbefunder eine Spezifität von 93,3 % (502 von 538 Fällen) für die Ziehl-Neelsen P-Färbung.

Für die Sekundärbefundung lag in 436 Fällen keine Färbung vor. Die Spezifität lag hier bei 94,0 % (363 von 386 Fällen). Es ergab sich also bei den molekularpathologisch negativen Fällen prozentual gesehen kein bedeutender Unterschied in der Detektion der richtig negativen Fälle. Die falsch positive Fallzahl lag bei der Ziehl-Neelsen P-Färbung bei 6,7 % (36 von 538 Fällen) und bei der Ziehl-Neelsen S-Färbung bei 6,0 % (23 von 386 Fällen) (siehe Anhang Tab. 19).

3.4.7 Vergleich: Ziehl-Neelsen-Färbung und positive Molekularpathologie

Die Abb. 23 zeigt die Bewertung der Ziehl-Neelsen-Färbung durch den Primär- und Sekundärbefunder unter den 351 molekularpathologisch positiv getesteten Fällen. Dabei wurde nicht unterschieden zwischen Tuberkulosen und NTM, positiv heißt in diesem Fall nur, dass eine Mykobakteriose vorlag.

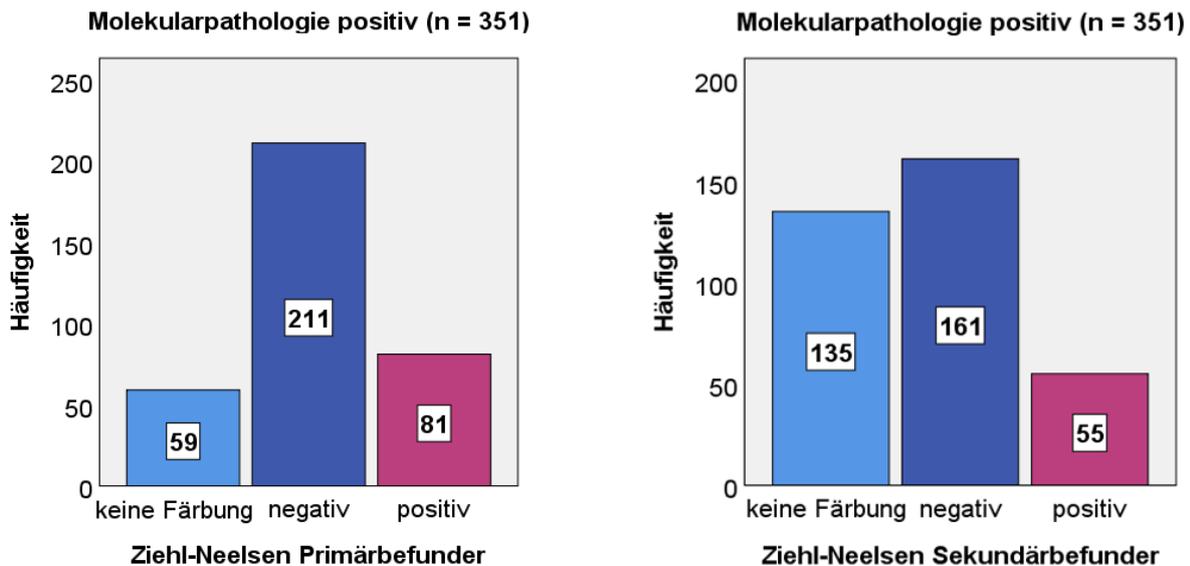


Abb. 23 Links: Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. molekularpathologisch positive Fälle (n = 351). **Rechts:** Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder vs. molekularpathologisch positive Fälle (n = 351)

Von den 351 molekularpathologisch positiv getesteten Fällen lag bei 59 Fällen in der Primärbefundung keine Färbung vor. Zieht man diese ab, so bleiben 292 gefärbte Fälle übrig. Hiervon wurden 81 Fälle positiv gewertet, dies entspricht einer relativ niedrigen Sensitivität von 27,7 % (81 von 292 Fällen) für den Primärbefunder.

Die Sensitivität der Sekundärbefundung lag allerdings prozentual gesehen noch ein wenig niedriger. Nach Abzug der nicht gefärbten Fälle (351 - 135 = 216) wurden von den 216 gefärbten Fällen nur 55 von 216 Fällen richtig positiv erkannt. Die Sensitivität der Primärbefundung lag also bei 25,5 % (McNemar-Bowker: p-Wert < 0,001). Dementsprechend hoch waren die falsch negativ erkannten Fälle: Bei der Ziehl-Neelsen P-Färbung waren es 72,3 % (211 von 292 Fällen) und bei der Ziehl-Neelsen S-Färbung 74,5 % (161 von 216 Fällen) (siehe Anhang Tab. 20).

3.4.8 Vergleich: Auramin-Färbung und negative Molekularpathologie

Die Abb. 24 vergleicht die Bewertung der Auramin-Färbung durch den Primär- und Sekundärbefunder innerhalb der 822 molekularpathologisch negativ getesteten Fälle.

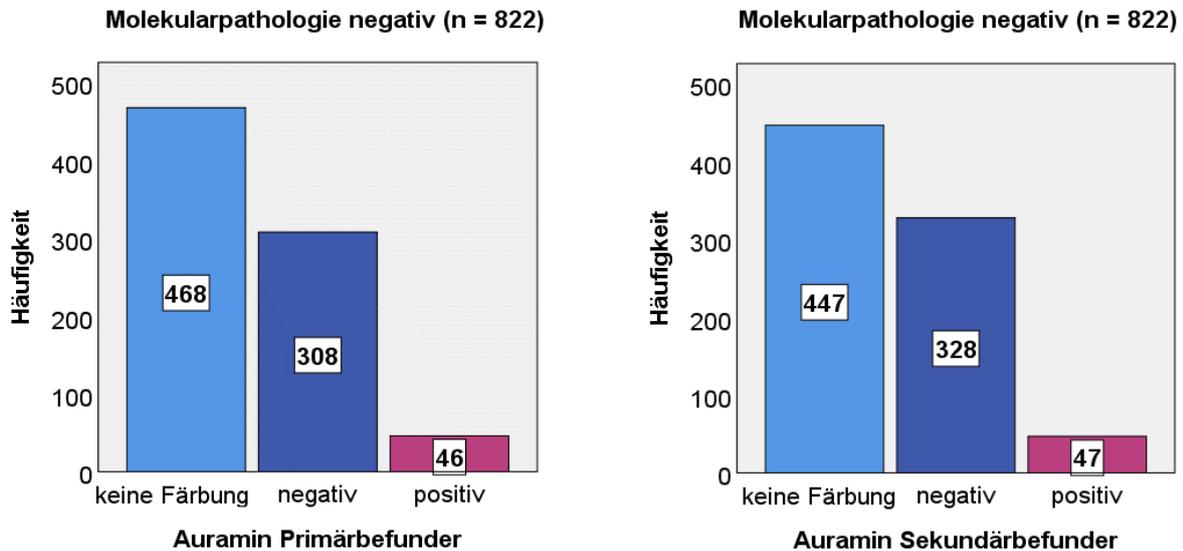


Abb. 24 Links: Auramin Primärbefunder vs. molekularpathologisch negative Fälle (n = 822). **Rechts:** Auramin Sekundärbefunder vs. molekularpathologisch negative Fälle (n = 822)

Von den 822 molekularpathologisch negativ getesteten Fällen lagen zu 468 Fällen der Primärbefundung keine Färbungen vor. Zieht man diese ab, so lagen zu 354 Fällen Färbungen vor. Hiervon wurden 87,0 % der Fälle (308 von 354 Fällen) richtig negativ erkannt und 13,0 % der Fälle (46 von 354 Fällen) falsch positiv. Die Auramin S-Färbung hatte nach Abzug der nicht gefärbten 447 Fälle eine ähnliche Spezifität mit 87,5 % (328 von 375 Fällen). Gleiches galt für die falsch positive Rate der Sekundärbefundung mit 12,5 % (47 von 375 Fällen). Die Spezifität war also innerhalb der Färbungen prozentual gesehen fast gleich (siehe Anhang Tab. 21).

3.4.9 Vergleich: Auramin-Färbung und positive Molekularpathologie

Die Abb. 25 zeigt die Bewertung der Auramin-Färbung durch den Primär- und Sekundärbefunder innerhalb der 351 molekularpathologisch positiv getesteten Fälle. Dabei

wurde nicht unterschieden zwischen Tuberkulosen und NTM, positiv heißt in diesem Fall wieder nur, dass eine Mykobakteriose vorlag.

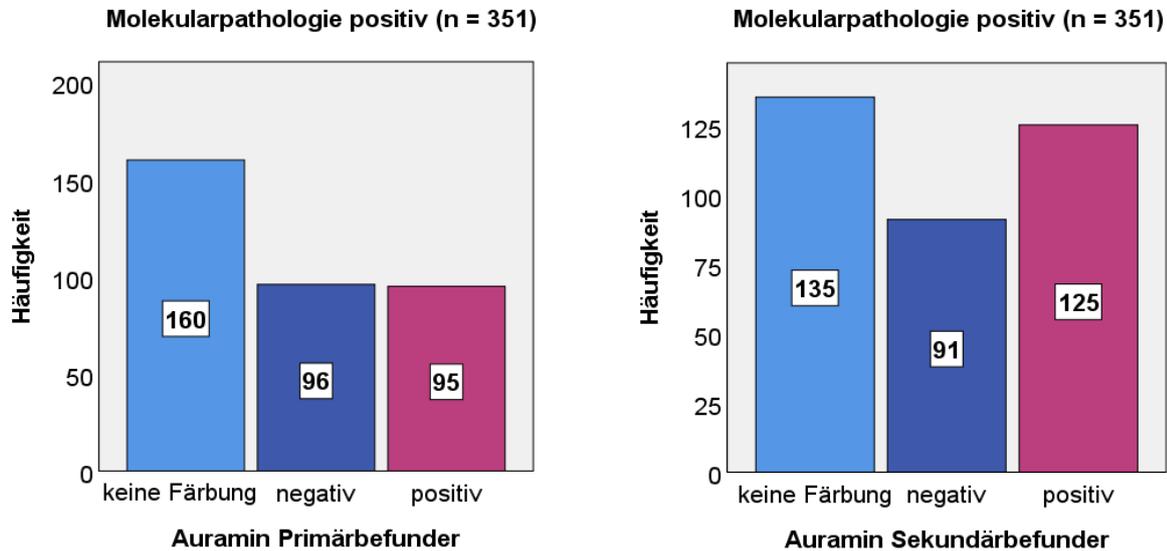


Abb. 25 Links: Auramin Primärbefunder vs. molekularpathologisch positive Fälle (n = 351). **Rechts:** Auramin Sekundärbefunder vs. molekularpathologisch positive Fälle (n = 351)

Von den 351 molekularpathologisch positiv getesteten Fällen erkannte die Auramin P-Färbung mit einer Sensitivität von 49,7 % die richtig positiven Fälle (95 von 191 Fällen, nach Abzug der nicht gefärbten Fälle) und lag in 50,3 % (96 von 191 Fällen) falsch negativ. Die Auramin S-Färbung erkannte mit einer Sensitivität von 57,9 % die richtig positiven Fälle (125 von 216, nach Abzug der nicht gefärbten Fälle) und lag in 42,1 % (91 von 216 Fällen) der Fälle falsch negativ. Folglich lag ein prozentualer Unterschied zwischen den beiden Färbungen vor. Die Auramin S-Färbung hatte eine um 8,2 % höhere Sensitivität als die Auramin P-Färbung (McNemar-Bowker-Test: signifikant, p-Wert < 0,001). Es zeigte sich also, dass ein erfahrener Pathologe eine signifikant höhere Sensitivität in der Detektion von Mykobakterien hat (siehe Anhang Tab. 22).

3.4.10 Kombinierte Sensitivität und Spezifität

Die Auswertung des Gesamtkollektives A zeigte folgende durchschnittliche Spezifitäten und Sensitivitäten (Tab. 4):

Tab. 4: Vergleichstabelle der Sensitivitäten und Spezifitäten der beiden Färbungen bei Molekularpathologie als Referenzstandard (Kollektiv A)

Färbung	Ziehl-Neelsen P+S	Ziehl- Neelsen-P	Ziehl- Neelsen-S	Auramin P+S	Auramin-P	Auramin-S
Spezifität (%)	93,7	93,3	94,0	87,3	87,0	87,5
Sensitivität (%)	26,6	27,7	25,5	53,8	49,7	57,9

3.5 Kollektiv B (n = 681)

Das Kollektiv B (Tab. 5) umfasst 681 Fälle in denen vollständige Ergebnisse zur Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung entweder des Primär- oder des Sekundärbefunders vorlagen. Molekularpathologisch ergaben sich 441 (64,8 %) negative und 240 (35,2 %) positive Fälle. Die positiven Fälle ließen sich noch einmal differenzieren in 203 (84,6 %) Tuberkulosen und 37 (15,4 %) NTM.

Tab. 5: Molekularpathologische Ergebnisse (n = 681)

		Häufigkeit	Prozent (%)
Molekularpathologie	negativ	441	64,8
	TB	203	29,8
	NTM	37	5,4
	Gesamt	681	100,0

3.5.1 Geschlechterverteilung

Das Gesamtkollektiv von 681 Fällen setzte sich aus 314 (46,1 %) Männern, 343 (50,4 %) Frauen und 24 (3,5 %) Personen unbekanntes Geschlechtes zusammen.

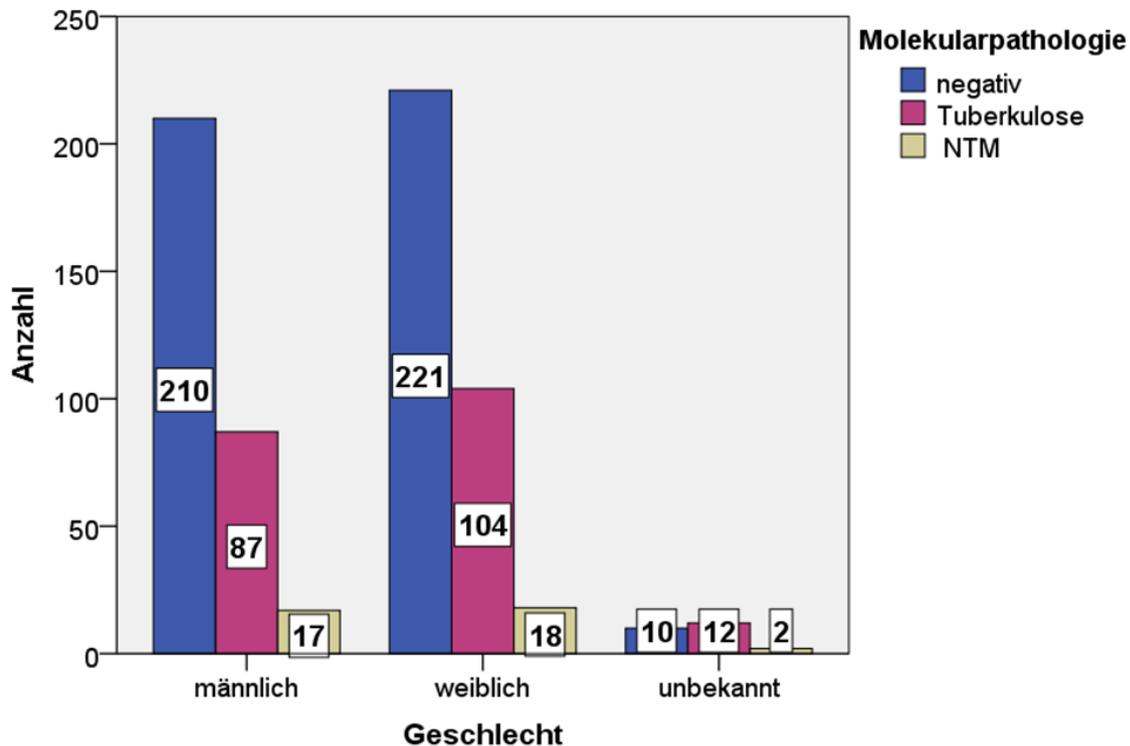


Abb. 26: Molekularpathologische Ergebnisse nach Geschlecht (n = 681)

Dabei waren 66,9 % (210 von 314) der Männer molekularpathologisch negativ und 33,1 % (104 von 314) positiv getestet worden. Innerhalb der positiven Ergebnisse konnte noch einmal in 83,7 % (87 von 104) Tuberkulosen und 16,3 % (17 von 104) NTM differenziert werden. Bei den Frauen war es ein Anteil von 64,4 % (221 von 343) molekularpathologisch negativ und 35,6 % (122 von 343) positiv getesteten Personen. Die 122 positiven Ergebnisse ließen sich in 85,3 % (104 von 122) Tuberkulosen und 14,7 % (18 von 122) NTM unterscheiden. Prozentual gesehen wurden bei den Frauen 2,5 % mehr positive Fälle diagnostiziert (Chi-Quadrat-Test: p-Wert 0,44). Bei der Unterscheidung der Tuberkulosen und NTM lag ein geringerer prozentualer Unterschied von nur 1,6 % mehr NTM bei den Männern vor (Abb. 26).

3.5.2 HE-Diagnose

Tab. 6: HE-Diagnose vs. Molekularpathologische Diagnose (n = 680)

		Molekularpathologie			Gesamt
		negativ	TB	NTM	
HE-Diagnose	Nicht epitheloidzellige Entzündung	89	24	5	118
	Epitheloidzellig-granulomatöse Entzündung mit Nekrosen	177	132	21	330
	Epitheloidzellig-granulomatöse Entzündung ohne Nekrosen	175	46	11	232
Gesamt		441	202	37	680

Bei den 441 molekularpathologisch negativ getesteten Fällen gab es 40,1 % (177 von 441) epitheloidzellig-granulomatöse Entzündungen mit Nekrosen, 39,7 % (175 von 441) epitheloidzellig-granulomatöse Entzündungen ohne Nekrosen und 20,2 % (89 von 441) nicht epitheloidzellige Entzündungen.

Unter den molekularpathologisch positiv auf *Mycobacterium tuberculosis* getesteten Fällen gab es 65,4 % (132 von 202) epitheloidzellig-granulomatöse Entzündungen mit Nekrosen, 22,8 % (46 von 202) epitheloidzellig-granulomatöse Entzündungen ohne Nekrosen und 11,9 % (24 von 202) nicht epitheloidzellige Entzündungen. Prozentual gesehen lag bei den molekularpathologisch positiven Fällen ein um 25,3 % höherer Anteil an epitheloidzellig-granulomatösen Entzündungen mit Nekrosen vor. Es zeigte sich also, dass eine epitheloidzellig-granulomatöse Entzündung mit Nekrosen ein Hinweis auf eine Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* sein kann.

Unter den molekularpathologisch positiv auf atypische Mykobakterien getesteten Fällen zeigte sich ein Anteil von 56,8 % (21 von 37) epitheloidzellig-granulomatösen Entzündungen mit Nekrosen. Der Anteil der epitheloidzellig-granulomatösen Entzündungen ohne Nekrosen lag bei 29,7 % (11 von 37) und war somit um 6,9 % höher als bei einer Infektion mit *M. tuberculosis*. Der nicht epitheloidzellige Entzündungsanteil lag bei

13,5 % (5 von 37) und war somit ähnlich wie bei den auf *M. tuberculosis* positiv getesteten Fällen (Tab. 6).

3.5.3 Vergleiche zwischen Primär- und Sekundärbefunder

Im Kollektiv B gibt es 525 Fälle mit vollständigen Ergebnissen (Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung) zur Primärbefundung und 585 Fälle mit vollständigen Ergebnissen zur Sekundärbefundung. Es ergeben sich verschiedene Fallzahlen, da unterschiedlich viele Fälle von der Primär- sowie der Sekundärbefundung untersucht wurden.

3.5.3.1 Vergleich Ziehl-Neelsen Primärbefunder- und Auramin Primärbefunder-Färbung

Die folgenden Auswertungen beziehen sich auf die Diagnostik des Primärbefunders.

3.5.3.1.1 Molekularpathologisch negative Fälle

Die Primärbefundung umfasst 525 Fälle mit Ergebnissen zur Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung. Davon waren 65,1 % (342 von 525) der Fälle negativ und 34,9 % (183 von 525) der Fälle molekularpathologisch positiv getestet worden.

Die Ziehl-Neelsen P-Färbung hatte eine Spezifität von 93,9 % (321 von 342 Fällen). Die falsch positive Fallrate lag bei 6,1 % (21 von 342 Fällen). Die Spezifität der Auramin P-Färbung lag bei 87,7 %; somit 6,2 % unter der Spezifität der Ziehl-Neelsen P-Färbung. Dementsprechend fiel die falsch positive Rate auch entsprechend höher aus mit 12,3 % (42 von 342 Fällen). Es ließ sich also feststellen, dass die Auramin P-Färbung in etwa doppelt so viele Fälle falsch positiv erkannte wie die Ziehl-Neelsen P-Färbung (McNemar-Test: p-Wert < 0,001) (Tab. 7).

Tab. 7: Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. Auramin Primärbefunder für molekularpathologisch negative Fälle (n = 342)

		Auramin Primärbefunder		Gesamt
		negativ	positiv	
Ziehl-Neelsen Primärbefunder	negativ	298	23	321
	positiv	2	19	21
Gesamt		300	42	342
Molekularpathologie negativ getestet				

3.5.3.1.2 Molekularpathologisch positive Ergebnisse

Bei den molekularpathologisch positiven Fällen erkannte die Ziehl-Neelsen P-Färbung 51 von 183 Fällen richtig positiv. Die Sensitivität war mit 27,9 % also eher gering. Entsprechend hoch fiel demnach die falsch positive Rate aus (72,1 %). Die Auramin P-Färbung lag in etwa bei der Hälfte aller Fälle richtig positiv (91 von 183), die Sensitivität betrug 48,7 %. Die falsch positive Rate lag bei 92 von 183 (50,3 %). Es ließ sich also schließen, dass die Auramin P-Färbung 40 Fälle mehr richtig positiv erkannte als die Ziehl-Neelsen P-Färbung. Die prozentuale Differenz betrug 21,8 % (McNemar-Test: signifikant, p-Wert: < 0,001) (Tab. 8).

Tab. 8: Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. Auramin Primärbefunder für molekularpathologisch positive Fälle (n = 183)

		Auramin Primärbefunder		Gesamt
		negativ	positiv	
Ziehl-Neelsen Primärbefunder	negativ	90	42	132
	positiv	2	49	51
Gesamt		92	91	183
Molekularpathologie positiv getestet				

3.5.3.2 Vergleich: Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder- und Auramin Sekundärbefunder-Färbung

Die folgenden Auswertungen beziehen sich auf die Diagnostik des Sekundärbefunders.

3.5.3.2.1 Molekularpathologisch negative Ergebnisse

Im Kollektiv B (n = 681) lagen aus der Sekundärbefundung 585 Fälle vor. Davon waren 63,4 % (371 von 585) negativ und 36,6 % (214 von 585) positiv auf Mykobakterien getestet worden. Für die Ziehl-Neelsen S-Färbung lag eine Spezifität von 93,8 % (348 von 371 Fällen) vor. 6,2 % der Fälle (23 von 371 Fällen) wurden falsch positiv erkannt. Die Auramin S-Färbung schnitt mit einer Spezifität von 87,9 % (326 von 371 Fällen) und 12,1 % (45 von 371) falsch positiv erkannten Fällen deutlich schlechter ab. Es ergab sich also eine prozentuale Differenz zwischen den beiden Färbungen. Diese betrug bei den falsch positiven Fällen 5,9 % und bei den richtig negativen Fällen 6,14 % (McNemar-Test: p-Wert < 0,001) (Tab. 9).

Tab. 9: Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder vs. Auramin Sekundärbefunder für molekularpathologisch negative Fälle (n = 371)

		Auramin Sekundärbefunder		Gesamt
		negativ	positiv	
Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder	negativ	325	23	348
	positiv	1	22	23
Gesamt		326	45	371
Molekularpathologie negativ getestet				

3.5.3.2.2 Molekularpathologisch positive Ergebnisse

Bei den molekularpathologisch positiven Fällen ergab sich für die Ziehl-Neelsen S-Färbung eine Sensitivität von 25,7 % (55 von 214 Fällen), entsprechend wurden 74,3 % (159 von 214 Fällen) fälschlicherweise negativ gewertet. Die Auramin S-Färbung lag mit einer Sensitivität von 57,9 % (124 von 214 Fällen) deutlich höher. Sie erkannte 71 Fälle mehr als die Ziehl-Neelsen S-Färbung. Prozentual gerechnet betrug die Differenz also

32,2 %. Für die falsch negativ erkannten Fälle ergab sich die gleiche prozentuale Differenz von 32,2 %. Hier schnitt die Auramin S-Färbung mit 42,1 % (90 von 214 Fällen) falsch negativ erkannten Fällen deutlich besser ab (McNemar-Test: signifikant, p-Wert < 0,001) (Tab. 10).

Tab. 10: Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder vs. Auramin Sekundärbefunder für molekularpathologisch positive Fälle (n = 214)

		Auramin Sekundärbefunder		Gesamt
		negativ	positiv	
Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder	negativ	88	71	159
	positiv	2	53	55
Gesamt		90	124	214
Molekularpathologie positiv getestet				

3.5.3.2.3 Kombinierte Sensitivität und Spezifität

Tab. 11: Kombinierte Sensitivität und Spezifität für Primär- und Sekundärbefunder (Kollektiv B)

Färbung	Primärbefunder			Sekundärbefunder		
	Ziehl-Neelsen-P	Auramin-P	Kombination-P	Ziehl-Neelsen-S	Auramin-S	Kombination-S
Sensitivität (%)	27,9	48,7	50,8	25,7	57,9	58,9
Spezifität (%)	93,9	87,7	87,1	93,8	87,9	87,6

Die kombinierte Sensitivität beider Färbungen ergab für den Primärbefunder eine gesteigerte Sensitivität von 50,8 % bei einer Spezifität von 87,1 %. Für den Sekundärbefunder zeigte sich eine gesteigerte Sensitivität von 58,9 % bei einer Spezifität von 87,6 %.

3.5.4 Unterschiede zwischen Primär- und Sekundärbefunder

3.5.4.1 Ziehl-Neelsen-Färbung

In den folgenden Auswertungen soll ein direkter Vergleich der Ziehl-Neelsen-Färbung des Primärbefunders mit der Ziehl-Neelsen-Färbung des Sekundärbefunders erfolgen. Das Unterkollektiv besteht hier nur noch aus 487 Fällen, bei denen eine Primär- und Sekundärbefundung an den gleichen Schnitten erfolgte.

Sowohl für die molekularpathologisch negativ-, als auch die positiv-getesteten Fälle, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Primär- und Sekundärbefunder (Tab. 12 & Tab. 13).

Tab. 12: Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder für molekularpathologisch negative Fälle (n = 302)

		Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder		Gesamt
		negativ	positiv	
Ziehl-Neelsen Primärbefunder	negativ	273	5	278
	positiv	8	16	24
Gesamt		281	21	302
Molekularpathologie negativ getestet				

Tab. 13: Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder für molekularpathologisch positive Fälle (n = 185)

		Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder		Gesamt
		negativ	positiv	
Ziehl-Neelsen Primärbefunder	negativ	122	11	133
	positiv	12	40	52
Gesamt		134	51	185
Molekularpathologie positiv getestet				

3.5.4.2 Auramin-Färbung

In Bezug auf die Auramin-Färbung lag das Kollektiv bei insgesamt 437 Fällen in denen ein Direktvergleich zwischen Primär- und Sekundärbefunder durchgeführt werden konnte. Es ergab sich bei den molekularpathologisch negativen Fällen ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Jedoch ergaben sich bedeutende Unterschiede für die molekularpathologisch positiven Fälle. Hier betrug die Sensitivität in der Auramin P-Färbung 52,2 % und in der Auramin S-Färbung 65,2 %. Die prozentuale Differenz lag bei 13 % (McNemar-Test: signifikant, p-Wert < 0,001) (Tab. 14 & Tab. 15).

Tab. 14: Auramin Primärbefunder vs. Auramin Sekundärbefunder für molekularpathologisch negative Fälle (n = 276)

		Auramin Sekundärbefunder		Gesamt
		negativ	positiv	
Auramin Primärbefunder	negativ	230	8	238
	positiv	6	32	38
Gesamt		236	40	276
Molekularpathologie negativ getestet				

Tab. 15: Auramin P vs. Auramin S für molekularpathologisch positive Fälle (n = 161)

		Auramin Sekundärbefunder		Gesamt
		negativ	positiv	
Auramin Primärbefunder	negativ	54	23	77
	positiv	2	82	84
Gesamt		56	105	161
Molekularpathologie positiv getestet				

Es lässt sich also schließen, dass durch die adäquate Schulung bzw. zunehmende Erfahrung eines Pathologen eine signifikante Steigerung der Sensitivität der Auramin-Färbung erreicht werden kann.

3.5.5 Vollständiges Kollektiv

In den folgenden Auswertungen sollen die diagnostischen Differenzen der Ergebnisse zwischen NAT und vollständiger Histomorphologie herausgearbeitet werden, unabhängig von Primär- und Sekundärbefundung. Von 525 der 681 Fälle lagen primäre histomorphologische und molekularpathologische Untersuchungsergebnisse vor. Bei den restlichen 156 Fällen wurden die histomorphologischen Ergebnisse des Sekundärbefunders herangezogen, um ein möglichst großes Vergleichskollektiv zu erhalten.

3.5.5.1 Molekularpathologisch negative Ergebnisse

Für die molekularpathologisch negativen Fälle ergab sich bei der Ziehl-Neelsen-Färbung eine Spezifität von 94,6 % (417 von 441 Fällen) und eine falsch positive Rate von 5,4 % (24 von 441 Fällen). Die Auramin-Färbung hatte eine geringere Spezifität mit 89,1 % (393 von 441 Fällen) und entsprechend eine höhere falsch positive Rate von 10,9 % (48 von 441 Fällen).

3.5.5.1.1 Diskrepanz zwischen Histochemie und Molekularpathologie

Eine Subgruppe der molekularpathologisch negativen Fälle (48 Fälle) war primär histologisch und histochemisch als sichere Mykobakteriose diagnostiziert worden. Entweder durch wiederholte NAT-Untersuchungen oder durch zusätzliche parallel verlaufende mikrobiologische Nachweisverfahren (Kultur, NAT am Sputum etc.) wurden 18 Fälle gefunden, die letztlich als positiv zu bewerten sind.

Rechnet man den Anteil dieser 18 nachweislich positiven Fälle in Bezug auf die primär negativen 441 Fälle des Gesamtkollektivs von 681 Fällen heraus, so ergibt sich eine falsch negative Befundrate der NAT von mindestens 4,1 %. Die folgenden zwei Fallbeispiele sollen diese Diskrepanz und auch eventuelle Konsequenzen einer solchen Fehldiagnostik verdeutlichen.

3.5.5.1.1.1 Diskrepanz Fall 1

Im Diskrepanz Fall 1 (Abb. 27) zeigen die Bilder A-D die erste histochemische Untersuchung, welche noch zu Lebzeiten des Patienten durchgeführt wurde, die Bilder E-F die Bilder der Obduktion.

Vorgestellt hatte sich ein 63-jähriger Patient, der klinisch die Symptomatik einer cervicalen Lymphadenopathie unklarer Genese mit B-Symptomatik bei einer früher bereits durchgemachten Tuberkulose und gleichzeitig chronischem Nikotinabusus zeigte. Zudem litt der Patient an einer ausgeprägten Leberzirrhose Stadium CHILD B bei chronischem Alkoholabusus.

Es wurde ein Lymphknoten exstirpiert, der in der Schnellschnitt-Untersuchung bereits eine abszedierende und nekrotisierende Entzündung zeigte. Nach Einbettung in Paraffin und Durchführung einer HE-Färbung zeigte sich Lymphknotengewebe mit einer zentralen großen Nekrose-Zone, histomorphologisch gut vereinbar mit einer rein produktiven Tuberkulose. In der Umgebung fanden sich Schaumzellen und einzelne Makrophagen. Eine echte granulomatöse Reaktion mit Epitheloidzellen und Riesenzellen lag jedoch nicht vor.

Zum damaligen Zeitpunkt erfolgte in der Primäruntersuchung im Anschluss an die HE-Färbung leider keine histochemische Färbung und Untersuchung der Schnitte mittels Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung. Die damals parallel durchgeführte molekularpathologische Untersuchung zeigte sich negativ für *Mycobacterium tuberculosis* oder NTM. Vier Wochen später verstarb der Patient und es wurde eine Obduktion durchgeführt.

Bei der Obduktion wurden schließlich auch histochemisch die Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung durchgeführt. Es zeigten sich in mehreren Organen septische Streuherde mit Infiltraten von neutrophilen Granulozyten, daneben auch Herde mit randlichem Epitheloidzellsaum und zentraler verkäsender Nekrose. Hier gelang in der Ziehl-Neelsen-Färbung kein Nachweis säurefester Stäbchen. In der Auramin-Färbung jedoch gelang der Nachweis stäbchenförmiger Bakterien im Bereich dieser Nekrosen. Eine Tuberkulose konnte schließlich molekularpathologisch am Autopsiematerial bestätigt werden. Es zeigte sich schlussendlich, dass der Patient an einem septischen Herz-Kreislauf-Versagen auf dem Boden einer Miliartuberkulose mit Aussaat in mehrere Or-

gane in Kombination mit einer Sepsis mit Ausbildung von septischen Streuherden bei alkoholtoxischer Leberzirrhose verstorben war.

Bei autoptischer Kenntnis einer Tuberkulose wurde der zervikale Lymphknoten im Rahmen dieser Studie nachträglich histochemisch nachuntersucht. Zumindest in der Auramin-Färbung wurden säurefeste Stäbchen eindeutig nachgewiesen und somit eine Tuberkulose auch histologisch nachgewiesen.

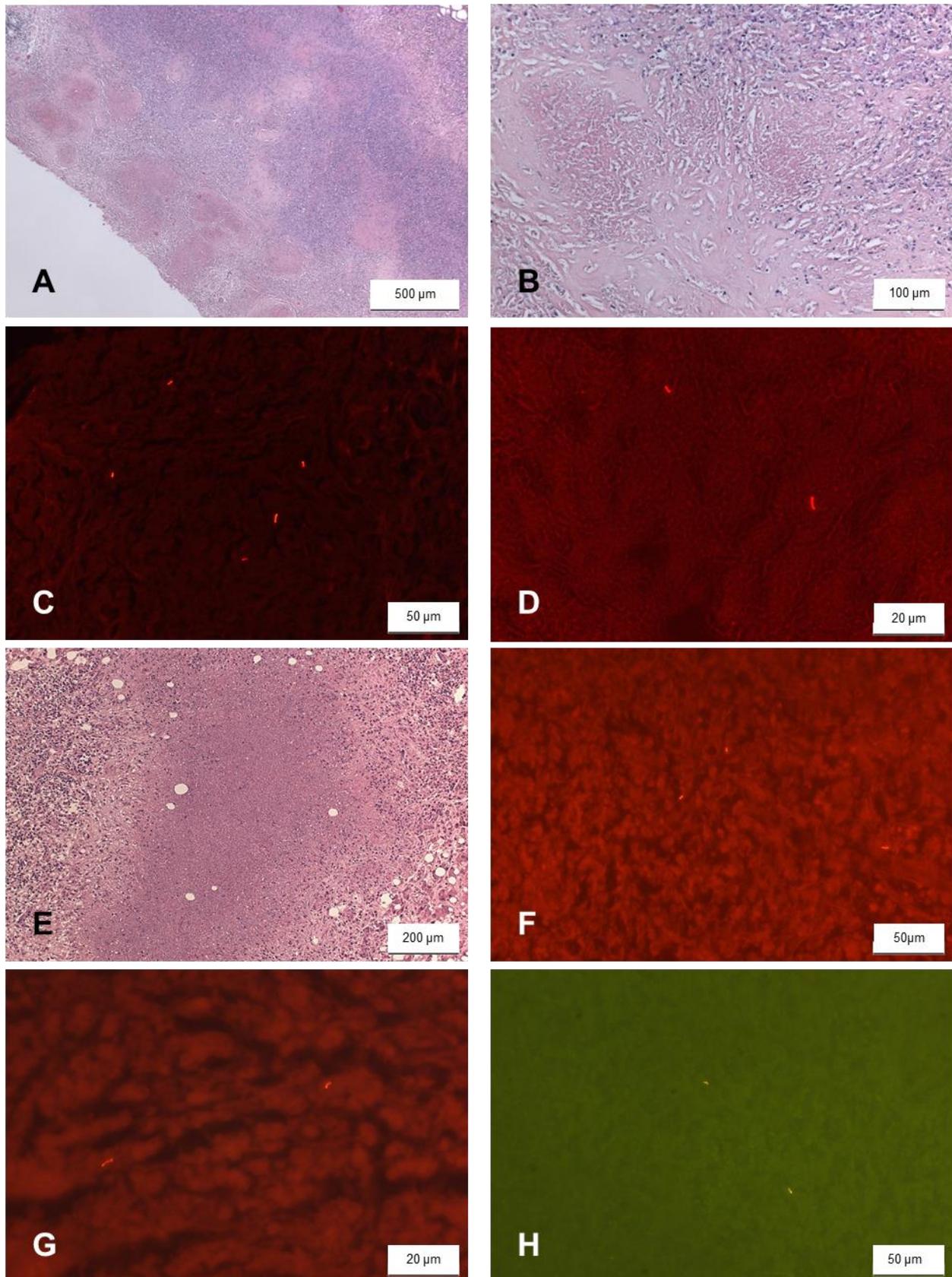


Abb. 27: Diskrepanz Fall 1: A-D Lymphknoten 4 Wochen vor dem Tode (A&B: HE-Färbung; C&D: Auramin-Färbung) und E-H Obduktionsfall (E: HE-Färbung; F-H: Au-

3.5.5.1.1.2 Diskrepanz Fall 2

Im Diskrepanz Fall 2 (Abb. 29) stellte sich ein 17-jähriger Junge in der Kinderklinik mit trockenem Husten, rezidivierendem abendlichen Fieber und Nachtschweiß, sowie einem Gewichtsverlust von ca. 4 kg vor. In der Umgebungsanamnese konnte eruiert werden, dass der Großvater mütterlicherseits an einer Tuberkulose verstorben war und auch die Mutter des Patienten vor 12 Jahren eine TB durchgemacht hatte.

In einer CT-Untersuchung fiel eine malignomsuspekte osteolytische Läsion in BWK 6 auf (Abb. 28).



Abb. 28: CT-Bild auf Höhe BWK 6

Der Tuberkulin-Hauttest zeigte sich positiv, wurde allerdings bei vermuteter stattgehabter BCG-Impfung nicht als wegweisend gewertet. Es erfolgte die mehrfache Entnahme von Gewebematerial zur histologischen Untersuchung. Bei Verdacht auf eine Sarkoidose bei durch den Primärbefunder nicht nachgewiesenen säurefesten Stäbchen sollte initial eine immunsuppressive Glucocorticoid-Therapie eingeleitet werden. Durch den

Sekundärbefunder gelang schließlich der Nachweis von säurefesten Stäbchen in der Auramin-Färbung. Die NAT zeigten sich initial sowohl in der Molekularpathologie, als auch in der Molekularmikrobiologie negativ für eine mykobakterielle Infektion. Erst im Tuberkulose-Referenzzentrum Borstel gelang der primäre NAT- Nachweis einer TB. Schließlich zeigte sich auch die mikrobiologische Kultur positiv. Hätte der Sekundärbefunder nicht darauf bestanden, dass eine gesicherte TB-Diagnose mittels positivem Nachweis von Bakterien in der Auramin-Färbung vorliegt, so hätte man beim Patienten durch eine immunsuppressive Fehltherapie womöglich eine akute Verschlechterung der Erkrankung ausgelöst.

Aus diesen Fallbeispielen kann man drei Schlussfolgerungen ziehen: Erstens werden die histochemischen Färbungen in der Diagnostik der Mykobakteriosen deutlich unterschätzt und infolgedessen auch weniger angewandt, zweitens sind auch NAT-Nachweisverfahren nicht unfehlbar und drittens ist die mikrobiologische Kultur nach wie vor der Goldstandard.

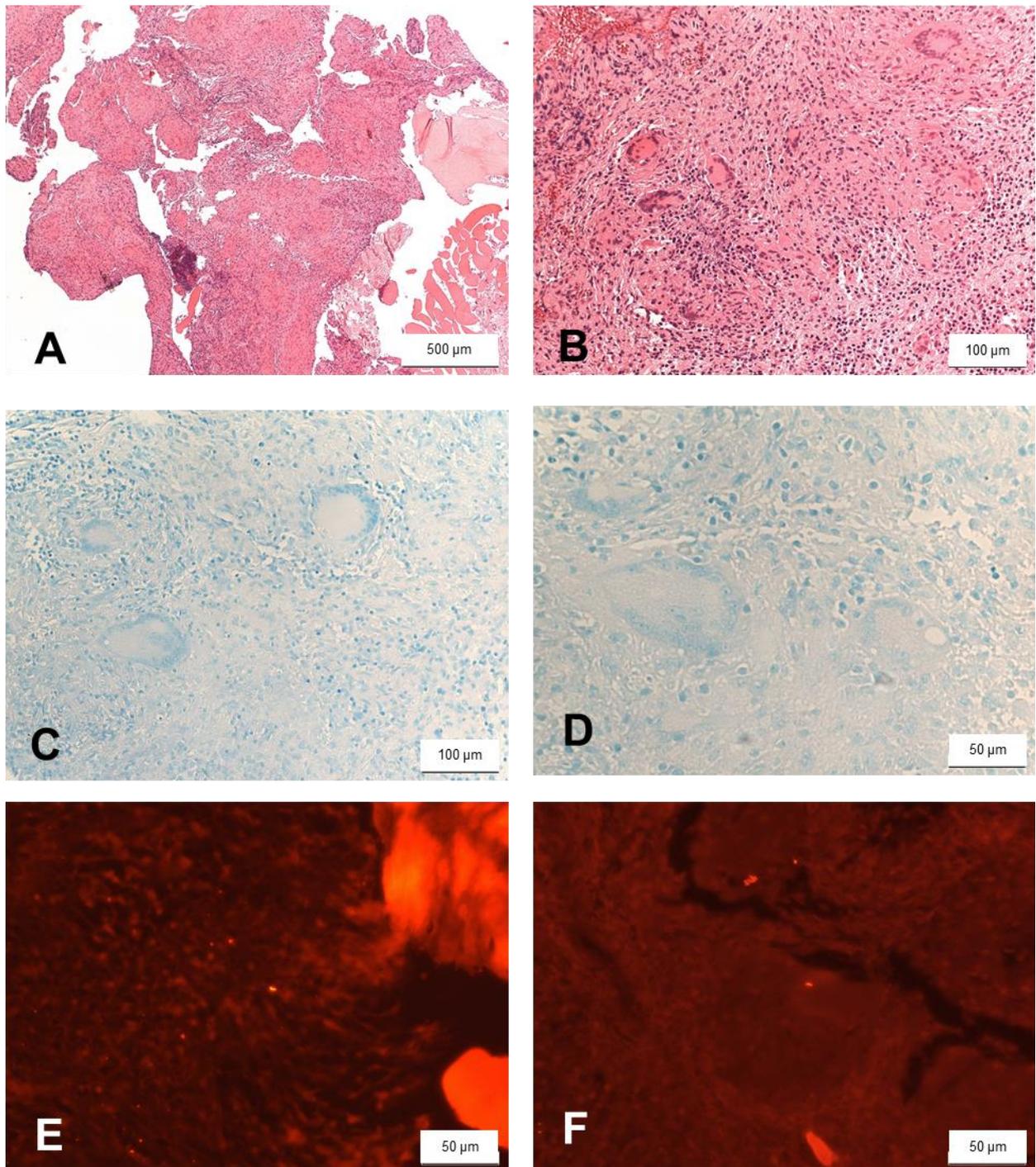


Abb. 29: Diskrepanz Fall 2: A&B: HE-Färbung, C&D: Ziehl-Neelsen-Färbung: negativ, E&F: Auramin-Färbung: positiv

3.5.5.2 Molekularpathologisch positive Ergebnisse

Die Sensitivität der Ziehl-Neelsen-Färbung bezogen auf die molekularpathologisch positiven Fälle betrug 24,6 % (59 von 240 Fällen). Die falsch negative Rate betrug somit 75,4 % (181 von 240 Fällen). Die Auramin-Färbung hatte mit 47,1 % eine fast doppelt so hohe Sensitivität wie die Ziehl-Neelsen-Färbung (113 von 240 Fällen). Die falsch negative Rate betrug hier 52,9 % (127 von 240 Fällen).

3.6 Kollektiv C (n = 150)

Das Kollektiv C der Kinder und Jugendlichen ist ein Unterkollektiv aus dem Kollektiv A (n = 1173). Es ergab sich eine Fallzahl von n = 150 für Kinder- und Jugendliche im Alter von 0 bis 20 Jahren. Innerhalb dieser 150 Fälle lagen für 100 Fälle vollständige Ergebnisse zu Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbungen vor.

3.6.1 Altersverteilung

Für die Auswertung der Altersverteilung wurden vier Altersgruppen festgelegt. Die jüngste Altersgruppe waren die 0- bis 5-jährigen, die mit einem Anteil von 41,3 % vertreten waren. Die 6- bis 10-jährigen waren mit 20 %, die 11- bis 15-jährigen mit 21,3 % und die 16- bis 20-jährigen mit 17,3 % vertreten (Abb. 30).

Das jüngste Kind war zum Zeitpunkt der Untersuchung gerade mal einen Monat alt, der älteste junge Erwachsene 20 Jahre alt. Das Durchschnittsalter für dieses Kollektiv lag bei 8,51 Jahren.

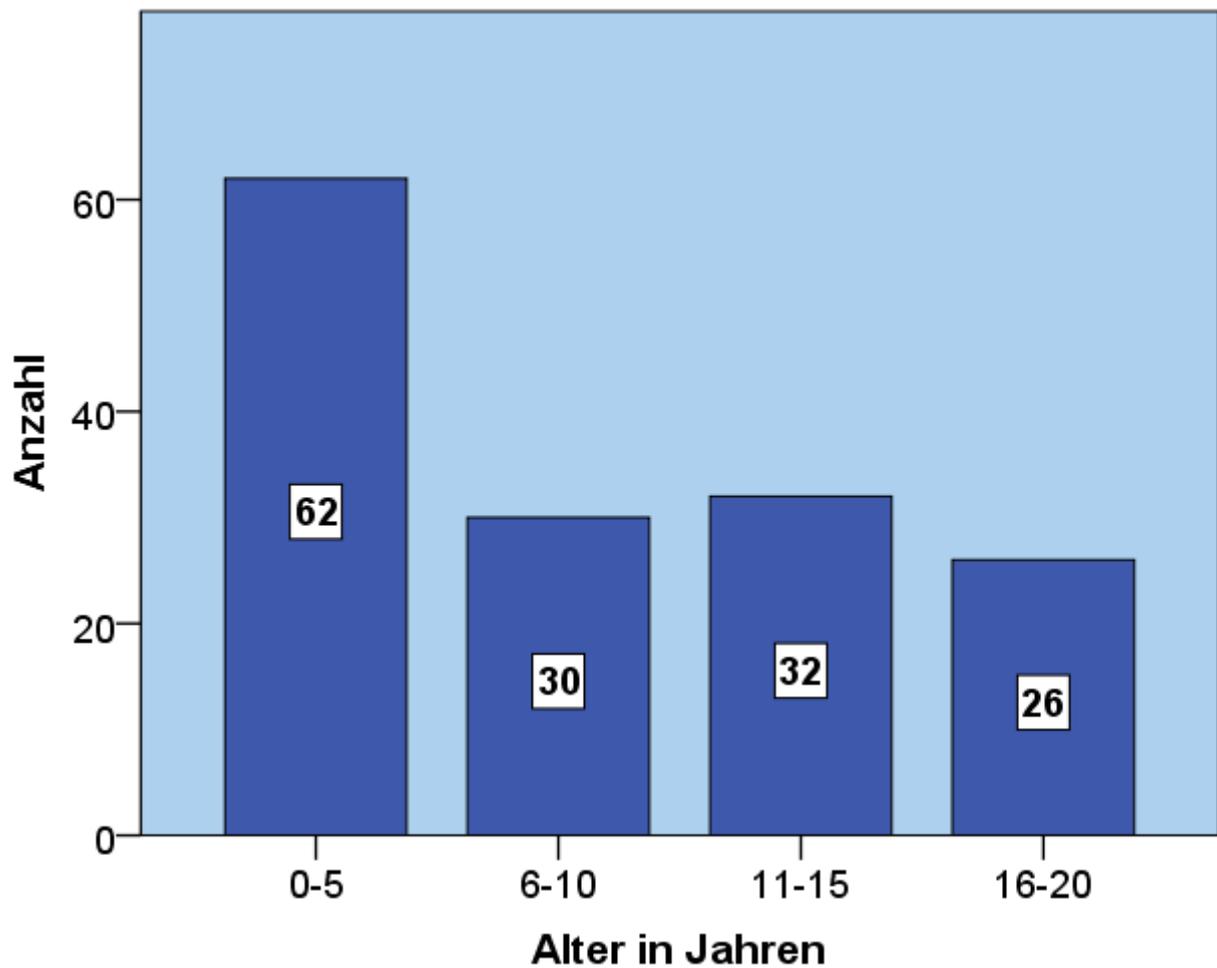


Abb. 30: Altersverteilung Kinder- und Jugendliche (n = 150)

3.6.2 Geschlechterverteilung

Innerhalb der Altersgruppen der 0- bis 5-, 6- bis 10- und 16- bis 20-jährigen waren die Mädchen stärker vertreten. Nur in der Altersgruppe der 11- bis 15-jährigen waren mehr Jungen vorhanden (Abb. 31).

Von den vorliegenden 150 Fällen waren 60 (40 %) Patienten männlich, 78 (52 %) weiblich und 12 (8 %) Patienten unbekanntes Geschlecht. Von den Jungen wurden 78,3 % (47 von 60 Fällen) molekularpathologisch negativ, und 21,7 % (13 von 60 Fällen) positiv getestet. Bei den Mädchen waren es 66,7 % (52 von 78 Fällen) negative und 33,3 % (26 von 78 Fällen) positive Fälle. Prozentual gesehen lag der Anteil der Mykobakterien bei den Mädchen also um 11,6 % höher als bei den Jungen (Abb. 32).

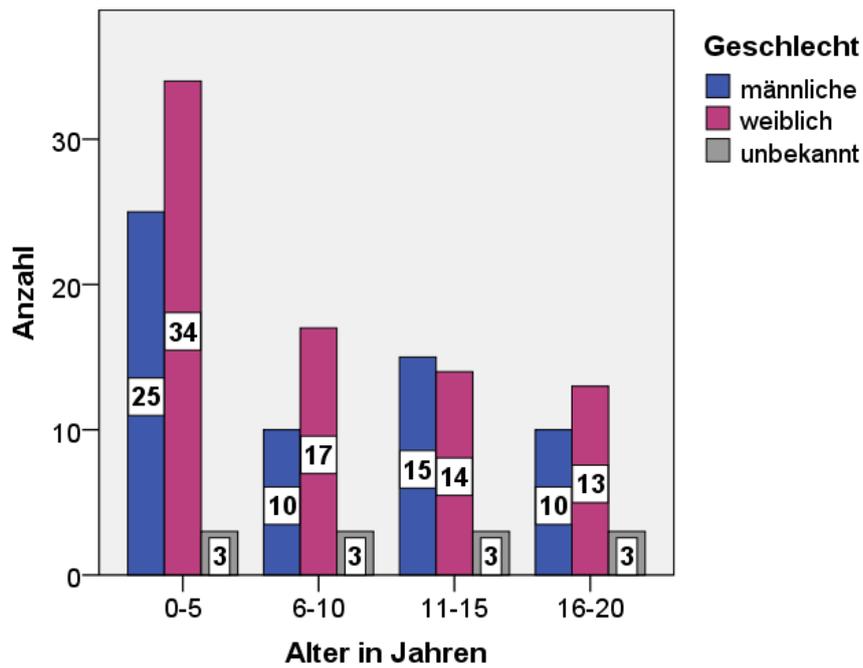


Abb. 31: Geschlechterverteilung Kinder- und Jugendliche nach Alter (n = 150)

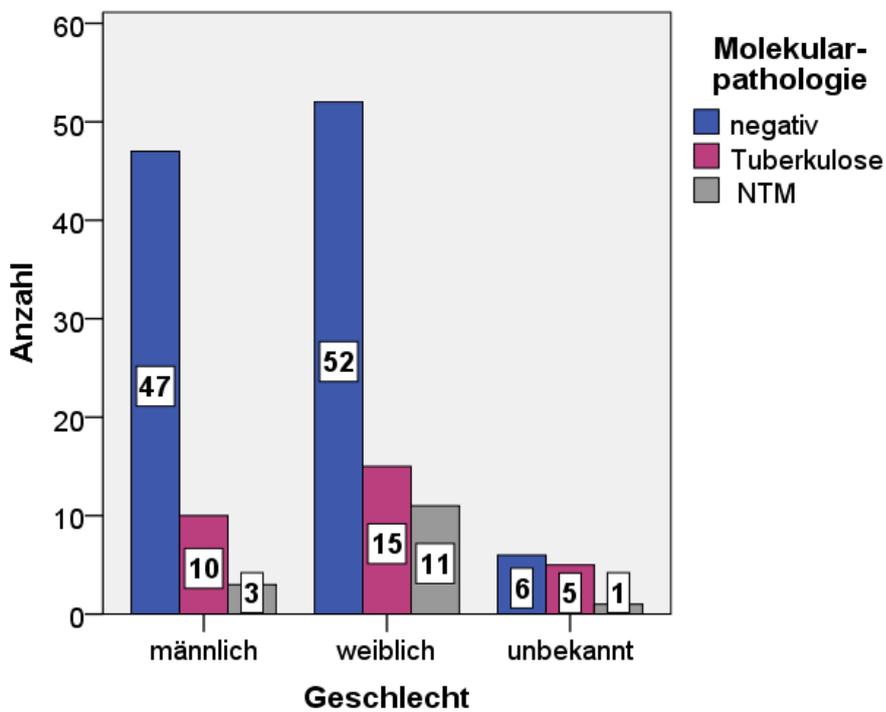


Abb. 32: Molekularpathologische Ergebnisse nach Geschlecht bei Kindern- und Jugendlichen (n = 150)

3.6.3 Organverteilung

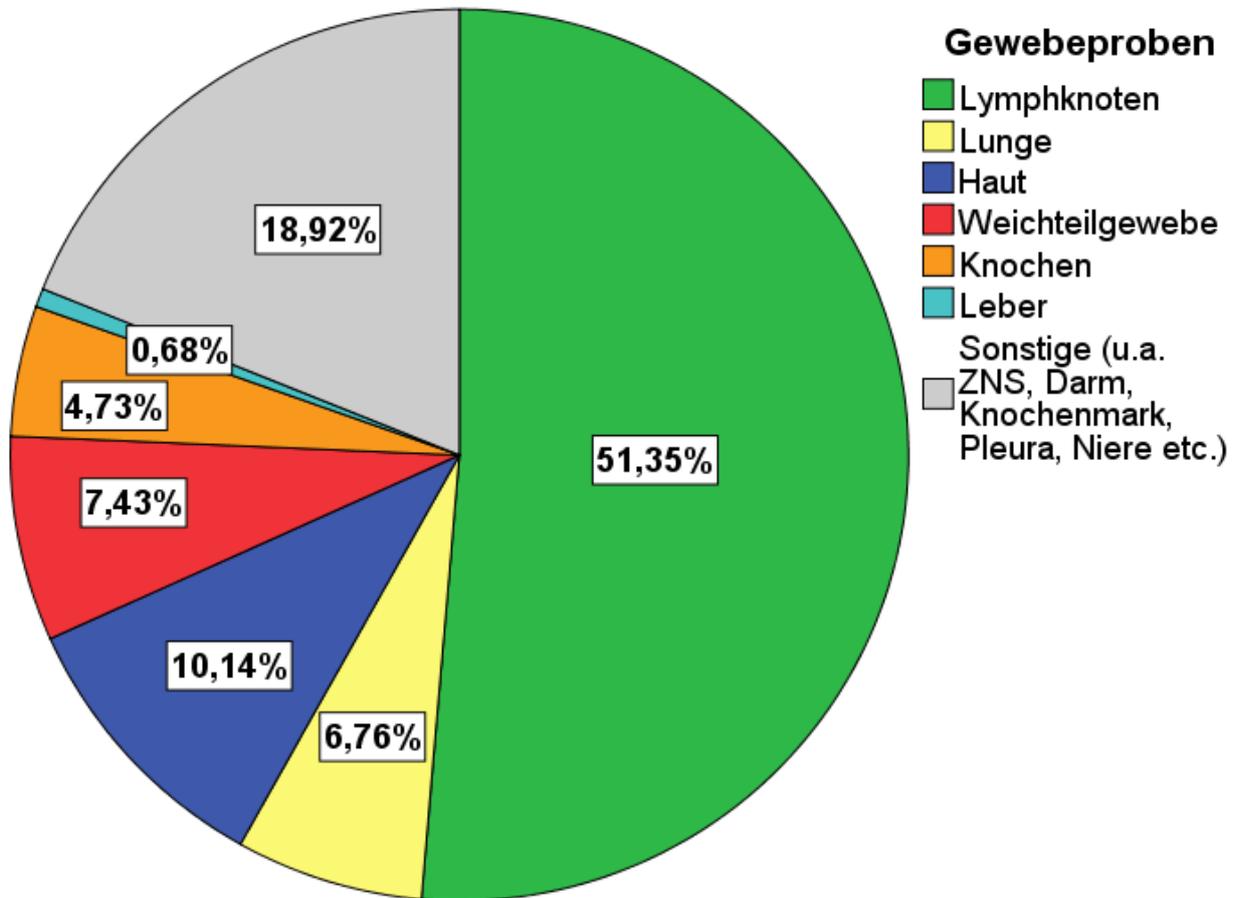


Abb. 33: Organverteilung der Gewebeproben bei Kindern- und Jugendlichen (n = 150)

Von den zur pathologischen Untersuchung eingeschickten Gewebeproben bei Kindern- und Jugendlichen waren die Lymphknoten mit Abstand am häufigsten betroffen (51,35 %), gefolgt von Gewebeproben der Haut (10,14 %), des Weichteilgewebes (7,43 %) und der Lunge (6,76 %). Im Gegensatz zum Kollektiv A mit n = 1173 Fällen, lag der Verteilungsschwerpunkt deutlicher auf den Lymphknoten. Die Lunge, welche dort an zweiter Stelle lag, war hier mit einem deutlich geringeren Prozentsatz vertreten (Abb. 33).

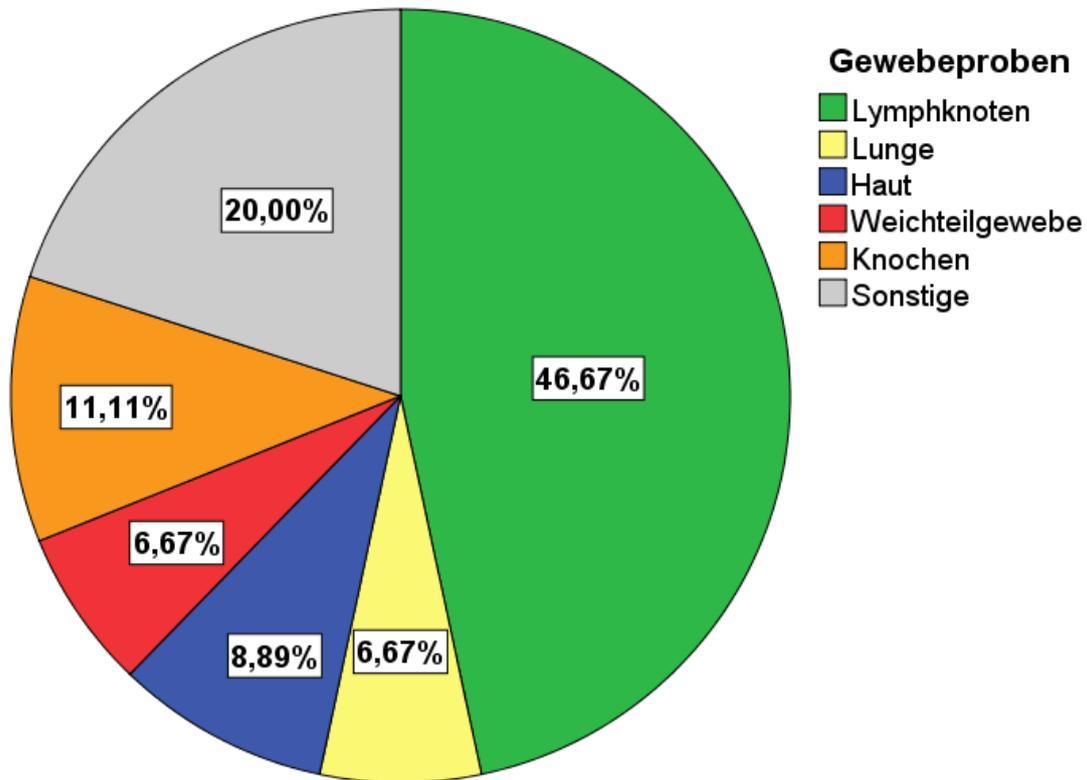


Abb. 34: Organverteilung der Gewebeproben bei Kindern- und Jugendlichen für die molekularpathologisch positiven Fälle (n = 45)

Bezogen auf die 45 molekularpathologisch positiv getesteten Fälle waren die Lymphknoten mit 46,7 % (21 von 45 Fällen) am häufigsten betroffen (Abb. 34). In dieser Auswertung ist retrospektiv allerdings nicht mehr nachzuvollziehen, ob es sich ausschließlich um extrapulmonale Tuberkulosen oder um Lungentuberkulosen mit extrapulmonaler Organmanifestation handelte.

3.6.4 Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung vs. Molekularpathologie

Von den vorliegenden 150 Fällen des Kollektivs C, für Kinder- und Jugendliche, lagen nur zu 100 Fällen Ergebnisse zu Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung vor. Es wurden hierfür, analog zum Kollektiv B, die Ergebnisse des Primärbefunders durch die Ergebnisse des Sekundärbefunders ergänzt.

3.6.4.1 Molekularpathologisch negative Ergebnisse

Innerhalb der 100 verwertbaren Fälle lagen 72 molekularpathologisch negative und 28 positive Fälle vor. Die Ziehl-Neelsen Färbung hatte eine Spezifität von 91,7 % (66 von 72 Fällen), die Auramin-Färbung eine Spezifität von 79,2 % (57 von 72 Fällen). Die falsch positive Rate der Ziehl-Neelsen-Färbung fiel mit 8,3 % deutlich niedriger aus als die der Auramin-Färbung mit 20,8 % (McNemar: p-Wert 0,012) (Tab. 16)

Tab. 16: Ziehl-Neelsen vs. Auramin für molekularpathologisch negative Fälle (n = 72)

		Auramin-Färbung		Gesamt
		negativ	positiv	
Ziehl-Neelsen-Färbung	negativ	56	10	66
	positiv	1	5	6
Gesamt		57	15	72
Molekularpathologie negativ getestet				

3.6.4.2 Molekularpathologisch positive Ergebnisse

Das Unterkollektiv der molekularpathologisch positiven Ergebnisse fiel mit n = 28 relativ klein aus, entsprechend ist die Aussagekraft auch geringer. Die Ziehl-Neelsen-Färbung hatte eine Sensitivität von 21,4 % und eine falsch negative Rate von 78,6 %. Die Auramin-Färbung hatte eine Sensitivität von 42,9 % und eine falsch negative Rate von 57,1 % (Tab. 17).

Tab. 17: Ziehl-Neelsen vs. Auramin für molekularpathologische positive Fälle (n = 28)

		Auramin-Färbung		Gesamt
		negativ	positiv	
Ziehl-Neelsen-Färbung	negativ	14	8	22
	positiv	2	4	6
Gesamt		16	12	28
Molekularpathologie positiv getestet				

4. Diskussion

Folgende Überlegungen und wissenschaftliche Erkenntnisse wurden der vorliegenden Arbeit zu Grunde gelegt.

4.1 Kritische Bewertung der retrospektiven Datenanalyse

Da es sich in dieser statistischen Auswertung um eine retrospektive Studie handelt, unterliegt sie folglich auch den Nachteilen einer solchen. Dazu gehört, dass zum einen unvollständige Unterlagen vorlagen, die zum Beispiel durch Dokumentierungsfehler, Verjährung der Datenaufbewahrungspflicht oder den technischen Fortschritt entstanden. Beispielsweise wurden Datenerfassungsprogramme wie das im UKB verwendete Orbis von der Firma AGFA Health Care hier erst Anfang der 2000er eingeführt, was teilweise zu unvollständigen Dokumentationen führte.

Weiterhin wurde der Auramin-Färbung in den Anfangsjahren dieser Studie eine noch nicht so hohe Bedeutung beigemessen. Die Empfehlung der WHO, die konventionelle lichtmikroskopische Ziehl-Neelsen-Färbung zur Detektion der Mykobakterien durch die Fluoreszenzmikroskopie (FM) zu ergänzen und sogar zu ersetzen, wurde erst im Jahre 2011 ausgesprochen (World Health Organization (WHO), 2011). In vielen Fällen lagen somit nur Ergebnisse zu Ziehl-Neelsen-Färbungen vor.

Auch die Größe des Kollektivs spielt für die Aussagekraft der gewonnenen Daten eine Rolle. Mit 1173 Fällen ist das analysierte Kollektiv zwar nicht klein, jedoch variieren die Größen in den Teilkollektiven erheblich, sodass zum Beispiel die Ergebnisse der Auswertung des Kollektivs C der Kinder- und Jugendlichen ($n = 150$) als weniger verlässlich betrachtet werden müssen.

4.2 Vergleich mit der aktuellen Literaturlage

In zahlreichen Studien wurden die Sensitivität und Spezifität der Ziehl-Neelsen- und auch Auramin-Färbung im Vergleich mit verschiedenen Nukleinsäure-Amplifikations-techniken ausgewertet, hierbei galt die mikrobiologische Kultur als Referenzstandard. Fast alle diese Studien konzentrieren sich auf die Sputumdiagnostik und nicht auf die Diagnostik an Gewebeproben (Laga et al., 2014). Dies ist verständlich, da die konventionelle lichtmikroskopische Auswertung von Sputumproben mittels Ziehl-Neelsen-Färbung zur Detektion von Mykobakterien die meist verbreitete Testmethode weltweit darstellt, vor allem in Ländern mit limitierten Ressourcen, in denen die TB am weitesten verbreitet ist (World Health Organization (WHO), 2011).

Die Ziehl-Neelsen-Färbung in Bezug auf Sputumproben weist eine relativ hohe Spezifität zur Detektion säurefester Stäbchen auf, hat aber eine sehr variable Sensitivität (20 – 80 %), die besonders bei Patienten mit einer extrapulmonalen TB oder einer HIV-Infektion, noch weiter reduziert ist (World Health Organization (WHO), 2011).

Die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie mittels Auramin-Färbung ist den früheren Studien zufolge sensitiver als die Ziehl-Neelsen-Färbung. Der Nachteil der Fluoreszenzmikroskopie lag jedoch zum einen an den hohen Anschaffungs- und Instandhaltungskosten der Quecksilberdampflampen als Lichtquelle und zum anderen auch daran, dass für die Arbeit mit dem konventionellen Fluoreszenzmikroskop ein abgedunkelter Raum erforderlich ist. Daher war die Fluoreszenzmikroskopie weniger verbreitet, insbesondere in den Entwicklungsländern, wo die Tuberkulose hauptsächlich vorkommt. Durch die Entwicklung der Lichtdioden als Lichtquelle konnten die hohen Anschaffungskosten gesenkt werden. Die LED-Fluoreszenzmikroskopie benötigt weniger Strom und kann sogar batteriebetrieben angewandt werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass sie nicht im Dunkelraum bedient werden muss, sondern auch bei Tageslicht gute Ergebnisse liefern kann (World Health Organization (WHO), 2011).

Im Zuge der Kostenreduktion der FM wurden mehrere Studien durchgeführt, die 2009 in einem systematischen Review zusammenfassend analysiert wurden, und auf deren Ergebnissen basierend die WHO eine neue Grundsatzerklärung (World Health Organization (WHO), 2011) mit Empfehlung zur Verwendung der Auramin-Färbung veröffentlichte.

Im Review wurden 12 Studien in Bezug auf Sputumproben zusammenfassend analysiert, dabei galt die mikrobiologische Kultur als Referenzmethode. Die Sensitivität der LED-FM (mit Auramin-Färbung) betrug 84 %, die Spezifität sogar 98 %. Im Vergleich zur Ziehl-Neelsen-Färbung ergab sich eine statistisch signifikant höhere Sensitivität von 6 %. Dabei wurde auch analysiert, dass für die Mikroskopie der Auramin-Färbung gut die Hälfte der Zeit gebraucht wurde, wie für die Ziehl-Neelsen-Färbung (World Health Organization (WHO), 2011). Eine Studie (Bhalla et al., 2013) in Indien beschrieb sogar eine bis zu dreimal schnellere Auswertung der LED-FM im Gegensatz zur Lichtmikroskopie (LM) (2 min für eine negative Probe in der LED-FM vs. 5 min in der LM). Dies lässt sich zum einen durch die Wahl des Vergrößerungs-Objektives als auch durch die Beleuchtung erklären.

Im Jahre 2011 wurde in Amerika eine Umfrage mit 21 Fragen an 1299 Pathologen gesendet, in der es u.a. um den Wissensstand der Pathologen, den Zeitaufwand und auch den diagnostischen Algorithmus in der Detektion von Mykobakteriosen ging. Hieraus ergab sich, dass die meisten der 392 teilnehmenden Pathologen die Ziehl-Neelsen-Färbung mit einer 40fachen Objektiv-Vergrößerung durchmusterterten und dass hiervon ungefähr die Hälfte der Teilnehmer eine Konfirmation der Bakterien mit einer 100fachen Objektiv-Vergrößerung unter Öl-Immersion anschloss. Nur 14,2 % der teilnehmenden Pathologen verwendeten eine zusätzliche FM mittels Auramin-Färbung. Durchschnittlich gaben die meisten der Teilnehmenden an in etwa 10 bis 15 min für die Durchmusterung eines Ziehl-Neelsen-Schnittes in 40facher Vergrößerung zu brauchen (Wu et al., 2012).

Auch in der vorliegenden Studie bezüglich der gewebebasierten Mykobakteriose-Analyse wurde die Durchmusterung der Ziehl-Neelsen-Färbung vornehmlich in der 40fachen Objektiv-Vergrößerung durchgeführt. Unserer Erfahrung nach kann man die Auramin-Färbung allerdings bereits in einer 10-20fachen Objektiv-Vergrößerung im Dunkelfeld durchmustern, da die fluoreszierenden Bakterien vor dem dunklen Hintergrund besser sichtbar sind. Es gelingt also eine schnellere Durchmusterung, da die Vergrößerung kleiner ist und infolgedessen entsteht ein zeitlich relevanter Vorteil mit folglich Kostenreduktion.

Im Allgemeinen zeigt sich bei den histochemischen Färbungen von Gewebeproben eine geringere Sensitivität für die Ziehl-Neelsen-Färbung als bei den Sputumproben. In einer

Studie aus Korea lag sie bei gerade einmal 32,5 % (Kim et al., 2015), in einer weiteren Studie aus Thailand lag sie bei 31,29 % (Mahaisavariya et al., 2005) und auch in unserer Studie bestätigt sich eine niedrigere Sensitivität (Ziehl-Neelsen-Färbung 26,6 % und Auramin-Färbung 53,8 %) im Vergleich zu den Sputum-basierten Studien (Tab. 4).

Dies kann daran liegen, dass im histologischen Schnitt wesentlich mehr und kompakter gelagerte, ineinander verwobene Gewebetypen mit unterschiedlichen farblichen Verhalten zu finden sind, die die sehr kleinen rot gefärbten Bakterien überdecken. Unserer eigenen Erfahrung nach lässt sich zum Beispiel kollagenfaseriges Bindegewebe häufiger durch die Ziehl-Neelsen-Färbung rot anfärben; hierdurch werden die ebenfalls rot gefärbten zarten säurefesten Bakterien gegebenenfalls überdeckt.

Allerdings handelt es sich unserer Recherche nach hierbei um die erste Studie, auch in Bezug auf die Größe des Kollektivs, die sich mit der Sensitivität und Spezifität der histochemischen Mykobakterien-Diagnostik (Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung) an formalinfixiertem, paraffineingebetteten Gewebeproben vor den molekularpathologischen Nachweismethoden am selben Gewebe als Referenzstandard befasst.

Ob eventuell eine reduzierte Sensitivität der Ziehl-Neelsen-Färbung auch an Gewebeproben bei HIV-Infizierten Patienten vorliegt, kann hier nicht mehr differenziert werden, da retrospektiv die Daten zur HIV-Erkrankung nicht mehr vollständig erhoben werden konnten. Nachweislich wurde lediglich bei 3,4 % (40 von 1173 Fällen) der Patienten retrospektiv die Diagnose einer HIV-Erkrankung gesichert.

4.3 Vergleiche bezüglich Zeiteffizienz und Kostenaufwand

4.3.1 Mikroskopie

Der mikroskopische Nachweis von Mykobakterien gelingt schnell (innerhalb von Minuten) und ist aktuell das kostengünstigste Verfahren in der Detektion der Mykobakteriose. Die Sachkosten laut Gebührenordnung für Ärzte (GOÄ) sind für eine Auramin-Färbung nach einfachem Satz mehr als doppelt so teuer wie für eine Ziehl-Neelsen-Färbung (Hermanns et al., 2018). Der Einheitliche Bewertungsmaßstab gibt allerdings einheitliche Preise von ca. 5 € für Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbungen an (Kassenärztliche

Bundesvereinigung (KBV), 2017). Hinzu kommen hier nur die Anschaffungs- und Wartungskosten von Licht- und Fluoreszenzmikroskopen. Das Aufstellen eines Mikroskops ist in jedem Raum möglich, wohingegen für die Durchführung von NAT oder das Anlegen einer mikrobiologischen Kultur speziell ausgestattete Labore vonnöten sind.

In Bezug auf Hochinzidenzländer ist die Mikroskopie sicherlich die kostengünstigste und einfachste Methode der Diagnosestellung. Vor allem dort, aber auch in Niedriginzidenzländern wie Deutschland, empfiehlt es sich bei nicht vorhandener molekularpathologischer Diagnostik die konventionelle Lichtmikroskopie mit der Fluoreszenzmikroskopie zu kombinieren, um eine größere Gesamt-Sensitivität und Gesamt-Spezifität zu erhalten. So führte die Kombination der beiden Färbetechniken in einer Studie (Hooja et al., 2011) zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Sensitivität von 27,4 %, bei einer kombinierten Spezifität von 99,2 %.

Auch in der Studiauswertung unseres Kollektives B ergaben sich für die kombinierte Sensitivität und Spezifität beider Färbetechniken höhere Werte: Die Kombination der beiden Färbetechniken führte für den Primärbefunder zu einer Gesamt-Sensitivität von 50,8 %. Dies bedeutet eine Steigerung der histochemischen Sensitivität gegenüber der alleinigen Ziehl-Neelsen-Färbung um > 20 % bei zu vernachlässigender Reduzierung der Spezifität. Für den Sekundärbefunder zeigten sich ähnliche Ergebnisse (Tab. 11).

Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass in der histomorphologischen Diagnostik einer Mykobakteriose die alleinige Ziehl-Neelsen-Färbung unzureichend ist und zwingend durch eine Auramin-Färbung ergänzt werden muss, um eine höhere kombinierte Sensitivität zu erreichen. Dies bestätigt auch eine Studie aus dem Jahre 2013, welche darlegt, dass eine additive Ziehl-Neelsen-Färbung bei bereits durchgeführter positiver Auramin-Färbung keine zusätzliche Information bietet (den Hertog et al., 2013).

4.3.2 Nukleinsäure-Amplifikations-Technik

In Niedriginzidenzländern wie Deutschland, die gleichzeitig auch noch zu den Industriestaaten gehören und über das entsprechende Budget verfügen, mag es sinnvoller erscheinen, zumindest in Bezug auf Sputumproben, sich mehr auf die molekularpathologi-

sche Diagnostik zu verlassen, da hier sowohl Sensitivität, als auch Spezifität sehr hoch ausfallen und für mikroskopisch positive Proben im Allgemeinen 100 % betragen (Loddenkemper et al., 2017). Jedoch fallen die Sensitivität und Spezifität bei mikroskopisch negativen Sputumproben geringer (80 - 90 %) aus, sodass eine TB durch ein molekularpathologisch negatives Ergebnis nicht sicher ausgeschlossen werden kann (Ling et al., 2008). Auch in dieser Studie, die sich nur mit Gewebeproben befasst, ließ sich unter Hinzunahme mikrobiologischer Diagnostik beweisen, dass die NAT keine 100 %ige Sensitivität in der Detektion der Mykobakteriosen aufweist. Bei den molekularpathologisch negativen Fällen lag die falsch negative Fallzahl bei 4,1 % (18 von 441 Fällen). Eine falschpositive Fallzahl ließ sich jedoch nicht nachweisen bei NAT als Referenzstandard.

Ursachen hierfür sind vielfältig, zum einen kann ein sogenannter Sampling Error vorliegen, d.h., dass im zur Extraktion verwendeten Schnitt zufälligerweise keine Bakterien miterfasst sind, zum anderen kann es zu methodischen Problemen bei der Gewinnung der Bakterien-DNA durch mechanische Zerkleinerung oder enzymatische Aufschlüsselung kommen. Zudem kann es bei einer inadäquaten Fixation des Schnittes zu einer Denaturierung der DNA durch Autolyse kommen. Von uns häufiger beobachtet, in Bezug auf das „Myco Direct 1.7“ Kit (Fa. Chipron), kam es beim Auslesen des Farbumschlages durch den Scanner zu grenzwertigen Befunden, die schließlich nach Rücksprache, in Zusammenschau der histologischen und histochemischen Ergebnisse, als negativ oder positiv gewertet wurden.

Insgesamt sind NAT relativ sensitiv und auch spezifisch, allerdings sind sie weitaus zeitaufwändiger und auch kostspieliger als mikroskopische Nachweisverfahren. Die PCR allein wird in der Gebührenordnung für Ärzte preislich mit 34,51 € angegeben (Sachkosten alleine: 15,30 €) (Hermanns et al., 2018). Hinzu kommt die labortechnische Ausstattung, die vonnöten ist, um diese durchzuführen. Im Hinblick auf ein optimales und auch zeitnahes Ergebnis mit maximaler Sicherheit für eine richtige Diagnose einer Mykobakteriose empfiehlt es sich eine Kombination von HE-, Ziehl-Neelsen-, Auramin-Färbung und NAT durchzuführen.

4.3.3 Kultur

Zwar gilt die Kultur derzeit als Goldstandard in der Diagnostik der Tuberkulose, jedoch ist auch hier bekannt, dass sie keine 100 %ige Sensitivität aufweist und auch falsch-negative Ergebnisse auftreten können (Walter et al., 1999, zitiert in Ling et al., 2008). Weitere Nachteile sind die lange Zeitspanne (2 - 8 Wochen) bis zur Auswertung der Ergebnisse und, dass das Anlegen einer Kultur ein gut ausgestattetes Labor, inklusive fachlich kompetent ausgebildetem Personal, sowie ein effizientes Transportsystem, welches das Überleben der Mykobakterien garantiert, benötigt (World Health Organization (WHO), 2016). In Deutschland ist lediglich der Zeitfaktor von Bedeutung. Zwar wird auch hier darauf geachtet, möglichst kosteneffizient und wirtschaftlich zu arbeiten, allerdings stellen letztgenannte Nachteile, die bei einer schlechter aufgestellten Infrastruktur in den Entwicklungsländern problematisch werden können, hier ein geringeres Problem dar.

Das Fehlen eines absoluten Goldstandards in der TB-Diagnostik stellt eines der größten Hindernisse in der Evaluation und Erforschung neuerer diagnostischer Verfahren dar, besonders in Bezug auf HIV-infizierte Personen und paucibacilläre (geringe Bakterienanzahl) Erkrankungen (z. B. extrapulmonale TBs und pädiatrische TB Erkrankungen). Es kann sein, dass die wirkliche Genauigkeit der NAT höher ist als bisher beschrieben, wenn ein imperfekter Referenzstandard verwendet wurde (Walter et al., 1999, zitiert in Ling et al., 2008).

4.4 Nichttuberkulöse Mykobakterien

„Mehrfach wurde vermutet, dass die Inzidenz der nichttuberkulösen Mykobakteriosen weltweit langfristig zugenommen habe“ (Prevots und Marras, 2015, zitiert in Loddenkemper et al., 2017). Die älter werdende Bevölkerung vor allem in der westlichen Welt scheint dafür verantwortlich zu sein, da pulmonal prädisponierende Grunderkrankungen - „Terrainfaktoren“ nach Forschbach (Forschbach, 1975, zitiert in Schönfeld et al., 2013; Loddenkemper et al., 2017) - wie zum Beispiel die COPD, Bronchiektasen und fibrosierende Lungenerkrankungen im Alter zunehmen (Loddenkemper et al., 2017). Eine Studie aus dem Jahr 2014 stellte fest, dass Patienten, die älter als 65 Jahre waren oder

bereits eine früher therapierte TB hatten, eine höhere Wahrscheinlichkeit aufwiesen mit NTM infiziert zu sein (Kim et al., 2014).

Hingegen war die Altersverteilung im unserem Kollektiv der NTM (n = 66) relativ gleichmäßig. Eine vermehrte Inzidenz bei den über 65-jährigen ließ sich nicht feststellen. Jedoch ist, wie bereits oben schon erwähnt, die Fallzahl des Kollektivs sehr klein, sodass sich keine stichfesten Rückschlüsse auf die Verteilung der NTM in Deutschland ziehen lassen. Wie hoch die dortige Dunkelziffer ist, kann nur gemutmaßt werden, da es für die NTM im Gegensatz zur TB, wegen der fehlenden Übertragbarkeit von Mensch zu Mensch, laut Infektionsschutzgesetz (IfSG) keine gesetzliche Meldepflicht und auch keine systematische Surveillance gibt (Ewig et al., 2016; Schönfeld et al., 2013).

4.5 Ausblick und Fazit

Die Weltgesundheitsorganisation hat sich in ihrer „The End TB Strategy“ das ehrgeizige Ziel gesetzt, die Tuberkuloseepidemie bis 2035 zu beenden (World Health Organization (WHO), 2015). Angestrebt wird hierzu eine globale Inzidenz von < 10 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern (World Health Organization (WHO), 2015, zitiert in Loddenkemper et al., 2017). Um dieses Ziel so schnell wie möglich zu erreichen, bedarf es auch in Deutschland einer optimalen Diagnostik, Therapie und Prävention in einem möglichst breiten Umfeld.

Die Mikroskopie ist auch hier immer noch das kostengünstigste und schnellste Verfahren in der Diagnostik der Mykobakterien. Dabei hat diese Studie einmal mehr gezeigt, dass die Auramin-Färbung der Ziehl-Neelsen-Färbung auch bei Gewebeproben in Bezug auf die Sensitivität deutlich überlegen war, jedoch andersherum die Ziehl-Neelsen-Färbung eine leicht höhere Spezifität als die Auramin-Färbung aufwies (NAT als Referenzstandard). Zusätzlich konnte die Auramin-Färbung etwas schneller ausgewertet werden, was eine Zeitreduktion und folglich eine Kostenreduktion mit sich bringt.

Bei imperfektem Referenzstandard (falsch negative Fallzahl der NAT 4,1 % bei Kultur als Referenzstandard) zeigt sich einmal mehr, dass eine Kombination der Färbungen mit NAT die schnellstmögliche und sicherste Möglichkeit einer schnellen Diagnostik der My-

kobakterien darstellt. Die mikrobiologische Kultur ist zwar nach wie vor der absolute Goldstandard in der Diagnostik der Mykobakterien, dauert jedoch bei einer akuten klinischen Symptomatik einfach zu lange, bis zum notwendigen Therapiebeginn.

5. Zusammenfassung

Einleitung: Die Tuberkulose gehört nach wie vor zu den häufigsten Infektionskrankheiten weltweit und ist auch in Deutschland im Zuge der Flüchtlingswelle wieder aktuell.

Zielsetzung: Trotz inzwischen zahlreicher Publikationen bezüglich der Sensitivität und Spezifität der Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung in der Detektion der Mykobakterien am Sputum-Material gibt es weltweit noch keine entsprechende systematische vergleichende Untersuchung am Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebe in der Pathologie. Die vorliegende Arbeit möchte diese Lücke schließen.

Patienten und Methoden: Anhand eines Patientenkollektivs von insgesamt 1234 Patienten im fortlaufenden Routineeingang zwischen 2000 – 2017 des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn mit einem histomorphologischen Verdacht auf eine Mykobakteriose wurden die Sensitivität, Spezifität und Kosteneffektivität der histochemischen Färbemethoden (HE-, Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung) bei molekularpathologischen Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken als Referenzstandard ermittelt. Die Patienten wurden in verschiedene Kollektive eingeteilt: A = 1173 Fälle mit molekularpathologischen Ergebnissen, B = 681 Fälle mit vollständiger Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung entweder des Primär- oder Sekundärbefunders mit weiterer Unterteilung in Teilkollektive und C = 150 Fälle der Kinder- und Jugendlichen.

Ergebnisse: Die Auramin-Färbung hatte in allen Kollektiven (A-C) eine bedeutend höhere Sensitivität als die Ziehl-Neelsen-Färbung (42,9 - 57,9 % vs. 21,4 - 27,9 %). Die Ziehl-Neelsen-Färbung hatte eine leicht höhere Spezifität als die Auramin-Färbung (91,7 - 94,6 % vs. 79,2 - 89,1 %). Innerhalb des Kollektives B war die Sensitivität des Sekundärbefunders sogar um 13 % höher als die des Primärbefunders (65,2 % vs. 52,2 %). Hier lagen zudem unter den 48 (10,9 %) molekularpathologisch negativen Fällen zu 18 Fällen weitere mikrobiologische Untersuchungsergebnisse vor, die trotz negativer molekularpathologischer Diagnostik, ebenfalls zu positiven Ergebnissen kamen (falsch negative Rate der NAT 4,1 %).

Die Kombination der beiden Färbetechniken führte zu einer Gesamt-Sensitivität von 50,8 % bei einer Spezifität von 87,1 %. Hier ergab sich eine Erhöhung der Sensitivität im Gegensatz zur alleinigen Sensitivität der Ziehl-Neelsen-Färbung von 23,1 % bei zu vernachlässigender Verringerung der Spezifität.

Fazit

- 1) Die konventionell-histologische Diagnostik ist nach wie vor das kostengünstigste und schnellste Verfahren in der Diagnostik einer Mykobakterieninfektion.
- 2) Die Sensitivität der Auramin-Färbung bezüglich der Mykobakteriose-Diagnostik ist doppelt so hoch wie die der Ziehl-Neelsen-Färbung.
- 3) Die Auswertung der Auramin-Färbung führt zu einer Zeitreduktion und damit einhergehend zu einer Erhöhung der Arbeitseffizienz und folglich Kostenreduktion.
- 4) Die Sensitivität der Auramin-Färbung war durch den Sekundärbefunder signifikant höher (13 %).
- 5) Die Nukleinsäureamplifikationstechniken an paraffin-eingebetteten Gewebeproben haben keine 100 %ige Sensitivität in der Detektion der Mykobakteriosen (falsch negative Fallzahl mindestens 4,1 %).
- 6) Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Auramin-Schnitte kann bei entsprechender Lagerung der Schnitte selbst nach 17 Jahren noch funktionieren.
- 7) Bei den molekularpathologisch positiven TB-Fällen lag in 59,3 % der Fälle eine epitheloidzellig-granulomatöse Entzündung mit Nekrosen vor.
- 8) Unter den Kindern und Jugendlichen gelangten signifikant mehr Lymphknoten als Proben aus anderen Organen zur Untersuchung. Es bestand kein signifikanter Unterschied zur diagnostischen Sensitivität und Spezifität der Erwachsenen.

6. Anhang

6.1 Nichttuberkulöse Mykobakterien - Gruppeneinteilung nach Runyon

Tab. 18: NTM Systematik nach Runyon entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit und Pigmentbildung bei Belichtung (Mulisch und Welsch, 2015)

Gruppe	Charakteristika	Spezies
I	Photochromogene (Pigmentbildung nur im Licht) langsamwachsende	<i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. asiaticum</i> , <i>M. simiae</i>
II	Skotochromogene (auch im Dunkeln Pigmentbildende) langsamwachsende	<i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. szulgae</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. szulgae</i> , <i>M. flavescens</i>
III	Nichtpigmentierte langsamwachsende	<i>Mycobacterium avium</i> -Komplex (MAC): <i>Mycobacterium avium</i> und <i>Mycobacterium intracellulare</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. malmoeense</i>
IV	schnellwachsende	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i>

6.2 Erläuterungen der Filter

Filtersystem A: (dapi) 4',6-Diamidin-2-phenylindol, kurz DAPI, ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in der Fluoreszenzmikroskopie zur Markierung von DNA eingesetzt wird.

Excitation: Bandpass 340 - 380

Dichroic: 400

Emission: Langpass 425 Emission

Filtersystem H3: (gfp)

Excitation: Bandpass 420 - 490

Dichroic: 510

Emission: Langpass 515

Filtersystem N2.1: (Auramin-Rhodamin-Färbung)

Excitation: Bandpass 515 - 560

Dichroic: 580

Emission: Langpass 590

6.3 HE - Färbeprotokoll

Hämatoxylin-Eosin (Multistainer TST 44 -Färbeautomat) mod. Krischer 19.07.2013

Maschinenfärbung Raum 204

1) Xylol	2 min
2) Xylol	2 min
3) Xylol	2 min
4) 100 % Alk.	1 min
5) 100 % Alk.	1 min
6) 96 % Alk.	1 min
7) 96 % Alk.	1 min
8) 70 % Alk.	1 min
9) Aqua dest	1 min
10) Aqua dest	1 min
11) Haemalaun	2 min 30 sec
12) Haemalaun	2 min 30 sec
13) Wasser	3 min
14) Eosin 1 %	4 min
15) Eosin 1 %	4 min
16) Wasser	1 min
17) 70 % Alk.	1 min
18) 96 % Alk.	1 min
19) 96 % Alk.	1 min
20) 100 % Alk.	1 min
21) 100 % Alk.	1 min
22) Xylol	1 min
23) Xylol	1 min

Haemalaun, sauer nach Mayer: Chroma 2E-038 (fertige Lösung)

Eosin Y: Merck 15935 (25 g + 2500 ml Aqua dest.) in heller Flasche ansetzen. Muss bei Tageslicht reifen. Ansatz R. 211

6.4 Ziehl-Neelsen-Färbung modifiziert nach Fite - Färbeprotokoll

Handfärbung R. 204

- 1) 25 ml Erdnussöl + 50 ml Xylol 2x12 min
- 2) Lufttrocknen
- 3) Filtriertes Karbolfuchsin 30 min
- 4) Wasser abspülen
- 5) HCL-Alk. 1 % entfärben bis schwach rosa 1-2 min
- 6) Wasser abspülen
- 7) Filtriertes Methylenblau 30 sec
- 8) Wasser abspülen
- 9) Lufttrocknen
- 10) Eindecken mit Pertex

Ergebnis: Säurefeste Stäbchen rot, Hintergrund hellblau

Karbolfuchsin: Ziehl-Neelsens Karbolfuchsin Fa. Merck (fertige Lösung)

Ansatz R. 211: Methylenblau-Lösung 0,5 g Methylenblau (Merck)
 100 ml 0,5 %ige Essigsäure

6.5 Auramin - Färbeprotokoll

Handfärbung R. 204

Fertiger Kit von Merck

TB-fluor phenolfrei

Ergebnis: Die TB-Bakterien erscheinen im Fluoreszenzmikroskop leuchtend gelb.

6.6 Molekularpathologische Methoden

6.6.1 Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis*

1.0 Extraktionsprotokoll

1. Tag

- 6x 10 µm dicke Schnitte auf Objektträger ziehen
- über Nacht bei 60° C Paraffin abtropfen lassen
- 2x 15 Min. Xylol

- 2x 15 Min. 100 % Alkohol
- 96 % Alkohol
- 70 % Alkohol
- 50 % Alkohol
- Aqua dest
- Material vom Objektträger kratzen und in ein Eppendorfhütchen überführen
- 180 µl Lysepuffer:
 - Zusammensetzung für 1 ml : 100 µl 200 mM Tris/HCl pH 8,0
 - + 100 µl 20mM EDTA
 - + 680 µl H₂O
 - + 120 µl Triton X 100
 - + Messerspitze Lysozym
- 1h bei 37°C inkubieren
- 200 µl AL-Puffer hinzu, vortexen
- 25 µl Proteinase K, vortexen
- über Nacht bei 56°C inkubieren

2. Tag

- 15 Min. bei 70°C inkubieren
- 15 Min. bei 95°C inkubieren
- kurz runterzentrifugieren und in neues Eppi überführen, wenn nicht alles gelöst ist
- 210 µl Ethanol dazugeben, vorsichtig mischen
- QIAamp spin column vorbereiten und alles hinein pipettieren
- 1 Min. bei 8000 U/min. zentrifugieren
- Filtrat verwerfen
- 500 µl AW1-Puffer hinzu
- 1 Min. bei 8000 U/Min. zentrifugieren
- Filtrat verwerfen
- 500 µl AW2-Puffer hinzu
- 1 Min. bei 8000 U/Min. zentrifugieren
- 5 Min. bei 13000 U/Min. zentrifugieren

- QIAamp spin column in ein sauberes Eppendorf-Hütchen setzen
- 200 µl 70°C heißes Tris (10mM, pH 7,6) hinzu
- 10 Min. bei 70°C inkubieren
- 1 Min. bei 8000 U/Min. zentrifugieren
- 10 µl der so gewonnenen DNA mit 5 µl 6x Loading Buffer für die Gel-Elektrophorese (1 %ige Agarose) einsetzen; Elektrophorese läuft bei 80 Volt ca. 45 Min.

2.0 PCR

2.1 Primersequenzen

F: 5'- ctcgtccagcgccgcttcgg- 3'

R: 5'- ctgcgagcgtaggcgtcgg- 3'

Insertionselement IS6110

Zugriffs-Nr.: M29899

Fragmentgröße 123 bp

2.2 Zusammensetzung PCR-Ansatz

Die Template-Menge wird nach Elektrophorese im 1 % Agarosegel abgeschätzt. Die Menge an DNA-Schmier, die gerade noch sichtbar ist, wird für eine PCR eingesetzt. In Abhängigkeit von der eingesetzten Template-Menge wird der Ansatz mit A.dest auf 50 µl aufgefüllt.

Anwendung	Volumen (µl)	dNTP (µM)	Primer (µM)	Taq-Pol. (U)	MgCl ₂ (mM)	Enzymhersteller
Tbc	50	DIG	0,4	1	1,5	Roche

DIG = PCR DIG labeling Mix (Roche), 5 µl / 50 µl # 1585550

Alternativ kann die PCR auch mit dem Hot-Start Enzym von Invitrogen durchgeführt werden.

2.3 PCR-Programm

Anwendung	1. Denat.	Denat.	Annealing	Ext.	Letzte Extension	Zykl.
Tbc	94°C, 5'	94°C, 1'	60°C, 1'	72°C, 1'	72°C, 10'	35

Die Annealing-Temperatur ist für das PCR-Gerät 2720 Thermal Cycler von Applied Biosystems optimiert.

3.0 PCR-ELISA

3.1 Durchführung

Wird durchgeführt nach der Anleitung im Manual des Kits

Kit: Roche: PCR ELISA (DIG detection) 192 Rkt. # 1636111

Hybridisierungsbedingungen: 37°C, 1-3 h

Sondenkonzentration: 7,5 pmol/ml

3.2 Sondensequenz

Hybridisierungssonde für den PCR-ELISA

Sonde ist 5' biotinmarkiert

5'- ccggctgtgggtagcagacctcac – 3'

6.6.2 Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken der atypischen Mykobakterien

<u>1.PCR:</u>	Gesamtvolumen: 50µl	Bandengröße: 439 bp
5µl	10xPuffer ohne MgCl ₂ (Invitrogen)	
1,5 µM	MgCl ₂	
100 µM	dNTP	
1µl	Primer Tb 11 (10 pmol/µl)	

1 µl	Primer Tb 12 (10 pmol/µl)
1 U	PlatinumTaq (Invitrogen)
x µl	Template-DNA (nach Gelabschätzung)
	A.dest ad 50 µl

2.PCR: Gesamtvolumen: 50 µl Bandengröße: 294 bp

1 µl	PCR-Produkt aus erster PCR
5 µl	10xPuffer ohne MgCl ₂
1,5 µM	MgCl ₂
100 µM	dNTP
1 µl	Primer hsp1 (10 pmol/µl)
1 µl	Primer hsp2 (10 pmol/µl)
1U	PlatinumTaq
	A.dest ad 50 µl

6.6.2.1 PCR-Bedingungen 1. PCR

94°C	2`	
94°C	30 sec	
60°C	30 sec	= 40 Zyklen
72°C	1`	
72°C	6`	

6.6.2.2 PCR-Bedingungen 2. PCR

94°C	2`	
94°C	30 sec	
64°C	30 sec	= 45 Zyklen
72°C	1`	
72°C	6`	

Das PCR-Produkt wird zum Überprüfen der Spezifität und zur Typisierung sequenziert.

Primer:

Tb11: 5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3'

Tb12: 5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3'

HSP1: 5'-GCC AAG AAG ACC GAY GAC GT-3'

HSP2: 5'-GGT GAT GAC GCC CTC GTT GC-3'

6.7 Kollektiv A

Tab. 19 Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder für molekularpathologisch negative Fälle (n = 822)

		Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder			Gesamt
		keine Färbung	negativ	positiv	
Ziehl-Neelsen Primärbefunder	keine Färbung	211	71	2	284
	negativ	213	284	5	502
	positiv	12	8	16	36
Gesamt		436	363	23	822

Molekularpathologie negativ getestet

Tab. 20 Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder für molekularpathologisch positive Fälle (n = 351)

		Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder			Gesamt
		keine Färbung	negativ	positiv	
Ziehl-Neelsen- Primärbefunder	keine Färbung	29	26	4	59
	negativ	77	123	11	211
	positiv	29	12	40	81
Gesamt		135	161	55	351

Molekularpathologie positiv getestet

Tab. 21 Auramin Primärbefunder vs. Auramin Sekundärbefunder für molekularpathologisch negative Fälle (n = 822)

		Auramin Sekundärbefunder			Gesamt
		keine Färbung	negativ	positiv	
Auramin Primärbefunder	keine Färbung	372	91	5	468
	negativ	69	231	8	308
	positiv	6	6	34	46
Gesamt		447	328	47	822
Molekularpathologie negativ getestet					

Tab. 22 Auramin Primärbefunder vs. Auramin Sekundärbefunder für molekularpathologisch positive Fälle (n = 351)

		Auramin Sekundärbefunder			Gesamt
		keine Färbung	negativ	positiv	
Auramin Primärbefunder	keine Färbung	106	34	20	160
	negativ	18	55	23	96
	positiv	11	2	82	95
Gesamt		135	91	125	351
Molekularpathologie positiv getestet					

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: TB-Fallzahlen in Deutschland 2001-2016 (Robert Koch Institut (RKI), 2016a) ..	15
Abb. 2: Tuberkulose-Inzidenz (Erkrankungen pro 100.000 Einwohner) nach Altersgruppe und Geschlecht (n = 5.904) (Robert Koch Institut (RKI), 2017).....	16
Abb. 3: Tuberkulose-Inzidenz (Erkrankungen pro 100.000 Einwohner) nach Altersgruppe und Staatsangehörigkeit (n = 5.332) (Robert Koch Institut (RKI), 2017)	17
Abb. 4: Anteil im Ausland geborener Personen unter den übermittelten Tuberkulose-Erkrankten – Vergleich der Jahre 2002–2016 (Robert Koch Institut (RKI), 2017)	18
Abb. 5 Patientenkollektiv	31
Abb. 6: Fallbeispiel 1 – TB bei Endometrium-Ca.: A&B: HE-Färbung; C: Ziehl-Neelsen-Färbung; D: Auramin-Färbung	40
Abb. 7: Fallbeispiel – TB bei AML, Lymphknoten: A&B: HE-Färbung; C: Ziehl-Neelsen-Färbung; D: Auramin-Färbung	41
Abb. 8: Fallbeispiel 3 – TB des Darmes DD Morbus Crohn: A&B: HE-Färbung; C&D: Ziehl-Neelsen-Färbung; E&F: Auramin-Färbung.....	42
Abb. 9: Fallbeispiel 4 – TB der Milz: A: HE-Färbung; B&C: Ziehl-Neelsen-Färbung; D-F: Auramin-Färbung	44
Abb. 10: Fallbeispiel 5 – <i>Mycobacterium avium</i> : A&B: HE-Färbung; C: Ziehl-Neelsen-Färbung; D: Auramin-Färbung	46
Abb. 11: Fallbeispiel 6 – <i>Mycobacterium celatum</i> : A: HE-Färbung; B: Ziehl-Neelsen-Färbung; C-F: Auramin-Färbung	47
Abb. 12: Nachweis der Beständigkeit der Färbungen: A&B: HE-Färbung; C: Ziehl-Neelsen-Färbung; D-F: Auramin-Färbung.....	49
Abb. 13: Fallzahlen von 2000 - 2017 (n = 1234)	50

Abb. 14: Molekularpathologische Ergebnisse nach Geschlechterverteilung (n = 1173).	51
Abb. 15: Geschlechterverteilung nach Altersgruppen; molekularpathologisch positive Fälle (n = 351).....	52
Abb. 16: Altersverteilung (n = 1173).....	53
Abb. 17: Geschlechterverteilung nach Alter (n = 1173).....	54
Abb. 18: Organverteilung der Gewebeproben (n = 1173)	55
Abb. 19: Organverteilung der Gewebeproben für molekularpathologisch positive Ergebnisse (n = 351).....	56
Abb. 20: Altersverteilung der NTM (n = 66).....	57
Abb. 21: Verteilung NTM (n = 66)	58
Abb. 22 Links: Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. molekularpathologisch negative Fälle (n = 822). Rechts: Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder vs. molekularpathologisch negative Fälle (n = 822).....	60
Abb. 23 Links: Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. molekularpathologisch positive Fälle (n = 351). Rechts: Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder vs. molekularpathologisch positive Fälle (n = 351).....	61
Abb. 24 Links: Auramin Primärbefunder vs. molekularpathologisch negative Fälle (n = 822). Rechts: Auramin Sekundärbefunder vs. molekularpathologisch negative Fälle (n = 822).....	62
Abb. 25 Links: Auramin Primärbefunder vs. molekularpathologisch positive Fälle (n = 351). Rechts: Auramin Sekundärbefunder vs. molekularpathologisch positive Fälle (n = 351).....	63
Abb. 26: Molekularpathologische Ergebnisse nach Geschlecht (n = 681)	65
Abb. 27: Diskrepanz Fall 1: A-D Lymphknoten 4 Wochen vor dem Tode (A&B: HE-Färbung; C&D: Auramin-Färbung) und E-H Obduktionsfall (E: HE-Färbung; F-H: Auramin-Färbung).....	76

Abb. 28: CT-Bild auf Höhe BWK 6	77
Abb. 29: Diskrepanz Fall 2: A&B: HE-Färbung, C&D: Ziehl-Neelsen-Färbung: negativ, E&F: Auramin-Färbung: positiv	79
Abb. 30: Altersverteilung Kinder- und Jugendliche (n = 150)	81
Abb. 31: Geschlechterverteilung Kinder- und Jugendliche nach Alter (n = 150)	82
Abb. 32: Molekularpathologische Ergebnisse nach Geschlecht bei Kindern- und Jugendlichen (n = 150).....	82
Abb. 33: Organverteilung der Gewebeproben bei Kindern- und Jugendlichen (n = 150)	83
Abb. 34: Organverteilung der Gewebeproben bei Kindern- und Jugendlichen für die molekularpathologisch positiven Fälle (n = 45)	84

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht <i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplex (nach Ewig et al., 2016).....	11
Tab. 2: Übersicht Fallkonstellationen Bildbeispiele	39
Tab. 3: HE-Diagnose vs. molekularpathologische Diagnose (n = 1173)	59
Tab. 4: Vergleichstabelle der Sensitivitäten und Spezifitäten der beiden Färbungen bei Molekularpathologie als Referenzstandard (Kollektiv A)	64
Tab. 5: Molekularpathologische Ergebnisse (n = 681)	64
Tab. 6: HE-Diagnose vs. Molekularpathologische Diagnose (n = 680)	66
Tab. 7: Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. Auramin Primärbefunder für molekularpathologisch negative Fälle (n = 342).....	68
Tab. 8: Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. Auramin Primärbefunder für molekularpathologisch positive Fälle (n = 183)	68
Tab. 9: Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder vs. Auramin Sekundärbefunder für molekularpathologisch negative Fälle (n = 371).....	69
Tab. 10: Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder vs. Auramin Sekundärbefunder für molekularpathologisch positive Fälle (n = 214)	70
Tab. 11: Kombinierte Sensitivität und Spezifität für Primär- und Sekundärbefunder (Kollektiv B).....	70
Tab. 12: Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder für molekularpathologisch negative Fälle (n = 302).....	71
Tab. 13: Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder für molekularpathologisch positive Fälle (n = 185)	71
Tab. 14: Auramin Primärbefunder vs. Auramin Sekundärbefunder für molekularpathologisch negative Fälle (n = 276).....	72

Tab. 15: Auramin P vs. Auramin S für molekularpathologisch positive Fälle (n = 161) ..	72
Tab. 16: Ziehl-Neelsen vs. Auramin für molekularpathologisch negative Fälle (n = 72).	85
Tab. 17: Ziehl-Neelsen vs. Auramin für molekularpathologische positive Fälle (n = 28)	85
Tab. 18: NTM Systematik nach Runyon entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit und Pigmentbildung bei Belichtung (Mulisch und Welsch, 2015)	97
Tab. 19 Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder für molekularpathologisch negative Fälle (n = 822)	104
Tab. 20 Ziehl-Neelsen Primärbefunder vs. Ziehl-Neelsen Sekundärbefunder für molekularpathologisch positive Fälle (n = 351)	104
Tab. 21 Auramin Primärbefunder vs. Auramin Sekundärbefunder für molekularpathologisch negative Fälle (n = 822)	105
Tab. 22 Auramin Primärbefunder vs. Auramin Sekundärbefunder für molekularpathologisch positive Fälle (n = 351)	105

9. Literaturverzeichnis

Bancroft JD, Gamble M. Theory and practice of histological techniques. Philadelphia, Pa.: Churchill Livingstone Elsevier. 2008

Bhalla M, Sidiq Z, Sharma PP, Singhal R, Myneedu VP, Sarin R. Performance of light-emitting diode fluorescence microscope for diagnosis of tuberculosis. *International journal of mycobacteriology*. 2013. 2: 174–178

Chan ED, Iseman MD. Underlying Host Risk Factors for Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2013. 34: 110–123

Chandler M. Insertion Sequence. In: Brenner S, Miller JH, Broughton WJ, Hrsg. *Encyclopedia of genetics*. San Diego: Academic Press, 2002: 1029–1037

Chang EW, Page A-L, Bonnet M. Light-emitting diode fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis. *The European respiratory journal*. 2016. 47: 929–937

Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respiratory medicine*. 2006. 100: 1862–1870

den Hertog AL, Daher S, Straetemans M, Scholing M, Anthony RM. No added value of performing Ziehl-Neelsen on auramine-positive samples for tuberculosis diagnostics. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2013. 17: 1094–1099

Diel R, Nienhaus A. Aktuelle Fragestellungen zum Tuberkulose-Screening mit Interferon-Gamma-Release Assays (IGRAs). *Pneumologie*. 2015. 69: 271–275

DIN Deutsches Institut für Normung e.V. 2011a. Medizinische Mikrobiologie - Tuberkulosedagnostik - Teil 3: Kulturelle Methoden zum Nachweis von Mykobakterien. DIN 58943-3. Verfügbar unter <https://www.beuth.de/de/norm/din-58943-3/136883527> (Zugriffsdatum: 15.11.2017)

DIN Deutsches Institut für Normung e.V. 2011b. Medizinische Mikrobiologie-Tuberkulosedagnostik-Teil 32: Mikroskopische Methoden zum Nachweis von Mykobak-

terien. DIN 58943-32. Verfügbar unter <https://www.beuth.de/de/norm/din-58943-32/136890205> (Zugriffsdatum: 15.11.2017)

Ewig S, Schaberg T, Rüscher-Gerdes S, Bollow M. Tuberkulose und nichttuberkulöse Mykobakterien. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag. 2016

Forschbach G. Nichttuberkulöse Infektionen durch Mycobakterien. Internist (Berl.). 1975: 393–400

Goodfellow SJ, Zomerdijs JCBM. Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. Sub-cellular biochemistry. 2013. 61: 211–236

Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, Reynolds CF von, Wallace RJ, Winthrop K. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. American journal of respiratory and critical care medicine. 2007. 175: 367–416

Groß U. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie [MEDI-LEARN-Gütesiegel]. Stuttgart: Thieme. 2009

Hauer B, Loddenkemper R, Detjen A, Forßbohm M, Haas W, Loytved G, Magdorf K, Mauch H, Nienhaus A, Rieder HL, Sagebiel D, Schaberg T. Interferon- γ -Tests in der Tuberkulose-Diagnostik - Aktueller Stand. Pneumologie. 2006. 61: 29–44

Hermanns PM, Schwartz E, Tiling T, Eisenkolb A, Hoffmann K-H. UV-GOÄ 2018 Kommentar. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 2018

Hooja S, Pal N, Malhotra B, Goyal S, Kumar V, Vyas L. Comparison of Ziehl Neelsen & Auramine O staining methods on direct and concentrated smears in clinical specimens. The Indian journal of tuberculosis. 2011. 58: 72–76

Huyen MNT, Tiemersma EW, Kremer K, Haas P de, Lan NTN, Buu TN, Sola C, Cobelens FGJ, van Soolingen D. Characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates lacking IS6110 in Viet Nam. The international journal of tuberculosis and lung dis-

ease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease. 2013. 17: 1479–1485

Infektionsschutzgesetz (IfSG). Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen. 2000

Infektionsschutzgesetz (IfSG). Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen. 2017

Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV). 2017. Einheitlicher Bewertungsmaßstab (EBM). Verfügbar unter http://www.kbv.de/html/themen_7177.php (Zugriffsdatum: 15.11.2017)

Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM, Haller O, Eckert J, Deplazes P, Voll M, Buscher-Ehrt S. Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie [Immunologie, Hygiene, Infektiologie, Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie]. Stuttgart: Thieme. 2010

Kendall BA, Winthrop KL. Update on the epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial infections. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2013. 34: 87–94

Kim YK, Hahn S, Uh Y, Im D-J, Lim YL, Choi HK, Kim HY. Comparable characteristics of tuberculous and non-tuberculous mycobacterial cavitary lung diseases. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2014. 18: 725–729

Kim YN, Kim KM, Choi HN, Lee JH, Park HS, Jang KY, Moon WS, Kang MJ, Lee DG, Chung MJ. Clinical Usefulness of PCR for Differential Diagnosis of Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infection in Paraffin-Embedded Lung Tissues. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2015. 17: 597–604

Laga AC, Milner DA, Granter SR. Utility of acid-fast staining for detection of mycobacteria in cutaneous granulomatous tissue reactions. *American journal of clinical pathology*. 2014. 141: 584–586

Leung E, Minion J, Benedetti A, Pai M, Menzies D. Microcolony culture techniques for tuberculosis diagnosis. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2012. 16: 16-23, i-iii

Li JY, Lo ST, Ng CS. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 2000. 9: 67–74

Li S, Liu B, Peng M, Chen M, Yin W, Tang H, Luo Y, Hu P, Ren H. Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF for tuberculosis detection in different regions with different endemic burden. *PloS one*. 2017. 12: e0180725

Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens. *PloS one*. 2008. 3: e1536

Loddenkemper R, Bauer TT, Diel R. *Tuberkulose aktuell*. München-Deisenhofen: Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle. 2017

LPSN. LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Verfügbar unter <http://www.bacterio.net/> (Zugriffsdatum: 15.11.2017)

Luca S, Mihaescu T. History of BCG Vaccine. *Maedica*. 2013. 8: 53–58

Mahaisavariya P, Chaiprasert A, Manonukul J, Khemngern S, Tingtoy N. Detection and identification of *Mycobacterium* species by polymerase chain reaction (PCR) from paraffin-embedded tissue compare to AFB staining in pathological sections. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2005. 88: 108–113

Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 1998. 62: 725–774

Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Hesselning AC, Obihara CC, Starke JJ, Enarson DA, Donald PR, Beyers N. The natural history of childhood intra-thoracic tuberculosis: a critical review of literature from the pre-chemotherapy era. *The international journal of tu-*

erculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease. 2004. 8: 392–402

Mulisch M, Welsch U. Romeis Mikroskopische Technik. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum. 2015

Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. Clinics in chest medicine. 2015. 36: 13–34

Richter E. Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätstandards. München: Elsevier, Urban & Fischer. 2010

Riede U-N. Allgemeine und spezielle Pathologie. Stuttgart: Thieme. 2004

Robert Koch Institut (RKI). Tuberkulose-Impfung in Deutschland? Welche Möglichkeiten gibt es, wenn die Impfung für einen Auslandsaufenthalt gefordert wird? Verfügbar unter <http://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/Tuberkulose/FAQ01.html> (Zugriffsdatum: 15.11.2017)

Robert Koch Institut (RKI). 2013. RKI - Infektionskrankheiten A-Z - Tuberkulose. Verfügbar unter <http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/T/Tuberkulose/Tuberkulose.html> (Zugriffsdatum: 27.07.2017)

Robert Koch Institut (RKI). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2016. Krankenhaus-Hygiene + Infektionsverhütung. 2016a. 38: 178–183

Robert Koch Institut (RKI). Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2016

Robert Koch-Institut (RKI). Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2015

Roychowdhury T, Mandal S, Bhattacharya A. Analysis of IS6110 insertion sites provide a glimpse into genome evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Scientific reports. 2015. 5: 12567

Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence microscopy. Cold Spring Harbor protocols. 2014. 2014: pdb.top071795

Sankar S, Kuppanan S, Balakrishnan B, Nandagopal B. Analysis of sequence diversity among IS6110 sequence of *Mycobacterium tuberculosis*. Bioinformation. 2011. 6: 283–285

Schaberg T, Bauer T. Empfehlungen zur Therapie, Chemoprävention und Chemoprophylaxe der Tuberkulose im Erwachsenen- und Kindesalter. Pneumologie. 2012: 133–171

Schönfeld N, Haas W, Richter E, Bauer TT, Bös L, Castell S, Hauer B, Magdorf K, Mattiessen W, Mauch H, Reuß A, Rüscher-Gerdes S, Zabel P, Dalhoff K, Schaberg T, Lodenkemper R. Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie nichttuberkulöser Mykobakterien des Deutschen Zentralkomitees zur Bekämpfung der Tuberkulose (DZK) und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP). Pneumologie. 2013. 67: 605–633

Schönlein JL. Allgemeine und spezielle Pathologie und Therapie: im Literatur-Comptoir. 1834

Seo AN, Park HJ, Lee HS, Park JO, Chang HE, Nam KH, Choe G, Park KU. Performance characteristics of nested polymerase chain reaction vs real-time polymerase chain reaction methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin-embedded human tissues. American journal of clinical pathology. 2014. 142: 384–390

Shapiro HM, Perlmutter NG. Killer applications. Cytometry. Part B, Clinical cytometry. 2008. 74 Suppl 1: S152-64

Sharma SK, Mohan A, Sharma A, Mitra DK. Miliary tuberculosis. The Lancet Infectious Diseases. 2005. 5: 415–430

Steensels D, Fauville-Dufaux M, Boie J, Beenhouwer H de. Failure of PCR-Based IS6110 analysis to detect vertebral spondylodiscitis caused by *Mycobacterium bovis*. Journal of clinical microbiology. 2013. 51: 366–368

van Ingen J, Wagner D. Epidemiologie der nichttuberkulösen mykobakteriellen Erkrankungen in Deutschland und weltweit. *Pneumologie*. 2011. 8: 396–403

Walter SD, Irwig L, Glasziou PP. Meta-analysis of diagnostic tests with imperfect reference standards. *Journal of clinical epidemiology*. 1999. 52: 943–951

World Health Organization (WHO). 2007. TB diagnostics and laboratory strengthening - WHO policy. Verfügbar unter http://www.who.int/tb/laboratory/policy_diagnosis_pulmonary_tb/en/ (Zugriffsdatum: 15.11.2017)

World Health Organization (WHO). Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis. Geneva: World Health Organization. 2011

World Health Organization (WHO). 2015. The End TB Strategy. Verfügbar unter http://www.who.int/tb/post2015_strategy/en/ (Zugriffsdatum: 15.11.2017)

World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2016. 2016

World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2017

Wu RI, Mark EJ, Hunt JL. Staining for acid-fast bacilli in surgical pathology. *Human pathology*. 2012. 43: 1845–1851

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank den folgenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Mein herzlicher Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Fischer, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit und die stets sehr gute und freundliche Zusammenarbeit.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Vater Herrn Prof. Dr. Hui Zhou, der mich ganz besonders bei der Anfertigung dieser Arbeit motiviert und unterstützt hat.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Rolf Fimmers für seine Unterstützung und Geduld bei der Betreuung der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich außerdem bei Herrn Dr. Molitor für den Beitrag zu den molekularbiologischen Daten dieser Arbeit und Frau Tondorf für die außerordentliche Hilfe beim Verstehen der molekularpathologischen Methoden.

Zudem möchte ich mich bei meinem Freund Willi Yu, meiner Freundin Eva Matuschek und meiner Familie bedanken, die mit Ihrer steten Unterstützung und hilfreichen Ratschlägen einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Sie haben mich in jedem Moment motiviert und konnten mich in den entscheidenden Arbeitsphasen wirkungsvoll unterstützen.