

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski

**Etablierung einer qualitativen Multiplex Real-Time PCR
zum Nachweis von Bakterien des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes
sowie von (nicht-tuberkulösen) *Mycobacterium* Spezies
auf dem BD MAX™ PCR-Vollautomaten**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Richard Werner Köhnke

geb. am 28.03.1987 in Osnabrück

aus Münster

Rostock, 10.08.2020

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski, Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Johann Christian Virchow, Rostock

3. Gutachterin: Prof. Dr. Katharina Riedel, Greifswald

Jahr der Einreichung: 2020

Datum der Verteidigung: 28. April 2021

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Mykobakterien	2
1.1.1. Mikrobiologische Charakteristika	2
1.1.2. Mycobacterium tuberculosis-Komplex (<i>MTC</i>)	3
1.1.3. Nicht-tuberkulöse Mykobakterien (<i>NTM</i>)	3
1.2. Tuberkulose	4
1.2.1. Geschichte	4
1.2.2. Epidemiologie.....	5
1.2.3. Klinik.....	5
1.2.4. Diagnostik.....	8
1.2.5. Hygiene.....	11
1.2.6. Therapie	11
1.3. Erkrankungen durch nicht-tuberkulöse Mykobakterien	13
1.3.1. Epidemiologie.....	13
1.3.2. Klinik.....	14
1.3.3. Diagnostik.....	15
1.3.4. Therapie	15
1.4. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	16
1.4.1. Methodische Grundprinzipien der PCR	16
1.4.2. Weiterentwicklung zur (Multiplex) Real-Time PCR	17
1.4.3. Messung und Auswertung einer Real-Time PCR	19
1.4.4. PCR-Automation	21
1.5. Anforderungen an Real-Time PCR-Verfahren in der Diagnostik	21
1.5.1. Qualitätssicherung diagnostischer PCRs	22
1.5.2. Methodenvalidierung.....	23
2. Zielsetzung der Arbeit	25
3. Materialien und Methoden	26
3.1. Geräte.....	26
3.1.1. BD MAX™	26
3.1.2. PlateMax™.....	28
3.2. Labormaterialien.....	29

3.3. Lösungen und Testreagenzien	29
3.3.1. Lösungen	29
3.3.2. DNA-Extraktionsgebinde	30
3.3.3. Arbeitsmix	32
3.3.4. Patientenmaterialien	34
3.3.5. Kulturmaterialeien.....	36
3.4. Ablauf der PCR-Etablierung.....	37
3.4.1. Vorversuche.....	38
3.4.2. Entwicklung.....	39
3.4.3. Validierung	39
3.5. Genereller Arbeitsablauf am PCR-Automaten	41
3.5.1. Phase 1: Testvorbereitung	41
3.5.2. Phase 2: Extraktion und PCR	42
4. Ergebnisse	46
4.1. Vorversuche	46
4.1.1. MTC-bezogene Vorversuche	47
4.1.2. NTM/Myspp.-bezogene Vorversuche	48
4.1.3. Besonderheiten der <i>M. abscessus</i> - und <i>M. chelonae</i> -Gruppe.....	48
4.1.4. Aliquotierung und Vorbereitungen am PlateMax™	48
4.2. Entwicklung der Multiplex PCR.....	49
4.3. Validierung	50
4.3.1. Sensitivität und Spezifität.....	50
4.3.2. Positiver und negativer prädiktiver Wert	51
4.3.3. Analytische Sensitivität	51
4.3.4. Kreuzreaktivität	52
4.3.5. Richtigkeit und Präzision	52
4.3.6. Matrixeffekt.....	55
5. Diskussion	57
5.1. Vergleich mit etablierten Methoden	58
5.1.1. Patientenmaterialien	62
5.1.2. Leistungsdaten.....	62
5.1.3. Beurteilung ausgewählter Ergebnisse.....	65
5.1.4. Arbeitsabläufe.....	66

5.1.5. Automation.....	67
5.1.6. Kosten.....	69
5.2. Aktuelle Entwicklungen in der Diagnostik von Mykobakterien	69
5.3. Relevanz und Ausblick	72
6. Zusammenfassung	73
7. Literaturverzeichnis.....	74
8. Abkürzungsverzeichnis	88
9. Tabellenverzeichnis.....	91
10. Abbildungsverzeichnis	93
11. Anhang	94
11.1. Thesen.....	94
11.2. Testung von Sensitivität und Richtigkeit.....	95
11.3. Testung von potenziell kreuzreaktiven Analyten	97
11.4. In-silico Analyse (BLASTn).....	99
12. Eidesstattliche Erklärung.....	115
13. Lebenslauf	116
14. Danksagung	117

1. Einleitung

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) beschreibt die Tuberkulose (TB, TBC) trotz aller bisheriger wissenschaftlichen und medizinischen Fortschritte noch immer als eine der bedeutendsten Gefahren für die Weltgesundheit [1]. Zur Bekämpfung der anhaltenden *Mycobacterium tuberculosis*-Epidemie verabschiedete die WHO im WHO Global Tuberculosis Report 2015 die End-TB-Strategy bis 2035 (als Nachfolger der Stop-TB-Kampagne im Rahmen der *Millennium-Development-Goals*) [2]. Dieser Plan beinhaltet u. a. die Entwicklung schneller molekularbiologischer Diagnostikmethoden [3].

Gängige kulturelle und serologische Diagnostikmethoden, die heute als Goldstandard in der Tuberkulose-Diagnostik gelten, sind teilweise bereits Jahrzehnte alt [4]. Diese sind außerdem in der Regel sehr zeit- und kostenintensiv. Dabei ist, vor allem im stationären Bereich, die rasche Diagnosefindung zur Einleitung hygienischer und therapeutischer Maßnahmen entscheidend. Hinzu kommt, dass in Industrieländern Infektionen mit nicht-tuberkulösen Mykobakterien sowohl bei immunkompetenten als auch immunsupprimierten Menschen mittlerweile verhältnismäßig häufig vorkommen [5,6]. Die korrekte und schnelle Detektion der verschiedenen *Mycobacterium* Spezies hat dabei unmittelbaren Einfluss auf die Behandlung der Patienten, in dem z. B. Therapieregime zeitnah angepasst werden können [5].

Vor diesem Hintergrund war es Ziel der vorliegenden Arbeit ein vollautomatisiertes, flexibel einsetzbares und schnelles Multiplex PCR-Verfahren (PCR = Polymerase-Kettenreaktion) zum simultanen Nachweis sowohl von *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex als auch atypischen Mykobakterien zu entwickeln und für den Einsatz am Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universität Rostock (IMIKRO) zu etablieren.

Die maschinelle Grundlage hierfür stellte der BD MAX™ PCR-Vollautomat der Firma Becton, Dickinson and Company (BD) dar. Dieses Gerät ermöglicht eine sehr flexible Reaktion auf dringende Untersuchungsaufträge, ohne die sonstigen Routineabläufe in molekularbiologischen Diagnostiklaboren zu stören. Als offene Plattform ermöglicht der BD MAX™ dabei als PCR-Vollautomat die Etablierung individueller, nicht kommerziell vertriebener PCR-Testmethoden (sogenannte „in-house“- oder „home brew“-Protokolle). Die nachfolgend beschriebene Methode stellt somit eine bis zu Beginn dieser Arbeit seltene, vollautomatisierte in-house Multiplex PCR dar.

1.1. Mykobakterien

Zu den *Mycobacterium* Spezies (*Myspp.*) zählen zahlreiche Spezies, von denen einige als bedeutende Krankheitserreger bei Menschen und Tieren beschrieben sind. Grob werden *Mycobacterium* Spezies – basierend auf ihrer klinischen Bedeutung – in Mykobakterien des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes, nicht-tuberkulöse Mykobakterien sowie *Mycobacterium leprae* eingeteilt. Bei der Detektion und Differenzierung von Mykobakterien kommt der molekularen Diagnostik, insbesondere den PCR-assoziierten Methoden, eine zentrale Bedeutung zu.

1.1.1. Mikrobiologische Charakteristika

Mykobakterien sind unbewegliche, stäbchenförmige Bakterien. Sie haben einen Durchmesser von circa 0,4 μm und eine Länge von circa 3-4 μm [7]. Mykobakterien leben obligat aerob, synthetisieren keine Toxine und bilden keine Sporen aus [8,9]. Die Außenschicht ihrer Zellwand ist reich an Mykolsäuren, den längsten natürlich vorkommenden Fettsäureketten ($\text{C}_{60}\text{-C}_{90}$), die über Arabinogalactan an das Mureinrückgrat der Zellwand gebunden sind [10]. Ebendiese namensgebenden Fettsäuren verleihen den Zellwänden ihren wachsartigen Charakter und den Mykobakterien ihre besonderen Eigenschaften. Mykobakterien sind als sogenannte säurefeste Organismen beschrieben, da ihre Zellwand, sofern einmal angefärbt, weder mit Säuren noch mit Alkohol zu entfärben ist [7,9]. Aufgrund des hydrophoben Charakters der Mykolsäuren ist die Zellwand wenig permeabel und schwer penetrierbar [9,11]. Dies hat sowohl auf die Erregerdetektion als auch auf die Behandlung von mykobakteriellen Infektionen Einfluss. Auch die für die Pathogenität relevanten Eigenschaften der Mykobakterien beruhen vor allem auf den Zellwandbestandteilen und -eigenschaften, beispielsweise den enthaltenen Wachsen. Diese Wachse werden je nach Wachstyp von A bis D benannt, wobei „Wachs C“ das Mykosid Trehalose-6,6'-dimycolat, den sogenannten Cordfaktor, enthält. Dieser bedingt eine zopfartige Aneinanderreihung der Mykobakterien und ermöglicht z. B. *M. tuberculosis* von Makrophagen nicht abgetötet zu werden [12,13]. Des Weiteren vermittelt die Zellwand durch ihre Struktur den Mykobakterien eine erstaunliche chemisch-physikalische Widerstandskraft, z. B. gegen Kälte bis -70°C , Austrocknung oder Magensäure [14].

1.1.2. *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (MTC)

Unter der Bezeichnung *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (TB-Komplex oder MTC) werden mehrere Mykobakterienspezies zusammengefasst, welche in der Lage sind, das Krankheitsbild der Tuberkulose auszulösen. Dazu gehören *M. tuberculosis*, *M. bovis* ssp. *bovis*, *M. bovis* ssp. *caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. suricattae*, *M. mungi*, *M. pinnipedii* und *M. orygis*. [15,16]. Der Impfstamm *Mycobacterium bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) ist attenuiert und kann bei Immungesunden keine Tuberkulose auslösen [17].

1.1.3. Nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM)

Zu den nicht-tuberkulösen Mykobakterien (NTM) zählen alle Mykobakterien außer *M. leprae*, die nicht im MTC enthalten sind. Synonyme für NTM sind auch „atypische Mykobakterien“ oder „mycobacteria other than tuberculosis“ (MOTT) [18]. Den Erregern gemein ist lediglich die Tatsache, dass sie keine Tuberkulose auslösen.

NTM sind ubiquitär in der Umwelt vorkommende Organismen. Sie besiedeln vor allem Gewässer und den Erdboden. Im Gegensatz zu den Mitgliedern des TB-Komplexes sind NTM nicht obligat pathogen, sondern zeichnen sich durch eine eher geringe Virulenz aus. Wie alle Mykobakterien sind auch die NTM außerordentlich resistent gegen Desinfektionsmittel, vor allem, wenn die Bakterienkolonien in Biofilmen enthalten sind [19,20].

Klassischerweise werden NTM in schnell und langsam wachsende NTM (slow-growing mycobacteria, SGM, vs. rapid-growing mycobacteria, RGM) unterteilt, wobei „schnell wachsend“ bedeutet, dass sich innerhalb von drei bis sieben Tagen eine sichtbare Kolonie auf den Nährböden bildet (Tabelle 1). Langsam wachsende NTM benötigen länger als sieben Tage um mit bloßem Auge sichtbare Kolonien zu bilden [21].

Tabelle 1 Auswahl an nicht-tuberkulösen Mykobakterien (Auswahl nach [18,22,23])

Langsam wachsende NTM (SGM, Runyon I-III)	Schnell wachsende NTM (RGM, Runyon IV)
<i>M. asiaticum</i> , <i>M. avium</i> -Komplex: <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> ; <i>M. celatum</i> , <i>M. chimaera</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. lentiflavum</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. xenopi</i> und weitere	<i>M. abscessus</i> ssp. <i>abscessus</i> , <i>M. alvei</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. septicum</i> und weitere

Abkürzungen: *M.*, *Mycobacterium*; RGM, rapid-growing mycobacteria; SGM, slow-growing mycobacteria; ssp. Subspezies.

Einige Mykobakterienspezies werden auch in Gruppen bzw. Komplexen zusammengefasst (Tabelle 2). Diese Komplexe umfassen z. B. Spezies, die ein ähnliches Krankheitsbild auslösen oder gleiche biochemische Eigenschaften aufweisen [24].

Tabelle 2 Auswahl an *NTM*-Komplexen (Auswahl nach [24–27])

Bezeichnung	Assoziierte Spezies
<i>M. avium-intracellulare</i> -Komplex (<i>MAC</i>)	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i>
<i>M. kansasii-gastri</i> -Komplex	<i>M. kansasii</i> , <i>M. gastri</i> , <i>M. persicum</i>
<i>M. chelonae-abscessus</i> -Komplex (<i>MCAC</i>)	<i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> und <i>M. abscessus</i> spp., <i>M. saopaulense</i> und weitere
<i>M. fortuitum</i> -Komplex (<i>MFC</i>)	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. porcinum</i> , <i>M. peregrinum</i> und weitere

Abkürzungen: *M.*, *Mycobacterium*; spp., Spezies.

1.2. Tuberkulose

Die Erkrankung Tuberkulose ist die bekannteste Mykobakteriose, wobei der Begriff Mykobakteriose die Besiedlung bzw. Infektion eines Organismus durch Mykobakterien beschreibt. Von den insgesamt circa 200 bekannten *Mycobacterium* Spezies sind neben einer Großzahl apathogener Mykobakterien eine Reihe von Spezies als zoopathogen, fakultativ humanpathogen oder obligat humanpathogen beschrieben [9,28]. Auch simultane Infektionen mit mehreren Mykobakterien-Arten, sowohl mit *MTC* als auch *NTM*, konnten festgestellt werden [29]. Grundsätzlich werden *Mycobacterium*-assoziierte Infektionen anhand der verursachenden Erreger in drei Gruppen unterteilt: Tuberkulose, atypische Mykobakteriosen und Lepra. Die durch *Mycobacterium leprae* verursachte Lepra, steht in dieser Arbeit nicht im Fokus und ist hier lediglich der Vollständigkeit halber genannt. Im Folgenden werden sowohl die *MTC*-assoziierte Tuberkulose als weltweit eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten sowie die *NTM*-assoziierten Mykobakteriosen vorgestellt.

1.2.1. Geschichte

Basierend auf morphologischen Skelettveränderungen bei fossilen Knochen eines *Homo erectus* wird heute angenommen, dass die Tuberkulose bereits im Pleistozän als Krankheit vorkam [30]. *Mycobacterium tuberculosis*-DNA konnte darüber hinaus in 9000 Jahre alten Proben detektiert werden [31]. Die ersten schriftlichen Überlieferungen stammen von Hippokrates von Kos, der die Tuberkulose als „phthisis“ (Schwindsucht) benannte und sie eindrucksvoll als eine der fast immer tödlichen Epidemien beschrieb [32]. Die Bezeichnung „Tuberkulose“ wurde in den 1830er Jahren von Johann Lukas Schönlein geprägt, der u. a. die

charakteristischen, namensgebenden Tuberkel beschrieb [32]. Die Tuberkulosebakterien wurden erstmals 1882 von Robert Koch als Erreger der Tuberkulose nachgewiesen [33]. In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts erreichte die Ausbreitung der Tuberkulose in Deutschland einen Höhepunkt, bedingt durch die rasant zunehmende Bevölkerungsdichte unter schlechten hygienischen Bedingungen. Zu dieser Zeit verstarb circa ein Drittel der 15- bis 60-jährigen Bevölkerung in Deutschland an Tuberkulose [34]. Insbesondere Arbeiter in den großen industriellen Ballungsgebieten waren betroffen, was der Tuberkulose auch den Beinamen „Krankheit des Proletariats“ einbrachte [34,35].

1.2.2. Epidemiologie

Schätzungen der WHO zufolge sind etwa 23 % der Weltbevölkerung (circa 1,7 Milliarden Menschen) mit dem Tuberkulose-Erreger infiziert (LTBI, latente Tuberkulose-Infektion) – Stand 2018 [36]. Dabei erkrankten nur etwa 5-10 % der Infizierten an einer aktiven Tuberkulose [37,38]. In den letzten Jahren ist die Inzidenz der Tuberkulose zwar weltweit um circa zwei Prozent pro Jahr zurückgegangen, die Sterblichkeit, mit circa 1,3 Millionen Todesfällen pro Jahr, ist jedoch weiterhin sehr hoch [36].

In Deutschland lag die Inzidenz der Tuberkulose im Jahre 2017 bei 6,7 pro 100.000 Einwohner, womit es im Vergleich zu den Vorjahren (2015: 7,1 und 2016: 7,2 pro 100.000 Einwohner) zu einem diskreten Rückgang gekommen ist [39]. Unter Berücksichtigung der Staatsangehörigkeit der Neuerkrankten zeigten sich erhebliche Unterschiede: So lag die Inzidenz bei deutschen Staatsangehörigen bei 2,2 pro 100.000 Einwohner, während sie bei Staatsbürgern anderer Nationen 40,6 pro 100.000 Einwohnern betrug. Es lässt sich ableiten, dass die Tuberkulose in Deutschland heutzutage im Wesentlichen eine aus anderen Weltregionen importierte Krankheit darstellt [39].

Es bestehen häufige TBC-Koinfektionen bei bestehender HIV-Infektion (Humanes Immundefizienz-Virus-Infektion). So waren 2014 weltweit circa 12 % der Tuberkulose-Erkrankten mit HIV koinfiziert. Die Mortalität von Patienten mit gleichzeitiger HIV- und TBC-Infektion ist etwa 5-fach erhöht gegenüber HIV-negativen Patienten; die TBC ist die häufigste Todesursache bei HIV-infizierten Patienten [17].

1.2.3. Klinik

Die Tuberkulose wird fast ausschließlich durch erregerhaltige Aerosole von Mensch zu Mensch übertragen. Eine Ansteckung mit Tuberkulosebakterien aus anderen Organen als der

Lunge ist selten. Die Lunge ist sowohl die wichtigste Eintrittspforte der Erreger in den menschlichen Organismus als auch das am häufigsten von der Tuberkulose betroffene Organ [41,42]. Die Infektion mit *MTC* durch Aerosole ist stark abhängig von der enthaltenen Erregermenge, der Dauer der Exposition und dem Aufenthaltsort (z. B. drinnen vs. draußen) [34,43–45].

Ob es nach einem Tuberkulosekontakt zu einer tatsächlichen Erkrankung kommt, hängt maßgeblich vom Immunstatus des Infizierten ab. Nur etwa 10 % aller Infizierten erkranken im Verlauf der nächsten Wochen, Monate oder Jahrzehnte an einer behandlungsbedürftigen Tuberkulose [34,44,46]. Insbesondere immunkompromittierte Personen und Kleinkinder haben dabei ein erhöhtes Erkrankungsrisiko. Als Risikofaktoren für die Infektion sowie die Erkrankung gelten u. a. eine Infektion mit HIV, Diabetes, Unterernährung, Rauchen, Alkoholabusus, das Leben in überfüllten Wohnumgebungen und genetische Faktoren [46].

Wurden Tuberkuloseerreger eingeatmet, verursachen diese in der Lunge eine lokale Entzündungsreaktion, welche zu einer Aktivierung des Immunsystems (Befall der regionalen Lymphknoten, Ghon-Komplex) sowie im Verlauf zu einer Abkapselung der Erreger führt [41]. Diese im Verlauf im Röntgenbild sichtbaren, klinisch inapparenten Komplexe bzw. Tuberkel können unter Umständen Jahrzehnte in einem Zustand des „immunologischen Äquilibrium“ als latente Infektion im Körper des Infizierten überdauern [45,47,48]. Da die Tuberkel keinen Zugang zu den Luftwegen haben, gilt diese „geschlossene Tuberkulose“ als nicht ansteckend. Wenn die Tuberkel vom Immunsystem allerdings nicht abgekapselt werden können oder abgekapselte, erregerhaltige Tuberkel zerfallen, kann durch Arrosion eine direkte Verbindung zum Bronchialsystem entstehen. In diesem Fall spricht man von einer ansteckungsfähigen, sogenannten „offenen Tuberkulose“ [49]. Die Bakterien können dann beim Husten, Reden, Niesen oder sogar beim normalen Atmen in die Umgebungsluft gelangen und andere Menschen infizieren [50]. Kommt es zu einer Aussaat der Erreger über die Blutbahnen des Infizierten, können auch extrapulmonale Tuberkulosen in anderen Organen entstehen (Dissemination) [46]. Hierdurch können, wie auch bei atypischen Mykobakteriosen, beispielsweise Lymphknoten, Rippenfell, Nieren, Knochen, Hirnhaut oder intestinale Organe betroffen sein [35,51]. Der stadienhafte Ablauf der Tuberkulose ist schematisch und zusammenfassend in der Abbildung 1 zusammengefasst.

Die Tuberkulose beginnt im Allgemeinen mit unspezifischen klinischen Zeichen wie Husten, Gewichtsabnahme, Appetitlosigkeit, Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Fieber und Nachtschweiß.

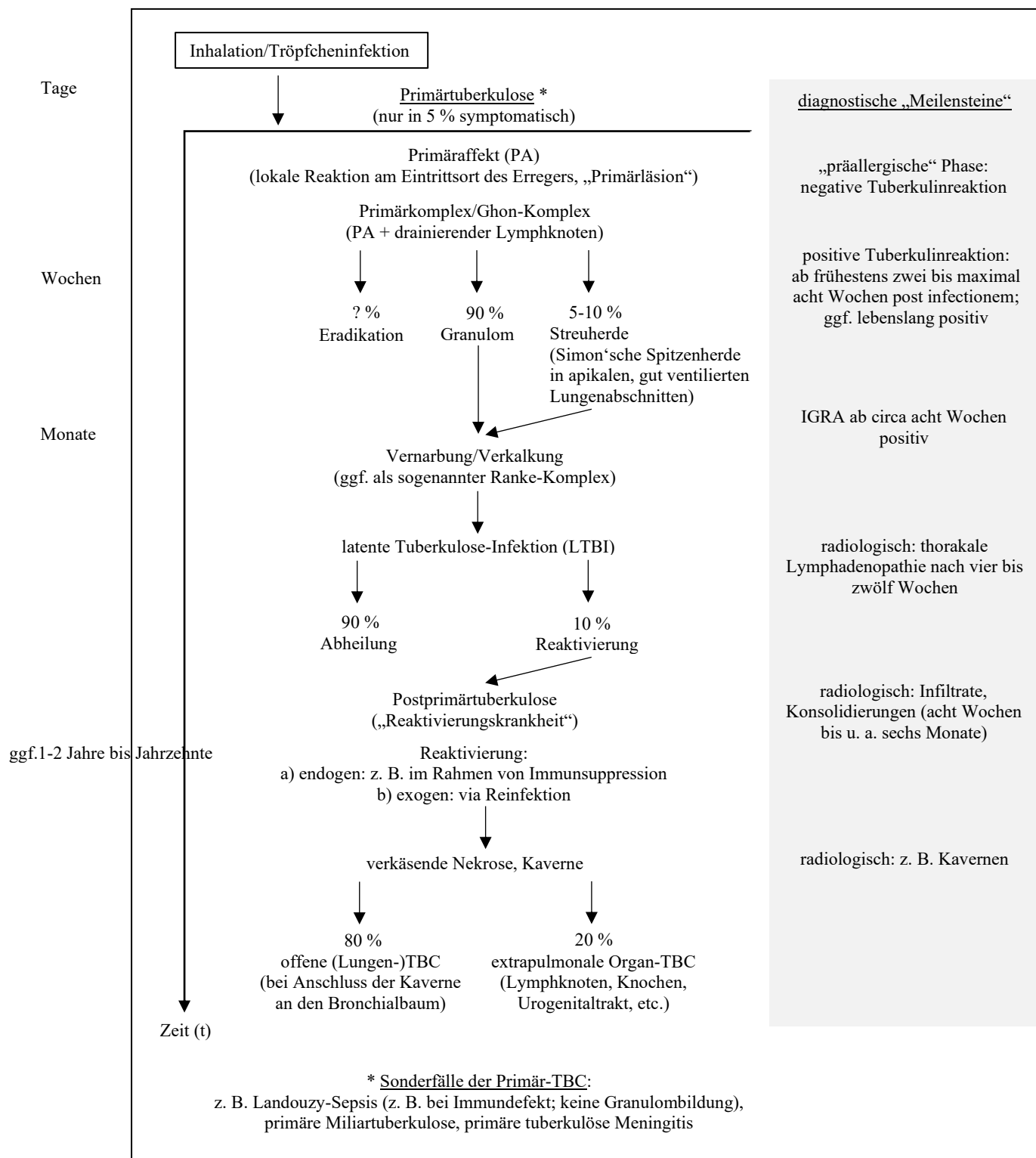


Abbildung 1 Schematischer Ablauf einer Tuberkuloseerkrankung mit Überblick über die klassischen diagnostischen "Meilensteine" im zeitlichen Kontext der Tuberkuloseerkrankung. Abkürzungen: IGRA, Interferon- γ -Release-Assay; LTBI, latente Tuberkulose-Infektion; PA, Primäraffekt; TBC, Tuberkulose. Abbildung adaptiert nach [8,14,41,45,47,52].

Im fortgeschrittenen Stadium können nach hämatogener Streuung und Manifestation in anderen Organen zusätzlich spezifische Symptome wie schmerzende Schwellungen der Gelenke und der Wirbelsäule (Knochentuberkulose) sowie klassische Symptome einer Harnwegsinfektion (Urogenitaltuberkulose) beobachtet werden. Bei Beteiligung der Hirnhaut treten außerdem klassische meningitische Zeichen wie Kopfschmerzen, Nackensteifheit, Halluzinationen, Bewusstseinsstörungen und epileptische Anfälle auf.

Bei Beteiligung anderer oder gleichzeitig mehrerer Organe im Rahmen einer sogenannten Miliartuberkulose können die o. g. allgemeinen und organspezifischen Symptome sehr kräftig ausgeprägt sein und in einem stark reduzierten Allgemeinzustand resultieren. Bei stark immunsupprimierten Patienten können außerdem schwere Septikämien mit Todesfolge entstehen [14,44]. Die konkreten Mechanismen der Immunologie der Tuberkuloseerreger in den jeweiligen Krankheitsstadien sind komplex und vor allem im Hinblick auf die Entwicklung etwaiger Impfstoffe nach wie vor Teil der aktuellen Tuberkuloseforschung [53].

1.2.4. Diagnostik

Neben der ärztlichen Anamnese, welche Fragen nach krankheitstypischen Symptomen, nach relevanten Vorerkrankungen (z. B. HIV) und vor allem nach Kontakten zu an Tuberkulose erkrankten Patienten enthalten sollte, ist eine schnelle und zuverlässige Erregerdiagnostik von großer therapeutischer und hygienischer Bedeutung. Es existiert eine Vielzahl von Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie der Tuberkulose. Die derzeit aktuelle Empfehlung in Deutschland ist die „S2k-Leitlinie: Tuberkulose im Erwachsenenalter“ vom Deutschen Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose (im Auftrag der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin) [17]. Basierend auf dieser sehr detaillierten Leitlinie soll im Folgenden ein allgemeiner Abriss der diagnostischen Untersuchungsmethoden und deren Kombination in Form eines beispielhaften Diagnosepfades aufgezeigt werden. Die Abbildung 1 zeigt beispielhaft typische diagnostische Meilensteine der Tuberkulosedagnostik auf; auf die mikrobiologische Diagnostik wird weiter unten eingegangen.

Die Erregerdiagnostik wird aus nahezu allen gängigen Untersuchungsmaterialien durchgeführt. Von besonderer Bedeutung sind dabei [17,54–56]:

- Sputum (auch durch Inhalation von hypertoner Kochsalzlösung produziertes Sputum),
- Magensaft,
- bronchoalveoläre Lavage (BAL), Bronchialsekrete,
- Blut,
- Urin,
- Liquor,
- Biopate von Weichgewebe und Knochen.

Die Diagnose einer Tuberkulose wird durch den direkten Erregernachweis und durch immunologische Untersuchungen einer möglichen Immunantwort gesichert. Als direkte Nachweismethoden stehen mikroskopische, kulturelle und molekularbiologische Verfahren zur Verfügung. Als immunologische Methoden seien hier der Interferon- γ -Release-Assay (IGRA) und der Tuberkulin-Hauttest (THT) genannt (vgl. Abbildung 1). Allerdings ist keine der serologischen Methoden als alleiniger Nachweis einer Tuberkulose geeignet [17]. Zur Verbesserung der Sensitivität und Spezifität der Untersuchung und wegen der Tragweite einer entsprechenden Diagnose wird im Rahmen einer umfassenden Tuberkulosedagnostik immer eine Kombination verschiedener Techniken angestrebt. Die TBC-Diagnostik wird dadurch äußerst komplex und ist eine der arbeitsintensivsten und langwierigsten Untersuchungsgänge der mikrobiologischen Diagnostik. Ein beispielhaftes Ablaufschema eines (labor-medicinischen) TBC-Untersuchungsgangs ist in Abbildung 2 dargestellt (hier mit negativem Ergebnis).

Die mikroskopische bzw. fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mittels Ziehl-Neelsen-, Kinyoun-, Auramin- und/oder Acridinorange-Färbung ist ein schnelles, kostengünstiges Verfahren zum Nachweis von Tuberkulosebakterien [57,58]. Durch die Mikroskopie können hochinfektiöse Patienten in der Regel sofort als solche erkannt werden.

Die molekularbiologische Untersuchung zum Nachweis bzw. zum Ausschluss einer TB-Komplex-Infektion stellt eine sinnvolle Ergänzung zu der Mikroskopie als „Schnell-Diagnostik“ dar. Wie bereits erwähnt, können TB-Komplex-Organismen mittels PCR schnell, spezifisch und mit hoher Sensitivität detektiert werden. Darüber hinaus können bei positivem Erregernachweis bei einigen verfügbaren PCR-Testverfahren gleichzeitig genotypische Resistenzprüfungen des Erregers durchgeführt werden.

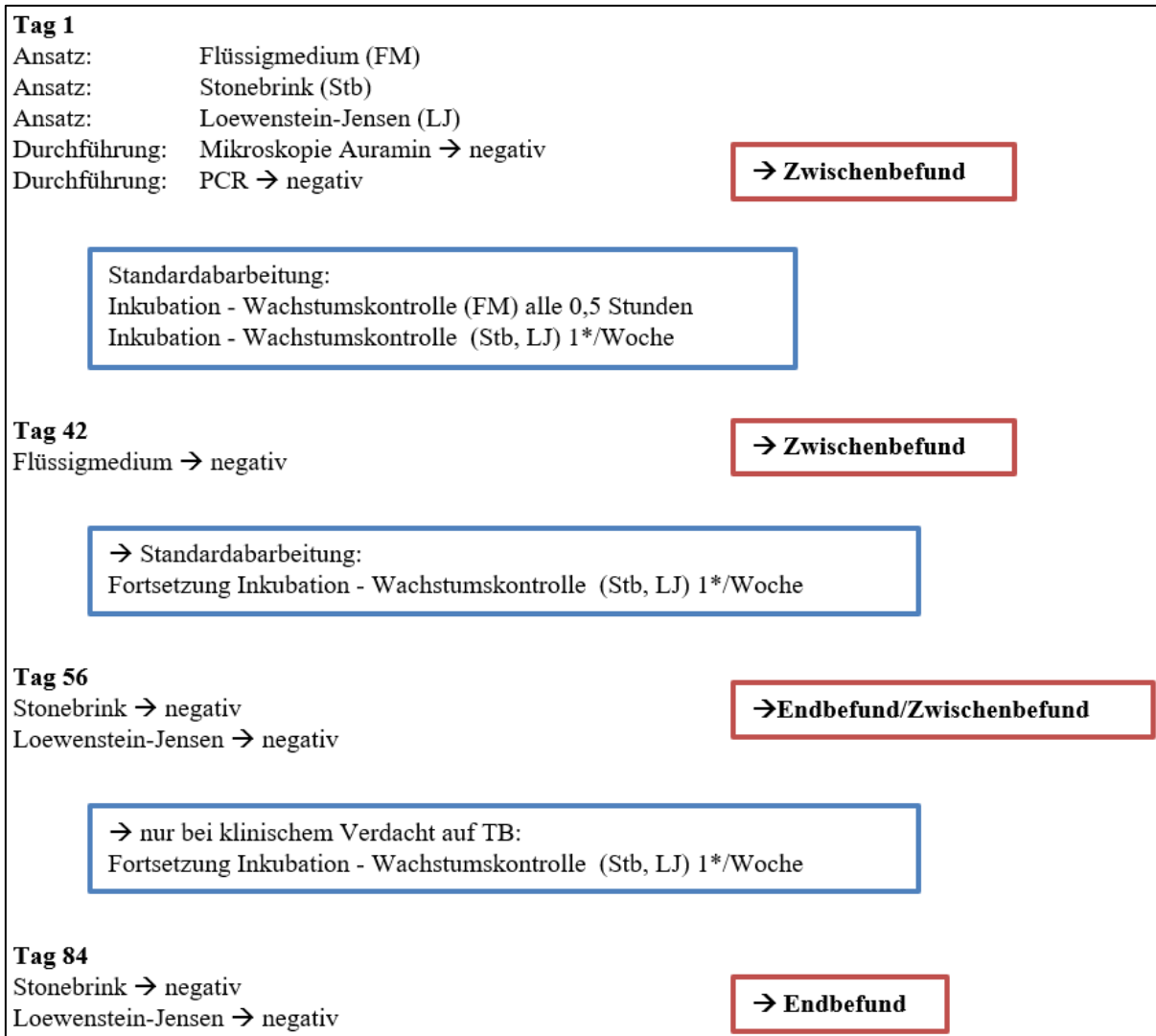


Abbildung 2 Beispielhafter Untersuchungsgang mit Kulturmedien für Mykobakterien. Hier ausgewählte Kulturmedien: Stonebrink-Medium sowie Loewenstein-Jensen-Agar. Der hier gewählte exemplarische Endbefund ist negativ für den Nachweis von Tuberkuloseerregern. Abkürzungen: FM, Flüssigmedium; LJ, Loewenstein-Jensen-Agar; PCR, Polymerase-Kettenreaktion; Stb, Stonebrink-Medium.

Basierend auf dem Ergebnis der mikroskopischen und molekularbiologischen Untersuchung von Sputumproben erfolgt die Befunderstellung. Entsprechend der Untersuchungsergebnisse erfolgt bei Lungentuberkulosen die etwaige Einstufung als z. B. offene Tuberkulose, welche den Startschuss für umfangreiche Therapie- und Hygienemaßnahmen (z. B. Patienten-isolierung, Umgebungsuntersuchungen, Untersuchungen von Kontaktpersonen und Reinigungs- bzw. Desinfektionsmaßnahmen) gibt [50]. Daher sollte die mikroskopische und molekularbiologische Eingangsuntersuchung des Sputums bei Tuberkuloseverdacht immer zur Anwendung kommen. Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass initial negative mikroskopische bzw. molekularbiologische Testergebnisse allein nicht zum Ausschluss einer Tuberkulose ausreichend sind. Der kulturelle Erregernachweis, nach wie vor der

Goldstandard der TBC-Diagnostik, dauert allerdings bis zu zwölf Wochen und somit in der Regel länger als der stationäre Aufenthalt des Patienten [17,59].

Durch den Kulturnachweis sind neben *MTC* auch *NTM* nachweisbar. Deshalb ist bei Wachstum in Kulturmedien vor der Diagnosestellung eine Identitätsprüfung mittels PCR durchzuführen. Da die ätiologische Relevanz der *NTM* deutlich geringer als die der *MTC* ist und eine Infektion mit *NTM* andere therapeutische bzw. hygienische Konsequenzen nach sich zieht, ist die Unterscheidung von *MTC* und *NTM* von besonderer Bedeutung [17,51,60,61].

1.2.5. Hygiene

Aufgrund des Übertragungsmodus durch erregerehaltige Aerosole stellt die Infektionsprophylaxe in der Umgebung der Tuberkulose-Erkrankten mit offener Lungentuberkulose eine besondere Herausforderung dar – insbesondere durch die leichte Aufnahme der Erreger über die Atemwege, die geringe Infektionsdosis (ein bis drei Erreger bei *MTC* ausreichend) und die hohe Virulenz der Erreger [50]. Die vorgenannten Punkte bedingen die Umsetzung bestimmter Präventions- und Hygienemaßnahmen, insbesondere um eine nosokomiale Übertragung zu verhindern. So wird unter anderem die Patientenunterbringung in Isolierzimmern (ggf. mit Unterdruck bzw. spezieller Lüftung) von verschiedenen Fachgesellschaften empfohlen. Der Patientenkontakt darf nur mit persönlicher Schutzausrüstung (Kittel, Handschuhe und Atemmaske FFP2/FFP3) erfolgen. Das betreuende Personal soll im Umgang mit den Maßnahmen und den infektiösen Patienten geschult sein; entsprechende Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen sind vorgeschrieben. Isolationsmaßnahmen können (in Deutschland) dann aufgehoben werden, wenn der Patient insgesamt drei (TB-) negative Sputumbefunde an drei unterschiedlichen Tagen vorzuweisen hat; bei manifester TB-Erkrankung soll zudem unter der medikamentösen Therapie auch eine klinische Besserung des Patienten eingetreten sein [50].

1.2.6. Therapie

Wenn ein mikroskopischer Erregernachweis erfolgt ist, kann gemäß den geltenden Leitlinien die Therapie unverzüglich auch ohne Zusatzdiagnostik eingeleitet werden [14,17]. Die Therapie der Tuberkulose wird mit speziellen Antibiotika (sogenannten Antituberkulotika oder Tuberkulostatika) nach bestimmten Standardschemata in der Regel über sechs Monate durchgeführt [17,59,62]. Die meisten Patienten mit einer unkomplizierten Lungentuberkulose können mit dem Standardtherapieregime geheilt werden. Das Standardregime setzt sich aus

Isoniazid und Rifampicin für sechs Monate sowie Ethambutol und Pyrazinamid für jeweils zwei Monate innerhalb der gesamten sechs Monate andauernden Therapie zusammen [17,63].

Falls eine Resistenz gegen die eingesetzten Medikamente vorliegt, muss das Therapieregime angepasst werden. Die medikamentöse Therapie der Tuberkulose ist immer eine Kombinationstherapie, bezogen auf die verschiedenen Wirkmechanismen der eingesetzten Antibiotika und der vielfältigen Eigenschaften des *MTC* und dem sie umgebenden Milieu. Eine korrekt durchgeführte Kombinationstherapie hat zusätzlich den Vorteil einer Resistenzentstehung entgegen wirken [63]. Die Standardkombinationstherapie richtet sich u. a. nach Risikofaktoren für eine Medikamentenresistenz, z. B. eine medikamentöse (Vor-)Behandlung einer TBC über mehr als vier Wochen in der Patientengeschichte. Je nach Risikofaktoren sollte eine Resistenztestung durchgeführt werden und das Therapieschema nach den jeweils aktuellen Richtlinien angepasst werden [17,63].

Die sogenannte „drug-resistant“ Tuberkulose wird folgendermaßen definiert:

- Monoresistenz (SDR, single-drug-resistance TB): Resistenz gegen ein Antituberkulotikum [63],
- Multiresistenz (MDR, multi-drug-resistance TB): Resistenz gegenüber mindestens Isoniazid und Rifampicin, den zwei wichtigsten Erstrangmedikamenten [63],
- Extensive Resistenz (XDR, extensively-drug-resistance TB): MDR plus Resistenz gegen mindestens ein Fluorchinolon und ein injizierbares Zweitstrangmedikament [2].

Darüber hinaus finden sich auch Polyresistenzen oder sogar „total-drug-resistant“ TB-Isolate. Diese Stämme sind mit den zur Verfügung stehenden Medikamenten nicht behandelbar und ziehen notwendigerweise besonders strenge hygienische Maßnahmen nach sich [63,64]. Eine Therapie dieser Tuberkuloseerkrankungen erfolgt nicht mittels Standardschema, sondern individualisiert und anhand der Ergebnisse molekularbiologischer Resistenztestungen. Die Kosten der Medikamente für die Behandlung der MDR-TBC sind mit > 20.000 € (XDR > 90.000 €) wesentlich höher als die Medikamentenkosten für das Standardregime (~ 334 €) [65].

Aufgrund der wieder zunehmenden epidemiologischen Relevanz der Tuberkulose und der besonderen Bedeutung der MDR/XDR-Tuberkulose wird verstärkt auf die ausreichende Wirkung neu zugelassener oder sich in klinischer Prüfung befindlicher Antituberkulotika, wie Bedaquilin, Delamanid und Pretomanid, gehofft. Darüber hinaus werden neue

Medikamentenkombinationen und Therapieregime unter Nutzung bekannter Therapeutika geprüft [17,65–67].

Eine klassische Primärprophylaxe gegen Tuberkulose, im Sinne einer Impfung, wurde bereits 1921 in Form von der *BCG* (*Bacillus Calmette-Guérin*) Impfung eingeführt. Seitdem hatte diese Impfung, trotz circa vier Milliarden geimpften Personen, allerdings nur wenig Einfluss auf die heutige Tuberkuloseverbreitung. Das Robert Koch-Institut (RKI) und die Ständige Impfkommision (STIKO) in Deutschland empfehlen die *BCG*-Impfung aufgrund der nicht belegten Wirksamkeit und der erheblichen Nebenwirkungen seit 1998 nicht mehr [52].

1.3. Erkrankungen durch nicht-tuberkulöse Mykobakterien

Nicht-tuberkulöse Mykobakterien sind, obwohl schon länger bekannt, erst in den 1950er Jahren als klinisch relevante Erreger (u. a. bei HIV-infizierten Patienten) beschrieben worden [68]. Sie führen nicht zu einer TBC, sondern zu einer Reihe anderer pulmonaler sowie extrapulmonaler Erkrankungen.

1.3.1. Epidemiologie

NTM-Infektionen treten vermehrt in Ländern mit niedriger Tuberkulose-Inzidenz auf, wobei vor allem die Prävalenz der durch *NTM* ausgelösten Lungenerkrankung zugenommen hat [69,70]. Die Häufigkeitsverteilung der jeweiligen *NTM*-Spezies variiert regional; insgesamt am häufigsten finden sich Erreger des *M. avium*-Komplexes (*MAC*) sowie *M. kansasii*, *M. xenopi* und *M. malmoense* als Infektionsauslöser [20,70].

Gründe für den Anstieg der Prävalenz *NTM*-assoziierter (Lungen-)Erkrankungen sind zum einen eine verbesserte Labordiagnostik und zum anderen eine alternde Gesellschaft mit entsprechend assoziierten Komorbiditäten, HIV-Infektionen und immunsuppressive Therapien. Es ist zukünftig von weiter steigenden Fallzahlen *NTM*-assoziierter Infektionen auszugehen [18,19].

Für erwachsene Patienten gibt es in Deutschland aufgrund der fehlenden Meldepflicht bisher keine Daten zur Prävalenz von *NTM*-Infektionen [71]. Für Kinder wurde im Zeitraum 2002 bis 2005 eine Inzidenz von 1,3 pro 100.000 Personen erfasst. Die häufigste Erkrankung innerhalb dieser Patientengruppe war die *NTM*-assozierte Lymphadenitis [18].

1.3.2. Klinik

Patienten infizieren sich u. a. durch die Inhalation erregerehaltigen Materials (z. B. Aerosole, Stäube) oder durch direkten Kontakt mit kontaminierten Erdböden oder verunreinigtem Trinkwasser. Die Mechanismen vieler *NTM*-Infektionen sind noch nicht vollständig aufgeklärt [18,19,22]. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist nicht häufig, wobei Fälle für die Übertragung von *M. kansasii* beschrieben wurden [72].

Bei Patienten mit *NTM*-Infektionen sind häufig prädispositionierende Faktoren wie etwa generelle Grunderkrankungen (u. a. Diabetes und chronisch-entzündliche Erkrankungen) sowie ungünstige Lebensstilfaktoren (z. B. Alkoholsucht und/oder starkes Rauchen) zu finden [19]. Eine wichtige Rolle für die Entstehung *NTM*-assoziiierter Lungenerkrankungen spielen darüber hinaus lokale Risikofaktoren, insbesondere Lungen- und Lungengerüsterkrankungen (z. B. chronisch obstruktive Lungenerkrankung, Bronchiektasie, Mukoviszidose), systemische Risikofaktoren (z. B. HIV-Infektion, Immunsuppression nach Organtransplantation) oder spezifische Genmutationen (z. B. Interferon-Gamma-Rezeptor-Gen-Mutation). *NTM*-Infektionen bzw. *NTM*-assoziierte Lungenerkrankungen sind jedoch auch bei Patienten ohne spezielle Risikofaktoren diagnostiziert worden [73,74].

Die Symptome der durch *NTM* ausgelösten Lungenerkrankung sind unspezifisch und der klassischen Lungentuberkulose ähnlich. Die klinischen wie radiologischen Symptome (z. B. Kavernen) finden sich sowohl bei TBC als auch bei Erkrankungen durch *NTM*, weshalb bei entsprechender Bildgebung eine umfassende mikrobiologische Diagnostik notwendig ist [20]. Inzwischen wurden mehr als 40 Spezies der *NTM* als humanpathogen beschrieben. Neben pulmonalen Erkrankungen wurden auch verschiedene extrapulmonale Manifestationen, wie z. B. Haut-, Weichteil- oder Lymphknoteninfektionen beschrieben (Tabelle 3). Die zu beobachtende Klinik richtet sich dementsprechend nach dem befallenen Organ [51,71].

Tabelle 3 Auswahl an durch *NTM* verursachten Erkrankungen (Tabelle adaptiert nach [18])

Erkrankung	Assoziierte <i>NTM</i>
Lungenerkrankung	<i>MAC</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. xenopi</i>
Lungenerkrankung bei Mukoviszidose	<i>MAC</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i>
Haut- & Weichteilinfektionen	<i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. ulcerans</i> ,
(Hals-)Lymphadenitis (v. a. bei Kindern)	<i>MAC</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. scrofulaceum</i>
Disseminierte Infektion (z. B. bei Immunsuppression)	<i>MAC</i>

Abkürzungen: *M.*, *Mycobacterium*; *MAC*, *M. avium*-Komplex; *NTM*, nicht-tuberkulöse Mykobakterien.

1.3.3. Diagnostik

Die Diagnose von durch *NTM* verursachten Erkrankungen ist langwierig und setzt sich häufig aus mehreren klinischen und mikrobiologischen Komponenten zusammen [75]. Zu nennen sind dabei vor allem [76]:

- Symptome des Patienten (ggf. ähnlich der der Tuberkulose; mit eher subakuter Präsentation),
- Ausbleiben der Symptomlinderung trotz laufender Therapie,
- ggf. entsprechende radiologische Befunde.

Weil es keine *NTM*-typischen klinischen Symptome gibt, sollte der mikrobiologische Nachweis von *NTM*-Infektionen erfolgen, wobei berücksichtigt werden muss, dass *NTM* mikroskopisch und kulturmorphologisch teils schlecht von *MTC* zu unterscheiden sind [18]. Außerdem können Interferon-Gamma-Release-Assays (IGRA), die u. a. auf dem Antigen „ESAT-6“ basieren, das als Antigen auch in einigen *NTM* vorkommt, falsch-positive *MTC*-Nachweise liefern [77]. Deshalb sollten gruppenspezifische PCR-Verfahren zur Anwendung kommen, die zum einen *MTC* ausschließen und zum anderen *NTM* als Erreger nachweisen können [18]. Die schnelle Einordnung in *MTC* bzw. *NTM* kann durch Multiplex-PCRs in einem Untersuchungsgang erreicht werden.

1.3.4. Therapie

NTM-Infektionen werden unter Berücksichtigung möglicher Therapienebenwirkungen, vorhandener Grunderkrankungen und hoher Therapiekosten nicht immer medikamentös behandelt. Entscheidungskriterien zur therapeutischen Intervention sind u. a. die Erregermenge, die Erregerspezies, die klinische Manifestation und der radiologische Fortschritt einer *NTM*-assoziierten Erkrankung [18,76]. Für die Therapie von ausgewählten *NTM* sind entsprechende Therapieschemata verfügbar, wobei als wichtige Substanzgruppen der Antibiotika hier insbesondere Makrolide (z. B. Clarithromycin) und Rifamycine (z. B. Rifampicin) zu nennen sind. Aufgrund unterschiedlicher Empfindlichkeiten von schnellwachsenden *NTM* gegenüber Antibiotika ist die Therapie mit Experten und spezialisierten mikrobiologischen Laboren abzustimmen [75].

1.4. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in den 1980er Jahren von K. Mullis entwickelt und ist heute der wichtigste Grundpfeiler der molekularen Diagnostik [78]. Einige grundlegende Ideen zur Amplifikation von DNA waren allerdings zuvor u. a. von Kleppe et al. im Jahre 1971 formuliert worden [79]. Die PCR ist ein äußerst sensitives und spezifisches enzymatisches In-vitro-Verfahren zur Vermehrung doppelsträngiger DNA [80]. Das Reaktionsverfahren ermöglicht es, eine theoretisch unbegrenzte Menge von Nukleinsäure-Kopien eines gewünschten DNA-Abschnittes (Template) zu erzeugen (Amplifikation), die dann detektiert werden kann. Die klassische PCR ist dabei ein rein qualitatives Testverfahren, welches bestenfalls eine semiquantitative Mengenbestimmung der Amplifikate bzw. der Ausgangs-DNA-Menge zulässt [80]. Diesbezüglich stellt die im Jahre 1992 entwickelte, mittlerweile häufig eingesetzte Real-Time PCR eine sinnvolle Weiterentwicklung dar, da diese die Schritte der Amplifikation und Detektion in einem Untersuchungsgang vereint [81].

1.4.1. Methodische Grundprinzipien der PCR

Eine PCR wird klassischerweise durchgeführt, um DNA-Abschnitte sequenzspezifisch zu amplifizieren. Das Verfahren basiert vor allem auf der Fähigkeit des hitzestabilen Enzyms Taq-DNA-Polymerase aus einzelsträngigen wieder doppelsträngige DNA-Stränge zu synthetisieren [80].

Dazu werden prinzipiell folgende „Zutaten“ benötigt [80,82]:

- die zu amplifizierende DNA (Template-DNA; „Vorlage“), welche die Zielsequenz enthält,
- zwei einzelsträngige Oligonukleotide, sogenannte Primer, die durch ihre Sequenz gezielt sowohl an den kodierenden als auch den komplementären DNA-Strang binden können und so den zu amplifizierenden DNA-Bereich definieren,
- Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) als Substrate, die in den zu synthetisierenden Komplementärsträngen verbaut werden,
- thermostabile DNA-Polymerase als wirksames Enzym,
- PCR-Pufferlösung mit Mg^{2+} -Ionen als Kofaktor für die Enzymaktivität.

Im Verlauf gliedert sich die PCR prinzipiell in drei nacheinander ablaufende Schritte, die zusammen einen Zyklus darstellen. Die einzelnen Schritte sind [80,83,84]:

- 1) Denaturierung: Die Denaturierung der Doppelstrang-DNA erfolgt bei 94 bis 98 °C zur Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleotiden der Doppelstrang-DNA. Im Ergebnis liegen zwei DNA-Einzelstränge im Reaktionsansatz vor.
- 2) Primerhybridisierung/Annealing: Das Annealing beschreibt das konsequente Anlagern der Primer an den Sequenz-komplementären DNA-Abschnitt zum Primer-Template-Komplex. Das Primer-Annealing erfolgt meist bei Temperaturen zwischen 50 bis 68 °C. Die Annealing-Temperatur ist dabei abhängig von der Länge und der Sequenz der verwendeten Primer.
- 3) Elongation/Extension: Die Neusynthese bzw. Elongation des komplementären Stranges unter Verbrauch der dNTPs führt letztendlich zur Verdopplung der Doppelstrang-DNA-Moleküle und wird nach Anlagerung der Taq-DNA-Polymerase an den Primer-Template-Komplex bei Temperaturen um 72 °C realisiert.

Die entstandenen Tochterstränge sind identisch mit dem eingangs gewählten DNA-Abschnitt. Üblicherweise werden die einzelnen Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation im Versuchsverlauf 25 bis 40 mal wiederholt, was zur exponentiellen Vermehrung der Template-DNA führt, bis das erste der zugegebenen Supplemente aufgebraucht ist [84]. Rein rechnerisch können so innerhalb von z. B. 30 PCR-Zyklen aus einem Doppelstrang-DNA-Template circa 2^{30} Kopien bzw. Tochterstränge erzeugt werden [83]. Diese Tochterstränge, die sowohl hinsichtlich ihrer Sequenz als auch ihrer Größe identisch sind, können in der Folge z. B. mittels Gelelektrophorese und Färbung mit interkalierenden Farbstoffen visualisiert werden [85]. Diese Extraschritte sind allerdings sehr zeitintensiv und ermöglichen lediglich die qualitative Detektion der DNA-Abschnitte. In der mikrobiellen Routinediagnostik ist die ätiologische Relevanz potenzieller Pathogene allerdings häufig auch von der Erregermenge abhängig. Daher ist eine Aussage zur Erregerkonzentration häufig ebenso wichtig wie die Detektion selbst. Diese Anforderung erfüllt die Real-Time PCR, welche heute den methodischen Goldstandard in der molekularen Diagnostik darstellt.

1.4.2. Weiterentwicklung zur (Multiplex) Real-Time PCR

Die weiterentwickelte Variante der Real-Time PCR (RT-PCR) vereinigt – im Gegensatz zur oben beschriebenen konventionellen PCR – die Amplifikation und Detektion in einem Untersuchungsgang, indem nach jedem PCR-Zyklus durch Fluoreszenzintensitätsmessungen die Produktmenge bestimmt wird [81]. Allerdings sind unter der Bezeichnung Real-Time PCR heute eine Vielzahl unterschiedlicher PCR-Methoden zusammengefasst, denen lediglich

die Möglichkeit der Ergebnisdarstellung in Echtzeit (= „real time“) und zum Teil die Möglichkeit der Quantifizierung gemein ist [86,87]. Hervorzuheben ist dabei insbesondere die Multiplex-TaqMan-RT-PCR, die auch die methodische Grundlage der in dieser Arbeit evaluierten Methode darstellt.

Diese TaqMan-RT-PCR basiert neben den bereits beschriebenen PCR-Grundlagen im Wesentlichen auf zwei Faktoren. Zum einen besitzen DNA-Polymerasen neben ihrer 3'-5' Polymerase auch eine 5'-3' Exonuclease-Aktivität (auch proofreading-Funktion zur Reduktion von Synthesefehlern genannt) [88,89]. Zum anderen existiert eine Vielzahl von Fluoreszenzfarbstoffen (z. B. FAM (Fluoreszin), HEX (Hexafluorescin), ROX (X-Rodamin), Cyanine, TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin)), welche als Energiedonor in Kombination mit Dark-Quenchern (Energieakzeptoren) an kurze DNA-Komplementärstränge zu sogenannten TaqMan-Sonden assembliert werden können. Die Fluoreszenz der Donor-Farbstoffe wird dabei im intakten Grundzustand, basierend auf dem physikalischen Prozess des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers, durch den Dark-Quencher absorbiert und die Sonde emittiert bei Anregung kein Licht. Bindet die Sonde aber im Verlauf einer PCR an einen Matrizen-DNA-Strang, wie in Abbildung 3 dargestellt, wird sie im Rahmen der Elongation durch die DNA-Polymerase verdaut und so der Donor-Farbstoff räumlich vom Dark-Quencher getrennt. Wird der Farbstoff nun angeregt, kann er Licht in spezifischen Wellenlängen emittieren, woraufhin die Detektion daraufhin erfolgen kann (im Sinne eines Reporters) [90–94]. Die Verwendung von TaqMan-Sonden birgt gewisse Vorteile gegenüber anderen Real-Time PCR-Methoden. So stellt die Sonde aufgrund ihrer DNA-Sequenz und der damit verbundenen Bindungsspezifität – neben den Primern – eine weitere Spezifitäts-Instanz der PCR dar – allerdings bei höheren Kosten [95]. Weiterhin können die verschiedenen Farbstoffe gemäß ihrer Extinktions- und Emissionseigenschaften bei geeigneter Kombination getrennt voneinander angeregt und detektiert werden, was die Kombination verschiedener Primer-Sonden-Kombinationen in einem Reaktionsansatz und folglich die Detektion multipler DNA-Sequenzen in einer Untersuchung ermöglicht. Dabei ist die Multiplex TaqMan-RT-PCR mit bis zu fünf getrennt voneinander detektierbaren Zielsequenzen gegenwärtig der Stand der Technik und ermöglicht die molekularbiologische Untersuchung mehrerer, potenziell ätiologisch relevanter Erreger in einem Untersuchungsgang. Die in dieser Arbeit evaluierte Multiplex RT-PCR erfasst durch die Kombination verschiedener Primer und TaqMan-Sonden zwei unterschiedliche Zielsequenzen und eine Amplifikationskontrolle pro Untersuchungsgang.

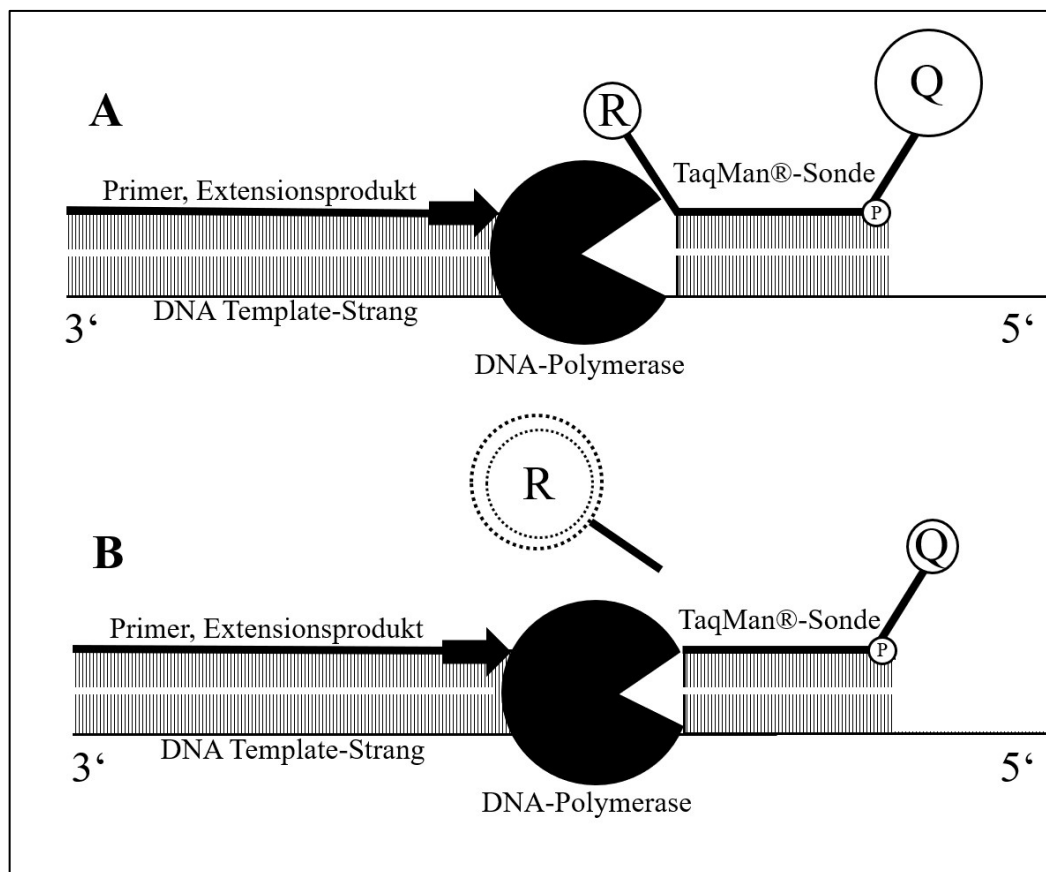


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Funktionsweise einer TaqMan-Sonde. Eine Sonde besteht aus einem Reporter (R) und Quencher (Q). Zunächst ist das Reportersignal unterdrückt (A). Bei Hybridisierung der Sonde mit der Zielsequenz wird die Sonde während der Strangverlängerung durch DNA-Polymerase abgespalten; die räumliche Nähe von Reporter und Quencher wird aufgehoben und somit das Reportersignal nicht mehr unterdrückt (B). Abbildung adaptiert nach [88,92,94,96].

1.4.3. Messung und Auswertung einer Real-Time PCR

Die gemessenen Daten werden mittels standardisierter Auswertealgorithmen interpretiert und letztlich in Form von Amplifikationskurven dargestellt. Diese Kurven stellen die Intensität der gemessenen Fluoreszenzemissionen je Amplifikationszyklus dar. Dabei wird anfänglich keine bzw. nur wenig Fluoreszenz (Hintergrundfluoreszenz) gemessen. Bei Zunahme der Amplifikate – pro abgelaufenem Zyklus – entsteht ein immer stärkeres Fluoreszenzsignal, das sich ab einem bestimmten Amplifikationszyklus deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt (Abbildung 4). Der Zyklus, in dem die Fluoreszenz diesen definierten Schwellenwert (threshold) überschreitet, nennt man Schwellenwert-Zyklus (cycle threshold, C_t -Wert) [93,97].

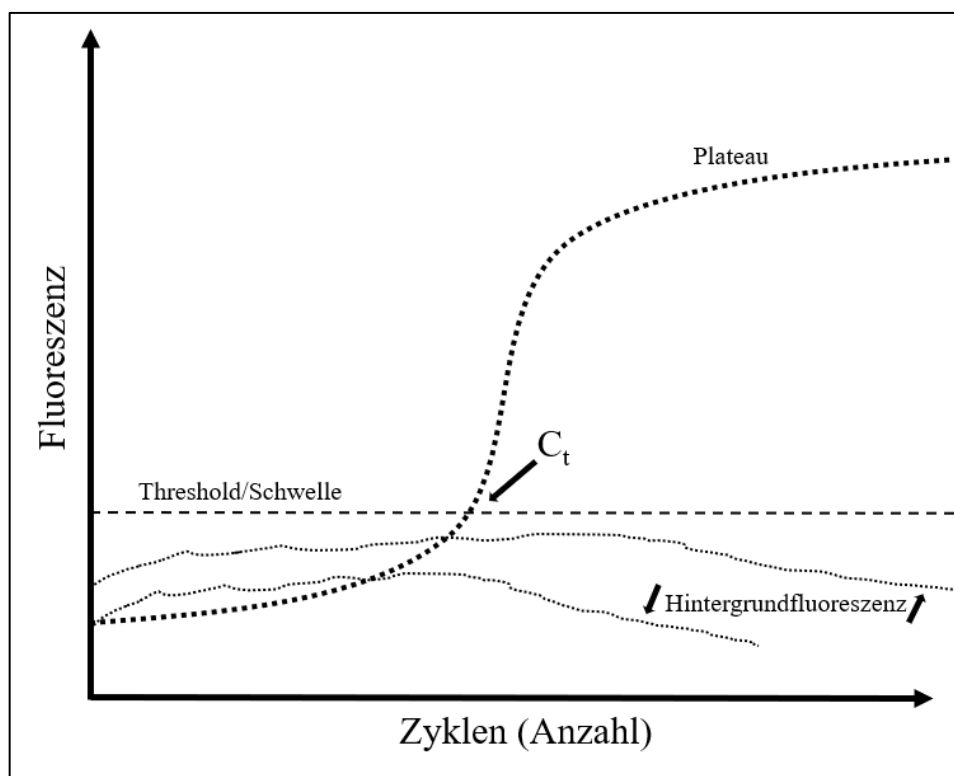


Abbildung 4 Veranschaulichung des C_t -Wertes. Die Fluoreszenz (Y-Achse) wird gegen die Zyklen (X-Achse) aufgetragen. Der C_t -Wert wird für den Punkt berechnet, an dem die Fluoreszenz einen festgelegten Schwellenwert überschreitet. Hier ist zudem die Hintergrundfluoreszenz beispielhaft eingezeichnet, die nicht ausreicht, um für ein entsprechendes Target einen C_t -Wert zu erzeugen. Abbildung adaptiert nach [93,97].

Der Schwellenwert und der Schwellenwert-Zyklus sind die kritischen Punkte einer TaqMan-Real-Time PCR. Wird die Schwelle im PCR-Verlauf überschritten, ist das Ergebnis der PCR rein qualitativ grundsätzlich als „positiv“ zu interpretieren. Darüber hinaus gibt der Amplifikationszyklus, in dem die Schwelle überschritten wird, aufgrund des umgekehrt proportionalen Verhältnisses von Amplifikatmenge im Reaktionsansatz zum Schwellenwert-Zyklus einen Aufschluss über die im Ausgangsmaterial enthaltenen Zielsequenzen. Je größer die Ausgangsmenge der Template-DNA in der Probe ist, desto früher kann ein verlässlicher Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden und desto kleiner ist der C_t -Wert [81]. In der Zusammenschau gibt der Schwellenwert-Zyklus dementsprechend Aufschluss darüber, ob und wieviel Ziel-DNA im Reaktionsansatz vorhanden ist.

Zur Kontrolle, inwieweit es sich bei dem gemessenen Fluoreszenzsignal um ein tatsächliches Amplifikationsereignis handelt, muss der weitergehende Verlauf der RT-PCR, sprich der Verlauf der Amplifikationskurve, betrachtet werden (Abbildung 4). Der Graph der Kurve muss nach Überschreiten des Schwellenwertes in eine Phase der exponentiellen Zunahme der gemessenen Fluoreszenzmissionen und letztendlich in eine Plateauphase ohne weitere

Zunahme der Lichtemissionen übergehen. Hier ist die Amplikonmenge so groß, dass keine Zunahme des Signals mehr gemessen werden kann. In dieser Phase herrscht häufig auch ein Substratmangel im Reaktionsansatz, sodass keine Amplifikation mehr möglich ist. Nur wenn die PCR-Kurve diesen Verlauf zeigt, ist von einem tatsächlich spezifischen Amplifikationsereignis auszugehen [83,94,98].

1.4.4. PCR-Automation

Schon in den 1990er Jahren wurde erkannt, dass die RT-PCR eine Grundlage der PCR-Automation sein könnte [81]. Besonders die Vereinfachung der DNA-Extraktion wurde als wichtige Säule in der Entwicklung von automatisierten PCR-Verfahren erkannt [99]. Es wurden daraufhin Multiplex Real-Time PCR-Tests entwickelt, die kein bzw. kaum „Postamplifikations-Handling“ benötigen [5]. Die Anfälligkeit des Testverfahrens – durch Beeinflussung durch den Anwender (z. B. Pipettieren, DNA-Extraktion) – kann durch Auswahl des Verfahrens (RT-PCR) und durch den Automatisierungsgrad reduziert werden [100].

Den Trend zur PCR-Automation ist auch u. a. im Bereich der Tuberkulose-Diagnostik aufgegriffen worden. Die früh verfügbaren automatisierten, kommerziellen Testverfahren vereinfachten den labortechnischen Arbeitsablauf und reduzierten die (manuelle) Bearbeitungszeit pro Probe. Neben der reduzierten Bearbeitungszeit wurden weitere Vorteile hervorgehoben, beispielsweise weniger Anforderungen an das Personal, Minimierung von Kontamination („Cross-Kontamination“), bessere Objektivierbarkeit der Ergebnisse, Reduktion der Testvariabilität sowie teilweise ökonomische Vorteile [101]. Der zunehmende Automatisierungsgrad in der Laboratoriumsmedizin reduziert im größeren Maße die Arbeitsanforderung an die jeweiligen Testsysteme bei meist gleichzeitiger Gewährleistung ausreichender Präzision des Tests – allerdings vor dem Hintergrund der ggf. höheren Kosten [83]. Automation kann zudem die Einbindung von Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT-Verfahren) in den Routinealltag eines Labors vereinfachen [102].

1.5. Anforderungen an Real-Time PCR-Verfahren in der Diagnostik

Um im Rahmen einer Diagnosestellung zuverlässige Aussagen darüber treffen zu können, ob ein Erreger in einer Probe enthalten ist oder nicht, müssen diagnostische Untersuchungsmethoden verschiedene Qualitäts- und Kontrollparameter erfüllen. Dazu muss sowohl die Untersuchungsmethode im Rahmen einer umfassenden Validierung auf ihre generelle

Eignung als auch jeder einzelne Untersuchungsgang hinsichtlich seiner Qualität geprüft werden. Die Maßnahmen zur Qualitätssicherung in der täglichen Arbeitsroutine jeder molekularbiologischen Methode stellen daher einen zentralen Bestandteil eines jeden Untersuchungsganges dar.

1.5.1. Qualitätssicherung diagnostischer PCRs

Die methodische Aussagekraft einer diagnostischen PCR wird im Wesentlichen über eine Reihe von Kontrollen (der Negativkontrolle, der Positivkontrolle und der Inhibitions- bzw. Proben-Prozesskontrolle) gesichert.

Die Negativkontrolle ermöglicht die Aussage, dass alle verwendeten Materialien und Substanzen frei von der gesuchten Ziel-DNA sind. Sie enthält ein grundsätzlich funktionales Reaktionsgemisch, dem als Template sicher Ziel-DNA-freies Wasser zugegeben wird. Bei ordnungsgemäß „negativem“ (in diesem Fall richtigem) Ausfall dieser Kontrolle sind somit potenzielle Kontaminationen im Reaktionsgemisch ausgeschlossen. Hierdurch könnten sonstige positive PCR-Ergebnisse zuverlässig als positive Patientenmaterialien interpretiert werden. Die Negativkontrolle wird einmal pro Untersuchungsgang durchgeführt [103–105].

Die Positivkontrolle dient zur Bestätigung der generellen Funktionalität des eingesetzten Reaktionsgemisches. Sie enthält neben dem Reaktionsgemisch als Template sicher Ziel-DNA-haltige Materialien. Diese sind meist Ziel-Gen-enthaltende Plasmide, welche dem Reaktionsgemisch in definierter Konzentration zugegeben werden. Bei ordnungsgemäß „positivem“ Ausfall dieser Kontrolle können sonstige negative Testergebnisse zuverlässig als negative Patientenmaterialien interpretiert werden [103,104,106]. Die Positivkontrolle wird ebenfalls einmal pro Untersuchungsgang durchgeführt.

Die Inhibitionskontrolle (auch Proben-Prozesskontrolle oder Amplifikationskontrolle genannt) dient zur Eignungskontrolle der zu untersuchenden Patientenmaterialien. Sie bestätigt die generelle Amplifizierbarkeit von Nukleinsäuren im Patientenmaterial und schließt bei „positivem“ Ausfall die Anwesenheit inhibitorischer Substanzen oder sonstiger, die Amplifikation/Detektion störende Einflüsse im Patientenmaterial aus. Dies garantiert, dass negative Untersuchungsergebnisse der Ziel-DNA tatsächlich aufgrund fehlender Templates und nicht aufgrund von Funktionseinschränkungen des PCR-Laufs zustande kommen [104,105,107–109].

In der Zusammenschau müssen alle Kontrollen erwartungsgemäß ausfallen, um die Funktionalität des Testlaufs und die Qualität der Testergebnisse zu garantieren. Die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen stellen daher zentrale Bestandteile der Ergebnisinterpretation molekularbiologischer Untersuchungen dar und werden in molekular-diagnostischen Laboren im Rahmen des Qualitätsmanagements (QM) dokumentiert.

1.5.2. Methodenvalidierung

Bevor jedoch eine Methode überhaupt in der molekularbiologischen Routinediagnostik eingesetzt werden darf, muss sowohl die generelle Eignung der Methode als auch ihre Leistungsfähigkeit hinlänglich geprüft bzw. optimiert werden. Als definitionsgemäß „nicht genormtes“ Verfahren muss dabei – neben der generellen Eignung – auch die Leistungsfähigkeit der Methode objektiv nachgewiesen werden. Diese objektive Überprüfung bzw. Validierung wird im IMIKRO der Universitätsmedizin Rostock gemäß der internen Standardarbeitsanweisung (SAA-IN QM VM 10 03 5) durchgeführt. Diese SAA enthält die zentralen Vorgaben der DIN EN ISO 15189:2013-03, DIN EN ISO/IEC 17025:2005 und der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (Rili-BÄK)) sowie die In-vitro-Diagnostika-Richtlinien der Europäischen Union (IVD-Richtlinie). Die Validierung neuer (Test-)Verfahren erfolgt unter der Grundvoraussetzung, dass eine ausführliche Dokumentation von z. B. Umgebungsfaktoren wie Temperaturen, Transportzeiten sowie eingesetzter Geräte und Materialien stattfindet. Hierfür sind regelmäßige Kontrollen und Kalibrierungen der genutzten Geräte und Materialien entsprechend der nötigen Anforderungen nötig [110].

Zur Validierung müssen die analytischen Leistungsdaten wie die „Sensitivität“, die „analytische Sensitivität“ (Nachweisgrenze), die „Spezifität“, die „Präzision“ und die „Richtigkeit“ beschrieben werden. Auch der direkte Vergleich zu bereits etablierten Untersuchungsmethoden kann Bestandteil einer Validierung sein, um mindestens eine Gleichwertigkeit bzw. mögliche diagnostische Verbesserungen zu bestätigen. Die durchzuführenden Untersuchungen müssen in Art und Umfang gemäß den oben genannten Normen vordefiniert und exakt dokumentiert werden [104,111].

Die Sensitivität ist definitionsgemäß das Maß für die Anzahl „richtig positiver“ Ergebnisse verglichen mit der Gesamtzahl aller positiven Ergebnisse. Sie wird meist in Prozent angegeben und beschreibt die Verlässlichkeit mit der positive Ergebnisse der Wahrheit entsprechen [112]. Häufig wird unter dem Begriff der Sensitivität – in Bezug auf

laborchemische Analysen – auch die Bestimmung der „analytischen Sensitivität“, also der Nachweisgrenze der Methode für den jeweiligen Analyten verstanden. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze werden Verdünnungsreihen sicher positiver Kontroll- oder Referenzmaterialien durchgeführt: Die niedrigste Konzentration, bei der mindestens 95 % aller erzielten Ergebnisse dem „positiven“ Erwartungswert entsprechen, wird als Nachweisgrenze bezeichnet [109,113].

Die Spezifität ist das Maß für die Anzahl „richtig negativer“ Ergebnisse verglichen mit der Gesamtzahl aller negativen Ergebnisse [112]. Sie wird ebenfalls in Prozent angegeben und beschreibt die Verlässlichkeit mit der negative Ergebnisse der Wahrheit entsprechen [113,114]. Es werden hierzu auch potenziell kreuzreaktive Reaktionspartner und bekannt negative Proben in die Testung einbezogen [109].

Die Vorhersagewerte (positiver und negativer prädiktiver Wert) werden ermittelt, um darzulegen wie viele der positiv bzw. negativ getesteten Personen tatsächlich positiv bzw. negativ für den jeweiligen Analyten sind [112].

Die Bestimmung der Präzision (= Wiederholgenauigkeit) beschreibt den Grad der Übereinstimmung zwischen einzelnen, unabhängigen Messergebnissen [115]. Das Maß der Präzision wird in Form der relativen Standardabweichung – dem Variationskoeffizienten – der erhobenen Einzelwerte vom Mittelwert angegeben. Die Wiederholgenauigkeit – bezogen auf unveränderte Testbedingungen – kann als Präzision in einer Serie, als sogenannter Intraassay, bezeichnet werden. Im Vergleich beschreibt der sogenannte Interassay die Variation innerhalb unterschiedlicher Testserien eines Labors. Entsprechende Einflüsse, die zur Variation führen können, wären z. B. Zeit(-punkt), Untersuchender (Anwender) oder genutzte Messgeräte [109].

Der Begriff der Richtigkeit umschreibt den Grad der Übereinstimmung der ermittelten Messergebnisse (inklusive ihres Mittelwertes) mit einem tatsächlich wahren Wert (z. B. anerkannter Referenzwert) [109,116].

Durch die Bestimmung der oben genannten Qualitätskennzahlen im Rahmen der Validierung kann sichergestellt werden, dass die PCR-Methode für die Diagnostik im Laboralltag geeignet ist.

2. Zielsetzung der Arbeit

Da die Entwicklung von *Mycobacterium*-bezogenen PCR-Testverfahren, speziell Multiplex Real-Time PCR-Testverfahren, stark voranschreitet, bestand am IMIKRO zu Beginn dieser Arbeit Bedarf für einen umfassenden molekularbiologischen Test, der die ätiologisch weniger relevanten, aber dennoch zunehmend bedeutsamen *NTM* nicht vernachlässigt [117]. Es fehlten zuverlässige und schnell verfügbare Tests, die im Rahmen der Diagnostik dazu geeignet sind, bei mikroskopischem Nachweis von „säurefesten Stäbchen“ die diagnostische Lücke zum dezidierten Ausschluss von *MTC* bzw. zum Nachweis von *NTM* zu schließen [46]. Die hohe Mortalität von *NTM*-Infektionen unterstreicht die Notwendigkeit zur Verbesserung und Erleichterung der Diagnostik solcher *NTM*-Infektionen [40].

Die zu Beginn dieser Arbeit am IMIKRO verfügbaren NAT-Verfahren wurden diesen Ansprüchen nicht vollends gerecht. Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Entwicklung und Validierung eines vollautomatisierten Multiplex Real-Time PCR-Testverfahrens auf dem BD MAX™ System zur raschen In-vitro-Diagnostik von *MTC* und *NTM* aus Sekretproben des Respirationstraktes sowie aus Blutproben. Zu diesem Zweck wurden die folgenden Arbeitsschritte nach den Maßgaben für In-vitro-Diagnostika gemäß DIN EN ISO 15189:2013-03, DIN EN ISO/IEC 17025:2005, Rili-BÄK und IVD-Richtlinie durchgeführt:

1. Literaturrecherche der verfügbaren Fachliteratur nach geeigneten PCR-Methoden,
2. Anpassung und Optimierung prinzipiell geeigneter Techniken entsprechend den definierten Anforderungen und den gerätetechnischen Gegebenheiten,
3. Prüfung des optimierten Verfahrens hinsichtlich seiner funktionellen Eignung,
4. Überprüfung des Verfahrens auf seine diagnostische Leistungsfähigkeit, insbesondere im Hinblick auf Intraassay-Präzision, Interassay-Präzision, Sensitivität, Spezifität, Kreuzreaktivität, potenzielle Matrixeffekte sowie ggf. eine mögliche Verbesserung der diagnostischen Qualität im Vergleich zu bereits etablierten Methoden.

Durch die Entwicklung und Etablierung eines automatisierten Multiplex RT-PCR-Verfahrens am IMIKRO sollte das übergeordnete Ziel verfolgt werden, eine nachhaltige Verbesserung der Aussagekraft der TB-Diagnostik innerhalb der ersten 24 Stunden nach Eingang des Patientenmaterials zu erreichen.

3. Materialien und Methoden

Neben der Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Laborgeräte und -materialien beschreibt der nachfolgende Abschnitt besonders die für diese Arbeit zentrale Plattform BD MAX™ und das Erstellen des hierfür benötigten Arbeitsmixes.

3.1. Geräte

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die eingesetzten Laborgeräte. Aufgrund der Bedeutung des BD MAX™ und des PlateMax™-Systems für die vorliegende Arbeit werden diese beiden Geräte nachfolgend im Detail aufgeführt.

Tabelle 4 Übersicht der verwendeten Geräte am IMIKRO

Gerät	Spezifische Angaben & Hersteller
Kühlschrank	2-8 °C, diverse Hersteller
Gefrierschrank	-20 °C, diverse Hersteller (u. a. Liebherr, Deutschland)
Inkubator	Modell KBWF 240, Binder GmbH, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Herasafe KS18, ThermoFisher, USA
Vortex Mixer	IKA® Vortex Genius 2/3 2, Scientific Industries Inc., USA
Densitometer	Vitek 2 Denscheck™, bioMérieux SA, Frankreich
Axygen™ PlateMax™ inkl. Zubehör	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
BD MAX™ System	Modellnummer: 449116, Becton, Dickinson & Company, Heidelberg, Deutschland
BD MAX™ PCR Karte	Becton, Dickinson & Company, Heidelberg, Deutschland
BD MAX™ Halterung für konische Röhrchen	Becton, Dickinson & Company, Heidelberg, Deutschland

3.1.1. BD MAX™

Das BD MAX™ System diene als Plattform zur Etablierung der oben genannten Multiplex RT-PCR. Das offene RT-PCR-Komplettsystem BD MAX™ arbeitet vollautomatisiert von der Zellyse, der Nukleinsäure-Extraktion, über die Amplifikation und Detektion bis hin zur Darstellung der Ergebnisse. Es ermöglicht das Entwickeln von und Arbeiten mit individuellen in-house-Protokollen (auch user developed protocols, UDP) mit eigenen Mastermixen und eignet sich zur zügigen und flexiblen In-vitro-Diagnostik inklusive der individuellen Ausgestaltung molekularbiologischer Arbeitsroutinen und der zeitnahen Abarbeitung dringender klinisch-diagnostischer Fragestellungen.

Das System besteht aus den folgenden Elementen:

- PCR-Gerät (BD MAX™ System),
- modulare DNA-Extraktions-Gebinde/Teststreifen, Probenröhrchen, Probengestelle und PCR-Karten,
- Computer inklusive Steuerungs- bzw. Auswertungssoftware,
- Strichcodelesegerät,
- Vorwärmestation,
- Drucker,
- Stromversorgungsmodul.

Das BD MAX™ System enthält zwei Module und kann insgesamt zwei Probengestelle (A und B) à zwölf DNA-Teststreifen in Position A (Abbildung 5, linke Seite) oder Position B (Abbildung 5, rechte Seite) aufnehmen.

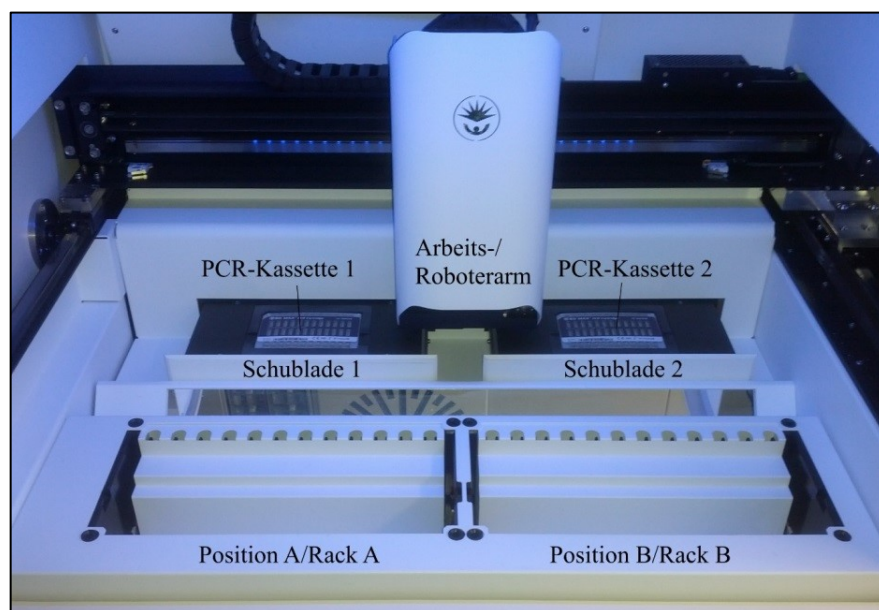


Abbildung 5 Übersicht über die Arbeitsplattform BD MAX™. Im Hintergrund sind zwei eingelegte PCR-Karten (sogenannte Cartridges) sichtbar. Die Positionen A und B für die Probengestelle sind hier jeweils leer. Eigene Abbildung.

Ein Pipettierroboter ist mit vier Pipetten ausgestattet, um die flüssigen Proben zu den jeweiligen Reagenzröhrchen der DNA-Teststreifen (Extraktionskits/Gebinde) oder zur PCR-Kaarte zu transportieren. Die Pipettenspitzen (2x 1 ml, 2x 175 µl Volumen) werden auf den DNA-Teststreifen herstellerseitig bereitgestellt. Durch das geräteeigene QM-System wird vor Testbeginn sowohl die richtige Testzusammenstellung als auch die korrekte Lage der

jeweiligen Testbestandteile automatisch kontrolliert. Ein Barcodescanner ermöglicht das Zuordnen der Probenröhrchen zu den passenden DNA-Teststreifen, den jeweiligen Einsteckröhrchen und den PCR-Karten (Cartridges); somit können Fehler beim Assemblieren des Testsystems grundsätzlich ausgeschlossen werden.

Die mit Patientenmaterial versehenen Probenröhrchen werden mit den modularen DNA-Teststreifen in die Probengestelle gesteckt und automatisch den PCR-Karten zugeordnet. Die PCR-Karten in Kreditkartenformat sind zweireihig aufgebaut: Jede der Reihen besteht aus zwölf Einzelpfaden. Diese Pfade enthalten Flüssigkeitsein- und -auslässe, mikrofluide Kanäle (10 µl Volumen je Kanal), Mikroklappen und Reaktionskammern (4 µl Volumen je Kammer).

Pro gestartetem PCR-Lauf kann entweder die eine (obere) oder die andere (untere) Reihe angesteuert werden. Die Mikroklappen enthalten eine geringe Menge an Wachs, das kurz vor dem Start des PCR-Protokolls geschmolzen wird, um die Reaktionskammern zu versiegeln und das Ampflifikat vor Verdunstung und Kontamination zu schützen. Die Karten werden in je einem der zwei Lesebereiche (Schubladen) platziert. Diese Lesebereiche beinhalten u. a. vier Funktionseinheiten: Lageüberprüfung der PCR-Karten, Druckkontrolle, Temperatursystem und optisches Lesesystem der Fluoreszenz/Detektor. Pro Leseinheit stehen fünf Fluoreszenzkanäle zur Auswahl (Tabelle 5).

Tabelle 5 Fluoreszenzkanäle am BD MAX™ (Tabelle adaptiert nach [118,119])

Kanal (Wellenlänge in nm; Anregung/Emission)	Farbstoff (Namen, beispielhaft)
475/520	FAM™
530/565	VIC™
585/630	Cal Red™ / ROX™
630/665	Cy®5
680/715	Cy®5.5

Namen und Abkürzungen: FAM™, 6-carboxy-Fluorescein; VIC™, 2'-chloro-7-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein; Cal Red™, 2-Hydroxy-1-(2-hydroxy-4-sulfo-1-naphthylazo)-3-naphthoic Acid; ROX™, 6-carboxy-X-Rhodamin; Cy®, Carbocyanin.

3.1.2. PlateMax™

Der Axygen™ PlateMax™ der Firma Fisher Scientific ist ein halbautomatisches Plattenversiegelungssystem. Das Gerät versiegelt die kleinen, konischen Röhrchen (auch „Conical Tubes“ genannt), indem spezielle Folien durch eine kurze Hitzeapplikation mit den Röhrchen verschweißt werden. Mit diesem Gerät können die Arbeitsmixe präaliquotiert

werden. Im Bedarfsfall muss hierdurch die benötigte Nasschemie für die PCR nicht extra angesetzt werden, sondern kann aus den vorbereiteten Beständen verwendet werden.

3.2. Labormaterialien

In Tabelle 6 werden nachfolgend die benötigten Materialien in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt.

Tabelle 6 Überblick über Labormaterialien

Labormaterialien
aerosoldichte Pipettenspitzen (10, 20, 200 und 1000 µl) (diverse Hersteller)
autoklavierbarer Abfallbehälter (diverse Hersteller)
BD MAX™ konische Röhrchen, Volumen 0,3 ml
Columbia-Agarnährböden (z. B. BD, Deutschland)
Einmalschutzhandschuhe (Nitril, ungepudert; diverse Hersteller)
Einwegimpfösen (diverse Hersteller)
Entsorgungsbeutel für Tischabwurf
Eppendorf-/Gilsonpipetten (variabel, Maximalvolumina bis 10, 20, 200 und 1000 µl)
Eppendorfreaktionsgefäße, steril (dünnwandig; Volumen 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml; z. B. Sarstedt, Deutschland)
Glasröhren (5 ml Volumen; z. B. Sarstedt, Deutschland)
Röhrchenständer (diverse Hersteller)
Schokoladen-Agarnährböden (z. B. Chocolate II Agar; BD, Deutschland)
Schutzkittel (diverse Hersteller)
Versiegelungsfolien für PlateMax™
wasserfester Faserstift (diverse Hersteller)

3.3. Lösungen und Testreagenzien

Es folgt die Beschreibung von genutzten Lösungen und Reagenzien inklusive z. B. der Hersteller-seitigen DNA-Gebinde (Kits) sowie der Patienten- und Kulturmaterialien.

3.3.1. Lösungen

Verwendete Lösungen und Flüssigkeiten zum Ansetzen der Arbeitsmische oder der Proben-vorbereitung sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7 Überblick über verwendete Lösungen

Produkt/Name	Gebindegröße/Volumen	Hersteller
Nuclease-Free-Water	25 ml	Promega, Madison, USA
Doppelt-deionisiertes Wasser	beliebig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
NaCl 0,9 %	beliebig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland

3.3.2. DNA-Extraktionsgebinde

Alle für die DNA-Extraktion benötigten Reagenzien und Verbrauchsstoffe werden in vom Hersteller vorgefertigten DNA-Extraktionsgebinden mit Teststreifen (sogenannten „DNA-Kits“) bereitgestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gebinde waren die des Typs „ExK™ DNA-1“ und „ExK™ DNA-2“, jeweils der Herstellerempfehlung entsprechend für die untersuchten Probenarten Blut und Sputum (Tabelle 8). Die DNA-1- und DNA-2-Extraktionsgebinde unterscheiden sich nicht im generellen Aufbau voneinander, sondern hinsichtlich der enthaltenen Pufferlösung (SB-1 vs. SB-2; herstellerseitige Bezeichnung) sowie des Probenpuffer-Volumens (750 µl vs. 1500 µl).

Tabelle 8 Überblick über verwendete DNA-Gebinde

Name	Unterstützte Probenart	Komponenten
ExK™ DNA-1	Blutplasma und -serum, Urin	Extraktionsröhrchen (A8), Sample Buffer Type SB-1 (750 µl Volumen) inklusive Verschlusskappen, Teststreifen (S05)
ExK™ DNA-2	Liquor, Trockenabstriche	Extraktionsröhrchen (A8), Sample Buffer Type SB-2 (1500 µl Volumen) inklusive Verschlusskappen, Teststreifen (S05)

Beim BD MAX™ System wird ein Probenröhrchen (sogenannte „sample buffer tubes“, SBT) einem Teststreifen zugeordnet und entspricht somit genau einer Patientenprobe (Abbildungen 6 und 7). In die SBT wird die jeweils zu untersuchende Patientenprobe gegeben. Die Probenstreifen beinhalten alle Materialien, Reagenzien und Informationen, die für einen vollständigen Testlauf benötigt werden. Auf Position 0 liegt der Lyse- und Reaktionsröhrchen. Lediglich die Einsteckröhrchen inkl. Extraktions-Röhrchen (Position 1), das Mastermix-Röhrchen (Position 2) und das Arbeitsmix-Röhrchen (Position 3) müssen in Vorbereitung auf den Testlauf zugeordnet werden.

Das Extraktions-Röhrchen enthält alle notwendigen Bestandteile für die Teststreifen-spezifischen Extraktionsprotokolle und wird immer mit dem Extraktionsgebinde mitgeliefert. Es enthält neben einigen Salzen beschichtete Magnetkügelchen zur Aufreinigung der extrahierten DNA. Das Mastermix-Röhrchen enthält alle Zutaten für die durchzuführende PCR in lyophilisierter Form. Im Wesentlichen enthalten sind PCR-Puffer, MgCl₂, DNA-Polymerase, Nukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), das SPC-Template (Prozesskontrollprobe), die SPC-Primer und die SPC-Sonde. Auch die Mastermix-Röhrchen werden im

Testgebinde mitgeliefert. Das Arbeitsmix-Röhrchen enthält den mittels PlateMax™ vorbereiteten Arbeitsmix.

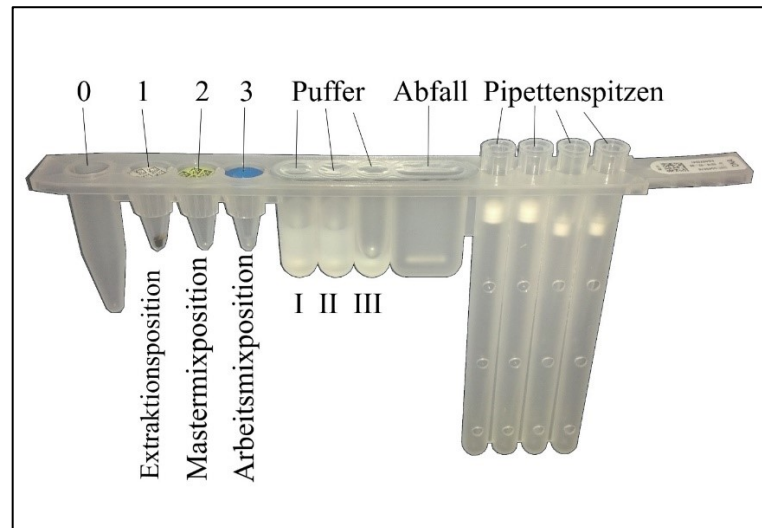


Abbildung 6 BD MAX™ Teststreifen: DNA-I-Extraktionsgebinde mit den bereits eingesetzten Einsteckröhrchen. Eigene Abbildung.

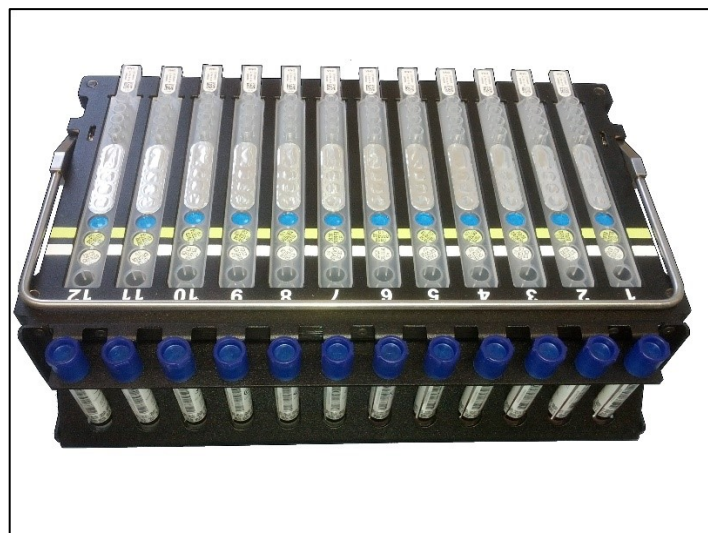


Abbildung 7 Beispielhaft beladenes Probengestell: Die Teststreifen sind eingelegt (1-12). Die dazugehörigen Patientenproben befinden sich in den – mit blauen Kappen versehenen – Probenröhrchen. Das beladene Gestell wird dann auf Position A oder B (vgl. Abbildung 5) in das BD MAX™ System geben. Die Analyse kann daraufhin gestartet werden. Eigene Abbildung.

3.3.3. Arbeitsmix

Der Arbeitsmix enthält alle Primer und Sonden, die zum Nachweis der eigentlichen Zielsequenzen benötigt werden. Die Primer und Sonden werden dabei pro Arbeitsmix-Röhrchen mit 2 µl BD MAX™ Diluent (gemäß den Herstellerangaben) gemischt und auf 12,5 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. In Tabelle 9 sind die herstellerseitigen Empfehlungen bzw. Volumenvorgaben für den Arbeitsmix aufgeführt.

Tabelle 9 Volumenvorgaben für den Arbeitsmix entsprechend den Herstellerempfehlungen

Komponente	Volumenvorgabe
BD MAX™ Diluent	2 µl
Primer und Sonden	maximal 10,5 µl
Wasser	um auf das Gesamtvolumen aufzufüllen
Gesamtvolumen je Arbeitsmix-Röhrchen pro Reaktion	12,5 µl

Die Zusammensetzung des Arbeitsmixes besteht stets aus den Primern „TB-1F“, „TB-1R“, „MysppF“ und „MysppR“, den Sonden „FAM-TB-TM“ und „Myspp-Probe“, dem BD MAX™ Diluent und Nukleinsäure-freiem Wasser (ddH₂O). Die Synthese der Primer und Sonden führte die TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin, nach Maßgaben des IMIKRO durch (Tabelle 10).

Die Sequenzen für die Forward- und Reverse-Primer sowie die Sonde für *MTC* wurden einem bereits am IMIKRO etabliertem Test von Eisenach et al. entnommen und getestet (adaptiert von [120]). Die Sequenzen für die Forward- und Reverse-Primer sowie die Sonde für *Myspp* entstammen dem Testprotokoll von Bruijnesteijn van Coppenraet et al. [117]. Die entsprechenden Farbstoffe und Quencher wurden vom Primerhersteller nach unseren Vorgaben für den BD MAX™ gewählt. Die Konzentrationen der Primer und Sonden wurden im Rahmen der Vorversuche variiert, um den optimalen Reaktionsansatz zu ermitteln.

Nach Abschluss der Vorversuche wurde der Arbeitsmix immer gemäß der entwickelten Rezeptur angesetzt, um die entsprechenden Primer- bzw. Sondenkonzentrationen zu erreichen. Tabelle 11 zeigt die Sonden- und Primerkonzentrationen, wie sie beim Hersteller gefertigt worden sind, Tabelle 12 die Zusammensetzung des Arbeitsmixes zu Beginn der Vorversuche; jeweils ein Arbeitsmixansatz wurde zum weiteren Gebrauch präaliquotiert.

Tabelle 10 Für die Ziele *MTC* und *NTM/Myspp.* gewählte Primer und Sonden

Erreger	Primer/ Sonde	Name	Sequenz (von 5' nach 3')	GC/%	bp	Position
<i>MTC</i>	Forward	TB-1F	CGAACGGCTGATGACCAAAC	52,4	21	IS6110
	Reverse	TB-1R	CGACACATAGGTGAGGTCTGCTAC	54,2	24	IS6110
	Sonde	FAM-TB-TM	FAM-ATCTCGTCCAGCGCCGCTTCG GAC-BBQ	66,7	24	
<i>Myspp.</i>	Forward	MysppF	GGGGTGTGGTGTGTTGAG	58,8	17	ITS
	Reverse	MysppR	CTCCACgTCCTTCATC	58,8	17	23S rRNA
	Sonde	Myspp-Probe	ROX-TGGATAGTGGTTGCGAGCATC -BBQ	52,4	21	ITS

Abkürzungen und Erläuterungen: BBQ, BlackBerry® Quencher; bp, Basenpaare (entspricht der Amplikonlänge); IS6110, Insertionssequenz 6110, eine Sequenz, die ausschließlich bei Mitgliedern des *MTC* nachweisbar ist; ITS, Internal transcribed spacer, eine Nukleotidsequenz, die zum Nachweis von Mykobakterien genutzt wird. FAM, 6-Carboxyfluorescein, ein Fluoreszenzfarbstoff; *MTC*, *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex; *Myspp.*, hier genutzter Neologismus für die Sondenbezeichnung zur Detektion von *Mycobacterium* Spezies/*NTM*. GC/%, relativer Gehalt an Guanin und Cytosin; ROX, X-Rodamin, ein Fluoreszenzfarbstoff.

Tabelle 11 Sonden- und Primerkonzentrationen in Lösung

Bezeichnung	Molare Konzentration ^a	Volumen ^b	Referenznummer
TB-1F	20 µM (20 pmol)	250 µl	#1659823
TB-1R	20 µM (20 pmol)	250 µl	#1659824
FAM-TB-TM	20 µM (20 pmol)	217 µl	#1659828
MysppF	20 µM (20 pmol)	250 µl	#1659825
MysppR	20 µM (20 pmol)	250 µl	#1659826
Myspp-Probe	20 µM (20 pmol)	219 µl	#1659831

Erläuterung: ^a Wenn gelöst in 1 ml Lösungsmittel. ^b Das durch Zugabe von ddH₂O zu erreichende Volumen, um entsprechende Konzentrationen (wie in ^a) zu erhalten.

Tabelle 12 Arbeitsmix zu Beginn der Vorversuche

Bezeichnung	Volumen (µl)	Konzentration
MysppF	1 µl	20 pmol/µl
MysppR	1 µl	20 pmol/µl
Myspp-Probe	0,5 µl	20 pmol/µl
TB-1F	1 µl	20 pmol/µl
TB-1R	1 µl	20 pmol/µl
FAM-TB	0,5 µl	20 pmol/µl
BD MAX™ Diluent	2 µl	-
ddH ₂ O	5,5 µl	-
Gesamtvolumen	12,5 µl	

Die Aliquots werden mittels PlateMax™-System einzeln versiegelt (Abbildung 8). Hierzu wurden die konischen Röhrchen mit je 12,5 µl des Arbeitsmixes befüllt und in den zum PlateMax™ gehörenden Aluminiumrahmen gesetzt. Die konischen Röhrchen wurden mit Versiegelungsfolie abgedeckt und anschließend im PlateMax™ bei 180 °C Versiegelungstemperatur in maximal 10 bis 15 Sekunden Versiegelungszeit verschlossen. Die so angefertigten Arbeitsmixe wurden danach bei -20 °C gelagert und konnten bei Bedarf aufgetaut und genutzt werden.



Abbildung 8 Aliquot als einzelnes Einsteckröhrchen mit Folie verschweißt. Beispiel, eigene Aufnahme.

3.3.4. Patientenmaterialien

Als Patientenmaterial wurden diverse Blut- (EDTA) und Sekretproben des Respirationstraktes (Sputum, Trachealsekret, Bronchialsekret) aus verschiedenen stationären und ambulanten Abteilungen der Universitätsmedizin Rostock herangezogen. Für die PCR-Etablierung am BD MAX™ System wurde kein heparinisiertes Blut genutzt, da dieses laut geltender Standardarbeitsanweisung (SAA-MD OM TP / 16 03 13) aufgrund der inhibitorischen Wirkung des Heparins nicht für einen PCR-Lauf empfohlen wird; für EDTA-Blut sind zwar ebenfalls inhibitorische Einflüsse auf PCR-Läufe beschrieben worden, jedoch werden EDTA-haltige Proben entsprechend obiger SAA nicht ausgeschlossen.

Zur Sicherstellung der Arbeitssicherheit wurden alle potenziell infektiösen Patientenrohmaterialien vor Durchführung jeglicher Untersuchungen gemäß gültiger SAA im Labor der Schutzstufe 3 (S3-Labor) thermisch inaktiviert. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte entweder als 1-1,5 ml-Aliquots in Eppendorfgläsern oder in 10 ml-Blutentnahmemonovetten und Sputumröhrchen (jeweils bei -20 °C). Aufgrund der geringen Anzahl verfügbarer positiver Patientenproben wurden zuvor negativ getestete Blut-/Sputumproben mit Referenz-DNA versetzt, um so positive Patientenproben zu simulieren und eine ausreichende Anzahl an Proben für die Validierung zu gewinnen. Dieses sogenannte „Spiken“ (Versetzen) der Rohmaterialien mit Referenz-DNA für die Vorversuche erfolgte unter strikter Einhaltung der Sicherheitsbestimmungen und wurde ebenfalls im S3-Labor durchgeführt. Alle verwendeten

Rohmaterial-Proben inklusive ihrer für die Versuche gewählten Nummerierung (Blut: 1-23; Sekret: I-XXII) sind in Tabelle 13 aufgelistet. Zur einfacheren Handhabbarkeit (z. B. kurze Auftauzeit) wurden weiterführend 110 µl-Aliquots erstellt, die bei -20 °C gelagert wurden.

Tabelle 13 Nummerierung der Patientenrohmaterialien (Blut und Sekret)

Blut		Sekrete des Respirationstraktes	
Probennummer	Interne Bezeichnung	Probennummer	Interne Bezeichnung
1	1951	I	w2859
2	1952*	II	1312
3	w1209	III	1550
4	1633	IV	1925
5	766	V	1984
6	1049	VI	w997
7	555	VII	w953
8	556	VIII	533
9	w1444	IX	500
10	549	X	2548
11	w04314	XI	w04448
12	w04586	XII	w04295*
13	w04613	XIII	w0294
14	997	XIV	w04011
15	w953	XV	w06298*
16	w06103*	XVI	w06299
17	w06026	XVII	w06196
18	w06028	XVIII	w05878
19	w05797	XIX	w05879 I*
20	w05831	XX	w05879 II
21	w05844*	XXI	w05942
22	w06218	XXII	w05915
23	w06216		

Erläuterung: Bei mit * markierten Proben trat im Versuchsverlauf vereinzelt PCR-Inhibition auf.

3.3.5. Kulturmaterien

Als Kulturmaterien und somit als Positivproben wurden im Labor archivierte Mykobakterien-Stämme herangezogen. Diese positiven Kulturmaterien sind in Tabelle 14 aufgeführt. Für die Erstellung von schwach-positiven Proben wurden Verdünnungen von 1:1000 bis 1:10 erstellt.

Tabelle 14 Kulturmaterien der Universität Rostock

Kulturmaterien	Ringversuch (Nummer)	Erreger
T1017	-/-	<i>M. tuberculosis</i>
T1057	-/-	<i>M. tuberculosis</i>
T1152	-/-	<i>NTM/atypisch</i> – nicht näher bezeichnet
T1155	-/-	<i>NTM/atypisch</i> – nicht näher bezeichnet
T91	155	<i>M. bovis</i>
T99	159	<i>M. tuberculosis</i>
T100	160	<i>M. tuberculosis</i>
T102	162	<i>M. bovis</i>
T788	111	<i>M. malmoense</i>
T885	133	<i>M. abscessus</i>
T891	135	<i>M. celatum</i>
T894	138	<i>M. intracellulare</i>
T895	139	<i>M. chelonae</i>
T131	143	<i>M. marinum</i>
T135	147	<i>M. szulgai</i>
T791	153	<i>M. fortuitum</i>
T97	157	<i>M. kansasii</i>
T101	161	<i>M. gordonae</i>

Erläuterung: T-Nummern, inaktiviertes Kulturmaterien entsprechend gültiger Standardarbeitsanweisung. Die Nummern wurden durch das Labor (Archiv) vorgegeben.

Neben den obigen Stämmen wurden weitere Bakterienstämme zur Testung der Kreuzreaktivität und Spezifität benötigt. Insgesamt 25 Bakterien- und Erregerstämme wurden aus dem Fundus der Qualitätskontroll-Stämme des IMIKRO herangezogen (Tabelle 15).

Tabelle 15 Bakterienstämme zur Testung der Kreuzreaktivität

Probennummer	Referenz-/Kollektionsnummer	Erreger
1	ATCC® 29213 TM	<i>Staphylococcus aureus</i>
2	ATCC® 25922 TM	<i>Escherichia coli</i>
3	NCTC® 12493 TM	<i>Staphylococcus aureus</i>
4	ATCC® 27853 TM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
5	ATCC® 49619 TM	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
6	ATCC® 9334 TM / NCTC 8468	<i>Haemophilus influenzae</i>
7	ATCC® 49247 TM	<i>Haemophilus influenzae</i>
8	ATCC® 51299 TM	<i>Enterococcus faecalis</i>
9	ATCC® 700603 TM	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
10	ATCC® 700324 TM	<i>Klebsiella oxytoca</i>
11	ATCC® BAA 1152 TM	<i>Eikenella corrodens</i>
12	ATCC® 29212 TM	<i>Enterococcus faecalis</i>
13	ATCC® 13048 TM	<i>Enterobacter aerogenes</i>
14	ATCC® 14053 TM	<i>Candida albicans</i>
15	ATCC® MYA 2950 TM	<i>Candida glabrata</i>
16	ATCC® 35218 TM	<i>Escherichia coli</i>
17	ATCC® 13813 TM	<i>Streptococcus agalactiae</i>
18	ATCC® 12344 TM	<i>Streptococcus pyogenes</i>
19	DSM 1798	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
20	ATCC® 29212 TM	<i>Enterococcus faecalis</i>
21	ATCC® 13883 TM	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
22	ATCC® 9542 TM	<i>Streptococcus equisimilis</i>
23	DSM 5570	<i>Shigella sonnei</i>
24	ATCC® 9610 TM	<i>Yersinia enterocolitica</i>
25	DSM 5569	<i>Salmonella typhimurium</i>

Neben den vorgenannten (Kultur-)Materialien wurde einmalig testweise Plasmid-DNA (kloniertes Amplikon der PCR des IS6110-Insertionselementes von *MTC*, 1 pg/μl) als Positivmaterial im Zuge der Vorversuche (Kapitel 4.1.) genutzt.

3.4. Ablauf der PCR-Etablierung

Zunächst wurde die internationale Fachliteratur hinsichtlich existierender molekularbiologischer Untersuchungsprotokolle und -methoden durchsucht, um ein funktionales und möglichst detailliert beschriebenes methodisches Setup zur Multiplex-Detektion von *NTM/Myspp.* und *MTC* zu erstellen. Im Fokus stand dabei insbesondere die Suche nach geeigneten Primer- und Sondenkombinationen zur Detektion der *Myspp.*, da am IMIKRO bereits eine bewährte manuelle Monoplex Real-Time PCR zur Detektion der *MTC* (vorliegender Testprotokoll adaptiert nach Eisenach und Kollegen) zur Verfügung stand, welche auf dem BD MAXTM System implementiert werden musste [120]. Die entsprechenden

Sequenzen zur Detektion der *NTM/Myspp.* wurden einem Testprotokoll von Bruijnesteijn van Coppenraet et al. (2004) entnommen und für den Arbeitsmix genutzt [117]. Der Nachweis von *NTM* erfolgt hierbei über den Nachweis von Zielsequenzen der *Mycobacterium* Spezies sowie gleichzeitig einem Nichtvorliegen von Zielsequenzen des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex. Wenn im Rahmen der PCR demensprechend Mykobakterien nachgewiesen werden (Ergebnis: *Myspp.* positiv), aber diese nicht *MTC* entsprechen (Ergebnis: *MTC* negativ), wird hieraus folglich abgeleitet, dass die detektierten Mykobakterien zu *NTM* gehören (müssen). Die für *MTC* gewählte Zielregion ist IS6110 (Insertionselement 6110), die exklusiv bei Mykobakterien des *M. tuberculosis*-Komplex nachweisbar ist [121–123]. Die Sequenz erscheint entsprechend bei *NTM* nicht sicher nachweisbar zu sein, sodass mit den beiden gewählten Zielen (targets) innerhalb des Testverfahrens eine Differenzierung von *MTC* und *NTM* möglich erschien.

Die praktische Etablierung der (qualitativen) Multiplex RT-PCR gliederte sich in drei Schritte:

1. Entwicklung und Etablierung von Einzelnachweisen für *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex und *NTM/Myspp.* nach oben genannten Publikationen inklusive der Adaption an den Arbeitsfluss der Plattform BD MAX™ und Optimierung der PCR in einer Reihe von Vorversuchen,
2. Kombination der Einzelnachweise im Sinne einer Multiplex RT-PCR und Festlegung des standardisierten Untersuchungsprotokolls,
3. Validierung der Multiplex RT-PCR nach aktuellen Vorgaben und QM-Richtlinien inklusive Erhebung und Auswertung der Gütekriterien des entwickelten Tests.

3.4.1. Vorversuche

Ziel der Vorversuche war es, die grundsätzliche Funktionalität der Primer und Sonden zu bestätigen, das PCR-Protokoll, inklusive der Annealing-Temperatur zu optimieren sowie entsprechende Mengen- und Konzentrationsverhältnisse der eingesetzten Substrate zu testen. Wesentlicher Bestandteil der Vorversuche war darüber hinaus die Funktionsprüfung der im BD-Mastermix enthaltenen SPC zur Detektion potenzieller PCR-inhibierender Einflüsse während des Testlaufs.

Die Vorversuche zur Entwicklung der Einzelnachweise wurden sowohl für *MTC* als auch für *NTM/Myspp.* durchgeführt. Die verwendeten *NTM* sollen im Rahmen der Versuche und der späteren Validierung dem Target „*Myspp.*“ entsprechen.

Das System PlateMax™ wurde für die Voraliquotierung und Versiegelung der Arbeitsmixe im „ready to use“-Format in den Arbeitsablauf integriert.

3.4.2. Entwicklung

Nach Testung auf generelle Funktionalität wurden weitere Testläufe durchgeführt. In diesem Rahmen wurden Anpassungen von Profil-Einstellungen am BD MAX™ sowie Anpassungen von u. a. Temperatur, Volumen und Primerkonzentration vorgenommen, um die Robustheit des Verfahrens zu gewährleisten. Zur Etablierung einer PCR müssen darüber hinaus ggf. Geräte-spezifische Eigenheiten, z. B. Filterdifferenzen, Probenvolumina, unterschiedliche PCR-Protokolle, berücksichtigt werden. Ziel war es, für die jeweiligen PCR-Läufe eine robuste Ergebnisausgabe anhand einer definierten Ergebnislogik zu erhalten (Abbildung 9). Am Ende der Entwicklungsphase stand die endgültige Rezeptur des Arbeitsmixes zur Verfügung; auf dieser Basis konnten die Validierungs-PCR-Läufe erfolgen.

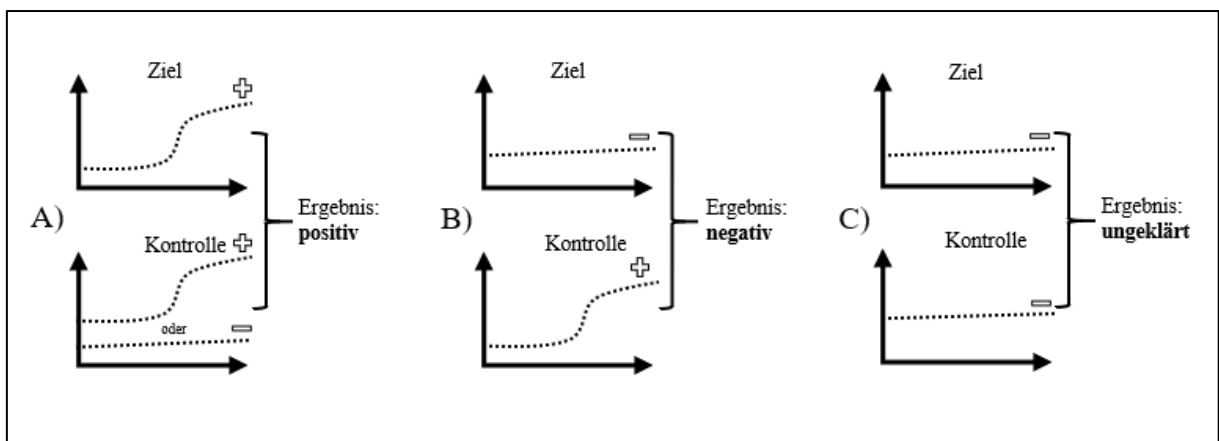


Abbildung 9 Darstellung der Ergebnislogik (beispielhaft): A) Ziel-DNA nachgewiesen, Kontrolle (SPC) kann dann positiv oder negativ sein; das Ergebnis wird als positiv gewertet. B) Ziel-DNA nicht nachgewiesen, SPC positiv, Ergebnis ist richtig-negativ. C) Ziel-DNA nicht nachgewiesen, SPC negativ, ungeklärtes Ergebnis, weil bei negativer Kontrolle keine Ziel-DNA nachgewiesen wurde. Hinweis: Bei positivem Zielnachweis, jedoch negativer/nicht-positiver SPC, kann das PCR-Ergebnis dennoch als positiv gewertet werden (siehe dazu auch den Abschnitt Matrixeffekt, Kapitel 4.3.6.).

3.4.3. Validierung

Für den Nachweis von einerseits *MTC* und andererseits *NTM* wurden die Validierungsvorgaben jeweils getrennt voneinander betrachtet und dokumentiert. Die Validierung

erfolgte anhand der hauseigenen Richtlinien zur Validierung von In-vitro-Diagnostikverfahren gemäß SAA-IN QM VM / 10 03 05 [124]. Darin enthalten sind die Entsprechungen der Richtlinien und Normungen MIQ 01, DIN EN ISO 15189:2013-03, DIN EN ISO/IEC 17025:2005, RiLi-BÄK und IVD-Richtlinie [103,104,109,125–127].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode als qualitatives in-house Verfahren, also ohne Bestimmung der Erregermenge, auf der Basis externer wissenschaftlicher Arbeiten entwickelt und etabliert. Die oben genannten Richtlinien zur angemessenen Validierung der Methode sehen in diesem Fall die Untersuchung der Intraassay-Präzision/Richtigkeit, der Interassay-Präzision/Richtigkeit, der Sensitivität, der Spezifität, potenzieller Kreuzreaktionen, potenzieller Matrixeffekte (durch Probenbestandteile ausgelöste Einflüsse auf den Analyten) und ggf. den Vergleich mit etablierten Methoden vor. Im Einzelnen haben die Untersuchungen folgenden Umfang [103,104,109,124–127]:

- Intraassay-Präzision: Es erfolgt eine Untersuchung mehrerer Proben in Dreifachbestimmung innerhalb eines Testlaufs (das heißt gleichzeitige Testung von drei negativen, drei schwach-positiven und drei stark-positiven Proben). Die Probenmatrix soll dabei Patientenmaterialien entsprechen. Die Intraassay-Präzision muss einen Variationskoeffizienten von $< 30\%$ aufweisen.
- Interassay-Präzision: Drei Proben aus dem vorgenannten Intraassay-Ansatz – hier entsprechend eine negative, eine schwach-positive und eine stark-positive Probe – werden an zwei weiteren (= unterschiedlichen) Tagen in Einfachbestimmung untersucht. Die Interassay-Präzision muss einen Variationskoeffizienten von $< 50\%$ aufweisen.
- Sensitivität: Zur Bestimmung der Sensitivität soll die Testung von mindestens fünf bekannt positiven und mindestens fünf bekannt schwach-positiven Proben durchgeführt werden.
- Spezifität: Mindestens 20 bekannt negative Proben sollen zur Bestimmung der Spezifität getestet werden.
- Kreuzreaktivität: Hierfür werden 20 Proben, die für Bakterien/Pilze positiv getestet oder mit potenziell kreuzreaktivem Referenzmaterial (Spiken) versetzt wurden. Die bei der Prüfung eingesetzten Proben sollen für den potenziell kreuzreaktiven Parameter stark-positiv sein.
- Matrixeffekt: Es erfolgt die Testung von 20 Probenmaterialien, die zur Durchführung der Testung als Untersuchungsmaterialien sinnvoll sind. Die Ziel-Erreger werden in definierter

Menge zugesetzt und die erzielten C_t -Werte mit einer entsprechenden Wasserprobe abgeglichen.

- Darüber hinaus kann ggf. ein Vergleich mit etablierten Methoden erfolgen.

3.5. Genereller Arbeitsablauf am PCR-Automaten

Der Arbeitsablauf am BD MAX™ System folgt einem immer gleichen Schema und kann grundsätzlich in zwei Phasen geteilt werden: Die erste Phase ist die anwenderseitige Probenvorbereitung; die zweite Phase entspricht dem systemseitigen Arbeitsablauf (Workflow), bestehend aus Nukleinsäure-Extraktion und PCR [128].

3.5.1. Phase 1: Testvorbereitung

Die Testvorbereitung besteht aus der korrekten Auswahl der DNA-Extraktionsgebinde bzw. Extraktionsröhrchen (in Form der Teststreifengebinde ExK™ DNA-1 oder DNA-2) inklusive der passend mitgelieferten Probenröhrchen (SBT). Es gilt bezüglich der zu wählenden Teststreifenanzahl: $n\text{Proben} = n\text{DNA-Teststreifen}$.

Je 100 µl der zu untersuchenden Probe werden in die zum ExK™-DNA-1 gehörenden Probenröhrchen gegeben. Es folgt das Mischen der befüllten Probenröhrchen für eine Minute auf dem Laborschüttler, um eine ausreichende Vermischung der Pufferlösungen mit den jeweiligen Proben zu gewährleisten. Daraufhin wird der Drehverschluss der Probenröhrchen gegen eine von Pipettenspitzen penetrierbare Kappe ersetzt. Die einzelnen Probenröhrchen werden nun mittels Strichcodescanner eingelesen, in der Software benannt und anschließend in das Probengestell gestellt. Die DNA-Gebinde werden vorbereitet, indem die Einsteckröhrchen in die Teststreifen an Position 1 und die BD DNA MMK(SPC)-Röhrchen an Position 2 eingeklickt werden (Abbildung 6). Der Arbeitsmix wird an Position 3 des DNA-Teststreifens eingeklickt (Abbildung 6). Der nun komplettierte Teststreifen wird in das Probengestell geklemmt. Das so präparierte Probengestell kann nun in den BD MAX™ gestellt (Position A oder B, Abbildung 5) und das Gestell verriegelt werden.

Die eingescannten Strichcodes der Probenröhrchen erscheinen in der Softwareansicht in einer Arbeitsliste. Hier werden den Proben der geplante Test, die passende Position auf dem Probengestell sowie die Chargennummern der DNA-Gebinde zugeordnet. Nun wird der Strichcode der PCR-Karte – zwecks Zuordnung zu den Teststreifen – eingelesen. Die Systemsoftware prüft die noch freien Positionen auf der PCR-Karte und zeigt die zu

beschickenden Bahnen des PCR-Gestells an. Die Teststeifen und die SBTs werden entsprechend angeordnet und das Gestell in das Gerät gestellt. Die Tür des BD MAX™ Systems wird geschlossen; daraufhin kann der PCR-Lauf benannt und gestartet werden. Der anwenderseitige Arbeitsablauf ist hiermit abgeschlossen.

3.5.2. Phase 2: Extraktion und PCR

Das BD MAX™ System startet nun den PCR-Lauf (systemseitiger Arbeitsablauf) und beginnt zunächst mit der Prüfung der Test-Einstellungen. Der Strichcodeleser des Roboterarms liest dazu die Probenröhrchen ein. DNA-Streifen, Einsteckröhrchen (Position 1, Position 2) und die PCR-Karte(n) werden überprüft. Ist die Prüfung erfolgreich, schließt sich automatisch die eigentliche Abarbeitung an. Sie besteht aus:

1. Nukleinsäureextraktion,
2. Vorbereitung des PCR-Reaktionsgemisches,
3. Ansatz des finalen Reaktionsgemisches,
4. Transfer des Reaktionsansatzes in die PCR-Karte,
5. Durchführung der PCR gemäß Protokoll und
6. vollautomatische Auswertung.

Im Folgenden sind die methodischen Grundlagen der aufgeführten Schritte kurz erläutert.

Extraktion sowie Vorbereitung und Transfer des Reaktionsansatzes (Schritte 1-4)

Das Extraktions-Röhrchen des Gebindes „ExK™-DNA-1“ enthält einen eingetrockneten Extraktionsmix aus Proteinase K zur Zelllyse und Freisetzung der Nukleinsäuren, magnetische Perlen zur Aufreinigung der Nukleinsäuren und die Zutaten der SPC. Die SPC ist eine DNA-Sequenz aus *Drosophila melanogaster* und dient hier als Eignungsprüfung, ob das Patientenmaterial in der eingesetzten Form überhaupt für eine PCR-Amplifikation verwendet werden kann.

Die durch den Hersteller definierte Standardprobenmenge von 937,5 µl wird vom Probenröhrchen in das Extraktions-Röhrchen (Position 1) transferiert, um die Extraktionsreagenzien zu rehydrieren. Nach dieser Hydrierungsphase wird dieses Gemisch nach Position 0, dem Lyse-/Reaktions-Röhrchen, verbracht, sodass Zellen zerstört und DNA freigesetzt wird (siehe auch Abbildung 6). Nach der Lysephase bindet die in den Proben nun freigesetzte DNA an die magnetischen Perlen. Ein kleiner Magnetstreifen fixiert daraufhin die

Perlen-DNA-Konglomerate an der Gefäßwand. Der Flüssigkeitsüberstand wird abgesogen und der Magnetstreifen von der Gefäßwand entfernt, sodass die DNA-behafteten Magnetperlen wieder freigegeben werden.

Mit Zugabe einer Lösung („DNA Lösung A“, Inhalt unterliegt dem Betriebsgeheimnis von BD) wird die Probenlösung mittels starker, basischer Puffer gewaschen, um unspezifisches Material wie Zucker- und Proteinreste zu entfernen. Ein Wiederaufbringen des Magnets fixiert nun nochmals die Magnetperlen, sodass wiederum der Überstand der Waschlösung abgesogen werden kann. In einem weiteren Schritt wird eine zusätzliche Lösung („DNA Lösung B“, Inhalt unterliegt dem Betriebsgeheimnis von BD) ins Lysegefäß gegeben, welches kurzzeitig inkubiert wird. Nach erneuter Hitzeapplikation löst sich die DNA von den magnetischen Perlen, die wiederum magnetfixiert werden, damit im Anschluss die saubere DNA in das den Arbeitsmix enthaltene, konische Röhrchen (Position 3) transferiert werden kann. Eine zusätzliche „DNA-Lösung C“ (Inhalt unterliegt dem Betriebsgeheimnis von BD) wird zur weiteren Elution hinzugefügt; das PCR-Reagenz ist nun für die Analyse aufbereitet und wird in die PCR-Karte überführt. Eine schematische Darstellung dieses Ablaufs ist in Abbildung 10 dargestellt.

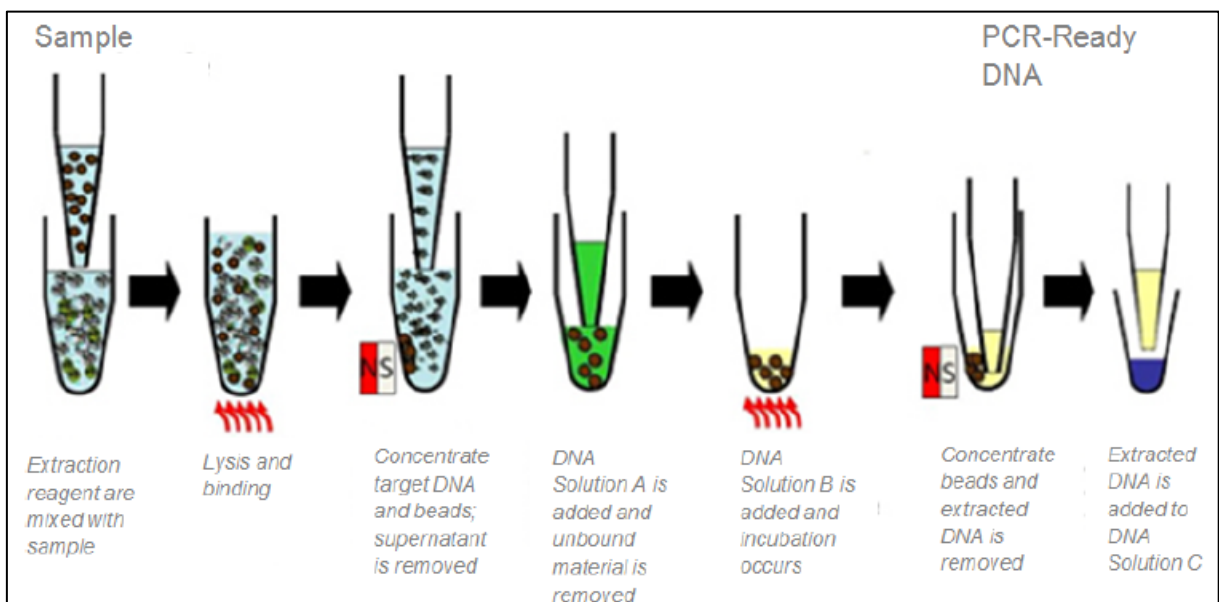


Abbildung 10 Schema des Extraktionsvorganges am BD Max™. Abkürzung: NS, Magnet. Grafik des Herstellers, entnommen aus [118].

Durchführung der PCR und deren Auswertung (Schritte 5-6)

Das offene BD MAX™ System stellt zur Entwicklung hauseigener Testverfahren und PCR-Läufe einen Test-Editor (integriertes Softwaremenü) bereit. Neben Basiseinstellungen, wie z. B. der Benennung des Testes, können dort die gewünschten weiteren Informationen und Spezifikationen festgelegt werden:

- Extraktionstyp (bezieht sich auf das Gebinde – vgl. ExK™ – das gewählt wird),
- Mastermix-Format (bezieht sich auf den Arbeitsmix an Position 3),
- C_T-Berechnung.

Weitere vorgespeicherte Parameter, wie u. a. die Lyse-Heizdauer und -Temperatur sowie Probenvolumina, können bei Bedarf händisch abgeändert und gespeichert werden. Im Rahmen der Vorversuche wurden diese jedoch nur sporadisch geändert und letztlich im finalen Protokoll nicht von den voreingestellten Einstellungen abgewandelt.

Während der Vorversuche wurde zunächst der Extraktionstyp „PCR Only“, also alleinige Nutzung der PCR-Funktion, später während der Validierung der Typ DNA-1 und DNA-2 gewählt: Diese Einstellungen beinhalten dann sowohl den Vorgang der DNA-Extraktion als auch die PCR. Als Mastermix-Format war der „Typ 2“ (BD MMK oder MMK SPC und flüssige Primer und Sonden) vorgesehen. Der Zusatz „flüssige Primer und Sonden“ verweist auf den geräteseitigen Umgang mit den Primern und Sonden an Position 3 des Teststreifens. Die Arbeitsmixe (Position 3) lagen in anwendbarer flüssiger Form vor.

Unter dem Menüpunkt „Kanaleinstellungen“ wurden die Kanäle zur Detektion gewählt, benannt und spezifiziert (Tabelle 16). Es wurde darauf geachtet, dass die Detektionskanäle jeweils durch freie, also unbelegte, Kanäle getrennt waren, um Interferenzen (sogenannter „Crosstalk“) zwischen den Anregungs- und Emissionskanälen zu vermeiden.

Tabelle 16 Kanaleinstellungen am BD MAX™

Kanal/Wellenlängen (nm)	Name	PCR Verstärkung	Threshold ^a
475/520	<i>MTC</i>	40	200
530/565	-/-	-/-	-/-
585/630	<i>Myspp</i>	30	200
630/665	-/-	-/-	-/-
680/715	SPC	40	200

Erläuterung: ^a Cut-off-Wert, ab dem C_T-Werte bestimmt werden sollen. Abkürzung: nm, Nanometer.

Das BD MAX™ System führt die Testschritte gemäß der Protokollvorgaben selbstständig aus. Nachdem der Testlauf beendet ist, werden die Ergebnisse automatisch ausgewertet und sowohl tabellarisch als auch als Amplifikationskurve dargestellt (Abbildung 11). Die so erhaltenen Ergebnisse wurden ausgedruckt und standen dann für die Testvalidierung zur Verfügung.

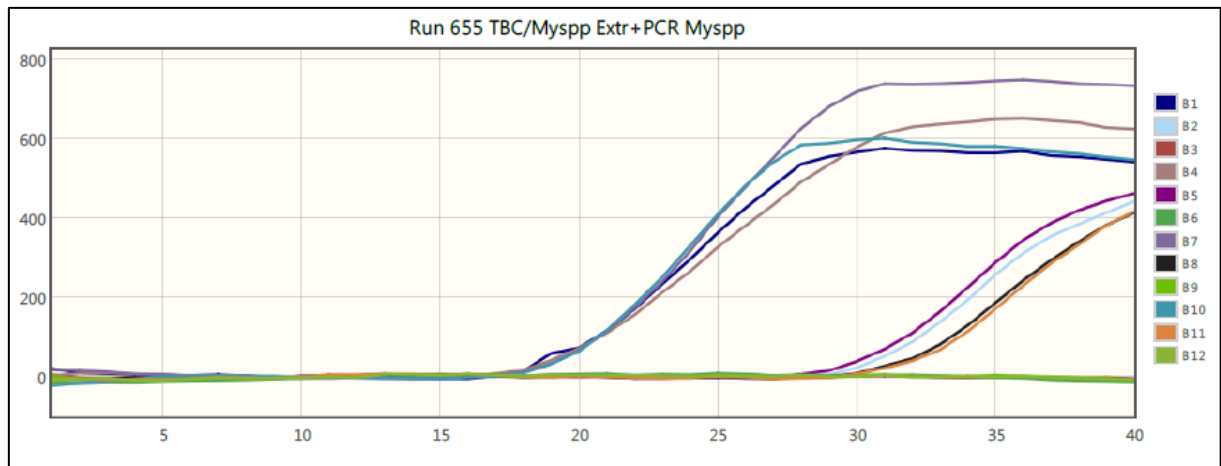


Abbildung 11 Beispielhafte Darstellung der Amplifikationskurven aus einem Laufergebnisbericht des BD MAX™. X-Achse: Anzahl der Zyklen; Y-Achse: Rn-Wert (Fluoreszenz). Eigene Abbildung.

4. Ergebnisse

Entsprechend der Zielsetzung dieser Arbeit wurden Mykobakterien-spezifische PCR-Verfahren auf dem BD MAXTM System unter Zuhilfenahme vorhandener Fachpublikationen und bereits am IMIKRO etablierter Protokolle entwickelt. Die durchgeführte Literaturrecherche, mit dem Ziel ein methodisches Testschema inklusive geeigneter Primer- und Sondenkombinationen zu finden ergab, dass aufgrund der methodischen Vereinbarkeit zum einen das Protokoll von Bruijnesteijn van Coppenraet und Kollegen aus dem Jahr 2004 für den Nachweis von *NTM/Myspp.* und zum anderen das Protokoll des bereits am IMIKRO bekannten Tests von Eisenach und Kollegen aus dem Jahr 1990 zum Nachweis von *MTC* für die Etablierung der Multiplex PCR ausgewählt wurden [117,120].

4.1. Vorversuche

In der Zusammenschau der Vorversuche können folgende Ergebnisse genannt werden: Die PCR-Versuche zum generellen Funktionsnachweis der PCR im BD MAXTM – ohne vorherige Extraktion (im Software-Modus „PCR only“) und unter Verwendung von Plasmid-DNA (kloniertes Amplikon der PCR des IS6110-Insertionselementes von *MTC*, 1pg/μl) – lieferten ad hoc zufriedenstellende Ergebnisse. Die grundsätzliche Funktionalität der eingesetzten Arbeitsmische war hierdurch bestätigt.

Anschließend Testläufe im Modus „Extraktion und PCR“ unter Verwendung der Kulturproben T1057, T1079 und T1086 erzeugten ebenfalls positive PCR-Ergebnisse im Rahmen des getrennten (Einzel-)Nachweises von *MTC* bzw. *NTM/Myspp.* Die im BD MAXTM Vollautomaten integrierten DNA-Extraktionsprotokolle schienen somit geeignet zur Extraktion und Aufreinigung der DNA aus den Bakterienzellen.

Nach diesen grundsätzlich „richtig-positiven“ PCR-Ergebnissen traten in der Folge bei der Untersuchung mehrerer bekannter und zum Teil mit Ziel-DNA versetzter Patientenmaterialien in seltenen Fällen unerwartete negative und nicht interpretierbare Ergebnisse durch PCR-Inhibition (z. B. C_t der SPC = -1) auf. Es war also zum damaligen Stand der Methoden-etablierung von einer noch unzureichenden Robustheit der Methode auszugehen.

Um die Robustheit zu verbessern, wurden in der Folge verschiedene Optionen zur Methodenoptimierung getestet. Unter der Vorstellung, dass es bei einer ggf. zu niedrig gewählten Annealingtemperatur durch bspw. Primerdimerisierung zu einer geringeren Primer-Target-Bindungsspezifität kommen kann, wurde die Annealingtemperatur zunächst auf 58 °C

und später auf 60 °C erhöht. Die Änderung der Annealingtemperatur bei der Untersuchung der von den Erwartungswerten abweichenden Proben jedoch keine suffiziente Verbesserung der PCR-Ergebnisse. Die Annealingtemperatur wurde daher wieder auf den Ausgangswert von 55 °C reduziert.

Um die Möglichkeit insuffizient pipettierter PCR-Arbeitsmixe auszuschließen, wurde das Volumen des Arbeitsmixes verdoppelt (von 12,5 µl auf 25 µl). Dies führte ebenfalls zu keiner Verbesserung der Ergebnisse, sodass das Volumen wieder auf 12,5 µl reduziert wurde.

In einem dritten Schritt wurde die eingangs definierte Primerkonzentration (20 pmol je eingesetztem Primer) im Arbeitsmix reduziert: Die Reduktion auf 10 pmol deutete bereits verbesserte Resultate an, da häufiger erwartete Ergebnisse erzielt wurden und die Rate gehemmter Proben abnahm. Nach weiterer Reduktion der Primerkonzentration auf 5 pmol wurde eine Übereinstimmung von 100 % mit den erwarteten Ergebnissen erreicht.

Die PCR-Methodik erschien nach dieser Anpassung im Vergleich mit etablierten Methoden somit als ausreichend robust. Auf dieser Basis konnte daraufhin die Etablierung der Methode als routinediagnostischer Untersuchungsgang fortgeführt werden.

4.1.1. MTC-bezogene Vorversuche

Schon der erste PCR-Testlauf mit 50 µl Tuberkulose-Kultur (Probe T1017) erbrachte für *M. tuberculosis* (C_t 26,7), für *Myspp.* (C_t 23,9) und für die positive SPC (C_t 27,6) ein korrektes Ergebnis für die Detektion von *MTC*. Die Primermenge lag für die Detektion von *MTC* und *NTM/Myspp.* bei je 1 µl innerhalb des Arbeitsmixes mit einer Primerkonzentration von 5 pmol/µl. Diese genannten Volumina und Konzentrationen entsprachen den am IMIKRO bereits genutzten und zuvor validierten Tests auf anderen Geräten, sodass auch hier von einer guten Leistungsfähigkeit in der PCR ausgegangen werden konnte. Das gewählte PCR-Profil beinhaltete, abgesehen vom initialen Denaturierungs-/Aktivierungsschritt, wie in der etablierten Routine-Methode gleichbleibende Temperaturen für die Annealing- und Elongationsschritte (Tabelle 17).

Die Amplifikate wurden nach der erfolgten Elongation detektiert. Die eingesetzten Farbstoffe FAM (Wellenlänge 475/520nm) und ROX (Wellenlänge 585/630nm, vgl. jeweils Tabelle 16) erbrachten direkt zu Beginn der Vorversuche korrekte Ergebnisse für die entsprechend gewählten Kanäle; die Signale wurden vom BD MAX™ entsprechend der programmierten Kanäle ausgewertet.

Tabelle 17 PCR-Profil am BD MAX™

Schritt	Name	Dauer (s)	Temperatur (°C)	Detektion	Anzahl Zyklen
1	Aktivierung	600	98	Nein	1
2	Denaturierung	10	98	Nein	je 40
3	Annealing/Elongation	49	55	Ja	

In einer ersten Zusammenschau schienen die gewählten Primer zum *MTC*-Nachweis für den Einsatz im BD MAX™ geeignet zu sein und konnten nachfolgend zur Validierung eingesetzt werden.

4.1.2. *NTM/Myspp.*-bezogene Vorversuche

Zeitgleich zu den Vorversuchen für *MTC* wurde mit dem Vorversuchen für *NTM/Myspp.* begonnen. Da für die späteren Analysen ein simultaner Multiplex-Ansatz vorgesehen war, wurde das gleiche PCR-Protokoll wie für *MTC* angewandt. Anhand der im BD MAX™ verarbeiteten Proben, wie z. B. atypische Mykobakterien in Kultur, ergab sich jeweils ein positives Ergebnis bei gleichzeitig positiver SPC. Es konnte dementsprechend auch für *NTM/Myspp.* davon ausgegangen werden, dass die Versuche anhand des spezifizierten Protokolls durchführbar waren korrekte Ergebnisse erbringen würden.

4.1.3. Besonderheiten der *M. abscessus*- und *M. chelonae*-Gruppe

Im Laufe der Vorversuche waren mehrmalig inhibierte bzw. ungeklärte PCR-*Myspp.*-Testergebnisse auffällig: Die dort geprüften Proben entstammten den Ringversuchsproben RV 139 und RV 133 mit den darin enthaltenen verwandten Stämmen *M. abscessus* und *M. chelonae*. Die PCR erkannte bei positiver SPC die Zielsequenzen nicht sicher. Auch eine Erhöhung der eingesetzten Zielsequenzmenge auf 100 µl oder später 200 µl *M. abscessus*- und *M. chelonae*-Kulturlösung erbrachten keine positiven Testergebnisse im Auswertungskanal für *NTM/Myspp.* Das Ergebnis der SPC in den Überprüfungsläufen war dabei jeweils positiv, sodass die PCR-Läufe jedoch per se als gültig zu bewerten waren.

4.1.4. Aliquotierung und Vorbereitungen am PlateMax™

Die Nutzung des halbautomatischen Plate-Sealing-Systems PlateMax™ gestaltete sich einfach und anwenderfreundlich. Die wenigen Arbeitsschritte, die für die Aliquotierung des Arbeitsmixes nötig waren, konnten zügig umgesetzt werden. Der jeweilige Zeitaufwand vom Ansetzen des Arbeitsmixes bis zum versiegelten Aliquot war gering (wenige Minuten).

Aufgrund der Gerätearchitektur war es möglich im Mastermixraum des Labors Arbeitsmixe im Mehrfachansatz in konischen Röhrchen vorzubereiten, um sie dann bis zur Verwendung bei -20 °C zu lagern. Die Lagerung der präaliquotierten Mixe über mehrere Wochen zeigte keinen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit der PCR. Aus der Anfertigung großer Aliquotmengen (bis zu 70 Aliquots in einem „Versiegelungsvorgang“) ergibt sich der Vorteil, dass die Reproduzierbarkeit einzelner Untersuchungsgänge erhöht wird, da mehrfach mit dem gleichen „Primer/Probe-Mix“ gearbeitet werden kann.

4.2. Entwicklung der Multiplex PCR

Der im Rahmen der Vorversuche entwickelte Arbeitsmix konnte anschließend für die Etablierung der Multiplex PCR genutzt werden (Tabelle 18). Die Kombination der beiden PCRs zu einem dualen Nachweis von *MTC* und *NTM/Myspp.* im Multiplex-Format konnte aufgrund der Infrastruktur des BD MAX™ sowie des simplen Arbeitsablaufes schon ab PCR-Testlauf Nr. 2 erfolgen.

Die empirische Anpassung von (System-)Einstellungen am BD MAX™, wie z. B. Änderung der voreingestellten Primerform (flüssig vs. fest) und des Mastermixformates („MM-Format“) sowie die Nutzung unterschiedlicher DNA-Extraktions-Streifen (DNA-1 vs. DNA-2) hatten keinerlei Einfluss auf die Ergebnisse, sodass das in den Vorversuchen erprobte PCR-Profil (Tabelle 17) beibehalten werden konnte. Als Extraktionsprotokoll bewährte sich das Standard-Extraktionsprogramm des BD MAX™, sodass auch hier keine weitere Anpassung des Extraktionsprozesses vorgenommen werden musste. Die jeweils gewählten Farbstoffe und Fluoreszenzkanaleinstellungen wurden bereits in der Tabelle 16 beschrieben. Die Wahl der Farbstoffe erfolgte aufgrund interner Erfahrungswerte mit bspw. FAM sowie den herstellerseitigen Empfehlungen (BD).

Tabelle 18 Arbeitsmixrezept nach Abschluss der Vorversuche

Ingredienz/Reagenz/Name	Volumen	Konzentration
MysppF	0,25 µl	5 pmol
MysppR	0,25 µl	5 pmol
Myspp-Probe	0,5 µl	5 pmol
TB-1F	0,25 µl	5 pmol
TB-1R	0,25 µl	5 pmol
FAM-TB	0,5 µl	5 pmol
BD Diluent	2 µl	-
ddH ₂ O	8,5 µl	-
Gesamtvolumen	12,5 µl	

Im Anschluss an die Vorversuche und die eigentliche Entwicklung der Multiplex PCR konnte die Validierung und Überprüfung der analytischen Leistungsfähigkeit der entwickelten Methode mit insgesamt 167 Proben (Rohmaterial, Kulturmaterial, versetzte Proben) in 32 Testläufen beginnen.

4.3. Validierung

Im Folgenden werden die gemessenen Leistungsdaten der Testverfahren (Sensitivität, Spezifität, negativer prädiktiver Wert, positiver prädiktiver Wert, analytische Sensitivität, Präzision bzw. Richtigkeit, Kreuzreaktivität sowie Matrixeffekt) dargestellt. Darüber hinaus werden die Testverfahren mit bereits am IMIKRO etablierten Untersuchungsmethoden verglichen.

4.3.1. Sensitivität und Spezifität

Vorgegeben ist die Testung von mindestens fünf bekannt positiven sowie mindestens fünf bekannt schwach-positiven Proben für den jeweils zu testenden Analyten (*MTC* oder *NTM/Myspp.*). Zur Überprüfung der Sensitivität sowie der Spezifität wurden speziell für diese Arbeit elf bekannt positive bzw. schwach-positive *MTC*- bzw. *NTM/Myspp.*-Proben und jeweils 20 bekannt negative Patienten isolate getestet (Abbildung 12, vgl. Anhang Tabellen 25 ff.). Die insgesamt 31 Proben wurden im Rahmen der vorliegenden Analyse immer korrekt detektiert. In wenigen Läufen musste die Verdünnung der schwach-positiven Proben von 1:1000 auf zunächst 1:100 und später 1:10 vermindert werden.

a)				b)			
	MTC	Keine MTC		Myspp.	Keine Myspp.		
Positives PCR-Ergebnis	11 (a)	0 (b)	11	11 (a)	0 (b)	11	
Negatives PCR-Ergebnis	0 (c)	20 (d)	20	0 (c)	20 (d)	20	
	11	20		11	20		

Abbildung 12 Vierfeldertafeln zur Errechnung der Sensitivität und Spezifität sowie der Vorhersagewerte für a) *MTC* und b) *NTM/Myspp.*

Auf Basis der Testergebnisse ergaben sich sowohl für die Sensitivität als Kenngröße, dass tatsächlich Kranke im Test auch als krank erkannt werden, als auch für die Spezifität als Kenngröße, dass tatsächlich Gesunde im Test auch als gesund erkannt werden, Werte von jeweils 100 %. Dieses Ergebnis gilt sowohl für *MTC* als auch für *NTM/Myspp*.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{richtig positive Ergebnisse (a)}}{\text{richtig positive} + \text{falsch negative Ergebnisse (a + c)}} = \frac{11}{11} = 100 \%$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{richtig negative Ergebnisse (d)}}{\text{richtig negative} + \text{falsch positive Ergebnisse (d + b)}} = \frac{20}{20} = 100 \%$$

4.3.2. Positiver und negativer prädiktiver Wert

Der positive (PPW) und der negative prädiktive Wert (NPW) lassen sich ebenfalls aus den Ergebnissen in Abbildung 12 berechnen:

$$\text{PPW} = \frac{\text{richtig positive Ergebnisse (a)}}{\text{richtig positive} + \text{falsch positive Ergebnisse (a + b)}} = \frac{11}{11} = 100 \%$$

$$\text{NPW} = \frac{\text{richtig negative Ergebnisse (d)}}{\text{richtig negative} + \text{falsch negative Ergebnisse (d + c)}} = \frac{20}{20} = 100 \%$$

Sowohl PPW als auch NPW haben 100 % bzw. 1 ergeben. Das Ergebnis ist wiederum identisch für *MTC*- und *NTM/Myspp*-Proben: 100 % der Proben mit positivem Testergebnis enthalten tatsächlich *MTC* bzw. *NTM*, sowie ebenfalls 100 % der Proben mit negativem Testergebnis enthalten tatsächlich keine *MTC* bzw. *NTM*.

Inhibition trat in je zwei gleichen Fällen der Analyse bekannt negativer Blut- und Sekretproben auf. Die Vorhersagewerte sind dennoch jeweils 1, da inhibierte Proben (vgl. SPC = -1) für die PCR-Untersuchung nicht geeignet sind und aus der Wertung entfernt sowie ersetzt wurden (= aussageleere Ergebnisse; siehe hierzu auch Tabellen 25ff. im Anhang).

4.3.3. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität ist als die niedrigste Konzentration definiert, bei der für mindestens 95 % der Fälle ein positiver Nachweis der Ziel-DNA erbracht wird [129]. Zur Prüfung der analytischen Sensitivität wurden arithmetische Verdünnungsreihen erreger-

haltiger Lösungen bekannter Konzentrationen (Material aus Ringversuchsproben) angefertigt und untersucht. Es wurden je drei Versuche à drei Proben getestet: drei Proben mit 25000 Genomkopien/ml, drei Proben mit 2500 Kopien/ml und drei Proben mit 250 Kopien/ml. Alle Proben mit 250 Kopien/ml wurden erfolgreich detektiert. Die Sensitivitätsgrenze liegt also unterhalb dieses Wertes.

4.3.4. Kreuzreaktivität

Es folgte die Testung der Kreuzanalyten für jeweils *MTC* und *NTM/Myspp.* zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse. Es wurden 25 bekannte humanpathogene Erreger getestet, die laut SAA nicht dem Testanalyt der zu testenden PCR entsprechen sollten (gefordert: 10-20 Proben). Es kam weder bei dem Test auf *NTM/Myspp.* noch bei dem Test auf *MTC* zu einer Kreuzreaktion. Alle Proben wurden korrekt als negativ ausgewertet. Eine Inhibition der PCR trat hierbei nicht auf (Tabellen 27 und 28 im Anhang). Entsprechend werden also bekannt positive Proben als positiv bzw. bekannt negative Proben als negativ bewertet. Es wurde – richtigerweise – kein Nachweis für *MTC* bei Läufen für *NTM/Myspp.* und vice versa erbracht.

Im Anschluss an die Prüfung auf Kreuzreaktivität wurden die Sonden und Primer zusätzlich einer Spezifitätsprüfung in Form einer (In-silico)-Analyse mittels BLAST® (englisch für: Basic Local Alignment Search Tool) unterzogen. Die entsprechenden Nukleotidsequenzen wurden hierbei mit der Sequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) verglichen. Im Anhang werden Auszüge aus diesen Analysen – der Übersicht halber jeweils auf 100 Sequenzen beschränkt – aufgeführt (Tabellen 29ff. im Anhang).

4.3.5. Richtigkeit und Präzision

Zur Kontrolle der Robustheit der Methode wurden verschiedene QM-Parameter untersucht. Die Richtigkeit gibt in diesem Zusammenhang an, ob ein Testergebnis den Erwartungswerten entspricht. Im Rahmen der Validierung wurden alle Werte richtig erkannt. Zur Validierung der Wiederholungsgenauigkeit (Reproduzierbarkeit) positiver Testergebnisse eines NAT-Verfahrens wird am IMIKRO bei qualitativen PCRs eine Intraassay-Präzision (Präzision innerhalb einer Testserie) mit einem (Variationskoeffizient) $V_k < 30 \%$ und eine Interassay-Präzision (Präzision von Testserie zu Testserie) mit $V_k < 50 \%$ gefordert. Die laut Validierungsvorgaben geforderten Werte wurden eingehalten (Tabelle 19 für *MTC* und Tabelle 20 für *NTM/Myspp.*): Für den Analyten *MTC* ergaben sich V_k -Werte im Intraassay

Tabelle 19 Intra- und Interassay für den Analyten *MTC*

Intraassay	Probenbezeichnung	Patmix1 ^a	Patmix2 ^b	Patmix3 ^c	Patmix4 ^d	Vmix1 ^e	Vmix2	Vmix3	Vmix4	N1	N2	N3
	Sollwert	positiv	positiv	positiv	positiv	schw. pos.	schw. pos.	schw. pos.	schw. pos.	negativ	negativ	negativ
	Tag 1 (03.06.2015), C _t -Werte	26,9	23,4	22,2	-1,0	28,0	23,5	28,6	-1,0	-1,0	0	0
	Tag 1 (03.06.2015), C _t -Werte	25,1	23,4	22,4	34,0	28,1	24,6	28,0	-1,0	0	0	0
	Tag 1 (03.06.2015), C _t -Werte	24,7	22,7	29,0	27,8	27,4	24,2	27,4	31,4	-1,0	0	0
	Lauf (interne Nr. im BD Max TM)	676	676	676	676	687	687	687	687	677	677	677
	ExK TM -Gebinde	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2
	Mittelwert	25,57	23,17	24,53	30,90	27,83	24,10	28,00	31,40	32,7	0	0
	Standardabweichung	1,17	0,40	3,87	4,38	0,38	0,56	0,60	-1,0	-/-	0	0
	Variationskoeffizient (%)	4,58	1,74	15,77	14,19	1,36	2,31	2,14	-1,0	-/-	0	0
Interassay	Probenbezeichnung	Patmix1	Patmix2	Patmix3	Patmix4	Vmix1	Vmix2	Vmix3	Vmix4	N1	N2	N3
	Sollwert	positiv	positiv	positiv	positiv	schw. pos.	schw. pos.	schw. pos.	schw. pos.	negativ	negativ	negativ
	Tag 1 (Mittelwert aus Intraassaytabelle oben), C _t -Werte	25,57	23,17	24,53	30,90	27,83	24,10	28,00	31,40	0	0	0
	Tag 2 (29.05. & 02.06.2015), C _t -Werte	-1,0	23,6	22,6	27,6	-1,0	26,3	30,2	29,3	0	0	0
	Lauf (interne Nr. im BD Max TM)	675	675	675	675	686	686	686	686	675	675	675
	ExK TM -Gebinde	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2
	Tag 3 (16.05. & 01.06.2015), C _t -Werte	27,4	23,4	22,4	25,0	28,2	24,1	28,3	28,2	0	-1,0	0
	Lauf (interne Nr. im BD Max TM)	655	655	655	655	682	682	682	682	655	655	655
	ExK TM -Gebinde	DNA-1	DNA-1	DNA-1	DNA-1	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-1	DNA-1	DNA-1
	Mittelwert	26,48	23,39	23,17	27,83	28,02	24,83	28,83	29,63	0	0	0
	Standardabweichung	1,30	0,22	1,18	2,96	0,26	1,27	1,19	1,63	0	0	0
	Variationskoeffizient (%)	4,90	0,92	5,08	10,62	0,93	5,11	4,14	5,49	0	0	0

Erläuterungen: Testname: „TBC/Myspp Extr+PCR“; Analyt: *MTC*, Kanal 475/520; Untersucher: R. Köhnke; Chargen: K1150487852016020 K12505089820160209 (DNA-2); Untersuchungen entsprechend SAA-IN QM VM / 10 03 05 / Version 02. ^a Blutprobe „w04314“ gespuckt; ^b Blutprobe „w04586“ mit *M. tuberculosis*; ^c BAL „w04448“ mit *M. tuberculosis* „RV 159“; ^d BAL „w0429“ mit *M. bovis*. Vmix1-4 entsprechen Patmix1-4 in der Verdünnung 1:10; N1 Blutprobe „1049“, N2 Blutprobe „555“, N3 BAL „w997“, N4 BAL „w955“. 0 entspricht Inhibition bzw. unrichtigem Ergebnis. Abkürzungen: BAL, Probe einer bronchoalveolären Lavage; N1-4, negative Proben 1-4; gespuckte Patientenproben 1-4; schw. pos., schwach-positiv; Vmix1-4, Bezeichnung für schwach-positive Proben.

Tabelle 20 Intra- und Interassay für den Analyten *NTM/Myspp.*

Intraassay	Probenbezeichnung	Patmix1 ^a	Patmix2 ^b	Patmix3 ^c	Patmix4 ^d	Vmix1 ^e	Vmix2	Vmix3	Vmix4	N1	N2	N3
	Sollwert	positiv	positiv	positiv	positiv	schw. pos.	schw. pos.	schw. pos.	schw. pos.	negativ	negativ	negativ
	Tag 1 (03.06.2015), C _T -Werte	23,8	23,3	23,7	28,4	26,3	25,5	29,1	-1,0	0	0	0
	Tag 1 (03.06.2015), C _T -Werte	23,4	23,0	23,4	28,1	26,3	26,4	29,1	34,1	0	0	0
	Tag 1 (03.06.2015), C _T -Werte	22,9	23,0	27,7	24,3	26,2	26,0	29,2	28,3	-1,0	0	0
	Lauf (interne Nr. im BD Max TM)	676	676	676	676	687	687	687	687	677	677	677
	ExK TM -Gebinde	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2
	Mittelwert	23,37	23,10	24,93	26,93	26,27	25,97	29,13	31,20	0	0	0
	Standardabweichung	0,45	0,17	2,40	2,29	0,06	0,45	0,06	4,1	0	0	0
	Variationskoeffizient (%)	1,93	0,75	9,63	8,49	0,22	1,74	0,20	13,14	0	0	0
Interassay	Probenbezeichnung	Patmix1	Patmix2	Patmix3	Patmix4	Vmix1	Vmix2	Vmix3	Vmix4	N1	N2	N3
	Sollwert	positiv	positiv	positiv	positiv	schw. pos.	schw. pos.	schw. pos.	schw. pos.	negativ	negativ	negativ
	Tag 1 (Mittelwert aus Intraassaytabelle oben), C _T -Werte	23,37	23,10	24,93	26,93	26,27	25,97	29,13	31,20	0	0	0
	Tag 2 (29.05. & 02.06.2015), C _T -Werte	24,0	24,0	24,2	25,0	27,0	27,4	29,5	28,3	0	0	0
	Lauf (interne Nr. im BD Max TM)	675	675	675	675	686	686	686	686	675	675	675
	ExK TM -Gebinde	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2
	Tag 3 (26.05. & 01.06.2015), C _T -Werte	22,5	22,8	22,4	22,2	26,5	26,2	28,5	27,6	0	-1,0	0
	Lauf (interne Nr. im BD Max TM)	655	655	655	655	682	682	682	682	655	655	655
	ExK TM -Gebinde	DNA-1	DNA-1	DNA-1	DNA-1	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-2	DNA-1	DNA-1	DNA-1
	Mittelwert	23,29	23,30	23,84	24,71	26,59	26,52	29,04	29,03	0	0	0
	Standardabweichung	0,75	0,62	1,30	2,38	0,37	0,77	0,51	1,91	0	0	0
	Variationskoeffizient (%)	3,23	2,68	5,46	9,62	1,40	2,90	1,74	6,57	0	0	0

Erläuterungen: Testname: „TBC/Myspp Extr+PCR“; Analyt: *Myspp.*, Kanal 585/630; Untersucher: R. Köhnke; Chargen: K11504878520160209, K12505089820160209 (DNA-2); Untersuchungen entsprechend SAA-IN QM VM / 10 03 05 / Version 02. ^a Blutprobe „w04314“ gespuckt, ^b „RV162“; ^c Blutprobe „w04586“ mit *M. tuberculosis*. „RV 160“; ^d BAL „w04448“ mit *M. tuberculosis* „RV 159“; ^e BAL „w0429“ mit *M. bovis*. Vmix1-4 entsprechen Patmix1-4 in der Verdünnung 1:10; N1 Blutprobe „1049“, N2 Blutprobe „555“, N3 BAL „w997“, N4 BAL „w955“. 0 entspricht Inhibition bzw. unrichtigem Ergebnis. Abkürzungen: BAL, Probe einer bronchoalveolären Lavage; N1-4, negative Proben 1-4; Patmix1-4, Patientenproben 1-4; schw. pos., schwach-positiv; Vmix1-4, Bezeichnung für schwach-positive Proben.

zwischen minimal 1,7 % bis maximal 15,8 %, im Interassay zwischen 0,9 % und maximal 10,6 % für positive Proben. Für den Analyten *NTM/Myspp.* ergaben sich V_k -Werte im Intraassay zwischen minimal 0,2 % bis maximal 13,4 %, im Interassay zwischen 1,4 % und maximal 9,6 % für positive Proben.

4.3.6. Matrixeffekt

Das zu untersuchende Probenmaterial, als vorliegendes Gemisch aus Sputum oder Blut mit Erreger-DNA und ggf. Verunreinigungen, kann die Ergebnisse der Multiplex PCR negativ beeinflussen und somit den Direktnachweis erschweren [110,130]. Dieser sogenannte Matrixeffekt (Probenmaterial = „Matrix“) soll vor der Einführung eines diagnostischen Tests für jedes genutzte Material überprüft werden. Klassischerweise werden die genutzten sicher negativen Probenmaterialien mit dem nachzuweisenden Erregermaterial in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt. Die unterschiedlichen C_t -Werte werden dann verglichen. Für qualitative Nachweise bei in-house Tests kann die Testung von positiven, schwach-positiven (bspw. 1:1000, 1:100 oder 1:10) und negativen Proben für jedes genutzte Probenmaterial erfolgen. In jedem der durchgeführten PCR-Läufe – von den Vorversuchen bis hin zum Abschluss der Validierung – wurde deshalb die SPC mitgeführt; sowohl bei Einzelnachweisen als auch bei Testungen von Leerproben oder sicher negativem Patientenmaterial (Blut- und Sekretproben). Diese Prozesskontrolle zeigt die korrekte Extraktion, Amplifikation und Detektion an.

Wird die Ziel-DNA amplifiziert und detektiert, nicht aber die SPC, so darf die jeweilige Probe dennoch als positiv gewertet werden. Dies kann bspw. der Fall sein, wenn die Ziel-DNA in sehr großer Menge vorliegt und es so zu einer Ressourcenkonkurrenz um die benötigten PCR-Zutaten kommt. Wenn weder die Ziel-DNA noch die Kontrolle amplifiziert werden, muss von Inhibitoren im PCR-Ansatz ausgegangen und die PCR wiederholt werden. Die Inhibition einer PCR erzeugt ein nicht auswertbares (= aussageloses) Ergebnis in der Laufauswertung (siehe Abbildung 9, Ergebnislogik). Die SPC, die in diesen Fällen nicht amplifiziert wird, zeigt dabei zuverlässig die mangelnde Eignung des Patientenmaterials für die PCR-Untersuchung an. Bei der Überprüfung der jeweils mitgeführten SPC ergaben sich im Rahmen der Methoden-Prüfung folgende Werte: Von insgesamt 125 Proben (alle Testungen) wurden sieben gehemmte Materialien detektiert.

Zum Ausschluss eines grundsätzlichen Einflusses unterschiedlicher Probenmaterialarten auf die Leistungsfähigkeit des Tests wurden die gemittelten C_t -Werte der SPC in Abhängigkeit

von der Materialart analysiert. Wie in Tabelle 21 dargestellt, scheint EDTA-Blut (Mittelwert C_t 31,5) weniger gut für die PCR-Analyse geeignet zu sein als Sekrete des Respirationstraktes (Mittelwert C_t 28,7).

Tabelle 21 C_t -Werte der Prozesskontrolle

	Blut (EDTA)	Bronchialsekret
Minimaler Wert (C_t)	27,8	26,5
Maximaler Wert (C_t)	38,4	30,1
Mittelwert	31,5	28,7
Mittlere Abweichung	$\pm 2,08$	$\pm 0,77$

Abkürzungen: C_t , cycle threshold; EDTA, Ethylendiamintetraacetat.

Exemplarisch wurden C_t -Werte für die SPC verglichen. Die Analyse von insgesamt 95 Proben, darunter 49 Sekretproben (BAL/Sputum) und 46 Blutproben, in zwölf bewerteten unterschiedlichen PCR-Läufen, die im Rahmen der Validierung herangezogen wurden, ergab folgende Ergebnisse: Inhibition trat bei insgesamt zwölf Proben, davon sieben Blutproben und fünf BAL-Proben, auf. Außerhalb dieser Übersicht sind darüber hinaus zwei Läufe (insgesamt 25 Proben) der Testung auf Kreuzreaktionen mit anderen pathogenen Erregern gelaufen (Tabelle 27 und Tabelle 28 im Anhang). Hierbei trat keine Inhibition auf. Die für die Ziele *NTM/Myspp.* und *MTC* negativen Proben wurden richtig erkannt. Es wurden also insgesamt 120 (95 + 25) Proben analysiert, bei denen es bei 12 Proben (10 %) zur Inhibition der PCR kam. Man kann deshalb den Matrixeffekt für Sputum/BAL- und Blutproben vor allem vor klinischem Hintergrund als vertretbar ansehen. Die Rate von gehemmten Materialien zeigt darüber hinaus, dass die Inhibitionskontrolle offensichtlich hinreichend empfindlich auf Störsubstanzen in den Patientenmaterialien reagiert.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Multiplex RT-PCR zur Detektion von *MTC* und *NTM/Myspp.* aus Sputum- und Blutproben auf dem BD MAXTM zu entwickeln und zu etablieren sowie diese nach gültigen Maßgaben gemäß DIN EN ISO 15189:2013-03, DIN EN ISO/IEC 17025:2005, Rili-BÄK und IVD-Richtlinie zu validieren. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeit gab es für den BD MAXTM Automaten keine validierte in-house PCR zur Analyse von *MTC* bei gleichzeitiger Detektion von *NTM/Myspp.* unter Mitführung einer SPC.

Es wurden im Voraus verschiedene Anforderungen an die zu etablierende PCR gestellt. Der entwickelte Test sollte spezifisch, sensitiv und robust sein. Darüber hinaus sollten die Untersuchungsvorbereitung und die Untersuchung technisch kombiniert werden, um durch diese Automatisierung mit geringem Personalaufwand arbeiten zu können. Schließlich sollte das Verfahren so flexibel handhabbar sein, dass es als sogenannte „on-demand“-Untersuchung einsetzbar ist.

Insgesamt sollte die Etablierung des Testverfahrens vor dem Hintergrund erfolgen, die Mykobakteriendiagnostik möglichst zeitnah, also z. B. auch am Wochenende und außerhalb der normalen Labordienstzeiten, anbieten zu können. Dies ist vor allem von hygienischem Interesse, da der Nachweis einer isolationspflichtigen TB-Erkrankung weitreichende Konsequenzen für den Patienten selbst, aber ggf. auch für Kontaktpatienten und das pflegerische bzw. ärztliche Personal hat.

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte PCR-Verfahren wurde als in-house Protokoll entwickelt. Ein großer Vorteil kommerzieller Testsysteme ist die sehr benutzerfreundliche Konfektionierung dieser Systeme. Die Zutaten werden gebrauchsfertig geliefert und müssen nur noch der Untersuchung zugeführt werden. In-house Verfahren müssen hingegen zunächst vorbereitet werden, indem die Grundzutaten wie etwa Primer, Sonden, Nukleotide, Polymerase und Salze zusammengegeben (als sogenannter „Arbeitsmix“) und vor allem hinsichtlich ihrer Funktionsfähigkeit getestet werden. Dies ist in der Regel sehr zeitaufwendig und fehleranfällig, weshalb viele mikrobiologische Labore auf den Einsatz von in-house Protokollen verzichten.

In diesem Zusammenhang ist eine Besonderheit der hier etablierten Methode gegenüber „normalen“ in-house Protokollen hervorzuheben: Die hier vorgestellte Methode ist im Kern ein Hybrid aus vorkonfektionierten Reagenzien und individuellen Komponenten, sodass die

Vorteile beider Test-Philosophien in sich vereint werden. Dabei werden vorgefertigte Mastermixe, welche alle grundlegenden Reagenzien für die PCR enthalten (inklusive einer Inhibitionskontrolle für die Untersuchung), als Basis genutzt und lediglich um die gewünschten Primer- und Sondengemische ergänzt. Dieses Testdesign vereinfacht bzw. verkürzt die Vorbereitungszeit der Testläufe und reduziert potenzielle Fehlerquellen. Darüber hinaus können die Primer-/Sondenmixe durch Einsatz des PlateMax™ in großer Stückzahl hergestellt und anschließend als gebrauchsfertige Aliquote gelagert werden. Somit ist das hier beschriebene in-house Verfahren ohne aufwendige Vorbereitung einsatzfähig. Einzelne PCR-Ergebnisse können am BD MAX™ in weniger als zwei Stunden nach Materialeingang im Labor erwartet werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit bis zu 24 Proben gleichzeitig zu analysieren, wobei sich die Bearbeitungszeit bei voller Auslastung auf circa vier Stunden erhöht.

5.1. Vergleich mit etablierten Methoden

Aktuell sind am IMIKRO die in Tabelle 22 aufgeführten Methoden zum Nachweis von Mykobakterien verfügbar und werden je nach Anforderung parallel zu dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Testverfahren genutzt. Die bis dato verfügbaren NAT-Verfahren für den Nachweis von Mykobakterien wurden bisher unter relativ großem Arbeits- und Zeitaufwand durchgeführt. Dies beinhaltete labormedizinische Verfahren (z. B. Elektrophorese), die besonders geschultes Fachpersonal zur Durchführung benötigen.

Jedes Verfahren bringt seine besonderen Indikationen, Vorteile, aber auch Limitationen mit sich. Beispielsweise können mit den in Tabelle 22 aufgeführten Verfahren nur entweder *MTC* oder *NTM* nachgewiesen werden, es erfolgt kein simultaner Nachweis. Auch kann die 16S-NAT nicht zwischen *M. chelonae* und *M. abscessus* differenzieren. Die nested-PCR ist so aufwändig, dass sie am IMIKRO z. B. nur noch ergänzend bei bestimmten Probenotypen durchgeführt wird.

Im direkten Vergleich mit den bisher etablierten Methoden fällt vor allem die Einfachheit und Schnelligkeit des im Rahmen dieser Arbeit etablierten Testverfahrens auf. Ein Methodenwechsel von anderen etablierten IVD-Tests am IMIKRO war jedoch nicht Ziel dieser Arbeit und ein Vergleich entsprechend SAA-IN QM VM / 10 03 05 zur Validierung des neuen Tests nicht gefordert.

Tabelle 22 Am IMIKRO verfügbare NAT-Verfahren zum Nachweis von Mykobakterien

	RT-TB-PCR	16S rDNA NAT	TB-NAT IS6110 nested PCR	IMIKRO Assay; Multiplex PCR MTC/Myspp.
Probenmaterial	Sekrete des Respirationstraktes, Magensaft, Bioptate, Liquor, Blut, Kulturmaterial (Fest- & Flüssigmedien)	Wie RT-TB-PCR zzgl. Liquor, Paraffinschnitte	Liquor, Knochengewebe, Paraffinschnitte	Blut, Sekrete des Respirationstraktes
Bearbeitung: Vorbereitung & Verarbeitung	Extraktion, Aufreinigung	Ggf. vorherige Aufarbeitung, Extraktion, Amplifikation und elektrophoretische Auftrennung, Färbung, Sequenzierung, ggf. <i>rpoB</i> -Verdau	Produktnachweis mittels Gelelektrophorese, Nachamplifikation	Extraktion, Amplifikation, Detektion
Erreger	<i>MTC</i>	<i>NTM/Myspp.</i>	<i>MTC</i>	<i>MTC, NTM/Myspp.</i>
Zielsequenz	<i>IS6110</i>	16S rDNA	<i>IS6110</i>	<i>IS6110</i> , ITS
Kontrolle	Inhibitionskontrolle (β -Globin-PCR), 3 Positivkontrollen, 2 Negativkontrollen (Extraktionskontrolle, Mastermixkontrolle)	1 Positivkontrolle (<i>M. fortuitum</i>), 2 Negativkontrollen (Extraktionskontrolle, Mastermixkontrolle)	Inhibitionskontrolle (β -Globin-PCR), 2 Positivkontrollen (kloniertes Amplikon von <i>IS6110</i>), 2 Negativkontrollen (Aufbereitungskontrolle, Mastermixkontrolle)	Inhibitionskontrolle
Güte	Hochsensitiv, Nachweisgrenze $\sim 10^2 - 10^3$ Mykobakterien/ml, Sensitivität 100 %, Spezifität 99,4 %	Geringe Sensitivität	Hochsensitiv, Sensitivität ~ 10 -100 Kopien des <i>IS6110</i> -Gens	Sensitivität 100 %, Spezifität 100 %
Zeitaufwand	1-2 Tage insgesamt, 6 h reiner Arbeitsaufwand, 2 x pro Woche am IMIKRO durchgeführt	~ 5 h insgesamt, 3 h reiner Arbeitsaufwand	2 Tage insgesamt, 7 h reiner Arbeitsaufwand	< 2 h für 1 Probe

Erläuterungen: Spezifikationen und Daten der angegebenen Testverfahren (Assays) wurde den entsprechenden SAA am IMIKRO entnommen. Abkürzungen: 16S-rDNA, 16S-Untereinheit der ribosomalen Desoxyribonukleinsäure; *IS6110*, *6110*-Insertionselement; ITS, internal transcribed spacer; *MTC*, *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex; *NTM/Myspp.*, nicht-tuberkulöse Mykobakterien.

Vor dem Hintergrund der Relevanz einer schnellen und zuverlässigen TB-Diagnostik ist die Entwicklung von „on-demand“-Systemen zur Detektion von *MTC* sowie von *NTM/Myspp.* ein Ziel verschiedener wissenschaftlicher Arbeitsgruppen wie bspw. Rocchetti et al. (2016), aber auch kommerzieller Testhersteller wie Cepheid Inc. (Xpert® MTB/RIF Assay, 2010) sowie mittlerweile auch der Firma BD selbst (Becton, Dickinson and Company, 2018) [131–133]. Sowohl die Testsysteme als auch die Methoden unterscheiden sich dabei in mehreren Details; alle Systeme verfolgen jedoch das Ziel den Nachweis von Mykobakterien zu erbringen. Zusätzlich zu *MTC* werden wahlweise weitere Zielsequenzen wie etwa *NTM/Myspp.* oder Tuberkulostatika-Resistenzen (u. a. gegen Rifampicin (RIF) und Isoniazid (INH)) detektiert, um weiterführende Hinweise zur Therapierbarkeit zu erhalten [27,134]. Ein Überblick über eine Auswahl vergleichbarer und aktuell vorhandener Testverfahren ist in Tabelle 23 aufgeführt.

Parallel zur Entwicklung des neuen IMIKRO-Verfahrens wurde an anderen Forschungseinrichtungen an ähnlichen Fragestellungen gearbeitet: So wurde im Jahr 2016 – zeitgleich zum Abschluss der Validierung des vorliegenden Verfahrens – eine Arbeit zur Detektion von *MTC* und *NTM/Myspp.* (sowie zusätzlich *MAC*) mittels Multiplex PCR für den BD MAX™ von Rocchetti et al. veröffentlicht [131]. Darüber hinaus sind mittlerweile Geräte und Testverfahren anderer kommerzieller Hersteller erhältlich.

Der kommerzielle Xpert® MTB/RIF-Assay der Firma Cepheid Inc. (Kalifornien, Sunnyvale, USA) ist ein von der US-amerikanischen Food and Drug Administration zugelassener sowie von der WHO favorisierter, automatisierter In-vitro-Test zur Detektion von *MTC* in Sputumproben. Im Rahmen dieses Testverfahrens kann die *MTC*-Detektion mit einer Testung auf Vorliegen einer Mutation im RNA-Polymerasegen und damit einer wahrscheinlichen RIF kombiniert werden. Eine RIF von mikroskopisch positiven Proben kann laut WHO als Surrogatparameter für MDR-TB genutzt werden, weil diese in der Regel nur in Kombination mit einer INH-Resistenz auftritt [135,136].

Auch die Firma Becton, Dickinson (BD) selbst hat im Laufe des Jahres 2018 den oben vorgenannten Test (BD MAX™ MDR-TB) zur Detektion von *MTC* veröffentlicht; ähnlich wie der kommerzielle Xpert® MTB/RIF-Test der Firma Cepheid Inc. wurde das Mykobakterien-spezifische Testverfahren dabei um die Testung auf Medikamentenresistenzen ergänzt (gegenüber Isoniazid und Rifampicin) [129,134].

Tabelle 23 Übersicht einer Auswahl molekularer Mykobakterien-Testverfahren [129,131,133,135–138]

	Xpert® MTB/RIF, 2010 (kommerziell)	RT-MTC/MAC-Assay (nach Rocchetti et al. 2016) (in-house)	BD MAX™ MDR-TB, 2018 (kommerziell)	IMIKRO Assay, 2015 (in-house)
Einsatz	Nach Bedarf	Nach Bedarf	Nach Bedarf	Nach Bedarf
Format	Kartusche	Kartusche	Karte/Kartusche	Karte/Kartusche
Proben-material	Sputum, Kultur	Sekrete des Respirationstraktes, Bioptate, Peritonealflüssigkeit, Kultur	Sputum	Sekrete des Respirationstraktes, Blut, Kultur
Proben-volumen	0,5 bis 1 ml	250 µl	2,5 ml	100 µl
Proben-vorbereitung	Verflüssigung und Inaktivierung des Materials, ~ 15 Min./Probe	Proteinase K, 30 Min. bei 60 °C, dann 5 Min. bei 95 °C	Mittels „BD MAX™ STR“ (Behandlungsreagenz, BD) ~ 30 min	Keine
DNA-Extraktion	Integriert	Integriert	Integriert	Integriert
Ziel	<i>rpoB</i>	16S-rRNA, IS6110, ITS	IS6110, IS1081	IS6110, ITS
RIF	Ja	Nein	Ja	Nein
INH	Nein	Nein	Ja	Nein
NTM	Nein	ja (<i>Myspp.</i> und <i>MAC</i> separat)	Nein	Ja (<i>Myspp.</i>)
Erweiterbar	Nein	Ja	Nein	Ja
Hands-on-Time	~ 3 Min./Probe	~ 35 Min.	30 Min. + X	~ 2 Min.
Zeitaufwand insgesamt	~ 2 h	< 4 h/1-24 Proben	30 Min. + X X= < 2 h/1 Probe	< 2 h/Probe < 4 h/24 Proben
Proben-durchsatz	4 Proben/2 h	Bis 24 Proben/Lauf	Bis 24 Proben/Lauf	Bis 24 Proben/Lauf
Kosten	~ 45-50 €/Probe	keine Angabe	~ 40 €	~ 15 €/Probe

Abkürzungen: 16S-rRNA, 16S-Untereinheit der ribosomalen Ribonukleinsäure; INH, Isoniazid-Resistenz; IS6110, 6110-Insertionselement; IS1081 1081-Insertionselement; ITS, internal transcribed spacer; *MAC*, *Mycobacterium avium*-Komplex; *MTB*, *Mycobacterium tuberculosis*; *MTC*, *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex; MDR-TB, multi-drug-resistant tuberculosis; *NTM*, nicht-tuberkulöse Mykobakterien; RIF, Rifampicin-Resistenz; *rpoB*, Gen von *MTC*, das die Beta-Untereinheit einer RNA-Polymerase kodiert; STR, sample treatment reagent/Behandlungsreagenz (hier: Reagenz für die Aufbereitung von Sputumproben).

Diese innerhalb kurzer Zeit deutlich voranschreitenden Entwicklungen auf dem Gebiet der TB-Diagnostik unterstreichen die Aktualität und Relevanz der vorliegenden Arbeit. In den folgenden Abschnitten wird ein Vergleich des im Rahmen dieser Arbeit etablierten IMIKRO-Testverfahrens mit den entsprechend ähnlichen Testverfahren der Firmen Cepheid (Xpert® MTB/RIF Assay), BD (BD MAX™ MDT-TB) und dem Testverfahren der Arbeitsgruppe um Rocchetti et al. (2016) hinsichtlich der Faktoren Patientenmaterialien, Leistungsdaten, Einfluss ausgewählter Ergebnisse, Arbeitsabläufe, Kosten und Automation dargelegt.

5.1.1. Patientenmaterialien

Im Rahmen der TB-Diagnostik ist es wichtig und sinnvoll, die Untersuchung an verschiedenen Patientenmaterialien durchführen zu können. Viele kommerzielle Tests sind aufgrund ökonomischer Zwänge auf die Untersuchung von Sputumproben beschränkt: Andere gängige Probenmaterialien, wie Trachealsekret, Biopsien, Punktate, Blut und Liquor, in denen Mykobakterien auch nachgewiesen werden könnten, sollten mit diesen Systemen nicht untersucht werden, da die Qualität der Untersuchungsergebnisse nicht garantiert werden kann. Die im Rahmen dieser Arbeit am IMIKRO etablierte Multiplex RT-PCR auf dem BD MAX™ kann neben verschiedenen Sekreten des Respirationstraktes auch Blutproben auf das Vorliegen von Mykobakterien(-DNA) ausreichend sensitiv und spezifisch analysieren. Blutproben erscheinen zunächst nicht als das klassische Probenmaterial für die TB-Diagnostik; es wurde allerdings in Studien gezeigt, dass *M. tuberculosis* während der Bakteriämie durchaus im Blut nachweisbar ist (insbesondere bei HIV-positiven Erwachsenen, seltener bei Kindern) [139]. Für nicht-tuberkulöse Mykobakterien aus dem MAC-Komplex gilt dies umso mehr [140,141]. Die Probengewinnung mittels Blutentnahme erscheint demnach als sinnvolle Ergänzung zur Probenasservation und lässt sich zudem einfach durchführen.

Die Kollegen um Rocchetti et al. nutzten zur Validierung ihres Verfahrens hauptsächlich Sekrete der Atemwege, Peritonealflüssigkeit und in sieben Fällen Biopate. Die Analyse von Biopaten zur Detektion einer Mykobakteriose ist – z. B. bei klinischer Manifestation einer Lymphadenopathie – positiv zu bewerten und stellt sicherlich eine sinnvolle Erweiterung des Probenspektrums dar. Blutproben wurden – anders als am IMIKRO – durch Rocchetti et al. nicht mit in die Analysen einbezogen. Der kommerzielle BD MAX™ MDR-TB-Test ist lediglich für die Analyse von Sputum – insbesondere auch aufgereinigtem Sputum – validiert. Ebenfalls für Sputum validiert ist der Xpert® MTB/RIF-Test. Dieses Testverfahren wird in der praktischen Anwendung jedoch auch zum TB-Nachweis in anderen Probenmaterialien genutzt, wobei hierbei die Sensitivität ggf. niedriger ausfällt (siehe unten). Der Xpert® MTB/RIF-Test wird von der WHO bisher nicht für die Analyse von Blutproben empfohlen [142].

5.1.2. Leistungsdaten

Die analytische Sensitivität des IMIKRO-Testverfahrens liegt bei ≤ 250 Kopien pro Milliliter Probe (bei nicht-aufgereinigten bzw. unvorbereiteten Proben). Bei dem von Rocchetti et al.

entwickelten Test liegt die analytische Sensitivität zwischen 10^1 CFU/ml für *MTC* und 10^5 CFU/ml für *M. abscessus* [131]. BD gibt für den BD MAXTM MDR-TB-Test für den *M. tuberculosis*-Nachweis aus aufgereinigtem Sputum eine analytische Sensitivität von $10^{0,5}$ CFU/ml an. Die analytische Sensitivität für den Resistenznachweis liegt bei $10^{3,75}$ - 10^6 [129]. Für das Testverfahren Xpert® MTB/RIF der Firma Cepheid werden 4,5 Genomkopien in aufgereinigter DNA oder 131 CFU pro Milliliter Sputumprobe angegeben [143]. Eine Weiterentwicklung des Xpert®-Tests findet sich mit dem Xpert® MTB/RIF Ultra: Die DNA-Reaktionskammer (Kammer innerhalb einer Kartusche) wurde vergrößert, sodass die Nachweisgrenze weiter reduziert werden konnte [144,145].

CFU oder KBE bedeutet Kolonie-bildende Einheit: In der Regel entspricht eine CFU genau einer vitalen Bakterienzelle, die in der Lage ist, eine Bakterienkolonie auf Festmedium zu bilden. Die Übersetzung zu Kopien/ml entspricht bei einmaliger Vorlage der Zielsequenz im Gesamtgenom genau dem Faktor 1 (1 KBE = 1 Kopie). Liegt die Zielsequenz häufiger im Genom vor ändert sich das Verhältnis. Im Fall des vorliegenden IMIKRO-Testverfahrens liegt die Zielsequenz IS6110 (Insertions-Sequenz 6110, eine bei *MTC* repetitive Sequenz) mehrfach im Genom vor (z. B. circa 20 Kopien bei *M. tuberculosis*). Im Vergleich zum kommerziellen Gebinde des BD MAXTM MDR-TB-Assay ist nicht klar, ob BD ggf. andere Sequenzen nutzt, welche möglicherweise noch häufiger im Genom vorkommen. Die Werte der verschiedenen Testverfahren sind also nicht zwingend miteinander vergleichbar.

Beide kommerziellen Testverfahren (BD MAXTM MDR-TB und Xpert® MTB/RIF) differenzieren nicht zwischen *MTC* und *NTM* – im Gegensatz zum Testverfahren von Rocchetti et al. und dem am IMIKRO etablierten Verfahren. Eine Arbeitsgruppe der Universität Heidelberg analysierte das Testverfahren von BD vor der Veröffentlichung des Tests durch den Hersteller (BD). Die errechnete Gesamtspezifität zur Detektion von *MTC* lag bei 96,4 %, die Sensitivität für den Nachweis in Ausstrich-negativen *MTC*-Proben bei 87,2 % und für Ausstrich-positive Proben bei 99,0 % [134]. Der Hersteller gibt für den Nachweis von *MTC* in nativem Sputum folgende Werte an: Gesamtsensitivität bei Ausstrich-positiven und Ausstrich-negativen Proben 94,5 %, Gesamtspezifität bei Ausstrich-positiven und Ausstrich-negativen Proben 94,9 % [129].

Die WHO fasste die Untersuchungsergebnisse des Xpert® MTB/RIF-Testverfahrens für verschiedene Untersuchungsmaterialien (z. B. Liquor, Aspirate, Pleuraflüssigkeit und u. a. Blut) zusammen und zeigte auf, dass die gepoolten Sensitivitäten des Tests für die

unterschiedlichen Materialien bei > 80 % liegen. Die Analyse der Pleuraflüssigkeit fiel mit einer Sensitivität von nur knapp 43 % als deutlich schlechter auf; Blutproben wurden aufgrund von Datenmangel aus der Analyse ausgeschlossen [142].

Ein Review aus 2014 analysierte die Testgenauigkeit des Xpert®-Testverfahrens auf die Detektion von *MTC* und RIF für Proben des Respirationstraktes vor dem Hintergrund, dass das Testverfahren sowohl als Primärdiagnostikum als auch als Diagnostik-Zusatz zum Einsatz gekommen ist. Als Eingangstest, der die mikroskopische Diagnostik ersetzen soll, ergab sich im Mittel eine gepoolte Sensitivität von 89 % und eine Spezifität von 99 % für den Nachweis von *MTC*. Als Zusatz-Test bei negativem mikroskopischem Ergebnis wurde eine gepoolte Sensitivität von 67 % und eine Spezifität von 99 % ermittelt. Bei positivem mikroskopischem Nachweis und positiver Erregerkultur lag die Sensitivität bei 98 % [138].

Bei Rocchetti et al. wurden auf dem BD MAX™ neben Primern und Sonden für *MTC* und *NTM* (hier: sogenanntes „PAN-Target“, 16s-rRNA) dem Arbeitsmix noch Primer für die Detektion von *MAC* hinzugefügt – *MAC* als SGM und Auslöser von *NTM*-assoziierter Lungenerkrankung. Nach einer Probenaufbereitung ergaben sich bezüglich der Güte des Tests von Rocchetti et al. laut der Autoren folgende Werte: *MTC*: Sensitivität 100 %, Spezifität 97,1 %, PPV 84,2 %, NPV 100 %; *NTM/Myspp.*: Sensitivität 89,7 %, Spezifität 100 %, PPV 100 %, NPV 84,0 %; *MAC*: Sensitivität 83,8 %, Spezifität 100 %, PPV 100 %, NPV 93,3 % [131]. Die erhobenen Werte beziehen sich auf kulturpositive bzw. mit Zielsequenz versetzte Proben. Im Vergleich zu den Werten des Verfahrens am IMIKRO sind die Werte von Rocchetti et al. für *NTM/Myspp.* und *MTC* trotz ausgiebiger Probenvorbereitung geringfügig niedriger. Zur Testung wurde dort ebenfalls positives Kulturmaterial herangezogen. In wenigen Fällen gab es unterschiedliche Ergebnisse bei PCR und Erregerkultur, sodass die Autoren annahmen, dass eine niedrige Erregerkonzentration in der jeweiligen Probe vorlag und ggf. deshalb die DNA-Extraktion erschwert wurde. Die Spezifität des Tests wurde dort an acht verschiedenen Mykobakterienstämmen geprüft, darunter auch *M. abscessus* (ATCC 19977) und *M. chelonae* (ATCC 35752) – alle seien korrekt identifiziert worden [131].

Im Vergleich mit ähnlichen Tests zum Nachweis von Mykobakterien schneidet das IMIKRO-Testverfahren mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 % dementsprechend positiv ab. Offen bleibt die Frage, wie gut die Sensitivität und Spezifität des IMIKRO-Tests bei nicht-kulturpositiven Proben ausfällt. Dies wird die Praxis zeigen.

5.1.3. Beurteilung ausgewählter Ergebnisse

Wichtig für die korrekte Behandlung von *NTM*-Infektionen ist die diagnostische Erfassung von *M. abscessus* als einem der virulentesten Stämme innerhalb der RGM; zu beachten ist die erschwerte Therapie aufgrund ausgeprägter Medikamentenresistenzmechanismen [146]. *M. chelonae* und *M. abscessus* wurden mit dem IMIKRO-Test nicht regelhaft sicher detektiert. Es konnte abschließend nicht geklärt werden, ob die am IMIKRO genutzten Stämme denen der oben erwähnten, von Rocchetti et al. genutzten, entsprechen: Eine ATCC®-Bezeichnung (American Type Culture Collection) der genutzten *NTM* konnte nicht ermittelt werden, da die Stämme aus Ringversuchsproben stammten (RV 133, RV 139) – somit war an dieser Stelle der rückwirkende Vergleich mit z. B. Rocchetti et al. (2016) nicht möglich (*M. abscessus*, ATCC 19977 und *M. chelonae*, ATCC 35752).

Eine Besonderheit der beiden vorgenannten Mykobakterienstämmen ist u. a. ihre taxonomische Ähnlichkeit. Bis in die frühen 1990er Jahre waren *M. abscessus* und *M. chelonae* noch in einer Gruppe zusammengefasst. *M. abscessus* ist eine der am häufigsten nachgewiesenen *NTM*-Spezies [18]. Die komplizierte Taxonomie wird auch bei der Durchsicht der Literatur deutlich: Manchmal werden beide Stämme auch in einem *M. chelonae-abscessus*-Komplex zusammengefasst. Die exakte Differenzierung ist kompliziert, wird allerdings durch den Einsatz von molekularbiologischen Methoden zunehmend vereinfacht. Die Nutzung von Zielgenen wie die *hsp65*- und *rpoB*-Gene und die ITS-Region ermöglicht die Differenzierung bis zum Niveau der Subspezies. Das Ausnutzen der 16S-rRNA ermöglicht bei RGM immerhin die Differenzierung auf Komplex-Niveau (z. B. *M. chelonae-M. abscessus*-Komplex) [60].

Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte In-silico-Analyse kann man entnehmen, dass die am IMIKRO eingesetzten Primer und Sonden *M. chelonae* (CCUG 47445, complete genome) und *M. abscessus* (strain WH836 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence) formal erfassen können. In der Datenbank zur BLAST-Analyse werden noch weitere *M. chelonae*- und *M. abscessus*-Stämme für die *Myspp*.-Sonde angegeben, die erfasst werden können. Der 2016 entwickelte Test von Rocchetti et al. nutzte *M. abscessus* ATCC19977 als Referenzstamm – ebendieser wird laut BLASTn auch von der am IMIKRO eingesetzten Sonde abgedeckt bzw. erfasst [131]. Für die Detektionsschwäche des IMIKRO-Verfahrens kommen neben ggf. falsch gewähltem Target der *Myspp*.-Sonde auch

Kulturfehler, niedrige DNA-Konzentration oder das Vorliegen von PCR-Inhibitoren infrage (beispielsweise durch EDTA-haltige Proben) [147].

Rocchetti et al. publizierten im Verlauf 2017 einen weiteren Test zur Detektion von *M. chelonae*, *M. abscessus* und *M. fortuitum*-Komplex [27]. Die Autoren hatten bei teilweise ungelösten PCR-Ergebnissen u. a. niedrige DNA-Konzentrationen als Ursache angenommen. Anders als beim IMIKRO-Test wurden jedoch keine Blutproben zur Analysenvalidierung genutzt [27].

Die mit dem IMIKRO-Test nachgewiesene IS6110-Region, in den frühen 1990er Jahren erstmals beschrieben, kommt ausschließlich in *MTC* vor. Aufgrund dieser Gegebenheit sowie guter Erfahrungen am IMIKRO mit der Ausnutzung von IS6110 in NAT-Verfahren wurde für die hier beschriebene PCR entsprechend dieses Target ausgewählt [148]. Die am IMIKRO bisher verfügbare 16S-PCR ist für die Identifikation von Mykobakterien wichtig. Anhand der 16S-rRNA können – bis auf einige Ausnahmen (z. B. *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus*) – mykobakterielle Spezies gut und sicher differenziert werden [149]. Für die Detektion von *NTM/Myspp.* wurde im Rahmen dieser Arbeit – wie auch bei den Kollegen um Rocchetti – die ITS-Sequenz als Mykobakterien-spezifische Sonde genutzt. ITS befindet sich zwischen den 16S- und 23S-rRNA-Genen von Mykobakterien. Diese Sequenz kann genutzt werden, um verschiedene Mykobakterien zu unterscheiden, teilweise sogar solche, die durch eine 16S-rRNA-PCR nicht unterschieden werden konnten [117]. Die benannten Detektionsschwächen könnten sich u. a. auch aufgrund von Sequenzvariationen innerhalb der ITS-Sequenz der gesuchten Erreger, wie z. B. *M. abscessus*, erklären [150].

Neben der oben genannten Schwäche hinsichtlich der Detektion von *M. abscessus* und *M. chelonae* ist ein ggf. weiterer Schwachpunkt des IMIKRO-Tests, dass die Verdünnung der schwach-positiven Proben (z. B. während der Vorversuche und später bei der Präzisionsprüfung) von 1:1000 auf 1:10 gesenkt werden musste, um schwankende PCR-Ergebnisse aufzufangen. Dies kann durch eine geringe Bakterienmenge (ggf. mit inhomogener Verteilung innerhalb der Probe) im Bereich der Sensitivitätsgrenze des Verfahrens oder das Vorkommen inhibitorischer Substanzen erklärt werden.

5.1.4. Arbeitsabläufe

Die Arbeitsabläufe umfassen vor allem die manuellen Schritte, die für eine vollständige Probenanalyse notwendig sind (z. B. ausgiebige Pipettierschritte zur Erstellung des Primer-

und Sondenmixes, Probenvorbereitungen). Das Testprotokoll des Verfahrens von Rocchetti et al. enthielt eine Probenvorbereitung: Die Proben wurden dort vor der PCR für 30 Minuten mit Proteinase K „vorverdaut“; die Bearbeitungszeit bzw. die „Hands-on-Zeit“ verlängert sich entsprechend, lag aber in den Analysen laut der Autoren noch unter vier Stunden pro Probe.

Der kommerzielle BD MAXTM MDR-TB-Test erscheint in der Anwendbarkeit einfach, bspw. hinsichtlich der kurzen händischen Bearbeitungszeit sowie mit eingängigen Arbeitsabläufen am Gerät. Bei dem Testverfahren ist jedoch eine Probenvorbereitung mittels „STR-Kit“ (Sample Treatment Reagent, herstellerseitige Bezeichnung) nötig bzw. vorgesehen: Dies ist eine circa 30 Minuten (zusätzlich zum PCR-Lauf) beanspruchende Methode zur Verflüssigung zäher Sputumproben [129,134]. Für den Xpert® MTB/RIF-Test gilt, dass die in Studien ermittelte Trainingsdauer von ein bis zwei Tagen an der Testplattform zunächst zwar ausreicht, für solide Testergebnisse allerdings deutlich längeres Training und Supervision – insbesondere in den ersten zwei Monaten nach Testeinführung – nötig sind [151].

Hinsichtlich des IMIKRO-Tests können die Arbeitsabläufe durch die Präaliquotierung der Arbeitsmixe sowie die nicht notwendige Probenvorbereitung einfach gehalten werden. Die Probeneingabe in den BD MAXTM, die Hinzugabe der Aliquote in den BD-Teststreifen sowie das Starten der automatischen Analyse sind die einzigen manuellen Schritte, die beherrscht werden müssen, um valide Testergebnisse zu erhalten. Pipettierfehler können so vermieden, das Kontaminationsrisiko kann niedrig gehalten werden.

Es wird deutlich, dass der IMIKRO-Test aufgrund der nicht notwendigen Probenvorbereitung die praktische Bearbeitungszeit reduziert und die Arbeitsabläufe vereinfacht. Ein medizinisches Labor profitiert von der Möglichkeit, zeitnahe und möglichst Personal-unabhängige, valide Testergebnisse hinsichtlich spezieller Fragestellungen liefern zu können.

5.1.5. Automation

Der für diese Arbeit genutzte BD MAXTM arbeitet als PCR-Vollautomat. Dies bedeutet, dass der BD MAXTM im Vergleich zu klassischen Systemen die Arbeitsschritte der Probenvorbereitung, Amplifikation und Detektion auf einem einzigen Instrument vereint [152]. Die Nutzung einer automatisierten Plattform wie der BD MAXTM ist speziell aufgrund des hohen Automatisierungsgrades wenig fehleranfällig. Es ist schon lange bekannt, dass die PCR-Automation die Kontaminationsgefahr reduziert bzw. minimiert [153]. Dabei ist die

Möglichkeit der Etablierung von in-house Protokollen auf dem BD MAX™ ein wichtiger Vorteil gegenüber vielen anderen PCR-Automaten, die nur kommerzielle und konfektionierte, d.h. vom Hersteller angebotene, Tests durchführen können. Typischerweise ist allen in-house Tests die besondere Anpassung an die individuellen Ansprüche der Einsender bzw. des diagnostischen Labors gemein, während kommerzielle Testsysteme diese individuellen Ansprüche oft nur teilweise erfüllen können. Neben der Nutzung speziell entwickelter PCR-Tests ist die Automation molekularbiologischer Verfahren derzeit einer der wichtigsten Trends in der molekularbiologischen Routinediagnostik, was sich u. a. auch in der Markteinführung immer neuer Automaten – neben dem BD MAX™ – zeigt (Tabelle 24).

Tabelle 24 Auswahl aktueller PCR-Automaten – neben dem BD MAX™ (Daten entnommen [154–156])*

Hersteller	Name	Erläuterung
Roche, Basel, Schweiz	Roche cobas® 6800/8800	Bisher ohne kommerzielles Gebinde zum MTB-Nachweis; nur zu Forschungszwecken, Stand 1/2020
bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich	Biofire® Filmarray®	Bisher ohne kommerzielles Gebinde zum MTB-Nachweis; bisher keine durch Anwender entwickelte Protokolle unterstützt, Stand 1/2020
Curetis, Holzgerlingen, Deutschland	Curetis Unyvero	Testkartusche für Mykobakterien-Nachweis aus Blutkulturen vorhanden; bisher keine durch Anwender entwickelte Protokolle unterstützt, Stand 1/2020

* Dies entspricht einer Auswahl aktueller PCR-Automaten, vorwiegend gebräuchlich im europäischen Raum. Diese Auswahl erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Die Entwicklung vollautomatisierter Testverfahren erscheint sinnvoll, denn zum einen müssen aufgrund der zunehmenden Menge potenzieller Zielorganismen immer mehr Proben und diagnostische Fragestellungen bearbeitet werden, zum anderen ist es heutzutage schwer, den Einsendern Abarbeitungszeiten von mehr als 24 h zu vermitteln, wo doch die Schnelligkeit der PCR immer wieder als wichtiger Vorteil dieser Methode beworben wird. Die Automation der Prozesse der DNA-Extraktion durch Pipettierroboter sowie die automatische PCR mit Amplifikation und Detektion vereint auf einer Arbeitsplattform (wie etwa dem BD MAX™) ermöglicht dabei eine sehr kurze Bearbeitungszeit der einzelnen Proben, was zu einer schnelleren Diagnosefindung führt und in der Folge zu einer Verbesserung der Behandlungsqualität beiträgt [157]. Darüber hinaus kann die PCR-Automation zu einem höheren Probendurchsatz bei geringerem Personalaufwand (im Vergleich zu konventionellen Verfahren), zur Reduktion der Subjektivität der Testverfahren und zur Steigerung der Testrobustheit beitragen [101].

5.1.6. Kosten

Bald nach der Entwicklung des Xpert® MTB/RIF-Testverfahrens (2009) empfahl die WHO im Jahr 2010 die Nutzung dieses Verfahrens zur Detektion von (MDR)-TB und HIV-TB sowie als Bestätigungstest bei mikroskopisch negativen TB-Patienten. Die Nutzung des Verfahrens nahm daraufhin weltweit zu und wurde fortan auch bei pädiatrischen Patienten und bei extrapulmonaler Tuberkulose immer häufiger eingesetzt [151].

Für Entwicklungsländer bzw. eine bestimmte Gruppe von Kunden (u. a. ausgewählter öffentlicher Sektor, Nichtregierungsorganisationen) konnten besondere Preise pro Kartusche ausgehandelt werden: So kostet eine Testkartusche im Jahr 2020 noch etwa US\$ 10 [158]. Im privaten Sektor sind die Kosten für die benötigten Kartuschen höher und liegen zwischen etwa US\$ 25 und US\$ 183. So hat z. B. im Jahr 2011 die Analyse einer Probe in Frankreich circa 50 € gekostet [135]. Diese Kosten können vor allem in Hochprävalenzländern ein Problem darstellen, da in diesen Ländern der private Sektor mehrheitlich eine wichtige Säule der Krankenversorgung darstellt [159]. Vor diesem Hintergrund erscheinen die Kosten für den Xpert® MTB/RIF-Test aktuell weiterhin hoch und sind insbesondere im Durchschnitt höher als die Kosten des IMIKRO-Verfahrens oder vergleichbarer Tests auf dem BD MAX™. Entsprechend eigener Korrespondenz wird für den kommerziellen BD MAX™ MDR-TB-Test in Deutschland ein Preis von circa 40 € veranschlagt. Die aktuell verursachten Kosten von circa 15 € für den IMIKRO-Test können demnach als großer Vorteil der Entwicklung von in-house Testverfahren gewertet werden. Ein ähnlicher Preis pro PCR-Lauf ist für den Test von Rocchetti et al. (2016) anzunehmen.

5.2. Aktuelle Entwicklungen in der Diagnostik von Mykobakterien

Die Entwicklung von Multiplex PCR-Verfahren bringt die mykobakterielle Diagnostik im Hinblick auf Schnelligkeit, Effizienz und Verlässlichkeit voran [160]. Wie zuvor beschrieben gibt es neben zahlreichen in-house Multiplex PCR-Verfahren gebrauchsfertige, kommerzielle PCR-Gebinde und Nachweissysteme für den Einsatz als Point-of-Care-Tests (POCT, Patientennahe Sofortdiagnostik) [152,161]. Die Entwicklung von POCT erscheint besonders wichtig für die TB-Diagnostik in Entwicklungsländern; hierzu können RT-PCR-Verfahren genutzt werden [162]. Kürzlich wurden Ergebnisse einer Multikohorten-Studie veröffentlicht, die u. a. für Testentwicklungen zur Aufdeckung einer aktiven versus einer latenten Tuberkuloseerkrankung mittels Detektion unterschiedlicher Genexpression genutzt werden könnten. Dies könnte unter Umständen auch zur Entwicklung neuer POCTs führen [163].

Einige bisher verfügbare NAT-Verfahren wurden bereits als mögliche Ersatzdiagnostika des mikroskopischen Nachweises benannt, weitere sind derzeit in der Entwicklung bzw. Markteinführung: EOSCAPE-TB Assay, Genedrive® Mycobacterium tuberculosis iD®, TrueNAT™ TB Assay, Isothermal TB POC Assays, EasyNAT® TB Assay und Loopamp™ MTBC Detection Kit sind hier als Beispiele zu nennen [137]. Als weiterhin relevantes PCR-Kartuschensystem ist die zuvor beschriebene Produktreihe Xpert® der Firma Cepheid Incorporated (USA) zu nennen. Dieses Produkt befindet sich in stetiger Weiterentwicklung und setzt Schwerpunkte auf die Analyse von *MTC* und Resistenzen (Xpert® MTB/RIF); wie jedoch bereits beschrieben ist dieses System verhältnismäßig teuer. Die Entwicklung von immer mehr Tests und Analyseverfahren soll es in Zukunft auch kleineren, ggf. peripher gelegenen und damit häufig nicht spezialisierten Laboratorien ermöglichen eine suffiziente Analyse von Patientenproben zu gewährleisten [152]. Nutzbar für die POCT-Diagnostik sind z. B. auch kostengünstigere PCR-Gebinde, die auf bestimmten Chips basieren; hierdurch sollen noch schnellere Diagnoseergebnisse ermöglicht werden [164].

Eine weitere Möglichkeit der patientennahen Sofortdiagnostik stellt darüber hinaus die Loop-mediated isothermal amplification, LAMP, dar. Bei dieser Methode herrschen isothermale Reaktionsbedingungen bei 60 bis 65 °C; durchgeführt wird dieses Testverfahren in einem Wasserbad. Nach einer DNA-Extraktion werden dem extrahierten Material spezifische Primer zugesetzt. Durch die Nutzung mehrerer Primer, die sechs verschiedene DNA-Regionen binden können, ist eine hohe Spezifität gegeben; ein Primerpaar ist komplementär, weshalb Loop-artige Sekundärstrukturen ausgebildet werden und die exponentielle Amplifikation erleichtert werden soll. Dieses Testverfahren ist mit einer Inkubationszeit von circa 60 Minuten verhältnismäßig schnell und bietet einen insgesamt zeitsparenderen Ablauf als eine gewöhnliche PCR, da aufgrund des sogenannten Autocyclings (durch Nutzung einer bestimmten DNA-Polymerase) kein Thermocycling nötig ist. Die DNA-Strangauftrennung erfolgt nicht durch Hitze, wie bei der konventionellen PCR, sondern durch die Enzymaktivität. Es werden große Mengen Amplifikate gebildet, was die Detektion vereinfacht. Es gibt bereits Methoden zur gleichzeitigen Testung auf *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* und *M. avium* [165–167]. Diese Methode soll leicht durchzuführen sein und arbeitet von einer Stromquelle unabhängig. Dies ermöglicht den Einsatz z. B. nach Katastrophenfällen, um frühzeitig ein Aufkeimen an Infektionskrankheiten (in diesem Falle Tuberkulose) erkennen zu können [168]. Zu erwerben gibt es bspw. das Loopamp™ MTBC Detection Kit (Eiken, Japan), das eine Sensitivität von 98 % bei Kultur-positivem Material

aufweist, jedoch nur 56 % bei Kultur-negativen Proben. Die mangelnde Sensitivität ist nicht nur der Nachteil dieses Systems, sondern der von zahlreichen in-house LAMP-Tests. Zudem ist das Etablieren solcher Verfahren aufgrund Primer-Primer-Interaktionen verhältnismäßig aufwendig [137]. Weitere isothermal arbeitende Tuberkulose-POCTs befinden sich derzeit in der Entwicklung. Neben dem Einsatz in Katastrophengebieten könnten solche Testverfahren ebenso in Gesundheitszentren in Entwicklungsländern ohne stete Stromversorgung zum Einsatz kommen [137].

Neben dem eigentlichen Erregernachweis ist zusätzlich auch die Resistenztestung von Bedeutung. So gibt es – bei bereits mikroskopisch positivem Probenmaterial – die Möglichkeit der Nutzung von Schnellresistenzverfahren, einem „Line Probe Assay“ (kurz LiPA oder LPA). Dieses Diagnose-Tool im Teststreifenformat arbeitet nach dem Prinzip der reversen Hybridisierung, bei dem auf einem Nitrozellulosestreifen bestimmte Sonden (Oligonukleotide) an gewissen Positionen verankert sind. Je nach Teststreifendesign können innerhalb von wenigen Stunden *MTC* und Tuberkulostatikaresistenzen (RIF, INH) nachgewiesen werden [169,170]. Es sind kommerzielle Line Probe Testverfahren (z. B. INNO-LiPA Rif.TB test, Innogenetics NV, Gent, Belgien) erhältlich, deren Nutzung bei mikroskopisch positiver Lungentuberkulose im Jahr 2008 von der WHO empfohlen wurde [171,172]. Darüber hinaus ermöglichen Line Probe Tests die Differenzierung mehrerer Mykobakterienspezies, jedoch teilweise mit falsch-positiven Ergebnissen [173]. Die Kombination dieses NAT-Verfahrens mit integrierten PCR-Automaten wie dem BD MAX™ erscheint sinnvoll: Die Erweiterung der Nachweise um zusätzliche Erreger sollte von der jeweils genutzten PCR-Plattform unterstützt werden. Neben den vorgenannten Weiterentwicklungen von NAT-Verfahren, gibt es auch Neuentwicklungen in anderen Diagnostik-Bereichen, beispielsweise hinsichtlich Kulturmedien und Mikroskopie, Bildgebung oder Atemanalyse (z. B. mittels Biomarker).

Die kürzliche Entwicklung des BD MAX™ MDR-TB-Testverfahrens von Becton, Dickinson für den BD MAX™ (2018) unterstreicht die Aktualität der vorliegenden Arbeit, einerseits bezogen auf das Erregerspektrum, andererseits bezogen auf das genutzte NAT-Verfahren und Nutzung von Automation. Im Hinblick auf die Entwicklung zukünftiger POCT zur Diagnostik von Tuberkulose kann man auf die Entwicklung und Weiterentwicklung von Multiplex-PCR, ggf. sogar als bedside-Diagnosetool, hoffen [174].

5.3. Relevanz und Ausblick

Die Bedeutung einer raschen und im Idealfall einfachen sowie patientennahen mikrobiologischen Diagnostik zur schnellen Einleitung von spezifischen Therapie- und Hygienemaßnahmen bei an Tuberkulose erkrankten bzw. mit *NTM* infizierten Patienten unterstreicht die Relevanz der vorliegenden Arbeit. Das ideale Diagnostikinstrument für TB sowie *NTM*-bezogene Erkrankungen wäre eines, das einfach und schnell anzuwenden ist, dabei wenig technisches Know-how voraussetzt und trotzdem ausreichend solide Testergebnisse generiert. Optimal wäre darüber hinaus eine gleichzeitige Detektion von Tuberkulostatikaresistenzen [171].

Mit der Entwicklung der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Multiplex RT-PCR konnte für das IMIKRO ein PCR-Verfahren etabliert werden, das die Anforderungen des einfachen und schnellen Arbeitsablaufes sowie solider und robuster Testergebnisse erfüllt. Das entwickelte Testverfahren hat mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 % eine sehr gute Leistung aufgezeigt. Die geltenden SAA, einschließlich der enthaltenen Richtlinien, sind im Rahmen der Validierung befolgt worden. Eine abschließende praktische Bewertung des hier beschriebenen Multiplex PCR-Testverfahrens im Rahmen der Diagnostikroutine am IMIKRO steht zu diesem Zeitpunkt noch aus.

Eine zusätzliche Verbesserung der Ergebnisse, bei ansonsten ausreichender Robustheit, kann ggf. auch durch eine weitere Probenvorbehandlung (vgl. das vorgefertigte BD MAX™ STR-Kit) erzielt werden. Dies würde dann jedoch auf Kosten der Bearbeitungszeit geschehen. Bei der Etablierung des Testverfahrens am IMIKRO wurde zugunsten der Einfachheit des Testverfahrens auf eine Probenvorbereitung zunächst verzichtet. Im Sinne einer weiteren Optimierung des hier entwickelten und etablierten Multiplex PCR-Testverfahrens auf dem BD MAX™ ist zukünftig ein Funktionsausbau denkbar und sinnvoll, beispielsweise durch die Einbindung zusätzlicher Patientenmaterialien oder die zusätzliche Überprüfung von Resistenzen. Eine Leistungsoptimierung für den Nachweis von u. a. *M. abscessus* und *M. chelonae* wäre ebenso wünschenswert – beispielsweise durch Hinzugabe eines weiteren Primer-Sonden-Mixes im Multiplexansatz. Die Anpassungsfähigkeit des Testverfahrens an sich ggf. noch entwickelnde Fragestellungen ist als großer Vorteil von in-house PCR-Testverfahren und offenen PCR-Systemen, wie dem BD MAX™, im Vergleich zu kommerziellen Testbinden und geschlossenen Testsystemen zu werten.

6. Zusammenfassung

Tuberkuloseerkrankungen sowie durch nicht-tuberkulöse Mykobakterien ausgelöste Erkrankungen sind weltweit relevante Krankheitsentitäten, die die Laboratoriumsmedizin vor große Herausforderungen stellen. Kulturelle Verfahren sind als bisheriger Standard der Tuberkulose-Diagnostik zeit- und kostenintensiv. Aus diesem Grund erscheinen molekularbiologische Verfahren zur raschen Identifikation der Erreger sowie zu schnellen Einleitung adäquater Therapie- und Hygienemaßnahmen in der Labordiagnostik von Mykobakteriosen als unverzichtbar. Mit der vorliegenden Arbeit sollte für das Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock eine qualitative Multiplex Real-Time PCR zur Detektion von Bakterien des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (*MTC*) und (nicht-tuberkulöse) *Mycobacterium* Spezies (*NTM/Myspp.*) aus Sputum-/Blutproben entwickelt und validiert werden. Als Arbeitsplattform wurde hierfür der PCR-Vollautomat BD MAX™ gewählt, der die Arbeitsschritte der Probenaufbereitung, des eigentlichen PCR-Laufs und der Auswertung auf einem System vereint. Zunächst wurde jeweils der Einzelnachweis (*MTC* und *NTM/Myspp.*) getestet; im Anschluss wurde ein Multiplex PCR-Test zum dualen Nachweis etabliert.

Nach initialer Literaturrecherche konnte eine Auswahl entsprechend spezifischer Primer und Sonden für *MTC* und *NTM/Myspp.* zur Entwicklung eines sogenannten PCR-Arbeitsmixes getroffen werden, der zur Etablierung dieses in-house Multiplex PCR-Verfahrens genutzt werden sollte. Dieser entwickelte Arbeitsmix wurde mit der Plattform PlateMax™ für den späteren Gebrauch präaliquotiert. Nach Vorversuchen, die den prinzipiellen Funktionsnachweis des Testverfahrens aufzeigen konnten, wurde eine Methodenvvalidierung (unter Beachtung gültiger Standardarbeitsanweisungen und Richtlinien) mittels PCR-Testläufen an Kultur-positiven, schwach-positiven, Kultur-negativen und kreuzreaktiven Proben durchgeführt. Nach Abschluss der Validierung konnte ein robust arbeitender Test vorgelegt werden. Aufgrund der Nutzung der Plattform BD MAX™ stellt dieses Nachweisverfahren eine Möglichkeit zur raschen Diagnostik von Tuberkulose und Mykobakteriosen dar, insbesondere bedingt durch die einfachen Arbeitsabläufe und den hohen Automatisierungsgrad. Entsprechend möglicherweise aufkommender Fragestellungen (z. B. Resistenztestungen, Einsatz verschiedener Probenmaterialien etc.) erscheint das Verfahren für zukünftige Entwicklungen leicht erweiterbar und entspricht damit den Anforderungen, die aktuelle Forschergruppen und kommerzielle Hersteller an PCR-Tests stellen.

7. Literaturverzeichnis

- 1 World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019. Genf, World Health Organization, 2019.
- 2 World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2015. Genf, World Health Organization, 2015.
- 3 Uplekar M, Weil D, Lonnroth K, et al. WHO's new End TB Strategy. *Lancet* 2015; 385: 1799–801.
- 4 Dunn JJ, Starke JR, Revell PA. Laboratory Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis Infection and Disease in Children. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 1434–41.
- 5 Richardson ET, Samson D, Banaei N. Rapid Identification of Mycobacterium tuberculosis and Nontuberculous Mycobacteria by Multiplex, Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1497–502.
- 6 Glassroth J. Pulmonary Disease Due to Nontuberculous Mycobacteria. *Chest* 2008; 133: 243–51.
- 7 Kayser FH. Bacteria as Human Pathogens. In: Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, et al. *Medical Microbiology*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2004: 229–346.
- 8 Böttger EC. Die Familie der Mycobacteriaceae. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, et al. *Medizinische Mikrobiologie*. München, Jena, Urban & Fischer Verlag, 2001: 407–34.
- 9 Ahmad N, Pottinger P, Drew WL, Reller LB, Lagunoff M, Sterling CR. Mycobacteria. In: Ryan KJ, Ray CG. *Sherris Medical Microbiology*. New York, McGraw-Hill Education/Medical, 2014: 489–506.
- 10 Willey JM, Sherwood LM, Woolverton C. Bacteria: The High G + C Gram Positives. In: Willey JM, Sherwood LM, Woolverton C. *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*. New York, McGraw-Hill, 2008: 589–604.
- 11 Brennan PJ. The Envelope of Mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 29–63.
- 12 Hunter RL, Olsen MR, Jagannath C, et al. Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Ann Clin Lab Sci* 2006; 36: 371–86.
- 13 Hof H, Dörries R. Mykobakterien. In: Bob A, Bob K. *Duale Reihe - Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2005: 348–61.
- 14 Bange FC, Hahn H, Kaufmann SHE, et al. Mykobakterien. In: Suerbaum S, Hahn H, Burchard GD, et al. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg,

- Springer, 2012: 341–55.
- 15 van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, et al. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 653–5.
 - 16 Vasconcellos SEG, Huard RC, Niemann S, et al. Distinct genotypic profiles of the two major clades of *Mycobacterium africanum*. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 80.
 - 17 Schaberg T, Bauer T, Brinkmann F, et al. S2k-Leitlinie: Tuberkulose im Erwachsenenalter. *Pneumologie* 2017; 71: 325–97.
 - 18 Schoenfeld N, Haas W, Richter E, et al. 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* 2016; 70: 250–76.
 - 19 Falkinham JO. Current Epidemiologic Trends of the Nontuberculous *Mycobacteria* (NTM). *Curr Environ Heal Reports* 2016; 3: 161–7.
 - 20 Kwon YS, Koh WJ. Diagnosis and Treatment of Nontuberculous *Mycobacterial* Lung Disease. *J Korean Med Sci* 2016; 31: 649.
 - 21 Kim CJ, Kim NH, Song KH, et al. Differentiating rapid- and slow-growing mycobacteria by difference in time to growth detection in liquid media. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75: 73–6.
 - 22 Porvaznik I, Solovič I, Mokřý J. Non-Tuberculous *Mycobacteria*: Classification, Diagnostics, and Therapy. *Adv Exp Med Biol* 2017; 944: 19–25.
 - 23 Simner PJ, Woods GL, Wengenack NL. *Mycobacteria*. In: Hayden RT, Wolk DM, Carroll KC, et al. *Microbiology Spectrum*, American Society for Microbiology Press. Washington DC, American Society of Microbiology, 2016: 367–89.
 - 24 Boyle DP, Zembower TR, Reddy S, et al. Comparison of Clinical Features, Virulence, and Relapse among *Mycobacterium avium* Complex Species. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191: 1310–7.
 - 25 Shahraki AH, Trovato A, Mirsaeidi M, et al. *Mycobacterium persicum* sp. nov., a novel species closely related to *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gastri*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017; 67: 1766–70.
 - 26 Fogelson SB, Camus AC, Lorenz WW, et al. Variation among human, veterinary and environmental *Mycobacterium chelonae-abscessus* complex isolates observed using core genome phylogenomic analysis, targeted gene comparison, and anti-microbial susceptibility patterns. *PLoS One* 2019; 14: e0214274.

- 27 Rocchetti TT, Silbert S, Gostnell A, et al. Detection of *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus* Group, and *Mycobacterium fortuitum* Complex by a Multiplex Real-Time PCR Directly from Clinical Samples Using the BD MAX System. *J Mol Diagnostics* 2017; 19: 295–302.
- 28 Parte AC. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net). 2020. <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html> (abgerufen am 10.02.2020).
- 29 Tobler NE, Pfunder M, Herzog K, et al. Rapid detection and species identification of *Mycobacterium* spp. using real-time PCR and DNA-Microarray. *J Microbiol Methods* 2006; 66: 116–24.
- 30 Kappelman J, Alçiçek MC, Kazancı N, et al. First *Homo erectus* from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia. *Am J Phys Anthropol* 2008; 135: 110–6.
- 31 HersHKovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, et al. Detection and molecular characterization of 9000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a neolithic settlement in the Eastern mediterranean. *PLoS One* 2008; 3: 1–6.
- 32 Herzog, H. History of Tuberculosis. *Respiration* 1998; 65: 5–15.
- 33 Koch R. Die Ätiologie der Tuberkulose (Nach einem in der Physiologischen Gesellschaft zu Berlin am 24. März 1882 gehaltenen Vortrage.). In: Schwalbe J. Historische Schriften aus dem Robert Koch-Institut, Gesammelte Werke Robert Kochs. Robert Koch-Institut, Berlin, 2010.
- 34 Vossen J. Tuberkulosefürsorge in Deutschland 1900 bis 1945 - Der Kampf gegen die Volkskrankheit Nr. 1: Die Anfänge der Tuberkulosefürsorge im Kaiserreich. In: Forßbohm M, Loytved G, Königstein B. Handbuch Tuberkulose für Fachkräfte an Gesundheitsämtern. Düsseldorf, Akademie für öffentliches Gesundheitswesen in Düsseldorf, 2009: 19–24.
- 35 Ewig S. Tuberkuloseepidemie in Europa. In: Ewig S, Schaberg T, RüsCh-Gerdes S, et al. Tuberkulose und nichttuberkulöse Mykobakterien. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2016: 18–20.
- 36 World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2018. Genf, World Health Organization, 2018.
- 37 Kunitz F, Brodhun B, Hauer B, et al. Die aktuelle Tuberkulosesituation in Deutschland und die Auswirkungen der globalen Situation. *Pneumologie* 2007; 61: 467–77.
- 38 World Health Organization. WHO Tuberculosis Fact sheet N°104. 2016.

- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/#> (abgerufen am 02.03.2016).
- 39 Brodhun B, Altmann D, Haas W. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2017. Berlin, Robert Koch-Institut, 2018.
- 40 Diel R, Jacob J, Lampenius N, et al. Burden of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease in Germany. *Eur Respir J* 2017; 49: 1602109.
- 41 Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 463–96.
- 42 Bloom BR, Atun R, Cohen T, et al. Tuberculosis. In: Holmes KK, Bertozzi S, Bloom BR, et al. *Major Infectious Diseases*. Washington DC, The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank, 2017: 233–313.
- 43 Pfyffer GE. *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, et al. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC, American Society of Microbiology, 2015: 536–69.
- 44 Allewelt M, Lode H. Mykobakterien. In: Adam D, Doerr HW, Link HL. *Die Infektiologie*. Heidelberg, Springer, 2004: 1087–93.
- 45 Diel R, Loytved G, Nienhaus A, et al. Neue Empfehlungen für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose. *Pneumologie* 2011; 65: 359–78.
- 46 Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet* 2011; 378: 57–72.
- 47 Nowag A, Hartmann P. Immunität gegen *Mycobacterium tuberculosis*. *Internist (Berl)* 2016; 57: 107–16.
- 48 Poulsen A. Some clinical features of tuberculosis. *Acta Tuberc Scand* 1957; 33: 37–92.
- 49 Riley LW. Tuberculosis: Natural history, microbiology, and pathogenesis. 2019. https://www.uptodate.com/contents/tuberculosis-natural-history-microbiology-and-pathogenesis?search=tuberculosis%20microbiology&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1 (abgerufen am 25.11.2019).
- 50 Wischnewski N, Mielke M. Prävention der nosokomialen Übertragung der Tuberkulose – Übersicht über verschiedene nationale Empfehlungen. *Hyg + Medizin* 2006; 31: 84–92.
- 51 Schönfeld N, Haas W, Richter E, et al. Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie nichttuberkulöser Mykobakteriosen des Deutschen Zentralkomitees zur Bekämpfung der Tuberkulose (DZK) und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP). *Pneumologie* 2013; 67: 605–33.

- 52 Robert Koch-Institut. Tuberkulose. RKI – Ratgeber für Ärzte. 2013.
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tuberkulose.html#doc2374486bodyText2 (abgerufen am 24.02.2016).
- 53 Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 581–91.
- 54 American Thoracic Society. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1376-95.
- 55 Malekmohammad M, Marjani M, Tabarsi P, et al. Diagnostic yield of post-bronchoscopy sputum smear in pulmonary tuberculosis. *Scand J Infect Dis* 2012; 44: 369–73.
- 56 Bodal V, Bal M, Bhagat S, et al. Fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen staining of bronchoalveolar lavage, bronchial washings, bronchoscopic brushing and post bronchoscopic sputum along with cytological examination in cases of suspected tuberculosis. *Indian J Pathol Microbiol* 2015; 58: 443.
- 57 DIN 58943-32:2015-05, Medizinische Mikrobiologie – Tuberkulosedagnostik – Teil 32: Mikroskopische Methoden zum Nachweis von Mykobakterien. Berlin, Beuth, 2015.
- 58 De Almeida IN, de Assis Figueredo LJ, Soares VM, et al. Evaluation of the Mean Cost and Activity Based Cost in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in the Laboratory Routine of a High-Complexity Hospital in Brazil. *Front Microbiol* 2017; 8: 249.
- 59 Feiterna-Sperling C, Brinkmann F, Adamczick C, et al. S2k-Leitlinie zur Diagnostik, Prävention und Therapie der Tuberkulose im Kindes- und Jugendalter. *Pneumologie* 2017; 71: 629–80.
- 60 Van Ingen J. Diagnosis of Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Semin Respir Crit Care Med* 2013; 34: 103–9.
- 61 Van Ingen J. Microbiological Diagnosis of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease. *Clin Chest Med* 2015; 36: 43–54.
- 62 Otto-Knapp R, Schenkel K, Bauer T. Standardtherapie der Tuberkulose. *Internist (Berl)* 2016; 57: 117–25.
- 63 Schaberg T, Bauer T, Castell S, et al. Empfehlungen zur Therapie, Chemoprävention und Chemoprophylaxe der Tuberkulose im Erwachsenen- und Kindesalter. *Pneumologie* 2012; 66: 133–71.
- 64 Velayati AA, Farnia P, Masjedi MR. The totally drug resistant tuberculosis (TDR-TB).

- Int J Clin Exp Med 2013; 6: 307–9.
- 65 Kalsdorf B, Olaru I, Lange C, et al. Tuberkulose. DMW - Dtsch Medizinische Wochenschrift 2015; 140: 1508–12.
- 66 Schaberg T. Neue Medikamente zur Behandlung der Tuberkulose. Internist (Berl) 2016; 57: 136–41.
- 67 Swindells S, Ramchandani R, Gupta A, et al. One Month of Rifapentine plus Isoniazid to Prevent HIV-Related Tuberculosis. N Engl J Med 2019; 380: 1001–11.
- 68 American Thoracic Society. Mycobacterioses and the Acquired Immunodeficiency Syndrome. Am Rev Respir Dis 1987; 136: 492–6.
- 69 Mokaddas E, Ahmad S. Development and evaluation of a multiplex PCR for rapid detection and differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex members from non-tuberculous mycobacteria. Jpn J Infect Dis 2007; 60: 140–4.
- 70 Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of Human Pulmonary Infection with Nontuberculous Mycobacteria. Clin Chest Med 2015; 36: 13–34.
- 71 Bös L, Schönfeld N, Schaberg T. Nichttuberkulöse Mykobakterien – eine kurze Übersicht zur Epidemiologie, Diagnostik und Therapie. Pneumologie 2015; 69: 287–94.
- 72 Ricketts WM, O’Shaughnessy TC, van Ingen J. Human-to-human transmission of Mycobacterium kansasii or victims of a shared source? Eur Respir J 2014; 44: 1085–7.
- 73 Prince DS, Peterson DD, Steiner RM, et al. Infection with Mycobacterium avium Complex in Patients without Predisposing Conditions. N Engl J Med 1989; 321: 863–8.
- 74 Kartalija M, Ovrutsky AR, Bryan CL, et al. Patients with Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease Exhibit Unique Body and Immune Phenotypes. Am J Respir Crit Care Med 2013; 187: 197–205.
- 75 Kappelman J, Alçiçek MC, Kazancı N, et al. First Homo erectus from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia. Am J Phys Anthropol 2008; 135: 110–6.
- 76 Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med 2007; 175: 367–416.
- 77 Field SK, Cowie RL. Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria. Chest 2006; 129: 1653–72.
- 78 Saiki R, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic

- sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350–4.
- 79 Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, et al. Studies on polynucleotides. *J Mol Biol* 1971; 56: 341–61.
- 80 Konrad R, Busch U. PCR und Real-Time PCR. In: Busch U. *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik*. Berlin, Heidelberg, Springer, 2010: 35–47.
- 81 Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, et al. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Biotechnol* 1992; 10: 413–7.
- 82 Nolan T, Novak T, Huggett J. Taking control of the polymerase chain reaction. In: Bustin SA. *The PCR Revolution - Basic Technologies and Applications*. Cambridge, Cambridge University Press, 2009: 129–52.
- 83 Viljoen GJ, Nel LH, Crowther JR. Background. In: Viljoen GJ, Nel LH, Crowther JR. *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 2005: 3–19.
- 84 Nowrousian M. Das Prinzip der PCR. In: Kück U. *Praktikum der Molekulargenetik*. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 2005: 221–8.
- 85 Viljoen GJ, Nel LH, Crowther JR. Amplicon Detection, Analysis and PCR Evaluation. In: Viljoen GJ, Nel LH, Crowther JR. *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 2005: 50–9.
- 86 Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Am J Physiol - Adv Physiol Educ* 2005; 29: 151–9.
- 87 Seifi M, Ghasemi A, Heidarzadeh S, et al. Overview of Real-Time PCR Principles. In: Hernandez-Rodriguez P. *Polymerase Chain Reaction*. London, InTechOpen, 2012: 405–42.
- 88 Holland PM, Abramson RD, Watson R, et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7276–80.
- 89 Cline J. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 3546–51.
- 90 Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* 1948; 437: 55–75.
- 91 Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, et al. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85:

- 8790–4.
- 92 Schild TA. Einführung in die Real-time TaqMan PCR-Technologie - 7700 SDS Workshop - Vers. 2.1. Weiterstadt, Applied Biosystems GmbH, 2010: 4–59.
- 93 Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986–94.
- 94 Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95–125.
- 95 Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard S. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res* 2014; 3: 85.
- 96 ThermoFisher Scientific. Wichtige Informationen zur Real-Time PCR. 2016. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html> (abgerufen am 03.11.2016).
- 97 Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996; 6: 995–1001.
- 98 Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1292–305.
- 99 Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3741–51.
- 100 Ortu S, Mollicotti P, Sechi LA, et al. Rapid detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by Real Time PCR and Bactec 960 MGT. *New Microbiol* 2006; 29: 75–80.
- 101 Yuen KY, Yam WC, Wong LP, et al. Comparison of two automated DNA amplification systems with a manual one-tube nested PCR assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1385–9.
- 102 Bogard M, Vincelette J, Antinozzi R, et al. Multicenter Study of a Commercial, Automated Polymerase Chain Reaction System for the Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory Specimens in Routine Clinical Practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 724–31.
- 103 Bundesärztekammer. Neufassung der „Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen – Rili-BÄK“ – Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer

- Untersuchungen. Dtsch Arztebl 2014; 111: A1583–618.
- 104 Reischl U, Drosten C, Geißdörfer W, et al. MiQ 01: Nukleinsäure-Amplifikationstechniken. In: Podbielski A, Hermann M, Kniehl E, et al. Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards (MiQ) Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. München, Elsevier Urban & Fischer, 2011: 1–80.
- 105 Kalle E, Kubista M, Rensing C. Multi-template polymerase chain reaction. Biomol Detect Quantif 2014; 2: 11–29.
- 106 Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin Chem 2009; 55: 611–22.
- 107 Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, et al. Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. J Clin Microbiol 2004; 42: 1863–8.
- 108 Hoorfar J, Cook N, Malorny B, et al. Making Internal Amplification Control Mandatory for Diagnostic PCR. J Clin Microbiol 2003; 41: 5835–5835.
- 109 Kortenbusch M, Berger A, Rabenau H. Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung - Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt. 2006. <https://www.g-f-v.org/sites/default/files/03%20Muster%20Verfahrensanweisung%20Validierung%204.06.pdf> (abgerufen am 08.08.2019).
- 110 Kromidas S, Morkowski JS. Teil A, Grundlagen. Grundsätze der Validierung in der Analytik und im Prüfwesen. In: Kromidas S. Handbuch Validierung in der Analytik. Weinheim, Wiley-VCH-Verlag, 2000: 1–29.
- 111 Heinzow B, Kappos AD, Schwenk M, et al. Leitlinien Diagnostische Validität. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 2008; 51: 1353–6.
- 112 Bautsch W. Anforderungen und Bewertung der Ergebnisse von Laboruntersuchungen. Dtsch Aerzteblatt Online 2009; 106: 403–6.
- 113 Hawkins RC. The Evidence Based Medicine approach to diagnostic testing: practicalities and limitations. Clin Biochem Rev 2005; 26: 7–18.
- 114 Saah AJ. “Sensitivity” and “Specificity” Reconsidered: The Meaning of These Terms in Analytical and Diagnostic Settings. Ann Intern Med 1997; 126: 91.
- 115 Röhrig B, Du Prel JB, Blettner M. Studiendesign in der medizinischen Forschung: Teil 2 der Serie zur Bewertung wissenschaftlicher Publikationen. Dtsch Arztebl 2009; 106:

- 184–9.
- 116 Barwick VJ, Prichard E. Eurachem Guide: Terminology in Analytical Measurement – Introduction to VIM 3. 2011. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/TAM_2011_DE_EN.pdf (abgerufen am 08.08.2019)
- 117 Bruijnesteijn van Coppenraet ES, Lindeboom JA, Prins JM, et al. Real-Time PCR Assay Using Fine-Needle Aspirates and Tissue Biopsy Specimens for Rapid Diagnosis of Mycobacterial Lymphadenitis in Children. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2644–50.
- 118 Becton, Dickinson and Company. System Overview. In: BD Diagnostics User's Training Manual - BD MAX™ System: Open System Applications. Maryland, US, Becton, Dickinson and Company, 2014: 19–32.
- 119 Becton, Dickinson and Company. System Overview. In: BD MAX™ System User's Manual (US IVD version). Maryland, US, Becton, Dickinson and Company, 2012: 1–10.
- 120 Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, et al. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990; 161: 977–81.
- 121 Zhou L, Ma C, Xiao T, et al. A New Single Gene Differential Biomarker for *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Non-tuberculosis *Mycobacteria*. *Front Microbiol* 2019; 10.
- 122 Fang Z, Kenna DT, Doig C, et al. Molecular Evidence for Independent Occurrence of IS6110 Insertions at the Same Sites of the Genome of *Mycobacterium tuberculosis* in Different Clinical Isolates. *J Bacteriol* 2001; 183: 5279–84.
- 123 Thabet S, Souissi N. Transposition mechanism, molecular characterization and evolution of IS6110, the specific evolutionary marker of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mol Biol Rep* 2017; 44: 25–34.
- 124 Aepinus C, Podbielski A, Köller T, et al. Standardarbeitsanweisung in QM VM (Verifizierung/Validierung von Untersuchungsverfahren im Modul Molekulare Diagnostik) - 10 03 05 Version 2. Rostock, Insitut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock, 2013.
- 125 DIN EN ISO 15189:2013-03. In: Medizinische Laboratorien - Anforderungen an die Qualität und Kompetenz (ISO 15189:2012); Deutsche Fassung EN ISO 15189:2012.
- 126 DIN EN ISO/IEC 17025:2005-08. In: Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025:2005); Deutsche und Englische

- Fassung EN ISO/IEC 17025:2005.
- 127 Europäisches Parlament. Richtlinie 98/79/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Oktober 1998 über In-vitro-Diagnostika. 1998.
 - 128 Becton, Dickinson and Company. Theory of Operation. In: BD Diagnostics User's Training Manual - BD MAX™ System: Open System Applications. Maryland, US, Becton, Dickinson and Company, 2014: 33–42.
 - 129 Becton, Dickinson and Company. BD Max MDR-TB. Ref 443878, Packungsbeilage. Maryland, US, Becton, Dickinson and Company, 2019.
 - 130 Guilbault GG, Hjelm M. Nomenclature for automated and mechanised analysis (Recommendations 1989). *Pure Appl Chem* 1989; 61: 1657–64.
 - 131 Rocchetti TT, Silbert S, Gostnell A, et al. Validation of a Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Mycobacterium* spp., *Mycobacterium tuberculosis* Complex, and *Mycobacterium avium* Complex Directly from Clinical Samples by Use of the BD Max Open System. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 1644–7.
 - 132 Blakemore R, Story E, Helb D, et al. Evaluation of the Analytical Performance of the Xpert MTB/RIF Assay. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2495–501.
 - 133 Becton, Dickinson and Company. BD launches molecular test for detecting tuberculosis and multi-drug resistant TB. 2018. <https://www.bd.com/en-us/company/news-and-media/press-releases/oct-17-2018-bd-launches-molecular-test-for-detecting-tuberculosis-and-multi-drug-resistant-tb> (abgerufen am 13.09.2019).
 - 134 Zimmermann AS, Dalpke A, Murray P, et al. Pre-validation of the BD MAX MDR-TB* assay for the rapid detection of MTBc DNA and mutations associated with rifampin and isoniazid resistance. Poster P1561, ECCMID in Madrid, 2018.
 - 135 Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, et al. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1772–6.
 - 136 Cepheid. Xpert® MTB/RIF (GXMTB/RIF-US-10). Packungsbeilage. Sunnyvale, US, Cepheid, 2015.
 - 137 Bates M, Zumla A. The development, evaluation and performance of molecular diagnostics for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Expert Rev Mol Diagn* 2016; 16: 307–22.
 - 138 Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, et al. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary

- tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; CD009593.
- 139 Pavlinac PB, Lokken EM, Walson JL, et al. Mycobacterium tuberculosis bacteremia in adults and children: a systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2016; 20: 895–902.
- 140 Chin DP, Reingold AL, Stone EN, et al. The Impact Of Mycobacterium Avium Complex Bacteremia And Its Treatment On Survival Of Aids Patients-A Prospective Study. *J Infect Dis* 1994; 170: 578–84.
- 141 MacGregor RR, Dreyer K, Herman S, et al. Use of PCR in Detection of Mycobacterium avium Complex (MAC) Bacteremia: Sensitivity of the Assay and Effect of Treatment for MAC Infection on Concentrations of Human Immunodeficiency Virus in Plasma. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 90–4.
- 142 World Health Organization. Xpert MTB/RIF implementation manual. Genf, World Health Organization, 2014.
- 143 Helb D, Jones M, Story E, et al. Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis and Rifampin Resistance by Use of On-Demand, Near-Patient Technology. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 229–37.
- 144 Dorman SE, Schumacher SG, Alland D, et al. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis* 2018; 18: 76–84.
- 145 World Health Organization. Next-generation Xpert® MTB/RIF Ultra assay recommended by WHO. 2017. https://www.who.int/tb/features_archive/Xpert-Ultra/en/ (abgerufen am 12.11.2019).
- 146 Nessar R, Cambau E, Reytrat JM, et al. Mycobacterium abscessus: A new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 810–8.
- 147 Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, et al. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 2012; 113: 1014–26.
- 148 Ei PW, Aung WW, Lee JS, et al. Molecular Strain Typing of Mycobacterium tuberculosis: A Review of Frequently Used Methods. *J Korean Med Sci* 2016; 31: 1673–83.
- 149 Clarridge JE, Alerts C. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 840–62.

- 150 Neal H, Cloud JL, Pounder JI, et al. Sequence Variant for Internal Transcribed Spacer Region of *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 6214–6214.
- 151 Albert H, Nathavitharana RR, Isaacs C, et al. Development, roll-out and impact of Xpert MTB/RIF for tuberculosis: What lessons have we learnt and how can we do better? *Eur Respir J* 2016; 48: 516–25.
- 152 World Health Organization / Unitaid. Tuberculosis. Diagnostics Technology and Market Landscape, 4th Edition. Vernier, World Health Organization / UNITAID, 2015: 11–60.
- 153 Wilke WW, Jones RN, Sutton LD. Automation of polymerase chain reaction tests. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 21: 181–5.
- 154 Cobb B, Simon CO, Stramer SL, et al. The cobas® 6800/8800 System: a new era of automation in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2017; 17: 167–80.
- 155 Curetis GmbH. The Unyvero System. Produktwebsite. 2020.
<https://curetis.com/products/unyvero-a50-system/> (abgerufen am 02.01.2020).
- 156 BioFire Diagnostics. The BioFire® FilmArray®-System. Produktwebsite. 2020.
<https://www.biofire.com> (abgerufen am 02.01.2020).
- 157 Smith K, Diggle MA, Clarke SC. Automation of a fluorescence-based multiplex PCR for the laboratory confirmation of common bacterial pathogens. *J Med Microbiol* 2004; 53: 115–7.
- 158 Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND). Negotiated prices. 2020.
<https://www.finddx.org/pricing/genexpert/> (abgerufen am 04.01.2020).
- 159 Puri L, Oghor C, Denkinger CM, et al. Xpert MTB/RIF for tuberculosis testing: Access and price in highly privatised health markets. *Lancet Glob Heal* 2016; 4: e94–5.
- 160 Sevilla IA, Molina E, Elguezabal N, et al. Detection of mycobacteria, *Mycobacterium avium* subspecies, and *Mycobacterium tuberculosis* complex by a novel tetraplex real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 930–40.
- 161 Schito M, Migliori GB, Fletcher HA, et al. Perspectives on Advances in Tuberculosis Diagnostics, Drugs, and Vaccines. *Clin Infect Dis* 2015; 61: S102–18.
- 162 Babafemi EO, Cherian BP, Banting L, et al. Effectiveness of real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pathological samples: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev* 2017; 6: 215.
- 163 Sweeney TE, Braviak L, Tato CM, et al. Genome-wide expression for diagnosis of pulmonary tuberculosis: a multicohort analysis. *Lancet Respir Med* 2016; 4: 213–24.

- 164 Lee SH, Kim S-W, Lee S, et al. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Using a Novel Ultrafast Chip-Type Real-Time Polymerase Chain Reaction System. *Chest* 2014; 146: 1319–26.
- 165 Kouzaki Y, Maeda T, Sasaki H, et al. A simple and rapid identification method for *Mycobacterium bovis* BCG with loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One* 2015; 10: 1–12.
- 166 Tanner NA, Zhang Y, Evans TC. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques* 2012; 53: 81–9.
- 167 Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E63.
- 168 Hattori T, Chagan-Yasutan H, Shiratori B, et al. Development of Point-of-Care Testing for Disaster-Related Infectious Diseases. *Tohoku J Exp Med* 2016; 238: 287–93.
- 169 De Beenhouwer H, Lhiang Z, Jannes G, et al. Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tuber Lung Dis* 1995; 76: 425–30.
- 170 Nathavitharana RR, Hillemann D, Schumacher SG, et al. Multicenter Noninferiority Evaluation of Hain GenoType MTBDR plus Version 2 and Nipro NTM+MDR/TB Line Probe Assays for Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 1624–30.
- 171 O’Grady J, Maeurer M, Mwaba P, et al. New and improved diagnostics for detection of drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 2011; 17: 134–41.
- 172 World Health Organization. WHO policy statement: molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis. 2008. https://www.who.int/tb/features_archive/policy_statement.pdf?ua=1 (abgerufen am 03.11.2019).
- 173 DS Sarro Y, Kone B, Diarra B, et al. Simultaneous diagnosis of tuberculous and non-tuberculous mycobacterial diseases: Time for a better patient management. *Clin Microbiol Infect Dis* 2018; 3.
- 174 Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, et al. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 559–570.

8. Abkürzungsverzeichnis

ATCC®	American Type Culture Collection
BAL	Bronchoalveläre Lavage
BBQ	BlackBerry® Quencher
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BD	Becton, Dickinson and Company
bp	Basenpaar
C	Carbonium/Kohlenstoff
CFU	Colony forming unit/Kolonie-bildende Einheit
C _t	Cycle Threshold
ddH ₂ O	Doppelt-deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP/dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat/e
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAM	6-Carboxyfluorescein
FFP	Filtering face piece
FM	Flüssigmedium
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
<i>hsp65</i>	Gen, kodiert das 65-Kilodalton Hitzeschockprotein (in z. B. <i>NTM</i>)
IGRA	Interferon-γ-Release-Assay
IMIKRO	Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universität Rostock
INH	Isoniazid/Isoniazid-Resistenz
IS	Insertionselement
ITS	Internal transcribed spacer
KBE	Kolonie-bildende Einheit
LAMP	Loop-mediated isothermal amplicifation
LiPA, LPA	Line Probe Assay
LJ	Löwenstein-Jensen-Agar
LTBI	Latente Tuberkulose-Infektion
<i>M</i>	<i>Mycobacterium</i>

MAC	<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> -Komplex
MCAC	<i>Mycobacterium chelonae-abscessus</i> -Komplex
MDR	Multi-drug-resistance (Tuberkulose)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MOTT	Mycobacteria other than tuberculosis
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Komplex
<i>Myspp</i>	<i>Mycobacterium</i> Spezies
NAT	Nukleinsäureamplifikationstechnik
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCTC	National Collection of Type Cultures
NTM	Nontuberculous mycobacteria/nicht-tuberkulöse Mykobakterien
PA	Primäraffekt
PCR	Polymerase Chain Reaction/Polymerase-Kettenreaktion
POCT	Point-of-Care-Testing
QM	Qualitätsmanagement
RGM	Rapid-growing mycobacteria
RIF	Rifampicin-Resistenz
Rili-BÄK	Richtlinie der Bundesärztekammer
RKI	Robert Koch-Institut
Rn	Normalized reporter value
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
ROX	X-Rodamin
<i>rpoB</i>	Gen, kodiert die Beta-Untereinheit einer RNA-Polymerase
RT-PCR	Real Time Polymerase-Kettenreaktion
SAA	Standardarbeitsanweisung
SB	Sample buffer
SBT	Sample buffer tube/s
SDR	Single-drug-resistance (Tuberkulose)
SGM	Slow-growing mycobacteria
SPC	Sample Process Control
spp	Spezies
ssp	Subspezies

Stb	Stonebrink-Medium
STIKO	Ständige Impfkommission
STR	Sample treatment reagent
Taq	Thermophilus aquaticus
TB, TBC	Tuberkulose, Tuberkulose-Komplex
TDR	Total-drug-resistance (Tuberkulose)
THT	Tuberkulin-Hauttest
UDP	User developed protocol
UMR	Universitätsmedizin Rostock
URL	Uniform Resource Locator
WHO	World Health Organization/Weltgesundheitsorganisation
XDR	Extensively-drug-resistance (Tuberkulose)

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auswahl an nicht-tuberkulösen Mykobakterien	3
Tabelle 2 Auswahl an <i>NTM</i> -Komplexen	4
Tabelle 3 Auswahl an durch <i>NTM</i> verursachte Erkrankungen	14
Tabelle 4 Übersicht der verwendeten Geräte am IMIKRO	26
Tabelle 5 Fluoreszenzkanäle am BD MAX™	28
Tabelle 6 Überblick über Labormaterialien	29
Tabelle 7 Überblick über verwendete Lösungen	29
Tabelle 8 Überblick über verwendete DNA-Gebinde	30
Tabelle 9 Volumenvorgaben für den Arbeitsmix entsprechend den Herstellerempfehlungen	32
Tabelle 10 Für die Ziele <i>MTC</i> und <i>NTM/Myspp.</i> gewählte Primer und Sonden	33
Tabelle 11 Sonden- und Primerkonzentrationen in Lösung	33
Tabelle 12 Arbeitsmix zu Beginn der Vorversuche	33
Tabelle 13 Nummerierung der Patientenrohmaterialien (Blut und Sekret)	35
Tabelle 14 Kulturmateriale der Universität Rostock	36
Tabelle 15 Bakterienstämme zur Testung der Kreuzreaktivität	36
Tabelle 16 Kanaleinstellungen am BD MAX™	44
Tabelle 17 PCR-Profil am BD MAX™	48
Tabelle 18 Arbeitsmixrezept nach Abschluss der Vorversuche	49
Tabelle 19 Intra- und Interassay für den Analyten <i>MTC</i>	53
Tabelle 20 Intra- und Interassay für den Analyten <i>NTM/Myspp.</i>	54
Tabelle 21 C _t -Werte der Prozesskontrolle	56
Tabelle 22 Am IMIKRO verfügbare NAT-Verfahren zum Nachweis von Mykobakterien	59
Tabelle 23 Übersicht einiger molekularer Mykobakterien-Testverfahren	61
Tabelle 24 Auswahl aktueller PCR-Automaten	68
Anhang:	
Tabelle 25 Testung von Sensitivität und Richtigkeit (Spezifität); Analyt: <i>NTM/Myspp.</i>	95
Tabelle 26 Testung von Sensitivität und Richtigkeit (Spezifität); Analyt: <i>MTC</i>	96
Tabelle 27 Testung von potenziell kreuzreaktiven Analyten; Analyt: <i>Myspp.</i>	97
Tabelle 28 Testung von potenziell kreuzreaktiven Analyten; Analyt: <i>MTC</i>	98
Tabelle 29 Einstellungen inkl. Erläuterungen der NCBI-Website ^a zur In-silico Analyse	99
Tabelle 30 In-silico-Analyse (BLASTn) der Sonde für <i>MTC</i>	99

Tabelle 31 In-silico-Analyse (BLASTn) der Sonde für <i>Myspp</i>	101
Tabelle 32 In-silico-Analyse (BLASTn) des forward primers TB1F (<i>MTC</i>).....	104
Tabelle 33 In-silico-Analyse (BLASTn) des reverse primers TB1R (<i>MTC</i>).....	106
Tabelle 34 In-silico-Analyse (BLASTn) des forward primers MysppF (<i>Myspp</i> .)	109
Tabelle 35 In-silico-Analyse (BLASTn) des reverse primers MysppR (<i>Myspp</i> .)	111

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematischer Ablauf einer Tuberkuloseerkrankung	7
Abbildung 2	Beispielhafter Untersuchungsgang mit Kulturmedien für Mykobakterien	10
Abbildung 3	Schematische Darstellung der Funktionsweise einer TaqMan-Sonde	19
Abbildung 4	Veranschaulichung des C _t -Wertes.....	20
Abbildung 5	Übersicht über die Arbeitsplattform BD MAX™.....	27
Abbildung 6	BD Max™ Teststreifen.	31
Abbildung 7	Beispielhaft beladenes Probengestell.	31
Abbildung 8	Aliquot als einzelnes Einsteckröhrchen mit Folie verschweißt	34
Abbildung 9	Darstellung der Ergebnislogik.....	39
Abbildung 10	Schema des Extraktionsvorganges am BD Max™.	43
Abbildung 11	Beispielhafte Darstellung der Amplifikationskurven.....	45
Abbildung 12	Vierfeldertafeln zur Errechnung der Sensitivität und Spezifität	50

11. Anhang

11.1. Thesen

1. Etablierung der in-house *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex PCR auf dem BD MAXTM unter Zuhilfenahme vorhandener Publikationen und Protokolle.
2. Etablierung der in-house *NTM/Myspp.*-PCR auf dem BD MAXTM unter Zuhilfenahme vorhandener Publikationen und Protokolle.
3. Kombination beider PCR-Protokolle.
4. Validierung der in-house *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex- und *NTM*-PCR am BD MAXTM nach gängigen QM-Richtlinien (MIQ 01, DIN EN ISO 15189:2013-03, DIN EN ISO/IEC 17025:2005, RiLi-BÄK, IVD-Richtlinie).
5. Etablierung der Testreagenzienvorportionierung (Präaliquotierung) mittels PlateMaxTM.

11.2. Testung von Sensitivität und Richtigkeit

Analyt: *NTM/Myspp.*

Sensitivität: Testung von 5 bekannt positiven, 5 bekannt schwach-positiven Proben

Spezifität: Testung von 20 bekannt negativen Proben hinsichtlich Kreuzreaktionen

Tabelle 25 Testung von Sensitivität und Spezifität; Analyt: *NTM/Myspp.*

Nr.	Probe	Sollwert	Resultat	Datum	Testlauf	Beurteilung
1	Patmix1 Blut	positiv	22,9	03.06.2015	676, DNA-2	richtig
2	Patmix2 Blut	positiv	24,0	02.06.2015	675, DNA-2	richtig
3	Patmix3 BAL	positiv	22,4	26.05.2015	655, DNA-1	richtig
4	Patmix4 BAL	positiv	22,2	26.05.2015	655, DNA-1	richtig
5	RV 160 (<i>MTC</i>) in BAL w04011	positiv	23,5	10.06.2015	706, DNA-2	richtig
6	Vmix1	schwach-positiv	26,5	01.06.2015	682, DNA-2	richtig
7	Vmix2	schwach-positiv	27,4	02.06.2015	686, DNA-2	richtig
8	Vmix3	schwach-positiv	29,1	03.06.2015	687, DNA-2	richtig
9	Vmix4	schwach-positiv	28,3	02.06.2015	686, DNA-2	richtig
10	1:10 aus Nr. 5	schwach-positiv	28,4	10.06.2015	706, DNA-2	richtig
11	1:100 aus Nr. 5	schwach-positiv	31,3	10.06.2015	706, DNA-2	richtig
12	N1 Blut (1049) SPC	negativ	32,7	03.06.2015	677, DNA-2	richtig
13	N2 Blut (555)	negativ	34,1	03.06.2015	677, DNA-2	richtig
14	N3 BAL (w997)	negativ	28,9	03.06.2015	677, DNA-2	richtig
15	N4 BAL (w953)	negativ	28,7	03.06.2015	677, DNA-2	richtig
16	N5A Blut (w06103)	negativ	-1,0	07.06.2015	698, DNA-2	Inhibition
17	N6A Blut (w06026)	negativ	31,6	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
18	N7A Blut (w06028)	negativ	38,4	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
19	N8A Blut (w05797)	negativ	33,2	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
20	N9A Blut (w05831)	negativ	30,9	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
21	N10A Blut (w05844)	negativ	-1,0	07.06.2015	698, DNA-2	falsch
22	N11A Blut (w06218)	negativ	31,0	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
23	N12A Blut (w06216)	negativ	30,6	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
24	N13A BAL (w06298)	negativ	-1,0	07.06.2015	698, DNA-2	Inhibition
25	N14A BAL (w06299)	negativ	26,5	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
26	N15A BAL (w06196)	negativ	27,3	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
27	N16A BAL (w05878)	negativ	28,3	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
28	N17A BAL (w05879 I)	negativ	-1,0	08.06.2015	699, DNA-2	Inhibition
29	N18A BAL (w05879 II)	negativ	29,2	08.06.2015	699, DNA-2	richtig
30	N19A BAL (w05942)	negativ	28,5	08.06.2015	699, DNA-2	richtig
31	N20A BAL (w05915)	negativ	30,1	08.06.2015	699, DNA-2	Richtig
a	ATCC 29213/ <i>S. aureus</i>	negativ	30,2	09.06.2015	702, DNA-2	richtig
b	ATCC 25922/ <i>E. coli</i>	negativ	28,4	09.06.2015	702, DNA-2	richtig
c	NCTC 12493/ <i>S. aureus</i>	negativ	30,9	09.06.2015	702, DNA-2	richtig
d	ATCC 27853/ <i>P. aeruginosa</i>	negativ	27,6	09.06.2015	702, DNA-2	richtig

Bemerkungen: Untersucher: R. Köhnke; Testname: TBC/Myspp Extr+PCR; ausgewerteter Kanal: *Myspp* (C_t 585/630); Charge/Extraktionsgebinde: K11504878520160202 DNA-1, K12505089820160209 DNA-2; Proben a-d sind Ergänzungen von sicher negativen Läufen aufgrund Inhibition in Nr. 16, 21, 24 & 28 (Siehe auch Testung auf Kreuzreaktive weiter unten).

Analyt: MTC**Sensitivität:** Testung von 5 bekannt positiven, 5 bekannt schwach-positiven Proben**Spezifität:** Testung von 20 bekannt negativen Proben hinsichtlich Kreuzreaktionen**Tabelle 26** Testung von Sensitivität und Spezifität; Analyt: *MTC*

Nr.	Probe	Sollwert	Resultat	Datum	Testlauf	Beurteilung
1	Patmix1 Blut (w04314) + <i>M. bovis</i> (RV 162)	positiv	25,1	03.06.2015	676, DNA-2	richtig
2	Patmix2 Blut (w04586) + <i>M. tuberculosis</i> (RV 160)	positiv	23,6	02.06.2015	675, DNA-2	richtig
3	Patmix3 BAL (w04448) + <i>M. tuberculosis</i> (RV 159)	positiv	22,4	26.05.2015	655, DNA-1	richtig
4	Patmix4 BAL (w04295) + <i>M. bovis</i> (RV 155)	positiv	25,0	26.05.2015	655, DNA-1	richtig
5	RV 160 (<i>MTC</i>) in BAL w04011	positiv	23,3	10.06.2015	706, DNA-2	richtig
6	Vmix1 1:10 von Nr. 1	schwach-positiv	28,2	01.06.2015	682, DNA-2	richtig
7	Vmix2 1:10 von Nr. 2	schwach-positiv	26,3	02.06.2015	686, DNA-2	richtig
8	Vmix3 1:10 von Nr. 3	schwach-positiv	27,4	03.06.2015	687, DNA-2	richtig
9	Vmix4 1:10 von Nr. 4	schwach-positiv	29,3	02.06.2015	686, DNA-2	richtig
10	1:10 aus Nr. 5	schwach-positiv	29,6	10.06.2015	706, DNA-2	richtig
11	1:100 aus Nr. 5	schwach-positiv	34,9	10.06.2015	706, DNA-2	richtig
12	N1 Blut (1049) SPC	negativ	32,7	03.06.2015	677, DNA-2	richtig
13	N2 Blut (555)	negativ	34,1	03.06.2015	677, DNA-2	richtig
14	N3 BAL(997)	negativ	28,9	03.06.2015	677, DNA-2	richtig
15	N4 BAL (w953)	negativ	28,7	03.06.2015	677, DNA-2	richtig
16	N5A Blut (w06103)	negativ	-1,0	07.06.2015	698, DNA-2	Inhibition
17	N6A Blut (w06026)	negativ	31,6	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
18	N7A Blut (w06028)	negativ	38,4	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
19	N8A Blut (w05797)	negativ	33,2	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
20	N9A Blut (w05831)	negativ	30,9	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
21	N10A Blut (w05844)	negativ	-1,0	07.06.2015	698, DNA-2	Inhibition
22	N11A Blut (w06218)	negativ	31,0	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
23	N12A Blut (w06216)	negativ	30,6	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
24	N13A BAL (w06298)	negativ	-1,0	07.06.2015	698, DNA-2	Inhibition
25	N14A BAL (w06299)	negativ	26,5	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
26	N15A BAL (w06196)	negativ	27,3	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
27	N16A BAL (w05878)	negativ	28,3	07.06.2015	698, DNA-2	richtig
28	N17A BAL (w05879 I)	negativ	-1,0	08.06.2015	699, DNA-2	Inhibition
29	N18A BAL (w05879 II)	negativ	29,2	08.06.2015	699, DNA-2	richtig
30	N19A BAL (w05942)	negativ	28,5	08.06.2015	699, DNA-2	richtig
31	N20A BAL (w05915)	negativ	30,1	08.06.2015	699, DNA-2	richtig
a	ATCC 29213/ <i>S. aureus</i>	negativ	30,2	09.06.2015	702, DNA-2	richtig
b	ATCC 25922/ <i>E. coli</i>	negativ	28,4	09.06.2015	702, DNA-2	richtig
c	NCTC 12493/ <i>S. aureus</i>	negativ	30,9	09.06.2015	702, DNA-2	richtig
d	ATCC 27853/ <i>P. aeruginosa</i>	negativ	27,6	09.06.2015	702, DNA-2	richtig

Bemerkungen: Untersucher: R. Köhnke; Testname: TBC/Myspp Extr+PCR; ausgewerteter Kanal: *MTC* (C_t 475/520); Charge/Extraktionsgebinde: K11504878520160202DNA-1, K12505089820160209 DNA-2; Proben a-d sind Ergänzungen von sicher negativen Läufen aufgrund Inhibition in Nr. 16, 21, 24 & 28.

Beurteilung: Inhibition erzeugt ein „unrichtiges“ Ergebnis. Die SPC in jenen Fällen wurde nicht amplifiziert. Das Ergebnis darf bei fehlendem Erregernachweis nicht zur Diagnostik herangezogen werden. Die C_t -Werte der richtig-negativen Ergebnisse sind Werte der mitgeführten SPC.

11.3. Testung von potenziell kreuzreaktiven Analyten

Analyt: NTM/Myspp.

Getestet werden mindestens 10, besser 20, Patientenmaterialien (bei bakteriellen Erregern auch mit Kulturmaterialeien gespickte Proben zulässig) mit verschiedenen bekannten humanpathogenen Erregern, die nicht dem Testanalyt der zu testenden PCR entsprechen. Alle Testungen sollten negativ sein.

Tabelle 27 Testung von potenziell kreuzreaktiven Analyten; Analyt: *Myspp*.

Nr.	Probenbezeichnung (DSM/ATCC/NCTC)	Organismus	Resultat (<i>Myspp</i>)	C_t -Wert (SPC)	Datum/Testlauf	Beurteilung
1	ATCC 29213	<i>S. aureus</i>	-1,0	30,2	09.06.2015, 702	richtig negativ
2	ATCC 25922	<i>E. coli</i>	-1,0	28,4	09.06.2015, 702	richtig negativ
3	NCTC 12493	<i>S. aureus</i>	-1,0	30,9	09.06.2015, 702	richtig negativ
4	ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	-1,0	27,6	09.06.2015, 702	richtig negativ
5	ATCC 49619	<i>S. pneumoniae</i>	-1,0	28,1	09.06.2015, 702	richtig negativ
6	ATCC 9334 / NCTC 8468	<i>H. influenzae</i>	-1,0	28,0	09.06.2015, 702	richtig negativ
7	ATCC 49247	<i>H. influenzae</i>	-1,0	28,4	09.06.2015, 702	richtig negativ
8	ATCC 51299	<i>E. faecalis</i>	-1,0	28,2	09.06.2015, 702	richtig negativ
9	ATCC 700603	<i>K. pneumoniae</i>	-1,0	26,9	09.06.2015, 702	richtig negativ
10	ATCC 700324	<i>K. oxytoca</i>	-1,0	27,5	09.06.2015, 702	richtig negativ
11	ATCC BAA 1152	<i>E. corrodens</i>	-1,0	27,5	09.06.2015, 702	richtig negativ
12	ATCC 29212	<i>E. faecalis</i>	-1,0	28,8	09.06.2015, 702	richtig negativ
13	ATCC 13048	<i>E. aerogenes</i>	-1,0	27,7	09.06.2015, 702	richtig negativ
14	ATCC 14053	<i>C. albicans</i>	-1,0	30,4	09.06.2015, 702	richtig negativ
15	ATCC NYA 2950	<i>C. glabrata</i>	-1,0	30,3	09.06.2015, 702	richtig negativ
16	ATCC 35218	<i>E. coli</i>	-1,0	28,3	09.06.2015, 702	richtig negativ
17	ATCC 13813	<i>S. agalactiae</i>	-1,0	29,3	09.06.2015, 702	richtig negativ
18	ATCC 12344	<i>S. pyogenes</i>	-1,0	28,9	09.06.2015, 702	richtig negativ
19	DSM 1798	<i>S. epidermidis</i>	-1,0	29,8	09.06.2015, 702	richtig negativ
20	ATCC 29212	<i>E. faecalis</i>	-1,0	28,6	09.06.2015, 702	richtig negativ
21	ATCC 13883	<i>K. pneumoniae</i>	-1,0	25,5	09.06.2015, 702	richtig negativ
22	ATCC 9542	<i>S. equisimilis</i>	-1,0	33,5	09.06.2015, 702	richtig negativ
23	DSM 5570	<i>S. sonnei</i>	-1,0	28,6	09.06.2015, 702	richtig negativ
24	ATCC 9610	<i>Y. enterocolitica</i>	-1,0	27,6	09.06.2015, 702	richtig negativ
25	DSM 5569	<i>S. typhimurium</i>	-1,0	27,6	10.06.2015, 706	richtig negativ

Bemerkungen: Untersucher: R. Köhnke; Testname: „Rkoeh Myspp. Kreuzreaktive 1-24“ & „10.06.2015“; Charge/Extraktionsgebinde: K12505089820160209 DNA-2

Analyt: MTC

Getestet werden mindestens 10, besser 20, Patientenmaterialien (bei bakteriellen Erregern auch mit Kulturmaterialeien gespickte Proben zulässig) mit verschiedenen bekannten humanpathogenen Erregern, die nicht dem Testanalyt der zu testenden PCR entsprechen. Alle Testungen sollten negativ sein.

Tabelle 28 Testung von potenziell kreuzreaktiven Analyten; Analyt: MTC

Nr.	Probenbezeichnung (DSM/ATCC/NCTC)	Organismus	Resultat (MTC)	C _r -Wert (SPC)	Datum/Testlauf	Beurteilung
1	ATCC 29213	<i>S. aureus</i>	-1,0	30,2	09.06.2015, 702	richtig negativ
2	ATCC 25922	<i>E. coli</i>	-1,0	28,4	09.06.2015, 702	richtig negativ
3	NCTC 12493	<i>S. aureus</i>	-1,0	30,9	09.06.2015, 702	richtig negativ
4	ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	-1,0	27,6	09.06.2015, 702	richtig negativ
5	ATCC 49619	<i>S. pneumoniae</i>	-1,0	28,1	09.06.2015, 702	richtig negativ
6	ATCC 9334 / NCTC 8468	<i>H. influenzae</i>	-1,0	28,0	09.06.2015, 702	richtig negativ
7	ATCC 49247	<i>H. influenzae</i>	-1,0	28,4	09.06.2015, 702	richtig negativ
8	ATCC 51299	<i>E. faecalis</i>	-1,0	28,2	09.06.2015, 702	richtig negativ
9	ATCC 700603	<i>K. pneumoniae</i>	-1,0	26,9	09.06.2015, 702	richtig negativ
10	ATCC 700324	<i>K. oxytoca</i>	-1,0	27,5	09.06.2015, 702	richtig negativ
11	ATCC BAA 1152	<i>E. corrodens</i>	-1,0	27,5	09.06.2015, 702	richtig negativ
12	ATCC 29212	<i>E. faecalis</i>	-1,0	28,8	09.06.2015, 702	richtig negativ
13	ATCC 13048	<i>E. aerogenes</i>	-1,0	27,7	09.06.2015, 702	richtig negativ
14	ATCC 14053	<i>C. albicans</i>	-1,0	30,4	09.06.2015, 702	richtig negativ
15	ATCC NYA 2950	<i>C. glabrata</i>	-1,0	30,3	09.06.2015, 702	richtig negativ
16	ATCC 35218	<i>E. coli</i>	-1,0	28,3	09.06.2015, 702	richtig negativ
17	ATCC 13813	<i>S. agalactiae</i>	-1,0	29,3	09.06.2015, 702	richtig negativ
18	ATCC 12344	<i>S. pyogenes</i>	-1,0	28,9	09.06.2015, 702	richtig negativ
19	DSM 1798	<i>S. epidermidis</i>	-1,0	29,8	09.06.2015, 702	richtig negativ
20	ATCC 29212	<i>E. faecalis</i>	-1,0	28,6	09.06.2015, 702	richtig negativ
21	ATCC 13883	<i>K. pneumoniae</i>	-1,0	25,5	09.06.2015, 702	richtig negativ
22	ATCC 9542	<i>S. equisimilis</i>	-1,0	33,5	09.06.2015, 702	richtig negativ
23	DSM 5570	<i>S. sonnei</i>	-1,0	28,6	09.06.2015, 702	richtig negativ
24	ATCC 9610	<i>Y. enterocolitica</i>	-1,0	27,6	09.06.2015, 702	richtig negativ
25	DSM 5569	<i>S. typhimurium</i>	-1,0	27,6	10.06.2015, 706	richtig negativ

Bemerkungen: Untersucher: R. Köhnke; Testname: „Rkoeh TBC Kreuzreaktive 1-24“ & „10.06.2015“;
Charge/Extraktionsgebinde: K12505089820160209 DNA-2

11.4. In-silico Analyse (BLASTn)

Einstellungen für die In-silico-Analyse (BLASTn) der Sonden von *MTC* und *Myspp*:

Tabelle 29 Einstellungen inkl. Erläuterungen der NCBI-Website^a zur In-silico Analyse

Einstellung	Erläuterung
Database	„Others“, Title: Nucleotide collection (nt)
Description	The nucleotide collection consists of GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+RefSeq sequences, but excludes EST, STS, GSS, WGS, TSA, patent sequences as well as phase 0, 1, and 2 HTGS sequences. The database is non-redundant. Identical sequences have been merged into one entry, while preserving the accession, GI, title and taxonomy information for each entry.
Molecule Type	Mixed DNA
Number of sequences	38406974
Exclude	Uncultured/environmental sample sequences
Programm selection	Optimize for somewhat similar sequences (blastn)
Max target sequences	100

^aURL:

[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_K_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn) (abgerufen am 30.08.2016)

Tabelle 30 In-silico-Analyse (BLASTn) der Sonde für *MTC*; Abbildung von 100 Zielsequenzen

Description	Max score	Total Query score	cover	E value	Ident	Accession
gb CP012506.2 Mycobacterium tuberculosis strain SCAID 187.0, complete genome	48.1	1183	100%	0.002	100%	CP012506.2
gb CP016794.1 Mycobacterium tuberculosis strain SCAID 320.0, complete genome	48.1	1280	100%	0.002	100%	CP016794.1
gb CP015773.2 Mycobacterium bovis strain SP38, complete genome	48.1	78.3	100%	0.002	100%	CP015773.2
gb KU301340.1 Mycobacterium tuberculosis isolate 2206/15 insertion sequence IS6110, partial sequence	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU301340.1
gb CP014617.1 Mycobacterium africanum strain UT307 genome	48.1	78.3	100%	0.002	100%	CP014617.1
gb CP010968.1 Mycobacterium tuberculosis strain PR10 genome	48.1	78.3	100%	0.002	100%	CP010968.1
gb CP014566.1 Mycobacterium bovis BCG str. Tokyo 172 substrain TRCS, complete genome	48.1	126	100%	0.002	100%	CP014566.1
gb CP010340.1 Mycobacterium tuberculosis strain 26105, complete genome	48.1	847	100%	0.002	100%	CP010340.1
gb CP010339.1 Mycobacterium tuberculosis strain 22103, complete genome	48.1	78.3	100%	0.002	100%	CP010339.1
gb CP010338.1 Mycobacterium tuberculosis strain 37004, complete genome	48.1	558	100%	0.002	100%	CP010338.1
gb CP010337.1 Mycobacterium tuberculosis strain 22115, complete genome	48.1	558	100%	0.002	100%	CP010337.1
gb CP010336.1 Mycobacterium tuberculosis strain 2279, complete genome	48.1	895	100%	0.002	100%	CP010336.1
gb CP010335.1 Mycobacterium tuberculosis strain 2242, complete genome	48.1	1087	100%	0.002	100%	CP010335.1
gb CP010334.1 Mycobacterium africanum strain 25, complete genome	48.1	270	100%	0.002	100%	CP010334.1
gb CP010333.1 Mycobacterium microti strain 12, complete genome	48.1	414	100%	0.002	100%	CP010333.1
gb CP010332.1 Mycobacterium bovis strain 30, complete genome	48.1	78.3	100%	0.002	100%	CP010332.1
gb CP010331.1 Mycobacterium bovis BCG strain 26, complete genome	48.1	78.3	100%	0.002	100%	CP010331.1
gb CP010330.1 Mycobacterium tuberculosis strain F28, complete genome	48.1	895	100%	0.002	100%	CP010330.1
gb CP010329.1 Mycobacterium tuberculosis strain F1, complete genome	48.1	799	100%	0.002	100%	CP010329.1
gb CP013741.1 Mycobacterium bovis strain BCG-1 (Russia), complete genome	48.1	126	100%	0.002	100%	CP013741.1
gb KT275244.1 Mycobacterium tuberculosis isolate TB_INS1/INS2 transposase gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KT275244.1
gb CP011455.1 Mycobacterium bovis strain BCG-1 genome	48.1	126	100%	0.002	100%	CP011455.1
gb CP009243.1 Mycobacterium bovis BCG strain Russia 368, complete genome	48.1	126	100%	0.002	100%	CP009243.1
gb CP012090.1 Mycobacterium tuberculosis W-148, complete genome	48.1	1039	100%	0.002	100%	CP012090.1
gb CP012095.1 Mycobacterium bovis strain 1595, complete genome	48.1	78.3	100%	0.002	100%	CP012095.1
gb CP008744.1 Mycobacterium bovis BCG strain 3281, complete genome	48.1	108	100%	0.002	100%	CP008744.1
gb KP844721.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 36 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844721.1
gb KP844720.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 35 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844720.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
dbj LC005477.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F208	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005477.1
dbj LC005476.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F200	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005476.1
dbj LC005475.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F194	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005475.1
dbj LC005473.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F178	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005473.1
dbj LC005472.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F158	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005472.1
dbj LC005471.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F145	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005471.1
dbj LC005465.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F97	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005465.1
dbj LC005463.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F76	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005463.1
dbj LC005462.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F60	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005462.1
dbj LC005461.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F49	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005461.1
dbj LC005459.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F41	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005459.1
dbj LC005458.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F33	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005458.1
dbj LC005457.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F31	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005457.1
dbj LC005456.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F20	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005456.1
dbj LC005455.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F16	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005455.1
dbj LC005454.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F9	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005454.1
gb CP010873.1 Mycobacterium tuberculosis strain Beijing-like, complete genome	48.1	847	100%	0.002	100%	CP010873.1
dbj AP014573.1 Mycobacterium tuberculosis str. Kurono DNA, complete genome	48.1	751	100%	0.002	100%	AP014573.1
gb KM516707.1 Mycobacterium tuberculosis strain IMR 672/14 insertion sequence IS6110 transposase gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KM516707.1
emb HG813240.1 Mycobacterium tuberculosis 49-02 complete genome	48.1	895	100%	0.002	100%	HG813240.1
gb CP009480.1 Mycobacterium tuberculosis H37Rv, complete genome	48.1	799	100%	0.002	100%	CP009480.1
gb CP009449.1 Mycobacterium bovis strain ATCC BAA-935, complete genome	48.1	78.3	100%	0.002	100%	CP009449.1
gb CP009427.1 Mycobacterium tuberculosis strain 96121, complete genome	48.1	847	100%	0.002	100%	CP009427.1
gb CP009426.1 Mycobacterium tuberculosis strain 96075, complete genome	48.1	847	100%	0.002	100%	CP009426.1
gb CP009101.1 Mycobacterium tuberculosis strain ZMC13-88, complete genome	48.1	799	100%	0.002	100%	CP009101.1
gb CP009100.1 Mycobacterium tuberculosis strain ZMC13-264, complete genome	48.1	799	100%	0.002	100%	CP009100.1
gb CP008981.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A029DS genome	48.1	1039	100%	0.002	100%	CP008981.1
gb CP008980.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A033DS genome	48.1	1039	100%	0.002	100%	CP008980.1
gb CP008978.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A087DS genome	48.1	1039	100%	0.002	100%	CP008978.1
gb CP008977.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A092DS genome	48.1	1039	100%	0.002	100%	CP008977.1
gb CP008976.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A093DS genome	48.1	1039	100%	0.002	100%	CP008976.1
gb CP008975.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A094DS genome	48.1	1039	100%	0.002	100%	CP008975.1
gb CP008973.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A117DS genome	48.1	1039	100%	0.002	100%	CP008973.1
gb CP008970.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0B070XDR genome	48.1	1039	100%	0.002	100%	CP008970.1
gb CP008968.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0B123ND genome	48.1	1039	100%	0.002	100%	CP008968.1
gb CP008966.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0B218DS genome	48.1	1039	100%	0.002	100%	CP008966.1

Tabelle 31 In-silico-Analyse (BLASTn) der Sonde für *Myspp.*; Abbildung von 100 Zielsequenzen

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
dbj AP017624.1 Mycobacterium ulcerans subsp. shinshuense DNA, complete genome, strain: ATCC33728	42.1	42.1	100%	0.050	100%	AP017624.1
gb CP016640.1 Mycobacterium sp. dj1-10, complete genome	42.1	84.2	100%	0.050	100%	CP016640.1
gb CP016396.1 Mycobacterium avium strain RCAD0278, complete genome	42.1	98.6	100%	0.050	100%	CP016396.1
gb CP011491.1 Mycobacterium vaccae 95051, complete genome	42.1	84.2	100%	0.050	100%	CP011491.1
emb LT549889.1 Mycobacterium aurum isolate liquid genome assembly, chromosome: I	42.1	112	100%	0.050	100%	LT549889.1
gb CP015495.1 Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strain MAP/TANUVAS/TN/India/2008, complete genome	42.1	98.6	100%	0.050	100%	CP015495.1
gb CP010996.1 Mycobacterium simiae strain MO323 genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP010996.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
gb CP014475.1 Mycobacterium phlei strain CCUG 21000, complete genome	42.1	140	100%	0.050	100%	CP014475.1
gb CP011022.1 Mycobacterium sp. NRRL B-3805, complete genome	42.1	84.2	100%	0.050	100%	CP011022.1
gb CP014258.1 Mycobacterium fortuitum subsp. fortuitum DSM 46621 = ATCC 6841 genome	42.1	84.2	100%	0.050	100%	CP014258.1
gb CP011883.2 Mycobacterium haemophilum DSM 44634 strain ATCC 29548, complete genome	42.1	42.1	100%	0.050	100%	CP011883.2
gb CP011269.1 Mycobacterium fortuitum strain CT6, complete genome	42.1	84.2	100%	0.050	100%	CP011269.1
gb CP012506.2 Mycobacterium tuberculosis strain SCAID 187.0, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP012506.2
gb CP016794.1 Mycobacterium tuberculosis strain SCAID 320.0, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP016794.1
gb CP015773.2 Mycobacterium bovis strain SP38, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP015773.2
gb KX263298.1 Mycobacterium gordonae strain IRLMedNTM_20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KX263298.1
gb KX263296.1 Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KX263296.1
gb KX263295.1 Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KX263295.1
gb KX263294.1 Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KX263294.1
gb KX263293.1 Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KX263293.1
gb KX263292.1 Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KX263292.1
gb KX263291.1 Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KX263291.1
gb KX263290.1 Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KX263290.1
gb KX263288.1 Mycobacterium simiae strain IRLMedNTM_10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KX263288.1
gb KX263287.1 Mycobacterium gordonae strain IRLMedNTM_09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KX263287.1
gb KX263285.1 Mycobacterium kansasii strain IRLMedNTM_07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KX263285.1
gb KX263284.1 Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KX263284.1
gb KX263283.1 Mycobacterium gordonae strain IRLMedNTM_05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KX263283.1
gb KX263279.1 Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KX263279.1
gb CP015596.1 Mycobacterium sp. YC-RL4, complete genome	42.1	84.2	100%	0.050	100%	CP015596.1
gb CP007220.1 Mycobacterium chelonae CCUG 47445, complete genome	42.1	42.1	100%	0.050	100%	CP007220.1
gb CP010071.1 Mycobacterium sp. QIA-37, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP010071.1
gb CP014617.1 Mycobacterium africanum strain UT307 genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP014617.1
gb CP010968.1 Mycobacterium tuberculosis strain PR10 genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP010968.1
gb CP014566.1 Mycobacterium bovis BCG str. Tokyo 172 substrain TRCS, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP014566.1
dbj LC126335.1 Mycobacterium sp. S-I-6 DNA, 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC126335.1
gb CP010340.1 Mycobacterium tuberculosis strain 26105, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP010340.1
gb CP010339.1 Mycobacterium tuberculosis strain 22103, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP010339.1
gb CP010338.1 Mycobacterium tuberculosis strain 37004, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP010338.1
gb CP010337.1 Mycobacterium tuberculosis strain 22115, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP010337.1
gb CP010336.1 Mycobacterium tuberculosis strain 2279, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP010336.1
gb CP010335.1 Mycobacterium tuberculosis strain 2242, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP010335.1
gb CP010334.1 Mycobacterium africanum strain 25, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP010334.1
gb CP010333.1 Mycobacterium microti strain 12, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP010333.1
gb CP010332.1 Mycobacterium bovis strain 30, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP010332.1
gb CP010331.1 Mycobacterium bovis BCG strain 26, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP010331.1
gb CP010330.1 Mycobacterium tuberculosis strain F28, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP010330.1
gb CP010329.1 Mycobacterium tuberculosis strain F1, complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP010329.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
gb CP013741.1 Mycobacterium bovis strain BCG-1 (Russia), complete genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP013741.1
gb KR856205.1 Mycobacterium intracellulare 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR856205.1
dbj LC055543.1 Mycobacterium haemophilum gene for internal transcribed spacer 1, strain: KB12MH	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC055543.1
gb KT149382.1 Mycobacterium yongonense strain NTM 359 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KT149382.1
gb KT149381.1 Mycobacterium yongonense strain NTM 211 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KT149381.1
gb KT935472.1 Mycobacterium kansasii strain 2009-13641 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KT935472.1
gb KT168287.1 Mycobacterium nonchromogenicum strain DSM 44164 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KT168287.1
gb KT168286.1 Mycobacterium alseense strain FI-02209 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KT168286.1
gb KT168285.1 Mycobacterium szulgai strain DSM 44166 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KT168285.1
gb CP011455.1 Mycobacterium bovis strain BCG-1 genome	42.1	70.4	100%	0.050	100%	CP011455.1
gb KR995227.1 Mycobacterium intracellulare strain WH1053 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995227.1
gb KR995226.1 Mycobacterium intracellulare strain WH1034 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995226.1
gb KR995225.1 Mycobacterium intracellulare strain WH1026 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995225.1
gb KR995223.1 Mycobacterium sp. QGD 101 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995223.1
gb KR995214.1 Mycobacterium obuense strain WH637 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995214.1
gb KR995213.1 Mycobacterium aubagnense strain WH537 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995213.1
gb KR995212.1 Mycobacterium porcinum strain WH500 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995212.1
gb KR995211.1 Mycobacterium fortuitum strain WH450 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995211.1
gb KR995201.1 Mycobacterium avium strain WH425 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995201.1
gb KR995200.1 Mycobacterium intracellulare strain WH406 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995200.1
gb KR995197.1 Mycobacterium intracellulare strain WH585 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995197.1
gb KR995196.1 Mycobacterium intracellulare strain WH579 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995196.1
gb KR995195.1 Mycobacterium intracellulare strain WH520 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995195.1
gb KR995194.1 Mycobacterium porcinum strain WH493 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995194.1
gb KR995193.1 Mycobacterium porcinum strain WH479 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995193.1
gb KR995191.1 Mycobacterium fortuitum strain WH313 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995191.1
gb KR995190.1 Mycobacterium intracellulare strain WH278 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995190.1
gb KR995189.1 Mycobacterium avium strain WH245 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995189.1
gb KR995188.1 Mycobacterium intracellulare strain WH722 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995188.1
gb KR995187.1 Mycobacterium avium strain WH906 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995187.1
gb KR995184.1 Mycobacterium abscessus strain WH836 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995184.1
gb KR995183.1 Mycobacterium fortuitum strain WH833 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995183.1
gb KR995182.1 Mycobacterium intracellulare strain WH831 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995182.1
gb KR995181.1 Mycobacterium intracellulare strain WH799 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995181.1
gb KR995180.1 Mycobacterium intracellulare strain WH787 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995180.1
gb KR995179.1 Mycobacterium intracellulare strain WH784 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995179.1
gb KR995178.1 Mycobacterium intracellulare strain WH781 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995178.1
gb KR995176.1 Mycobacterium fortuitum strain WH723 16S-23S ribosomal RNA intergenic	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995176.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
spacer, partial sequence						
gb KR995175.1 Mycobacterium intracellulare strain WH676 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995175.1
gb KR995173.1 Mycobacterium intracellulare strain WH622 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995173.1
gb KR995171.1 Mycobacterium fortuitum strain WH996 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995171.1
gb KR995170.1 Mycobacterium fortuitum strain WH1072 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995170.1
gb KR995169.1 Mycobacterium fortuitum strain WH979 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995169.1
gb KR995165.1 Mycobacterium intracellulare strain WH1035 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995165.1
gb KR995163.1 Mycobacterium intracellulare strain WH1000 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995163.1
gb KR995160.1 Mycobacterium intracellulare strain WH966 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995160.1
gb KR995159.1 Mycobacterium intracellulare strain WH957 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995159.1
gb KR995158.1 Mycobacterium intracellulare strain WH916 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995158.1
gb KR995157.1 Mycobacterium intracellulare strain WH965 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995157.1
gb KR995156.1 Mycobacterium intracellulare strain WH1036 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995156.1
gb KR995155.1 Mycobacterium intracellulare strain WH995 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995155.1
gb KR995154.1 Mycobacterium intracellulare strain WH994 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KR995154.1

Tabelle 32 In-silico-Analyse (BLASTn) des forward primers TB1F (*MTC*); Abbildung von 100 Zielsequenzen

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
gb CP012506.2 Mycobacterium tuberculosis strain SCAID 187.0, complete genome	42.1	1010	100%	0.050	100%	CP012506.2
gb CP016794.1 Mycobacterium tuberculosis strain SCAID 320.0, complete genome	42.1	1095	100%	0.050	100%	CP016794.1
gb CP015773.2 Mycobacterium bovis strain SP38, complete genome	42.1	42.1	100%	0.050	100%	CP015773.2
gb CP014566.1 Mycobacterium bovis BCG str. Tokyo 172 substrain TRCS, complete genome	42.1	84.2	100%	0.050	100%	CP014566.1
gb CP010340.1 Mycobacterium tuberculosis strain 26105, complete genome	42.1	716	100%	0.050	100%	CP010340.1
gb CP010339.1 Mycobacterium tuberculosis strain 22103, complete genome	42.1	42.1	100%	0.050	100%	CP010339.1
gb CP010338.1 Mycobacterium tuberculosis strain 37004, complete genome	42.1	463	100%	0.050	100%	CP010338.1
gb CP010337.1 Mycobacterium tuberculosis strain 22115, complete genome	42.1	463	100%	0.050	100%	CP010337.1
gb CP010336.1 Mycobacterium tuberculosis strain 2279, complete genome	42.1	758	100%	0.050	100%	CP010336.1
gb CP010335.1 Mycobacterium tuberculosis strain 2242, complete genome	42.1	926	100%	0.050	100%	CP010335.1
gb CP010334.1 Mycobacterium africanum strain 25, complete genome	42.1	210	100%	0.050	100%	CP010334.1
gb CP010333.1 Mycobacterium microti strain 12, complete genome	42.1	336	100%	0.050	100%	CP010333.1
gb CP010332.1 Mycobacterium bovis strain 30, complete genome	42.1	42.1	100%	0.050	100%	CP010332.1
gb CP010331.1 Mycobacterium bovis BCG strain 26, complete genome	42.1	42.1	100%	0.050	100%	CP010331.1
gb CP010330.1 Mycobacterium tuberculosis strain F28, complete genome	42.1	758	100%	0.050	100%	CP010330.1
gb CP010329.1 Mycobacterium tuberculosis strain F1, complete genome	42.1	673	100%	0.050	100%	CP010329.1
gb CP013741.1 Mycobacterium bovis strain BCG-1 (Russia), complete genome	42.1	84.2	100%	0.050	100%	CP013741.1
gb CP011455.1 Mycobacterium bovis strain BCG-1 genome	42.1	84.2	100%	0.050	100%	CP011455.1
gb CP009243.1 Mycobacterium bovis BCG strain Russia 368, complete genome	42.1	84.2	100%	0.050	100%	CP009243.1
gb CP012090.1 Mycobacterium tuberculosis W-148, complete genome	42.1	884	100%	0.050	100%	CP012090.1
gb CP012095.1 Mycobacterium bovis strain 1595, complete genome	42.1	42.1	100%	0.050	100%	CP012095.1
gb CP008744.1 Mycobacterium bovis BCG strain 3281, complete genome	42.1	42.1	100%	0.050	100%	CP008744.1
dbj LC005482.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F309	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005482.1
dbj LC005481.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F302	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005481.1
dbj LC005473.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F178	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005473.1
dbj LC005472.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F158	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005472.1
dbj LC005471.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F145	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005471.1
dbj LC005469.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F145	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005469.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
complete sequence, strain: F130						
dbj LC005463.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F76	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005463.1
dbj LC005462.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F60	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005462.1
dbj LC005460.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F47	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005460.1
dbj LC005459.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F41	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005459.1
dbj LC005458.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F33	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005458.1
dbj LC005457.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F31	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005457.1
gb CP010873.1 Mycobacterium tuberculosis strain Beijing-like, complete genome	42.1	716	100%	0.050	100%	CP010873.1
dbj AP014573.1 Mycobacterium tuberculosis str. Kurono DNA, complete genome	42.1	631	100%	0.050	100%	AP014573.1
emb HG813240.1 Mycobacterium tuberculosis 49-02 complete genome	42.1	758	100%	0.050	100%	HG813240.1
gb CP009480.1 Mycobacterium tuberculosis H37Rv, complete genome	42.1	673	100%	0.050	100%	CP009480.1
gb CP009449.1 Mycobacterium bovis strain ATCC BAA-935, complete genome	42.1	42.1	100%	0.050	100%	CP009449.1
gb CP009427.1 Mycobacterium tuberculosis strain 96121, complete genome	42.1	716	100%	0.050	100%	CP009427.1
gb CP009426.1 Mycobacterium tuberculosis strain 96075, complete genome	42.1	716	100%	0.050	100%	CP009426.1
gb CP009101.1 Mycobacterium tuberculosis strain ZMC13-88, complete genome	42.1	673	100%	0.050	100%	CP009101.1
gb CP009100.1 Mycobacterium tuberculosis strain ZMC13-264, complete genome	42.1	673	100%	0.050	100%	CP009100.1
gb CP008981.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A029DS genome	42.1	884	100%	0.050	100%	CP008981.1
gb CP008980.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A033DS genome	42.1	884	100%	0.050	100%	CP008980.1
gb CP008979.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A036DS genome	42.1	884	100%	0.050	100%	CP008979.1
gb CP008978.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A087DS genome	42.1	884	100%	0.050	100%	CP008978.1
gb CP008977.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A092DS genome	42.1	884	100%	0.050	100%	CP008977.1
gb CP008976.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A093DS genome	42.1	884	100%	0.050	100%	CP008976.1
gb CP008975.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A094DS genome	42.1	884	100%	0.050	100%	CP008975.1
gb CP008974.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A115DS genome	42.1	884	100%	0.050	100%	CP008974.1
gb CP008973.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0A117DS genome	42.1	884	100%	0.050	100%	CP008973.1
gb CP008972.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0B026XDR genome	42.1	884	100%	0.050	100%	CP008972.1
gb CP008971.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0B049XDR genome	42.1	884	100%	0.050	100%	CP008971.1
gb CP008970.1 Mycobacterium tuberculosis strain 0B070XDR genome	42.1	884	100%	0.050	100%	CP008970.1
gb CP014617.1 Mycobacterium africanum strain UT307 genome	42.1	42.1	100%	0.050	100%	CP014617.1
gb CP010968.1 Mycobacterium tuberculosis strain PR10 genome	42.1	42.1	100%	0.050	100%	CP010968.1
gb KP844720.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 35 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844720.1
gb KP844719.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 34 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844719.1
gb KP844718.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 33 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844718.1
gb KP844717.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 32 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844717.1
gb KP844716.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 31 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844716.1
gb KP844715.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 30 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844715.1
gb KP844714.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 29 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844714.1
gb KP844713.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 28 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844713.1
gb KP844712.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 27 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844712.1
gb KP844711.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 26 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844711.1
gb KP844710.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 25 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844710.1
gb KP844709.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 24 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844709.1
gb KP844708.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 23 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844708.1
gb KP844707.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 22 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844707.1
gb KP844706.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 21 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844706.1
gb KP844705.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 20 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844705.1
gb KP844704.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 19 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844704.1
gb KP844703.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 18 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844703.1
gb KP844702.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 17 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844702.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844700.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 15 insertion sequence IS6110	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844700.1
transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844699.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 14 insertion sequence IS6110	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844699.1
transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844698.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 13 insertion sequence IS6110	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844698.1
transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844697.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 12 insertion sequence IS6110	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844697.1
transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844696.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 11 insertion sequence IS6110	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844696.1
transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844695.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 10 insertion sequence IS6110	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844695.1
transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844694.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 9 insertion sequence IS6110	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844694.1
transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844693.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 8 insertion sequence IS6110	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844693.1
truncated transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844692.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 7 insertion sequence IS6110	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844692.1
transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844691.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 6 insertion sequence IS6110	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844691.1
transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844690.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 5 insertion sequence IS6110	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844690.1
transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844689.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 4 insertion sequence IS6110	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844689.1
transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844688.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 3 insertion sequence IS6110	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844688.1
transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844687.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 2 insertion sequence IS6110	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844687.1
transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844686.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 1 insertion sequence IS6110	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KP844686.1
transposase (orfB) gene, partial cds						
dbj LC005477.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F208	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005477.1
dbj LC005476.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F200	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005476.1
dbj LC005475.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F194	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005475.1
dbj LC005465.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F97	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005465.1
dbj LC005461.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F49	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005461.1
dbj LC005456.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F20	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005456.1
dbj LC005455.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F16	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005455.1
dbj LC005454.1 Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F9	42.1	42.1	100%	0.050	100%	LC005454.1
gb KM516707.1 Mycobacterium tuberculosis strain IMR 672/14 insertion sequence IS6110 transposase gene, partial cds	42.1	42.1	100%	0.050	100%	KM516707.1

Tabelle 33 In-silico-Analyse (BLASTn) des reverse primers TB1R (*MTC*); Abbildung von 100 Zielsequenzen

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
gb CP012506.2 Mycobacterium tuberculosis strain SCAID 187.0, complete genome	48.1	1153	100%	0.002	100%	CP012506.2
gb CP016794.1 Mycobacterium tuberculosis strain SCAID 320.0, complete genome	48.1	1249	100%	0.002	100%	CP016794.1
gb CP015773.2 Mycobacterium bovis strain SP38, complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	CP015773.2
gb KU301340.1 Mycobacterium tuberculosis isolate 2206/15 insertion sequence IS6110, partial sequence	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU301340.1
gb CP014617.1 Mycobacterium africanum strain UT307 genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	CP014617.1
gb CP010968.1 Mycobacterium tuberculosis strain PR10 genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	CP010968.1
gb CP014566.1 Mycobacterium bovis BCG str. Tokyo 172 substrain TRCS, complete genome	48.1	96.1	100%	0.002	100%	CP014566.1
gb CP010340.1 Mycobacterium tuberculosis strain 26105, complete genome	48.1	817	100%	0.002	100%	CP010340.1
gb CP010339.1 Mycobacterium tuberculosis strain 22103, complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	CP010339.1
gb CP010338.1 Mycobacterium tuberculosis strain 37004, complete genome	48.1	528	100%	0.002	100%	CP010338.1
gb CP010337.1 Mycobacterium tuberculosis strain 22115, complete genome	48.1	528	100%	0.002	100%	CP010337.1
gb CP010336.1 Mycobacterium tuberculosis strain 2279, complete genome	48.1	865	100%	0.002	100%	CP010336.1
gb CP010335.1 Mycobacterium tuberculosis strain 2242, complete genome	48.1	1057	100%	0.002	100%	CP010335.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
gb CP010334.1 Mycobacterium africanum strain 25, complete genome	48.1	240	100%	0.002	100%	CP010334.1
gb CP010333.1 Mycobacterium microti strain 12, complete genome	48.1	384	100%	0.002	100%	CP010333.1
gb CP010332.1 Mycobacterium bovis strain 30, complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	CP010332.1
gb CP010331.1 Mycobacterium bovis BCG strain 26, complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	CP010331.1
gb CP010330.1 Mycobacterium tuberculosis strain F28, complete genome	48.1	865	100%	0.002	100%	CP010330.1
gb CP010329.1 Mycobacterium tuberculosis strain F1, complete genome	48.1	769	100%	0.002	100%	CP010329.1
gb CP013741.1 Mycobacterium bovis strain BCG-1 (Russia), complete genome	48.1	96.1	100%	0.002	100%	CP013741.1
gb KT275244.1 Mycobacterium tuberculosis isolate TB_INS1/INS2 transposase gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KT275244.1
gb CP011455.1 Mycobacterium bovis strain BCG-1 genome	48.1	96.1	100%	0.002	100%	CP011455.1
gb CP009243.1 Mycobacterium bovis BCG strain Russia 368, complete genome	48.1	96.1	100%	0.002	100%	CP009243.1
gb CP012090.1 Mycobacterium tuberculosis W-148, complete genome	48.1	1009	100%	0.002	100%	CP012090.1
gb CP012095.1 Mycobacterium bovis strain 1595, complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	CP012095.1
gb CP008744.1 Mycobacterium bovis BCG strain 3281, complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	CP008744.1
gb KP844721.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 36 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844721.1
gb KP844720.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 35 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844720.1
gb KP844719.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 34 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844719.1
gb KP844718.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 33 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844718.1
gb KP844717.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 32 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844717.1
gb KP844716.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 31 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844716.1
gb KP844715.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 30 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844715.1
gb KP844714.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 29 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844714.1
gb KP844713.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 28 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844713.1
gb KP844711.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 26 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844711.1
gb KP844710.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 25 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844710.1
gb KP844709.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 24 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844709.1
gb KP844708.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 23 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844708.1
gb KP844707.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 22 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844707.1
gb KP844706.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 21 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844706.1
gb KP844705.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 20 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844705.1
gb KP844704.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 19 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844704.1
gb KP844703.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 18 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844703.1
gb KP844702.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 17 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844702.1
gb KP844701.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 16 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844701.1
gb KP844700.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 15 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844700.1
gb KP844699.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 14 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844699.1
gb KP844698.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 13 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844698.1
gb KP844697.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 12 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844697.1
gb KP844696.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 11 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844696.1
gb KP844695.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 10 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844695.1
gb KP844694.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 9 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844694.1
gb KP844693.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 8 insertion sequence IS6110 truncated transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844693.1
gb KP844692.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 7 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844692.1
gb KP844691.1 Mycobacterium tuberculosis haplotype 6 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844691.1

Description		Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
	transposase (orfB) gene, partial cds						
gb KP844690.1	Mycobacterium tuberculosis haplotype 5 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844690.1
gb KP844689.1	Mycobacterium tuberculosis haplotype 4 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844689.1
gb KP844688.1	Mycobacterium tuberculosis haplotype 3 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844688.1
gb KP844687.1	Mycobacterium tuberculosis haplotype 2 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844687.1
gb KP844686.1	Mycobacterium tuberculosis haplotype 1 insertion sequence IS6110 transposase (orfB) gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KP844686.1
dbj LC005482.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F309	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005482.1
dbj LC005481.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F302	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005481.1
dbj LC005477.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F208	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005477.1
dbj LC005476.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F200	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005476.1
dbj LC005475.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F194	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005475.1
dbj LC005473.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F178	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005473.1
dbj LC005472.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F158	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005472.1
dbj LC005471.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F145	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005471.1
dbj LC005469.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F130	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005469.1
dbj LC005465.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F97	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005465.1
dbj LC005463.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F76	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005463.1
dbj LC005462.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F60	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005462.1
dbj LC005461.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F49	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005461.1
dbj LC005460.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F47	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005460.1
dbj LC005459.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F41	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005459.1
dbj LC005458.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F33	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005458.1
dbj LC005457.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F31	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005457.1
dbj LC005456.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F20	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005456.1
dbj LC005455.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F16	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005455.1
dbj LC005454.1	Mycobacterium tuberculosis DNA, insertion sequence:IS6110, VNTR, complete sequence, strain: F9	48.1	48.1	100%	0.002	100%	LC005454.1
gb CP010873.1	Mycobacterium tuberculosis strain Beijing-like, complete genome	48.1	817	100%	0.002	100%	CP010873.1
dbj AP014573.1	Mycobacterium tuberculosis str. Kuroko DNA, complete genome	48.1	721	100%	0.002	100%	AP014573.1
gb KM516707.1	Mycobacterium tuberculosis strain IMR 672/14 insertion sequence IS6110 transposase gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KM516707.1
emb HG813240.1	Mycobacterium tuberculosis 49-02 complete genome	48.1	865	100%	0.002	100%	HG813240.1
gb CP009480.1	Mycobacterium tuberculosis H37Rv, complete genome	48.1	769	100%	0.002	100%	CP009480.1
gb CP009449.1	Mycobacterium bovis strain ATCC BAA-935, complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	CP009449.1
gb CP009427.1	Mycobacterium tuberculosis strain 96121, complete genome	48.1	817	100%	0.002	100%	CP009427.1
gb CP009426.1	Mycobacterium tuberculosis strain 96075, complete genome	48.1	817	100%	0.002	100%	CP009426.1
gb CP009101.1	Mycobacterium tuberculosis strain ZMC13-88, complete genome	48.1	769	100%	0.002	100%	CP009101.1
gb CP009100.1	Mycobacterium tuberculosis strain ZMC13-264, complete genome	48.1	769	100%	0.002	100%	CP009100.1
gb CP008981.1	Mycobacterium tuberculosis strain 0A029DS genome	48.1	1009	100%	0.002	100%	CP008981.1
gb CP008980.1	Mycobacterium tuberculosis strain 0A033DS genome	48.1	1009	100%	0.002	100%	CP008980.1
gb CP008978.1	Mycobacterium tuberculosis strain 0A087DS genome	48.1	1009	100%	0.002	100%	CP008978.1
gb CP008977.1	Mycobacterium tuberculosis strain 0A092DS genome	48.1	1009	100%	0.002	100%	CP008977.1
gb CP008976.1	Mycobacterium tuberculosis strain 0A093DS genome	48.1	1009	100%	0.002	100%	CP008976.1
gb CP008975.1	Mycobacterium tuberculosis strain 0A094DS genome	48.1	1009	100%	0.002	100%	CP008975.1
gb CP008974.1	Mycobacterium tuberculosis strain 0A115DS genome	48.1	1009	100%	0.002	100%	CP008974.1
gb CP008973.1	Mycobacterium tuberculosis strain 0A117DS genome	48.1	1009	100%	0.002	100%	CP008973.1
gb CP008972.1	Mycobacterium tuberculosis strain 0B026XDR genome	48.1	1009	100%	0.002	100%	CP008972.1

Tabelle 34 In-silico-Analyse (BLASTn) des forward primers MysppF (*Myspp.*); Abbildung von 100 Zielsequenzen

Description		Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
gb CP012506.2	Mycobacterium tuberculosis strain SCAID 187.0, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP012506.2
gb CP016794.1	Mycobacterium tuberculosis strain SCAID 320.0, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP016794.1
gb CP015773.2	Mycobacterium bovis strain SP38, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP015773.2
gb KX263298.1	Mycobacterium gordonae strain IRLMedNTM_20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KX263298.1
gb KX263296.1	Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KX263296.1
gb KX263295.1	Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KX263295.1
gb KX263294.1	Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KX263294.1
gb KX263293.1	Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KX263293.1
gb KX263292.1	Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KX263292.1
gb KX263291.1	Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KX263291.1
gb KX263290.1	Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KX263290.1
gb KX263288.1	Mycobacterium simiae strain IRLMedNTM_10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KX263288.1
gb KX263287.1	Mycobacterium gordonae strain IRLMedNTM_09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KX263287.1
gb KX263285.1	Mycobacterium kansasii strain IRLMedNTM_07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KX263285.1
gb KX263284.1	Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KX263284.1
gb KX263283.1	Mycobacterium gordonae strain IRLMedNTM_05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KX263283.1
gb KX263279.1	Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KX263279.1
ref XM_01614889.1	PREDICTED: Roussettus aegyptiacus angiopoietin 4 (ANGPT4), mRNA	34.2	34.2	100%	12	100%	XM_01614889.1
gb CP014617.1	Mycobacterium africanum strain UT307 genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP014617.1
gb CP010968.1	Mycobacterium tuberculosis strain PR10 genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP010968.1
gb CP014566.1	Mycobacterium bovis BCG str. Tokyo 172 substrain TRCS, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP014566.1
gb CP010340.1	Mycobacterium tuberculosis strain 26105, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP010340.1
gb CP010339.1	Mycobacterium tuberculosis strain 22103, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP010339.1
gb CP010338.1	Mycobacterium tuberculosis strain 37004, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP010338.1
gb CP010337.1	Mycobacterium tuberculosis strain 22115, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP010337.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
gb CP010336.1	Mycobacterium tuberculosis strain 2279, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100% CP010336.1
gb CP010335.1	Mycobacterium tuberculosis strain 2242, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100% CP010335.1
gb CP010333.1	Mycobacterium microti strain 12, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100% CP010333.1
gb CP010332.1	Mycobacterium bovis strain 30, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100% CP010332.1
gb CP010331.1	Mycobacterium bovis BCG strain 26, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100% CP010331.1
gb CP010330.1	Mycobacterium tuberculosis strain F28, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100% CP010330.1
gb CP010329.1	Mycobacterium tuberculosis strain F1, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100% CP010329.1
gb CP013741.1	Mycobacterium bovis strain BCG-1 (Russia), complete genome	34.2	34.2	100%	12	100% CP013741.1
gb KR856205.1	Mycobacterium intracellulare 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR856205.1
dbj LC055543.1	Mycobacterium haemophilum gene for internal transcribed spacer 1, strain: KB12MH	34.2	34.2	100%	12	100% LC055543.1
gb KT149382.1	Mycobacterium yongonense strain NTM 359 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KT149382.1
gb KT149381.1	Mycobacterium yongonense strain NTM 211 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KT149381.1
gb KR340011.1	Jasminum sambac microsatellite Js870 sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR340011.1
gb KT896749.1	Mycobacterium sp. YM12 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KT896749.1
emb LN879547.1	Comamonas testosteroni P19 genome assembly Comamonas testosteroni P19, chromosome : I	34.2	34.2	100%	12	100% LN879547.1
gb KT168287.1	Mycobacterium nonchromogenicum strain DSM 44164 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KT168287.1
gb KT168286.1	Mycobacterium alseense strain FI-02209 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KT168286.1
gb KT168285.1	Mycobacterium szulgai strain DSM 44166 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KT168285.1
gb CP011455.1	Mycobacterium bovis strain BCG-1 genome	34.2	34.2	100%	12	100% CP011455.1
gb KR995227.1	Mycobacterium intracellulare strain WH1053 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995227.1
gb KR995226.1	Mycobacterium intracellulare strain WH1034 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995226.1
gb KR995225.1	Mycobacterium intracellulare strain WH1026 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995225.1
gb KR995201.1	Mycobacterium avium strain WH425 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995201.1
gb KR995200.1	Mycobacterium intracellulare strain WH406 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995200.1
gb KR995197.1	Mycobacterium intracellulare strain WH585 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995197.1
gb KR995196.1	Mycobacterium intracellulare strain WH579 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995196.1
gb KR995195.1	Mycobacterium intracellulare strain WH520 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995195.1
gb KR995190.1	Mycobacterium intracellulare strain WH278 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995190.1
gb KR995189.1	Mycobacterium avium strain WH245 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995189.1
gb KR995188.1	Mycobacterium intracellulare strain WH722 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995188.1
gb KR995187.1	Mycobacterium avium strain WH906 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995187.1
gb KR995184.1	Mycobacterium abscessus strain WH836 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995184.1
gb KR995182.1	Mycobacterium intracellulare strain WH831 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995182.1
gb KR995181.1	Mycobacterium intracellulare strain WH799 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995181.1
gb KR995180.1	Mycobacterium intracellulare strain WH787 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995180.1
gb KR995179.1	Mycobacterium intracellulare strain WH784 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995179.1
gb KR995178.1	Mycobacterium intracellulare strain WH781 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995178.1
gb KR995175.1	Mycobacterium intracellulare strain WH676 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995175.1
gb KR995173.1	Mycobacterium intracellulare strain WH622 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995173.1
gb KR995165.1	Mycobacterium intracellulare strain WH1035 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995165.1
gb KR995163.1	Mycobacterium intracellulare strain WH1000 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KR995163.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
gb KR995160.1 Mycobacterium intracellulare strain WH966 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KR995160.1
gb KR995159.1 Mycobacterium intracellulare strain WH957 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KR995159.1
gb KR995158.1 Mycobacterium intracellulare strain WH916 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KR995158.1
gb KR995157.1 Mycobacterium intracellulare strain WH965 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KR995157.1
gb KR995156.1 Mycobacterium intracellulare strain WH1036 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KR995156.1
gb KR995155.1 Mycobacterium intracellulare strain WH995 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KR995155.1
gb KR995154.1 Mycobacterium intracellulare strain WH994 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KR995154.1
gb KR995153.1 Mycobacterium kansasii strain WH993 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KR995153.1
gb KR995150.1 Mycobacterium intracellulare strain WH985 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KR995150.1
gb KR995148.1 Mycobacterium kansasii strain WH983 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KR995148.1
gb KR995147.1 Mycobacterium intracellulare strain WH982 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KR995147.1
gb KR995145.1 Mycobacterium intracellulare strain WH978 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KR995145.1
gb KR995144.1 Mycobacterium intracellulare strain WH976 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KR995144.1
gb CP009243.1 Mycobacterium bovis BCG strain Russia 368, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP009243.1
gb CP012090.1 Mycobacterium tuberculosis W-148, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP012090.1
gb CP012095.1 Mycobacterium bovis strain 1595, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP012095.1
gb CP008744.1 Mycobacterium bovis BCG strain 3281, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP008744.1
emb AM902930.2 Mycobacterium angelicum ITS1 complete sequence, type strain DSM 45057T	34.2	34.2	100%	12	100%	AM902930.2
gb CP010873.1 Mycobacterium tuberculosis strain Beijing-like, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP010873.1
dbj AP014573.1 Mycobacterium tuberculosis str. Kurono DNA, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	AP014573.1
dbj AB973499.1 Mycobacterium genavense DNA, 16S-23S internal transcribed spacer, partial sequence, clone: M5112801_2	34.2	34.2	100%	12	100%	AB973499.1
emb HG813240.1 Mycobacterium tuberculosis 49-02 complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	HG813240.1
gb CP009614.1 Mycobacterium avium subsp. avium strain DJO-44271, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP009614.1
gb KM230422.1 Mycobacterium haemophilum strain KAD61 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KM230422.1
gb KM230421.1 Mycobacterium haemophilum strain KAD25 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KM230421.1
gb KM230420.1 Mycobacterium haemophilum strain KAD167 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100%	KM230420.1
dbj AP017624.1 Mycobacterium ulcerans subsp. shinshuense DNA, complete genome, strain: ATCC33728	34.2	34.2	100%	12	100%	AP017624.1
gb CP016396.1 Mycobacterium avium strain RCAD0278, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP016396.1
gb CP015495.1 Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strain MAP/TANUVAS/TN/India/2008, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP015495.1
gb CP010996.1 Mycobacterium simiae strain MO323 genome	34.2	62.4	100%	12	100%	CP010996.1
gb CP011883.2 Mycobacterium haemophilum DSM 44634 strain ATCC 29548, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100%	CP011883.2
emb HG917972.2 Mycobacterium marinum E11 main chromosome genome	34.2	68.4	100%	12	100%	HG917972.2
gb KT935472.1 Mycobacterium kansasii strain 2009-13641 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	30.2	30.2	100%	191	94%	KT935472.1
gb CP011894.1 Ovis canadensis canadensis isolate 43U chromosome 9 sequence	30.2	58.5	100%	191	94%	CP011894.1

Tabelle 35 In-silico-Analyse (BLASTn) des reverse primers MysppR (*Myspp*.); Abbildung von 100 Zielsequenzen

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
emb LT607755.1 Micromonospora zamorensis strain DSM 45600 genome assembly, chromosome: I	34.2	102	100%	12	100%	LT607755.1
emb LT607754.1 Micromonospora inositolata strain DSM 43819 genome assembly, chromosome: I	34.2	102	100%	12	100%	LT607754.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
emb LT607753.1	Micromonospora coxensis strain DSM 45161 genome assembly, chromosome: I	34.2	136	100%	12	100% LT607753.1
emb LT607752.1	Micromonospora rifamycinica strain DSM 44983 genome assembly, chromosome: I	34.2	136	100%	12	100% LT607752.1
emb LT607751.1	Micromonospora siamensis strain DSM 45097 genome assembly, chromosome: I	34.2	136	100%	12	100% LT607751.1
emb LT607750.1	Micromonospora echinaurantiaca strain DSM 43904 genome assembly, chromosome: I	34.2	102	100%	12	100% LT607750.1
gb CP016819.1	Rhodococcus sp. p52, complete genome	34.2	136	100%	12	100% CP016819.1
emb LT607733.1	Micromonospora echinofusca strain DSM 43913 genome assembly, chromosome: I	34.2	136	100%	12	100% LT607733.1
emb LT607413.1	Micromonospora echinospira strain DSM 43816 genome assembly, chromosome: I	34.2	102	100%	12	100% LT607413.1
emb LT607412.1	Micromonospora coriariae strain DSM 44875 genome assembly, chromosome: I	34.2	102	100%	12	100% LT607412.1
emb LT607411.1	Micromonospora viridifaciens strain DSM 43909 genome assembly, chromosome: I	34.2	102	100%	12	100% LT607411.1
emb LT607410.1	Micromonospora purpureochromogenes strain DSM 43821 genome assembly, chromosome: I	34.2	136	100%	12	100% LT607410.1
emb LT607409.1	Micromonospora chokoriensis strain DSM 45160 genome assembly, chromosome: I	34.2	130	100%	12	100% LT607409.1
gb CP012506.2	Mycobacterium tuberculosis strain SCAID 187.0, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100% CP012506.2
gb CP011533.1	Streptomyces noursei ATCC 11455, complete genome	34.2	239	100%	12	100% CP011533.1
gb CP016824.1	Streptomyces sampsonii strain KJ40, complete genome	34.2	239	100%	12	100% CP016824.1
ref XM_008823509.2	PREDICTED: Nannospalax galili makorin ring finger protein 1 (Mkm1), transcript variant X5, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_008823509.2
ref XM_008823510.2	PREDICTED: Nannospalax galili makorin ring finger protein 1 (Mkm1), transcript variant X4, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_008823510.2
ref XM_008823508.2	PREDICTED: Nannospalax galili makorin ring finger protein 1 (Mkm1), transcript variant X3, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_008823508.2
ref XM_008823507.2	PREDICTED: Nannospalax galili makorin ring finger protein 1 (Mkm1), transcript variant X2, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_008823507.2
ref XM_008823506.2	PREDICTED: Nannospalax galili makorin ring finger protein 1 (Mkm1), transcript variant X1, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_008823506.2
gb CP016794.1	Mycobacterium tuberculosis strain SCAID 320.0, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100% CP016794.1
gb CP015529.1	Rhodococcus sp. WB1, complete genome	34.2	136	100%	12	100% CP015529.1
gb CP015773.2	Mycobacterium bovis strain SP38, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100% CP015773.2
gb CP013854.1	Pseudonocardia sp. HH130630-07, complete genome	34.2	102	100%	12	100% CP013854.1
ref XM_017667949.1	PREDICTED: Manis javanica makorin ring finger protein 1 (MKRN1), mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_017667949.1
gb CP016559.1	Streptomyces clavuligerus strain F613-1, complete genome	34.2	205	100%	12	100% CP016559.1
ref XM_006236304.3	PREDICTED: Rattus norvegicus makorin ring finger protein 1 (Mkm1), transcript variant X4, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_006236304.3
ref XM_006236303.3	PREDICTED: Rattus norvegicus makorin ring finger protein 1 (Mkm1), transcript variant X3, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_006236303.3
ref XM_006236302.3	PREDICTED: Rattus norvegicus makorin ring finger protein 1 (Mkm1), transcript variant X2, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_006236302.3
ref XM_006236301.3	PREDICTED: Rattus norvegicus makorin ring finger protein 1 (Mkm1), transcript variant X1, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_006236301.3
ref XM_017499749.1	PREDICTED: Cebus capucinus imitator makorin ring finger protein 1 (MKRN1), transcript variant X3, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_017499749.1
ref XM_017499748.1	PREDICTED: Cebus capucinus imitator makorin ring finger protein 1 (MKRN1), transcript variant X2, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_017499748.1
ref XM_017499747.1	PREDICTED: Cebus capucinus imitator makorin ring finger protein 1 (MKRN1), transcript variant X1, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_017499747.1
gb CP016438.1	Streptomyces lincolnensis strain NRRL 2936, complete genome	34.2	235	100%	12	100% CP016438.1
gb KX263298.1	Mycobacterium gordonae strain IRLMedNTM_20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KX263298.1
gb KX263296.1	Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KX263296.1
gb KX263295.1	Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KX263295.1
gb KX263294.1	Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	12	100% KX263294.1
gb KX263293.1	Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_15 16S	34.2	34.2	100%	12	100% KX263293.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
gb KX263292.1	ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_14 16S	34.2	34.2	100%	12	100% KX263292.1
gb KX263291.1	ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_13 16S	34.2	34.2	100%	12	100% KX263291.1
gb KX263290.1	ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_12 16S	34.2	34.2	100%	12	100% KX263290.1
gb KX263288.1	ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence Mycobacterium simiae strain IRLMedNTM_10 16S	34.2	34.2	100%	12	100% KX263288.1
gb KX263287.1	ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence Mycobacterium gordonae strain IRLMedNTM_09 16S	34.2	34.2	100%	12	100% KX263287.1
gb KX263285.1	ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence Mycobacterium kansasii strain IRLMedNTM_07 16S	34.2	34.2	100%	12	100% KX263285.1
gb KX263284.1	ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_06 16S	34.2	34.2	100%	12	100% KX263284.1
gb KX263283.1	ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence Mycobacterium gordonae strain IRLMedNTM_05 16S	34.2	34.2	100%	12	100% KX263283.1
gb KX263279.1	ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence Mycobacterium intracellulare strain IRLMedNTM_01 16S	34.2	34.2	100%	12	100% KX263279.1
emb LT598496.1	Micromonospora krabiensis strain DSM 45344 genome assembly, chromosome: I	34.2	161	100%	12	100% LT598496.1
gb CP016279.1	Streptomyces griseochromogenes strain ATCC 14511, complete genome	34.2	233	100%	12	100% CP016279.1
gb CP012117.1	Dermabacter vaginalis strain AD1-86, complete genome	34.2	102	100%	12	100% CP012117.1
ref XM_00825078.1.2	PREDICTED: Oryctolagus cuniculus makorin ring finger protein 1 (MKRN1), mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_00825078.1.2
ref XM_011241413.2	PREDICTED: Mus musculus makorin, ring finger protein, 1 (Mkm1), transcript variant X4, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_011241413.2
ref XM_011241412.2	PREDICTED: Mus musculus makorin, ring finger protein, 1 (Mkm1), transcript variant X3, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_011241412.2
ref XM_011241411.2	PREDICTED: Mus musculus makorin, ring finger protein, 1 (Mkm1), transcript variant X2, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_011241411.2
ref XM_017321683.1	PREDICTED: Mus musculus makorin, ring finger protein, 1 (Mkm1), transcript variant X1, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_017321683.1
emb LT594324.1	Micromonospora narathiwatensis strain DSM 45248 genome assembly, chromosome: I	34.2	102	100%	12	100% LT594324.1
emb LT594323.1	Micromonospora auratinigra strain DSM 44815 genome assembly, chromosome: I	34.2	136	100%	12	100% LT594323.1
gb AH008807.3	Homo sapiens chromosome 7 makorin 1 (MKRN1) gene, complete cds	34.2	34.2	100%	12	100% AH008807.3
gb CP015866.1	Streptomyces parvulus strain 2297, complete genome	34.2	205	100%	12	100% CP015866.1
ref XM_011515997.2	PREDICTED: Homo sapiens makorin ring finger protein 1 (MKRN1), transcript variant X2, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_011515997.2
gb CP011491.1	Mycobacterium vaccae 95051, complete genome	34.2	68.4	100%	12	100% CP011491.1
ref XM_016944331.1	PREDICTED: Pan troglodytes putative E3 ubiquitin-protein ligase makorin-4 (LOC739560), mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_016944331.1
ref XR_001720905.1	PREDICTED: Pan troglodytes E3 ubiquitin-protein ligase makorin-1 pseudogene (LOC746792), misc_RNA	34.2	34.2	100%	12	100% XR_001720905.1
ref XM_016958266.1	PREDICTED: Pan troglodytes makorin ring finger protein 1 (MKRN1), transcript variant X3, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_016958266.1
ref XM_009454347.2	PREDICTED: Pan troglodytes makorin ring finger protein 1 (MKRN1), transcript variant X2, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_009454347.2
ref XM_016945499.1	PREDICTED: Pan troglodytes E3 ubiquitin-protein ligase makorin-	34.2	34.2	100%	12	100% XM_016945499.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
1 (LOC107971684), transcript variant X4, mRNA						9.1
ref XM_016945498.1	PREDICTED: Pan troglodytes E3 ubiquitin-protein ligase makorin-1 (LOC107971684), transcript variant X3, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_016945498.1
ref XM_016945496.1	PREDICTED: Pan troglodytes E3 ubiquitin-protein ligase makorin-1 (LOC107971684), transcript variant X2, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_016945496.1
ref XM_016945495.1	PREDICTED: Pan troglodytes E3 ubiquitin-protein ligase makorin-1 (LOC107971684), transcript variant X1, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_016945495.1
gb CP015849.1	Streptomyces sp. SAT1, complete genome	34.2	205	100%	12	100% CP015849.1
ref XM_016970562.1	PREDICTED: Cricetulus griseus makorin ring finger protein 1 (Mkrn1), transcript variant X3, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_016970562.1
ref XM_007628850.2	PREDICTED: Cricetulus griseus makorin ring finger protein 1 (Mkrn1), transcript variant X2, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_007628850.2
ref XM_007643644.2	PREDICTED: Cricetulus griseus makorin ring finger protein 1 (Mkrn1), transcript variant X1, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_007643644.2
gb CP015726.1	Streptomyces sp. RTd22, complete genome	34.2	233	100%	12	100% CP015726.1
gb CP015596.1	Mycobacterium sp. YC-RL4, complete genome	34.2	68.4	100%	12	100% CP015596.1
gb CP012949.1	Streptomyces ambofaciens strain DSM 40697, complete genome	34.2	205	100%	12	100% CP012949.1
ref XM_007504428.2	PREDICTED: Monodelphis domestica makorin ring finger protein 1 (MKRN1), transcript variant X6, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_007504428.2
ref XM_007504427.2	PREDICTED: Monodelphis domestica makorin ring finger protein 1 (MKRN1), transcript variant X5, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_007504427.2
ref XM_007504426.2	PREDICTED: Monodelphis domestica makorin ring finger protein 1 (MKRN1), transcript variant X4, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_007504426.2
ref XM_007504425.2	PREDICTED: Monodelphis domestica makorin ring finger protein 1 (MKRN1), transcript variant X3, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_007504425.2
ref XM_007504424.2	PREDICTED: Monodelphis domestica makorin ring finger protein 1 (MKRN1), transcript variant X2, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_007504424.2
dbj AP017424.1	Streptomyces laurentii DNA, complete genome, strain: ATCC 31255	34.2	239	100%	12	100% AP017424.1
ref XM_016205100.1	PREDICTED: Miniopiterus natalensis makorin ring finger protein 1 (MKRN1), mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_016205100.1
gb CP015098.1	Streptomyces sp. S10(2016), complete genome	34.2	205	100%	12	100% CP015098.1
dbj BA000030.4	Streptomyces avermitilis MA-4680 = NBRC 14893 DNA, complete genome	34.2	261	100%	12	100% BA000030.4
ref XM_006990406.2	PREDICTED: Peromyscus maniculatus bairdii makorin ring finger protein 1 (Mkrn1), transcript variant X3, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_006990406.2
ref XM_016008724.1	PREDICTED: Peromyscus maniculatus bairdii makorin ring finger protein 1 (Mkrn1), transcript variant X2, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_016008724.1
ref XM_006990405.2	PREDICTED: Peromyscus maniculatus bairdii makorin ring finger protein 1 (Mkrn1), transcript variant X1, mRNA	34.2	34.2	100%	12	100% XM_006990405.2
gb CP014617.1	Mycobacterium africanum strain UT307 genome	34.2	34.2	100%	12	100% CP014617.1
gb CP010968.1	Mycobacterium tuberculosis strain PR10 genome	34.2	34.2	100%	12	100% CP010968.1
gb CP014475.1	Mycobacterium phlei strain CCUG 21000, complete genome	34.2	68.4	100%	12	100% CP014475.1
gb CP014566.1	Mycobacterium bovis BCG str. Tokyo 172 substrain TRCS, complete genome	34.2	34.2	100%	12	100% CP014566.1
gb CP014485.1	Streptomyces albus strain SM254, complete genome	34.2	239	100%	12	100% CP014485.1
dbj AP017624.1	Mycobacterium ulcerans subsp. shinshuense DNA, complete genome, strain: ATCC33728	34.2	34.2	100%	12	100% AP017624.1
gb CP016640.1	Mycobacterium sp. djl-10, complete genome	34.2	68.4	100%	12	100% CP016640.1
gb CP016396.1	Mycobacterium avium strain RCAD0278, complete genome	34.2	64.4	100%	12	100% CP016396.1
gb CP016174.1	Amycolatopsis orientalis strain B-37, complete genome	34.2	136	100%	12	100% CP016174.1
gb CP015495.1	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strain MAP/TANUVAS/TN/India/2008, complete genome	34.2	64.4	100%	12	100% CP015495.1

12. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass ich meine wissenschaftlichen Arbeiten nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens“ an der Universität Rostock angefertigt habe.

Darüber hinaus versichere ich, dass ich an keiner weiteren Stelle als der Universität Rostock einen Antrag auf Zulassung zur Promotion gestellt bzw. bereits einen Dokortitel auf der Grundlage des Medizinstudiums erworben habe oder mich auch nicht einer medizinischen Doktorprüfung erfolglos unterzogen habe.

Rostock, den 10.08.2020

Richard Werner Köhnke

13. Lebenslauf

14. Danksagung