

Axel Oppermann
Dr. med. dent.

Evaluation molekularbiologischer Verfahren auf PCR-Basis zur Detektion häufiger, bei *Mycobacterium tuberculosis* vorkommender Tuberkulostatika-Resistenz vermittelnder Mutationen

Geboren am 21.09.1977 in Heidelberg
Staatsexamen am 23.06.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. h.c. H.-G. Sonntag

In der vorliegenden Arbeit wurde die von RINDER et al. (1999, 2001) und MIESKES et al. (2000) beschriebene PCR-RFLP-Methode zur Detektion resistenzdeterminierender Mutationen des *M. tuberculosis*-Genoms für Isoniazid (Genlocus *katG*), Ethambutol (Genlocus *embB*) und Streptomycin (Genlocus *rpsL*) überprüft und eine Einordnung hinsichtlich ihrer Einsetzbarkeit in der Routinediagnostik vorgenommen. Die Primer und Restriktionsenzyme sind so aufeinander abgestimmt, dass sie das Genom des Wildtyp-Stammes von *M. tuberculosis* genau an dem Codon schneiden, dessen Mutationen am häufigsten die Resistenz gegenüber dem jeweiligen Antibiotikum auslösen. Das Verfahren ist jedoch auf die Detektion des jeweiligen Genlocus beschränkt.

In einem ersten Schritt wurde die Reproduzierbarkeit des Verfahrens an mono-, mehrfach- bzw. multiresistenten Stämmen des *M. tuberculosis* aus der Stammsammlung des Hygiene-Instituts Heidelberg bzw. eines kooperierenden Instituts in Houston/USA überprüft. Die SENSITIVITÄT des Verfahrens zur Detektion der Isoniazidresistenz lag höher als aus publizierten Daten bekannt war, für die Ethambutolresistenz entsprach die SENSITIVITÄT den in der Literatur publizierten Daten und für die Streptomycinresistenz genügte die SENSITIVITÄT des Verfahrens den Anforderungen an die Routinetauglichkeit nicht. Ursächlich für von publizierten Daten abweichende Sensitivitätswerte ist vermutlich die geographische Variabilität des Auftretens der jeweils detektierten Mutation. Die SPEZIFITÄT der Resistenztestung wurde anhand einer Auswahl sensibler Stämme des Hygiene-Instituts Heidelberg getestet. Das Verfahren erwies sich als hoch spezifisch (keine falsch-resistente Detektion).

Im zweiten Abschnitt wurde die SPEZIFITÄT des Verfahrens für *M. tuberculosis* unter Einbeziehung einer repräsentativen Auswahl von MOTT-Spezies bestimmt. Keiner der getesteten Stämme der MOTT-Spezies zeigte eine Übereinstimmung im PCR-RFLP-Ergebnis für die Isoniazid-determinierende Mutation mit RFLP-Mustern von *M. tuberculosis*. Dagegen zeigten einzelne Stämme der MOTT-Spezies übereinstimmende RFLP-Muster mit solchen von *M. tuberculosis* bei Überprüfung der *rpsL*- und *embB*-Genloci. Um Fehldiagnosen bei Anwendung des PCR-RFLP-Verfahrens aus ‚unbekannten‘ Sputumproben zu vermeiden, muss daher parallel eine zweite, tuberkulosespezifische PCR durchgeführt werden. Auch das Mitführen eines sensiblen und eines resistenten Referenzstammes von *M. tuberculosis* ist für die Differenzierung gegenüber den MOTT-Spezies obligat.

Im letzten Teil der Versuchsreihe sollte die klinische Tauglichkeit und die SENSITIVITÄT der Amplifikation des Verfahrens exemplarisch an der Methode für die Detektion der Isoniazidresistenz überprüft werden. Hierfür wurde einerseits die Fähigkeit des Verfahrens