Optimierung der Mykobakterien Diagnostik:
Implementierung einer Real-Time PCR-Methode zur schnellen Detektion von Mycobacterium tuberculosis-Komplex und nichttuberkulösen Mykobakterien

Carol, Gloor, BMA 22-25

Biomedizinische Analytik HF

Kantonsspital Aarau AG, Institut für Labormedizin IfLM, Mikrobiologie

1. Zusammenfassung

Mykobakterien umfassen den *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTBC), der Tuberkulose verursacht, sowie nichttuberkulöse Mykobakterien (NTM), die als opportunistische Erreger verschiedene Erkrankungen hervorrufen können. Die Unterscheidung dieser Gruppen ist für Diagnostik und Therapie essenziell [1]. Ziel dieser Arbeit war die Optimierung der mykobakteriellen Routinediagnostik durch die Implementierung eines Real-Time PCR Geräts, die MTBC und NTM direkt aus klinischen Proben rasch, sensitiv und differenziert nachweist. Dafür wurden die beiden vollautomatisierten Geräte geneLEAD VIII und STANDARD M10 hinsichtlich Sensitivität, Spezifität und Nachweisgrenze evaluiert. Die Resultate zeigen, dass der STANDARD M10 durch höhere diagnostische Genauigkeit und eine tiefere Nachweisgrenze eine insgesamt zuverlässigere Detektion ermöglicht, während der geneLEAD VIII im Vergleich geringere Werte erreichte.

2. Einleitung

In der Mikrobiologie am Kantonspital Aarau AG wurde die Implementierung einer Real-Time PCR-Methode zur schnellen Diagnostik von Mykobakterien untersucht. Die Gattung Mycobacterium umfasst sowohl den *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTBC) als auch nichttuberkulöse Mykobakterien (NTM). Während MTBC obligat pathogen ist und Tuberkulose verursacht, zählen zu den klinisch relevanten NTM insbesondere der *Mycobacterium-avium*-Komplex (MAC) mit M. *avium*, M. *intracellulare*, M. *chimaera* sowie weitere medizinische bedeutsame Spezies, die vor allem chronische Lungenerkrankungen hervor rufen. Ihre Unterscheidung ist für Diagnostik und Therapie essenziell [2]. Die Routinediagnostik im Labor stützt sich auf Mikroskopie mittels Ziehl-Neelsen- oder Auramin-Färbung, Kultur auf Löwenstein-Jensen-Agar und MGIT(Goldstandard) sowie den GeneXpert, der nur MTBC nachweist. Während die Mikroskopie keine Differenzierung erlaubt und die Kultur mehrere Wochen bis zum Wachstum benötigt, verzögert das Fehlen eines internen molekularen Nachweises für NTM die Diagnosestellung zusätzlich [3]. Die Arbeit prüft, ob die RT-PCR Geräte geneLEAD VIII und STANDARD M10, MTBC und NTM direkt aus klinischen Proben zuverlässig detektieren können und welche Nachweisgrenzen im Vergleich zur bestehenden Diagnostik erreicht werden.

3. Ziele und Fragestellungen

Ziel 1: Evaluation der RT-PCR Geräte geneLEAD VIII und STANDARD M10 hinsichtlich Sensitivität, Spezifität und Nachweisgrenze, um das besser geeignete Gerät für den laborinternen Einsatz und die Optimierung der Diagnostik von MTBC und NTM zu bestimmen.

Fragestellungen:

1. Welches der beiden RT-PCR Geräte bietet die höhere Sensitivität, Spezifität und Übereinstimmung mit dem Goldstandard bei der Detektion von MTBC und NTM?
2. Wie unterscheidet sich die Nachweisgrenze der beiden Geräte bei der Detektion von MTBC, NTM und MAC, basierend auf der durchgeführten Verdünnungsreihe?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Für den Methodenvergleich wurden 39 Patientenisolate aus Sputum, Bronchoalveoläre Lavage, Bronchialsekret, Gewebe, Lymphknoten und Magensaft untersucht. Zusätzlich kamen Verdünnungsreihen mit den Referenzstämmen M. *bovis* (MTBC), M. *abscessus* (NTM) und M. *intracellulare* (MAC) zum Einsatz. Die Patientenisolate wurden mit dem BD MycoPrep™-Kit vorbehandelt, um Begleitflora zu dekontaminieren, Mykobakterien zu stabilisieren und das Probenvolumen zu erhöhen, sodass Messungen auf beiden Geräten möglich waren. Die Analysen erfolgten parallel auf dem geneLEAD VIII mit 200µl Probenvolumen, einer Laufzeit von 120 Minuten und dem Nachweis von MTBC, NTM und MAC, sowie auf dem STANDARD M10 mit 1400µl Probenvolumen, einer Laufzeit von 77 Minuten und dem Nachweis von MTBC und NTM, wobei MAC nicht separat, sondern innerhalb der NTM-Gruppe erfasst wird. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden serielle Verdünnungen bis 1:10’000 in negativem Sputum durchgeführt. Als etablierte Referenzmethode für MTBC diente der GeneXpert.

5. Ergebnisse/ Resultate

Die Bewertung von Sensitivität, Spezifität und Übereinstimmung mit dem Goldstandard erfolgte anhand einer Konfusionsmatrix.

Tabelle 1: Konfusionsmatrix Vergleich geneLEAD VIII und Goldstandard (Gloor, 2025)

Goldstandard	geneLEAD VIII: Positiv	geneLEAD VIII: Negativ	
Positiv	22	3	25
Negativ	4	10	14
	26	13	39

Sensitivität: **88.00%** Positiver prädiktiver Wert (PPV): **84.62%**
Spezifität: **71.43%** Negativer prädiktiver Wert (NPV): **76.92%**

Tabelle 2: Konfusionsmatrix Vergleich STANDARD M10 und Goldstandard (Gloor, 2025)

Goldstandard	STANDARD M10: Positiv	STANDARD M10: Negativ	
Positiv	24	1	25
Negativ	0	13	13
	24	14	38

Sensitivität: **96.00%** Positiver prädiktiver Wert (PPV): **100.00%**
Spezifität: **100.00%** Negativer prädiktiver Wert (NPV): **92.86%**

Die Nachweisgrenze ergab sich aus der höchsten Verdünnungsstufe, in der noch ein positives Signal detektiert werden konnte.

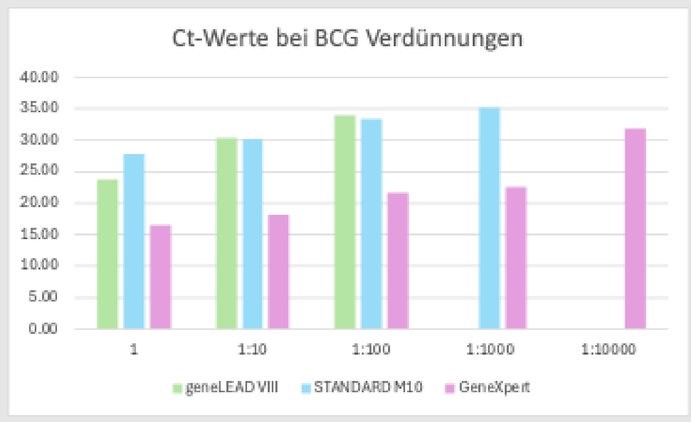


Abb. 1: Ct-Werte von geneLEAD VIII, STANDARD M10 und GeneXpert bei einer BCG Verdünnungsreihe (Gloor, 2025)

NTM-Verdünnungsreihe: Bei M. abscessus detektierte der STANDARD M10 bis 1:100, während der geneLEAD VIII ab 1:10 keine Signale mehr detektierte.

MAC-Verdünnung: Bei M. intracellulare erreichten beide Geräte eine Nachweisgrenze bis 1:10’000, in der zusätzlichen Verdünnungsstufe 1:100’000 erfasste nur der geneLEAD VIII noch ein positives Signal.

6. Diskussion

Der STANDARD M10 zeigte die höchste diagnostische Genauigkeit und eine gute Übereinstimmung mit dem Goldstandard. Der geneLEAD VIII war hingegen anfälliger für Fehlbefunde bei NTM, was auf unspezifische Amplifikationen, Kontaminationen, geringer Erregermenge, Inhibitoren oder Unterschiede in der Extraktion zurückzuführen sein könnte. Die Verdünnungsreihe bestätigen diese Unterschiede. Der GeneXpert war bei MTBC am sensitivsten, der STANDARD M10 bei NTM und der geneLEAD VIII beim MAC. Damit variiert die Leistungsfähigkeit je nach Zielorganismus, und die Wahl des Gerätes sollte sich am Erregerprofil, dem klinischen Kontext und den Bedingungen im Labor orientieren. Der STANDARD M10 stellt dabei eine zuverlässige Option für die Routinediagnostik von MTBC und NTM dar.

Referenzen

[1] Bange, F.-C., Hahn, H., Kaufmann, S. H. E., Lange, C., & Ulrichs, T. (2020). Mykobakterien. In S. Suerbaum, G.-D. Burchard, S. H. E. Kaufmann, & T. F. Schulz (Hrsg.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (S. 447-465). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-61385-6_42 Bundesamt für Gesundheit BAG. (2025). *Zahlen zur Infektionskrankheit*. https://www.bag-ad-min.ch/bag/de/home/zahlen-und-statistiken/zahlen-zu-infektionskrankheiten.html

[2] Daley, C. L. Iaccardino, J. M., Lange, C., Cambau, E., Wallace, R. J. Andrejak, C., Böttger, E. C.,Brozek, J.,Griffthi, D.E.,Guglielmetti, L.,Huitt,G. A., Knight, S. L., Leitman, P., Marras, T.K., Oliver, K.N., Santin, M., Stout, J. E., Tortoli, E., Van Ingen, J., Winthrop, K.L. (2020) Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary diseade

[3] Richter, E., Andres, S., & Diel, R. (2019). *Tuberkulose, Mykobakteriose* (3.Auflage). Elsevier.

Tabellen

Tabelle 1: Konfusionsmatrix Vergleich geneLEAD VIII und Goldstandard (Gloor, 2025)
Tabelle 2: Konfusionsmatrix Vergleich STANDARD M10 und Goldstandard (Gloor, 2025)

Abbildungen

Abb.1: Ct-Werte von geneLEAD VIII, STANDARD M10 und GeneXpert bei einer BCG Verdünnungsreihe (Gloor, 2025