

Aus dem Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Laboratoriumsmedizin
der Lungenklinik Heckeshorn – jetzt: Helios Klinikum Emil von Behring

DISSERTATION

**Entwicklung einer gattungsspezifischen PCR für Mykobakterien
mit speziesspezifischer Detektion durch Restriktions-Endonukleasen
anhand des 16S-23S rDNA Gen Spacers**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –

Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Streubel

aus Zürich

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Mauch

 2. Prof. Dr. med. D. H. Krüger

 3. Prof. Dr. R. Burger

Datum der Promotion: 21.11.2008

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Einleitung	7
1.1.	Mykobakterien	7
1.1.1.	Morphologisch-chemische Eigenschaften	7
1.1.2.	Epidemiologie	9
1.1.3.	Klinische Aspekte	11
1.2.	Konventionelle Diagnostik von Mykobakterien	16
1.2.1.	Mikroskopie	16
1.2.2.	Kultur	17
1.2.3.	Biochemische und chemotaxonomische Verfahren	18
1.2.4.	High Performance Liquid Chromatography	19
1.3.	Molekulargenetische Methoden zum Nachweis von Mykobakterien	20
1.3.1.	Genamplifikation	20
1.3.2.	Die Sequenzierung des 16S-rDNA-Gens	21
1.3.3.	Andere Methoden anhand alternativer Zielsequenzen	22
1.4.	Fragestellung	23
2.	Material / Methoden	25
2.1.	Bakterienstammsammlung	25
2.1.1.	Identifikation der klinischen Isolate	29
2.1.1.1.	Kultur und konventionelle Methoden	29
2.1.1.2.	Sequenzierung des 16S-rDNA-Gens sowie 16S-23S Gen-Spacers	29
2.2.	Material	30
2.2.1.	Nährmedien	30

2.2.2.	Reagenzien	30
2.2.3.	PCR-Reaktionsansatz (Master-Mix)	32
2.2.4.	Pipetten, Spritzen und Röhren	33
2.2.5.	Geräte und Filme	33
2.3.	DNA-Gewinnung	34
2.4.	Amplifikation des 16S-23S rDNA Spacers	34
2.4.1.	Primer	34
2.4.2.	Polymerasekettenreaktion	34
2.5.	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus	35
2.5.1.	Verwendete Enzyme	35
2.5.2.	Verdauung der PCR-Produkte mittels Endonukleasen	36
2.6.	Nachweis der Amplifikate durch Gelelektrophorese	36
2.6.1.	Nachweis der PCR-Produkte	36
2.6.2.	Nachweis der verdauten PCR-Produkte	36
2.7.	Aufnahme von Nukleotide sequence accession numbers	37
3.	Ergebnisse	38
3.1.	Qualitätskontrolle	38
3.1.1.	Positivkontrollen	38
3.1.2.	Negativkontrollen	38
3.2.	Spezifität der Primer für den 16S-23S rDNA Spacer	38
3.3.	Spezifität der RFLP Muster	38
3.4.	Reklassifizierung von vier Referenzstämmen	43
3.5.	Taxonomisch unklare Stämme	43
3.5.1.	Schnell wachsende Mykobakterien	43
3.5.2.	Langsam wachsende Mykobakterien	44
3.6.	Intraspezies Stabilität von Spacersequenzen	49

3.7.	Abgrenzung der Spezies <i>Gordona terrae</i> von Mykobakterien durch die Endonuklease Hae III	53
4.	Diskussion	54
4.1.	Notwendigkeit einer breiten Auswahl von Isolaten für die Realibilität von Primern und des Algorithmus	54
4.2.	Die Auswahl der Primer	54
4.2.1.	Genusspezifität	54
4.2.2.	Die Unterscheidung zwischen schnell wachsenden und langsam wachsenden Mykobakterien	55
4.3.	Intraspeziesstabilität der RFLP Muster von langsam wachsenden Mykobakterien im Vergleich zum hsp65 Gen	55
4.4.	Intraspeziesstabilität der RFLP Muster von schnell wachsenden Mykobakterien	56
4.5.	Vor- und Nachteile der Methode im Vergleich zum hsp65 Gen	57
4.6.	Die Bedeutung der RFLP Methode in Bezug auf die mykobakterielle Taxonomie	58
5.	Zusammenfassung	60
6.	Literatur	62
7.	Anhang	77
	Danksagung	78
	Eidesstattliche Erklärung	79
	Curriculum Vitae	80
	Publikationsliste	81

Abkürzungsverzeichnis

7H11	flüssiges Kulturmedium mit Nährstoffen und Antibiotika
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Mikrobiologie und Hygiene
DIN	Deutsches Institut für Normung
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
HLPC	High Liquid Performance Chromatography
Hsp 65	Heat Shock Protein
KBE	Koloniebildene Einheiten
LiPA	Line Probe Assay
M.	Mycobacterium
MAC	M. avium complex
Mgo	M. gordonae
MiQ	Mikrobiologische-Infektiologische Qualitätsstandards
Mka	M. kansasii
NAP	Nitroacetyl-glycerinaminohydroxypropriophenon
NTM	Nicht-tuberkulöse Mykobakterien
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCR-Tube-Strips	Kunststoff-Mehrfachreagiergefäße für PCR-Verfahren: ein Strip besteht aus Mikroreagiergefäßen (Tube, je 0,2 ml) die durch Kunststoffbrücken verbunden sind
Positivkontrolle	genomische DNA zur Amplifikationkontrolle
RFLP	RestriktionsFragmentLängenPolymorphismus

1. Einleitung

1.1. Mykobakterien

Das Genus *Mycobacterium* ist durch eine große Vielfalt an Spezies repräsentiert. Die Gattung bildet eine heterogene Gruppe bezüglich ihres Auftretens in klinischem Material, der Umwelt, komplexer phenotypischen bzw. genetischer Daten und ihrer Assoziation mit Krankheiten [Shinnick et al. 1994, Wallace et al. 1994]. Der generische Name *Mycobacterium* (griech. myces = Pilz) leitet sich vom pilzartigen Wachstum auf der Oberfläche von Flüssigkulturen ab [Lehmann et al. 1896].

1.1.1. Morphologisch-chemische Eigenschaften

Die säurefesten, obligat aeroben Stäbchen des Genus *Mycobacterium* sind weder beweglich noch sporenbildend, sie haben keine Kapseln und variieren bzgl. ihrer Grösse zwischen 0,2 – 0,6 x 1-10 µm. Im Kulturmedium zeigen die Bakterien Formen von kokkoid bis filamentös, gekrümmt oder gerade. Die Koloniemorphologie variiert unter den einzelnen Spezies; imponiert *M. tuberculosis* mit rauhen Kolonien, bei denen sich die Bacilli zopfartig zusammenfügen, bildet *M. avium* complex (*M. avium*, *M. intracellulare*) weiche transparente Kolonien und auch rauhe Koloniemuster. *M. kansasii* nimmt eine Zwischenposition unter den eben genannten Beispielen ein. Die optimalen Wachstumsbedingungen in vitro sind bzgl. der Umgebungstemperatur unterschiedlich und variieren zwischen 28 °C und 45 °C. Die meisten Spezies wachsen jedoch bei 35-37 °C und bei Zugabe einfacher Substrate wie Aminosäuren als Stickstoffquelle und Glycerol als Kohlenstoffquelle zuzüglich Mineralsalzen. Eine mit 5-10 % CO₂ angereicherte Atmosphäre fördert das Wachstum bei allen Mykobakterien [Beam et al. 1968]. *M. leprae* ist als einzige Spezies außerhalb lebender Zellen noch nicht kultivierbar gewesen. Die Wachstumsraten für Mykobakterien sind langsam und die Teilungsrate beträgt 2 bis 20 Stunden. Deshalb sind Kolonien erst nach zwei Tagen bis acht Wochen Inkubationszeit, abhängig von den verschiedenen Spezies erkennbar. Hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit und der Pigmentierung sind neben den Mitgliedern von *M. tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* und *M. africanum*), welche langsam wachsend und nicht pigmentiert sind, die anderen Mykobakterien in vier Gruppen eingeteilt worden [Runyon 1959]:

photochromogene Mykobakterien (Bildung von gelbem Pigment bei Licht)
 scotochromogene Mykobakterien (Bildung von gelbem Pigment im Dunkeln)
 nicht-chromogene Mykobakterien und
 schnell wachsende Mykobakterien.

Diese Einteilung ist weniger von taxonomischer als von klinisch-historischer Bedeutung.

Die Mykobakterien werden aufgrund ihrer Säurefestigkeit, der Präsenz von Mykolsäuren und des hohen Gehalts an G+C in ihrer DNA als Mykobakterien klassifiziert. Diese Kriterien gelten derzeit als minimaler Standard für die Zuordnung einer Spezies zum Genus *Mycobacterium* [Levy-Frebault et al. 1992].

Der hohe Lipidgehalt der Zellwand widersteht den üblichen Anilinfärbungen. Mykobakterien sind durch die Gramfärbmethode kaum erkennbar anfärbbar, gelten aber als grampositiv.

Die lipidreiche Zellwand (bis 60 % der Trockensubstanz) wird von innen nach außen durch drei Strukturelemente aufgebaut [Mc Neil et al. 1996]:

- Peptidoglykane, mykobakterielles Murein, welche N-glycolyl Muraminsäure, statt des in anderen Genera vorkommende N-acetylanalogums, enthalten. Sie sind für Rigidität und Form verantwortlich. Über ein Disaccharid kovalent verbunden sind Peptidoglykane mit
- Arabinogalaktan, einem komplexen Polysaccharid. Ebenfalls kovalent gebunden folgen die
- Mykolsäuren. Diese 60 - 90 C-Atome langen, gesättigten Fettsäuren machen etwa die Hälfte der Lipide aus. Sie finden sich ausser in der Zellwand von Mykobakterien nur noch bei Nocardien und Corynebakterien

Aus dem Aufbau der Zellwand ergeben sich charakteristische Eigenschaften:

- hohe Resistenz gegen Umwelteinflüsse
 - (i) intrazellulären Abbau nach Phagozytose, (ii) Austrocknung: Die Bakterien können (z.B. nach Aushusten) monatelang im Staub überleben. (iii) Niedrige Temperaturen. Unter Aufbewahrung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bleiben Mykobakterien monatelang vermehrungsfähig. Thermische Energie hingegen ($>65\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30min) tötet sie sicher ab. (iv) Antibiotika
- Säurefestigkeit. Werden Mykobakterien mit Farbstoffen wie Karbolfuchsin oder Auramin angefärbt, geben sie diese auch nach Behandlung mit einem Säure-

Alkoholgemisch nicht wieder ab. Säurefestigkeit ist nicht spezifisch für Mykobakterien und findet sich partiell auch z.B. bei *Gordonia*, *Nocardien*, *Rhodococcus* und *Tsukamurella*. Schnell wachsende Arten können weniger als 10% säurefest sein.

- Langsame Reproduktion. Die Verdopplungszeit liegt zwischen 12 bis etwa 24 Stunden für die langsam wachsenden Mykobakterien [Murray 1998].

1.1.2. Epidemiologie

Tuberkulose. Ungefähr 32% (1,86 Milliarden Menschen) der Weltpopulation sind mit *M. tuberculosis* dem Krankheitserreger infiziert [Kunitz et al. 2007]. Jedes Jahr entwickeln ca. 5-10 % dieser infizierten Personen eine aktive Tuberkulose und fast 2 Millionen von diesen werden an der Erkrankung sterben [Dye C. et al. 1999, Kunitz et al. 2007]. Während die Inzidenzraten der Tuberkulose in Westeuropa einschließlich Deutschland seit etwa der industriellen Revolution kontinuierlich sinken [Bericht Robert Koch Institut Berlin 2004] (ausgenommen der beiden Weltkriege), ist in den USA diese Entwicklung in den späten 80iger Jahren eine Plateauphase übergegangen, um seit 1989 wieder anzusteigen [Bloom et al. 1992, Rieder et al. 1995, CDC 2007].

Hauptendemiegebiete sind Südostasien und die Sub-Sahara Region, unterdessen nehmen auch die Meldungen von Tuberkulose Fällen aus den neuen unabhängigen Staaten der ehemaligen Sowjetunion erheblich zu [Keshavjee et al. 1999, Dye et al. 1999, Kunitz et al. 2007, Loddenkemper et al. 2007].

Als Ursachen für den Anstieg der weltweiten Tuberkulose-Inzidenz werden u. a. sozioökonomische Faktoren wie Armut und Obdachlosigkeit [Haddad et al. 2005], die Zunahme von intravenös injizierenden Drogenabhängigen und die zunehmende Migration zwischen Staaten mit hoher und niedriger Tuberkulose-Inzidenz. verantwortlich gemacht [Bloom et al. 1992, Kunitz et al. 2007]. Als die wichtigste Ursache für die Zunahme der Tuberkulose gilt jedoch die HIV-Epidemie und die resultierende Immunschwäche bei HIV-Patienten [Dooley et al. 1992, Enarson et al. 1996, De Cock et al. 1999, Dye et al. 1999, WHO 2006]. Eine Infektion mit dem HI-Virus gilt als größter Risikofaktor für *M. tuberculosis*-Infizierte eine manifeste Tuberkulose zu entwickeln [Markowitz et al. 1997, CDC 2007].

Ein besonders schwerwiegendes Problem stellt die Zunahme medikamentenresistenter Tuberkulosestämme dar [Cox et al. 2006, Kunitz et al. 2007, Loddenkemper et al. 2007].

Infektionen durch Nicht-Tuberkulöse Mykobakterien.

Die Nicht-Tuberkulösen Mykobakterien (NTM) bzw. sog. „atypischen“ Mykobakterien beinhalten die mykobakteriellen Spezies, welche keine Mitglieder des *M. tuberculosis* complex sind. Mit Abnahme der Inzidenz der Tuberkulose, wurde Infektionen durch NTM zunehmend mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Aufgrund ihrer Relevanz in der Klinik und damit ihrer Rolle als ernstzunehmende Krankheitserreger, erhält die Untersuchung der NTM in Bezug auf ihre Epidemiologie, Pathogenität, Taxonomie und Molekulargenetik einen zunehmend wachsenden Stellenwert [Wolinsky 1979, Davidson 1981, Falkinham 1996, David et al. 2007].

Ein entscheidender Einschnitt bezüglich der Inzidenz von NTM war der Einbruch der AIDS Epidemie. Seit ersten Berichten über die Erkrankung durch NTM in AIDS Patienten 1982 [Zakowski 1982], haben sowohl die Inzidenz als auch die Prävalenz der Mykobakteriosen kontinuierlich zugenommen [Pitchenik et al. 1988, O'Brian 1989, Schönfeld et al. 1999, David et al. 2007].

Vor dem Beginn der AIDS-Epidemie äußerte sich die NTM hauptsächlich als pulmonale Erkrankung, als cervikale Lymphadenitis oder beschränkte sich auf granulomatöse Erkrankungen der Haut. Nur selten fanden sich disseminierte Verläufe. Die bedeutsamsten pathogenen Erreger sind *M. kansasii*, *M. avium* und *M. intracellulare*, seltene nicht pulmonale Infektionen durch *M. scrofulaceum* oder *M. marinum* wurden als cervikale Lymphadenitis bei Kindern beschrieben bzw. manifestierten sich an der Haut [Zeligman et al. 1972, Wolinski 1979, David et al. 2007].

Das Auftreten der AIDS-Epidemie hatte starke Auswirkungen auf das Bild der „atypischen“ Mykobakteriosen [Selik et al. 1987, Young et al. 1988, Benson 1994, Horsburgh 1996, David et al. 2007]. Das Gewicht der Erkrankung verlagerte sich auf die disseminierte Form, wie sie hauptsächlich, im Gegensatz zu immunkompetenten, bei immungeschwächten Patienten vorkommt. *M. avium* complex (MAC) ist die häufigste nicht-tuberkulöse Mykobakterienspezies, welche mit Erkrankungen beim Menschen mit AIDS assoziiert ist [Inderlied C. B. 1993, David et al. 2007]. MAC beinhaltet zwei klar definierte Spezies *M. avium* und *M. intracellulare* mit insgesamt 28 Seroagglutinationstypen, wobei aus taxonomischer Sicht von einer dritten Spezies ausgegangen wird [Wayne et al. 1991, Turenne et al. 2007]. Als „Komplex“ werden hierbei zwei oder mehrere Spezies verstanden, deren Unterschied von geringer oder keiner klinischen Relevanz sind oder Spezies zusammengefasst, die phenotypisch nicht oder kaum unterscheidbar sind.

Die Häufigkeit der *M. avium*- und *M. intracellulare*-Isolate ist unterschiedlich in AIDS- und nicht mit AIDS erkrankten Patienten. Ungefähr 90 % der *M. avium*-Isolate von AIDS-Patienten wurden mittels DNA-Sonden als *M. avium* identifiziert, weiterhin wurden jedoch ca. 40% der *M. avium* complex-Isolate von nicht mit AIDS erkrankten Patienten als *M. intracellulare* abgegrenzt [Drake et al. 1988, Guthertz et al. 1989]. Dadurch lässt sich der verhältnismäßige Rückgang von Infektionen durch die vorher häufiger vorkommenden Spezies wie z. B. *M. kansasii* und *M. intracellulare* erklären [Young et al. 1986]. Die Inzidenz letzterer ist jedoch nicht zurückgegangen, sondern wird nur durch die große Anzahl der AIDS-assoziierten *M. avium*-Infektionen überlagert [Falkinham 1996].

Sowohl bei Patienten mit aber auch ohne AIDS werden dabei von den 28 Seroagglutinationstypen vor allem die Serovare 8, 4, 1 und 9 von *M. avium* gefunden [Tsang et al. 1992]. *M. kansasii* steht an zweiter Stelle der Häufigkeit, allerdings kann die Verteilung der verschiedenen Spezies regional sehr unterschiedlich sein [Schönfeld et al. 1996]. Es wurden weiterhin auch viele andere Spezies für wichtige Infektionen durch Mykobakterien in AIDS Patienten verantwortlich gemacht [Wayne et al. 1992]. Darüber hinaus werden fortwährend neue Spezies beschrieben und mit Erkrankung am Menschen assoziiert [Butler et al. 1993, Springer et al. 1993 und 1995, Tortoli et al. 1996, Schröder et al. 1997, Reischl et al. 1998, Torkko et al. 2000, Roth et al. 2001, Tortoli et al. 2001, Tortoli et al. 2003].

Aufgrund der Auswirkungen der nicht-tuberkulösen Mykobakterien auf die Morbidität und Mortalität von AIDS-Patienten und der allgemeinen Zunahme der Erkrankung durch NTM, wird die Erforschung von deren Epidemiologie, Taxonomie und Molekulargenetik und die Suche nach schnellen Identifizierungsmöglichkeiten zunehmend gefordert [Falkinham 1996, Mauch et al. 1999, Katoch et al. 2003].

1.1.3. Klinische Aspekte

Mykobakterien sind weiterhin eine wichtige Ursache von Morbidität und Mortalität, vor allem in Ländern mit limitierten medizinischen Versorgungsmöglichkeiten und bei immunsupprimierten Patienten. In Entwicklungsländern werden nicht-tuberkulöse Mykobakterien im Gegensatz zur Tuberkulose selten gefunden. Sie sind jedoch ganz im Gegenteil dazu in den Industrieländern häufiger nachgewiesen. Sowohl die Inzidenz als auch die Prävalenz der Erkrankungen durch nicht-tuberkulöse Mykobakterien sind in den letzten Jahren stetig angestiegen [Schönfeld 1999, Katoch et al. 2003]. Zur Zeit sind über 130 mykobakterielle Spezies identifiziert worden, 42 neue Spezies allein seit 1990; davon werden 24 langsam wachsende und 8 schnell wachsende Mykobakterien mit

Erkrankung am Menschen assoziiert [Wallace 1994, Tortoli et al. 2003, Turenne et al. 2004, DSMZ 2007]. Trotz der großen Zahl an mykobakteriellen Spezies, ist die Majorität klinischer Isolate von nicht-tuberkulösen Mykobakterien, wie z..B *M. gordonae* oder einigen schnell wachsenden Mykobakterien, nicht pathogen oder von zweifelhafter klinischer Relevanz [De Beenhouwer et al. 1995, Falkingham 1996]. Für mehr als 95 % aller Infektionen am Menschen sind nur sieben Spezies oder Gruppen verantwortlich: *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* und *M. abscessus* [Murray 1998], hinzukommen *M. malmoense*, *M. xenopi* und etwas seltener *M. marinum*.

Die häufigsten Erscheinungsformen nicht-tuberkulöser Mykobakteriosen stellen Lungen-erkrankungen, Lymphadenitiden, disseminierte Erkrankungen und Weichteilinfektionen dar. Bei pulmonaler Manifestation sind verschiedene Gruppen voneinander abzugrenzen [Schönfeld 1996]:

- Patienten mit vorbestehender Lungenkrankheit wie z.B. Pneumokoniose oder chronischer Bronchitis u.a. [Wolinski 1992, David et al. 2007]
- systemischer Abwehrschwäche (AIDS, Diabetes mellitus, therapeutische Immunsuppression, Kollagenosen) oder auch
- Patienten ohne erkennbare resistenzmindernde Grundkrankheit, z.B. hohes Alter [Kennedy et al. 1994].

Dem disseminierten Befall liegt fast immer eine Immunschwäche zugrunde, hier ist an erster Stelle AIDS zu nennen. Als Eintrittspforte kommen hier die Lungen, der Gastrointestinaltrakt oder die Haut oder alle drei Organe in Frage [Falkinham 1996, David et al. 2007].

***M. avium* complex (MAC)**

M. avium complex (MAC) verursacht bei immunkompetenten Patienten hauptsächlich pulmonale Infektionen, welche sich klinisch ähnlich wie eine blande Form einer Tuberkulose präsentieren [Inderlied et al. 1993]. Disseminierte Erkrankungen sind bei AIDS-Patienten progredient und durch intermittierendes Fieber, Gewichtsverlust und Schwäche charakterisiert. Bei nicht HIV-Infizierten ist die disseminierte Form eine Rarität, hämatologische Neoplasien, angeborende Immundefekte, zytostatische Chemotherapie oder andere immunsuppressive Therapien sind dann meist die Ursache für die zugrundeliegende Abwehrschwäche [Horsburgh et al. 1985]. Bei Kindern zwischen ein

und fünf Jahren werden granulomatöse Lymphadenitiden in etwa zwei Dritteln durch *M. avium* complex verursacht [Colville 1993].

M. kansasii

Die Breite der Klinik bezüglich Infektionen durch *M. kansasii* gleicht denen durch *M. avium*, eine höhere Inzidenz pulmonaler Manifestation findet sich in zentralen Bereichen der USA, Lymphadenitiden und Hautprozesse durch *M. kansasii* sind jedoch seltener [Wolinski 1992].

Weitere Mykobakterienspezies

Aus der *photochromogenen* Gruppe ist *M. marinum* als typischer Erreger für Hautinfektionen und Osteomyelitiden bekannt [Collins et al. 1985]. Von Infektionen durch *M. simiae* und *M. asiaticum* wurde nur in Einzelfällen berichtet [Blacklock et al. 1983, Woods et al. 1987]. Über die relativ neu identifizierte Spezies *M. intermedium* kann klinisch noch nichts genaueres gesagt werden [Meier et al. 1993].

Als Vertreter der *skotochromogenen* Gruppe verursacht *M. xenopi* fast ausschließlich pulmonale Erkrankungen [Wayne et al. 1992], *M. scrofulaceum* steht als Erreger von kindlichen *Lymphadenitiden* hinter *M. avium* an zweiter Stelle [Inderlied 1993].

M. szulgai-Infektionen können zur Lungenerkrankung bei fast ausschließlich männlichen Patienten im mittleren Alter führen [Maloney et al. 1987]. *M. interjectum* wurde z. B. von einem Patienten mit chronischer Lymphadenitis isoliert [Springer et al. 1993]. Eine der neueren identifizierten Spezies *M. heckeshornense* verursachte eine schwere bilaterale kavernöse Lungenerkrankung bei einer immunkompetenten jungen Frau [Roth et al. 2001].

Sowohl pulmonale Mykobakterien als auch Lymphadenitiden, welche durch die *nonphotochromogene* Spezies *M. malmoense* ausgelöst werden, werden vornehmlich aus Großbritannien berichtet und entwickelten sich häufig auf dem Boden einer chronischen Bronchitis [Jenkins et al. 1985, France et al. 1987, Research Committee British Thoracic Society 2003]. Infektionen durch *M. haemophilum* betreffen sehr häufig Aids-Patienten oder Organtransplantatempfänger, klinisch imponieren fast ausschließlich disseminierte Hautgranulome, nur selten führt die Infektion zur cervikalen Lymphadenitis [Wayne et al. 1992, Strauss et al. 1994]. *M. shimoidei* war in einigen Berichten für eine pulmonale Mykobakteriose verantwortlich gemacht worden [Rüsch-Gerdes 1985, Schönfeld et al.

1994]. Disseminierte Infektionen durch *M. genavense* sind von denen durch *M. avium* complex klinisch nicht zu unterscheiden [Böttger et al. 1992, Falkinham 1996]. Die eng verwandten Spezies *M. celatum* und *M. branderi* sowie *M. conspicuum* gehören zu den neuer identifizierten *nonchromogenen* Spezies, deren Verbreitung und Pathogenität noch nicht eindeutig geklärt sind [Brander et al. 1992, Butler et al. 1993, Springer et al. 1995].

Schnell wachsende Mykobakterien gewinnen bezüglich ihrer Pathogenität beim Menschen zunehmend an Bedeutung. Für fast alle Erkrankungen, welche durch schnell wachsende Mykobakterien hervorgerufen werden, sind drei Spezies verantwortlich: *M. fortuitum*, *M. chelonae* und *M. abscessus* [Wallace 1994]. Die Erkrankungstypen beinhalten Haut- und Weichteilinfektionen, welche durch Verletzungen entstehen, Osteomyelitiden, disseminierte Infektionen, chronische pulmonale Prozesse, Otitis media u.a. [Wallace et al. 1983]. Als weitere potentiell pathogene Spezies unter den schnell wachsenden Mykobakterien ist *M. smegmatis* zu nennen, welche fast ausnahmslos zu posttraumatischen Weichteilinfektionen führt, als Rarität wurde jedoch eine Infektion mit einer pulmonalen Manifestation beschrieben [Wallace et al. 1988, Schreiber et al. 2001].

Die kombinierte Chemotherapie der nicht-tuberkulösen Mykobakteriosen gilt wie bei der Tuberkulose als Therapiebasis, die Behandlungsmöglichkeiten variieren jedoch erheblich unter den einzelnen Spezies (Tab. 2). *M. kansasii* ist z. B wesentlich leichter zu behandeln als *M. avium* complex, schnell wachsende Mykobakterien sind sehr schwer therapierbar und sind gegen alle Erstrangmittel resistent. Neben den klassischen Antituberkulotika stellen zunehmend neuere Makrolide, Chinolone oder Tetracykline eine interessante Alternative dar [Schönfeld 1996].

Tab. 1
Klassifikation von pathogenen Mykobakterien am Menschen
(modifiziert nach [Murray 1998])

Mikroorganismus	Pathogenität	Mikroorganismus	Pathogenität
<i>M.tuberculosis complex</i>		<i>Runyon Gruppe III</i>	<i>nicht chrom.</i>
M. tb	obligat	M. avium (MAC)	Häufig
M. leprae	obligat	M. intracellulare	häufig
M. africanum	obligat	M. genavense	nicht häufig
M. bovis	obligat	M. haemophilum	nicht häufig
M. ulcerans		M. malmoense	selten
<i>Runyon Gruppe I</i>	<i>photochrom.</i>	M. shimoidei	selten
M. kansasii	häufig	M. celatum	selten
M. marinum	häufig	M. branderi	selten
M. simiae	nicht häufig	<i>Runyon Gruppe IV</i>	<i>schnell wachsend</i>
M. asiaticum	selten	M. fortuitum	häufig
M. intermedium	selten	M. chelonae	häufig
<i>Runyon Gruppe II</i>	<i>scotochrom.</i>	M. abscessus	häufig
M. szulgai	nicht häufig	M. mucogenicum	nicht häufig
M. scrofulaceum	nicht häufig	M. peregrinum	selten
M. heckeshornense	nicht häufig	M. smegmatis	selten
M. xenopi	nicht häufig		
M. lentiflavum	selten		
M. interjectum	selten		

Tab. 2

Therapeutische Einteilung ubiquitärer Mykobakterien nach Bailey (modifiziert nach Bailey)	
Klasse 1 (therapeutisch unkompliziert)	Klasse 2 (therapeutisch kompliziert)
M. kansasii	M. avium complex
M. xenopi	M. celatum
M. szulgai	M. scrofulaceum
M. marinum	M. simiae
	M. fortuitum
	M. chelonae
	M. abscessus
	M. peregrinum

1.2. Konventionelle Diagnostik von Mykobakterien

1.2.1. Mikroskopie

Da die Anzucht von pathogenen Mykobakterien auf herkömmlichen Kulturmedien einige Wochen dauern kann, hat die Mikroskopie zur Erlangung einer vorläufigen Diagnosestellung und der Einschätzung des Krankheitswertes große Bedeutung [Grange 1996]. Die mikroskopische Untersuchung auf säurefeste Stäbchen kann vor oder nach der dekontaminierenden Aufarbeitung erfolgen. Die Präparate werden nach der Ziehl-Neelsen-Methode angefärbt oder bevorzugt jedoch mit der [DIN Teil 32, 1980-2007; Kent et al. 1985] Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Der einerseits teureren Methode wird von einigen Autoren geringere Spezifität nachgesagt, sie zeigt andererseits positive Ergebnisse bei niedrigerer Keimzahl [Grange 1996]. Andere nicht mykobakterielle Mikroorganismen, welche Säurefestigkeit aufweisen (z.B. Kryptosporidien und Nocardien), können morphologisch von Mykobakterien abgegrenzt werden, die morphologische Differenzierung zwischen *M. tuberculosis* und nicht tuberkulösen Mykobakterien hingegen ist nicht sicher möglich [Salfinger und Kafader 1992].

Eine negative mikroskopische Untersuchung besagt nicht, dass keine Mykobakterien in dem Material vorhanden sind, da erst ab einer Konzentration von 10^{4-5} Bakterien pro ml Untersuchungsmaterial ein säurefestes Stäbchen pro Gesichtsfeld zu erkennen ist [DIN Teil 9 und 32, 1980-2007; Hahn et al. 2005].

1.2.2. Kultur

Die definitive Diagnose der Mykobakteriose erfolgt durch die Kultur. Obwohl die meisten Mykobakterien auf einfachen synthetischen Kulturmedien wachsen, werden zur Primärisolation komplexere Medien empfohlen, welche idealerweise folgende Bedingungen erfüllen sollten [Kent et al. 1985; DIN Teil 3, 1980-2007]:

- kleinste Mengen von Mykobakterien sollte ein schnelles und komfortables Wachstum gewährleistet sein
- vorläufige Identifizierung anhand von Pigmentbildung und Koloniemorphologie
- Inhibition des Wachstums von Kontaminanten
- Ökonomische und einfache Herstellung
- Ermöglichung zur Antibiotika-Empfindlichkeits-Testung.

Kulturmedien

Solide Kulturmedien beruhen entweder auf Ei- oder Agarbasis. Sie enthalten Malachitgrün zur Unterdrückung von kontaminierenden Bakterien.

Nährböden auf Ei-Basis

Sie umfassen neben Vollei oder Eigelb Kartoffelmehl, Elektrolyte und Glycerol (z.B. Löwenstein-Jensen-Medium). Darüber hinaus neutralisieren Phospholipide und Proteine Stoffe, die für Mykobakterien toxisch sind. Erkennbare Kulturen erscheinen im Durchschnitt nach 18-24 Tagen.

Nährböden auf Agarbasis

Auf den transparenten Nährmedien können Kolonien ca. nach 10 bis 12 Tagen beobachtet werden. Noch früher gelingt der Nachweis der Bakterien auf dem Agar unter dem Mikroskop [Welch et al. 1993, Idigoras et al. 1995]. Weiterhin sind Nährmedien wie die Middlebrook 7H-Serie sehr gut für das Auszählen von Kolonie-bildenden-Einheiten (KBE) und für Empfindlichkeitsprüfungen geeignet.

Flüssige Medien:

Die Einführung von Flüssigkulturmedien hat die Fähigkeit, das Wachstum von Mykobakterien nachzuweisen, entschieden verbessert [Pfyffer et al. 1997].

Das BACTEC AFB¹ System ist die Weiterentwicklung der radiometrischen Detektion von Mykobakterien [Middlebrook et al. 1977]. Das MGIT™-Flüssigmedium besteht aus "modifiziertem Middlebrook 7H9", das Casein-Pepton und Glycerol enthält und wird mit

¹ Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, Md.

OADC (Dextrose, Katalase, bovines Serumalbumin und Ölsäure) angereichert [Becton Dickinson 1997]. Die Flüssigkulturen-Technik erlaubt die Erkennung des Wachstums von nicht-tuberkulösen Mykobakterien in vielen Fällen schon nach weniger als sieben Tagen. Der durchschnittliche Zeitraum zum Nachweis positiver Kulturen von *M. tuberculosis* liegt bei 9 bis 14 Tagen. Gelingt es einerseits, über die Flüssigkultur-Methode mehr positive Kulturen aus klinischem Material zu gewinnen als bei den festen Nährmedien, so gehören die fehlende Möglichkeit, die Koloniemorphologie zu beobachten, die höheren Kosten und das Überwachsen der Kultur durch Kontaminanten zu den Nachteilen des Systems [Nolte et al. 1995]. Sowohl beim BACTEC™- als auch bei dem MGIT™-System wird die Kultur im Anschluss an den Wachstumsnachweis mikroskopisch auf säurefeste Stäbchen untersucht.

1.2.3. Biochemische und chemotaxonomische Verfahren

Nachdem das Mykobakterien-Isolat zunächst auf der Basis von Wachstumskriterien einer vorläufigen Untergruppe zugeordnet werden kann (Wachstumsrate, Pigmentierung, Photoreaktivität und Temperaturbedingungen), schließen sich in der Routinediagnostik konventionelle biochemische Tests zur Identifizierung auf Spezies- oder Komplexniveau an. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über gebräuchliche biochemische Tests für unterschiedliche Mykobakterien-Gruppen. Detaillierte Beschreibungen der einzelnen Methode finden sich in den Publikationen des Deutsches Institut für Normung (DIN), Normenausschuss Medizin (NAMed) DIN 58943 [DIN Teil 32, 1980-2007] und in Public health mycobacteriology [Kent et al. 1985].

Vorteile der biochemischen Tests sind deren relativ kostengünstige Anwendung, sie sind standardisiert und gut etabliert. Andererseits führen die Methoden nur langsam zum gewünschten Ergebnis (3-6 Wochen), dabei können nicht alle Spezies voneinander unterschieden werden (z.B. *M. avium* / *intracellulare* ; *M. xenopi* / *M. celatum*).

Der BACTEC NAP Test wird zur Abgrenzung von *M. tuberculosis* complex von anderen Mykobakterien eingesetzt. Die Chloramphenicol-Vorstufe Nitroacetylaminohydroxypropionphenon (NAP) hemmt das Wachstum des *M. tuberculosis*-Komplex, nicht aber von anderen Mykobakterien. Ergebnisse werden nach vier Tagen erzielt. Als Nachteil sei hier jedoch die fehlende Differenzierung zwischen den einzelnen Spezies von *M. tuberculosis*-Komplex erwähnt.

Der BACTEC NAP Test sollte immer durch einen konventionellen biochemischen Test oder durch die Identifizierung mittels DNA-Sonde bestätigt werden.

Tab. 3

Biochemische Standardtests zur Identifizierung von Mykobakterien, eingeteilt in Gruppen [modifiziert nach Nolte 1995]	
<i>Erregergruppe</i>	<i>Biochemische Methoden</i>
M. tuberculosis complex	Niacin Akkumulation, Nitratreduktion, hitzelabiler (68°C) Katalasetest, Pyrazinamidase
Nonphotochromogene Gruppe	Nitratreduktion, Telluritreduktion, semiquantitative und hitzelabile (68°C) Katalase, Tween 80 Hydrolyse, Urease
Photochromogene Gruppe	Nitratreduktion, Tween 80 Hydrolyse, semiquantitative Katalase, Pyrazinamidase
Skotochromogene Gruppe	Nitratreduktion, Tween 80 Hydrolyse, Urease, 5 % NaCl Toleranz
Schnell wachsende Mykobakterien	Arylsulfatase (Wayne Methode), Nitratreduktion, Eisenoxidproduktion, NaCl Toleranz

Numerische Taxonomie

Bei diesem System werden die jeweiligen Eigenschaften der einzelnen Erreger dokumentiert, um dann je nach Anzahl gemeinsamer Eigenschaften, die Erreger in Gruppen zusammenfassen zu können [Sneath et al. 1973]. Dabei gehören im allgemeinen Mykobakterien mit identischen Ergebnissen > 85 % derselben Spezies, < 75 % unterschiedlichen Spezies an [Wayne et al. 1986]. Allerdings werden hierbei nur Ähnlichkeiten auf phänotypischer Ebene ermittelt, welche nicht notwendigerweise den genetischen Verwandtheitsgrad widerspiegeln. Die Differenzierung von z. B. *M. avium* und *M. intracellulare* auf molekulargenetischem Niveau, im Gegensatz zu fehlender Unterscheidung der beiden Spezies in der numerischen Taxonomie verdeutlicht das Problem [Shinnick et al. 1994].

1.2.4. High Performance Liquid Chromatography

Die Methode ist schnell und zur chemotaxonomischen Klassifikation von Mykobakterien geeignet, sie benötigt außerdem im Vergleich zu biochemischen Tests weniger Erregermaterial. Sie basiert auf der Bestimmung des unterschiedlichen Gehalts an Mykolsäuren in Mykobakterien. Nach Aufarbeitung der Bakterien und Kopplung der Mykolsäuren mit UV-Licht absorbierenden Estern werden diese in flüssiger Phase unter Druck über eine Gelsäule geleitet. Die fraktionierten Anteile werden spektrometrisch

gemessen, die entstandenen spezifischen Peak-Muster computergestützt mit einer Mykobakterien-Bibliothek² verglichen.

Durch den technisch hohen Aufwand, eine mühsame Handhabung sowie die kostspielige Apparatur und Software, wird die HPLC allerdings nur von einer kleinen Anzahl Labors mit entsprechenden Kapazitäten durchgeführt, ihre Anwendung in der Routinediagnostik bleibt somit dahingestellt [Nolte und Metchock 1994, Miller J. L. et al. 1997, Butler und Guthertz 2001].

1.3. Molekulargenetische Methoden zum Nachweis von Mykobakterien

Durch die stetige Zunahme der Inzidenz der Erkrankungen ausgelöst durch NTM – wobei immer wieder neu beschriebene Spezies mit potentiell klinischer Relevanz auftreten – und der daraus folgenden Notwendigkeit einer präzisen Diagnose auf Spezieslevel, wächst auch der Bedarf an Methoden, welche zeitgemäß schnelle und präzise Ergebnisse liefern [Falkinham 1996]. Die Identifikation von Mykobakterien auf phänotypischer Ebene ist zeitaufwendig, schwierig in der Diagnose einzelner eng verwandter Spezies und teilweise wenig reproduzierbar [Springer et al. 1996]. Darüber hinaus sind konventionelle Methoden im Vergleich zu molekulargenetischen Verfahren kostenintensiver [Cook et al. 2002]. Folglich konzentrierte man sich in den letzten Jahren besonders auf die Entwicklung molekulargenetischer Arbeitsverfahren, mit dem Ziel, schnellere und genauere Resultate hinsichtlich der mykobakteriellen Diagnostik zu erbringen [Kirschner et al. 1993, Telenti et al. 1993, Kox et al. 1995, Taylor et al. 1997, Müller et al. 1998, Roth et al. 1998, Sanguinetti et al. 1998, Kim et al. 1999, Kirschner et al. 2000, Turenne et al. 2001, Mijs et al. 2002, Ruiz et al. 2002, Harmsen et al. 2003, Aragon et al. 2006].

1.3.1. Genamplifikation

Durch die Entwicklung und Einführung der in-vitro Genamplifikationsmethode können nur kleinste Mengen genetischen Materials vermehrt und damit einer weiteren Analyse zugänglich gemacht werden. In Bezug auf den direkten Nachweis von Mykobakterien aus klinischen Proben mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) ergibt sich ein wesentlicher Vorteil: Nimmt der kulturelle Nachweis von Mykobakterien mehrere Wochen in Anspruch, so liegt hier ein endgültiges Ergebnis innerhalb von 2-3 Tagen vor. Das

² bestehend aus 45 Mykobakterienspecies; kostenlos erhältlich beim CDC

Prinzip dieser Technik beruht auf der Amplifikation eines durch synthetisch hergestellte Oligonukleotide (sog. Primer) definierten DNA-Abschnitts, welcher durch wiederholte Denaturationszyklen, Primer-Annealing und anschließende Extension durch die hitzeresistente *Taq*-Polymerase in wenigen Stunden tausendfach vervielfältigt wird [Saiki et al. 1988]. Nach Amplifikation auf gewünschter taxonomischer Ebene (z.B. „broad-range“, Genus), wird das PCR-Produkt über nachfolgende Sequenzanalyse, Hybridisierung oder über die Länge bestimmter Restriktionsfragmente identifiziert.

1.3.2. Die Sequenzierung des 16S-rDNA-Gens

Das 16S-rDNA-(RNA)-Gen ist zurzeit das am verbreitetsten genutzte Gen zur Identifizierung von Mykobakterien. Die direkte Sequenzierung amplifizierter DNA des 16S-rDNA-Gens ist gut untersucht und wird als Goldstandard für die Identifizierung von Mykobakterien angesehen [Böttger 1989; Böddinghaus et al. 1990; Rogall et al. 1990; Kirschner et al. 1993; Kirschner, Meier, Böttger 1993; Torrko et al. 1998; Kirschner et al. 2000]. Die 16S rDNA Sequenz ist insofern ein attraktives Ziel für die genotypische Identifikation, als sie neben hochkonservierten Bereichen, welche den molekular-genetischen Nachweis von Mikroorganismen eher auf Ordnungs- oder Gattungsebene erlauben, auch hypervariable Bereiche besitzt [Woese 1987]. Letztere sind besonders für die Identifizierung auf Speziezebene, ebenso wie für die Erkennung neuer bisher unbeschriebener Spezies, geeignet [Rogall et al. 1990, Kirschner et al. 1993, Torrko et al. 1997]. Das Verfahren der Nukleinsäuresequenzanalyse beinhaltet DNA-Extraktion, die Polymerasekettenreaktion vermittelte Amplifikation des 16S-rDNA-Genfragments, Sequenzbestimmung und Datenanalyse und erlaubt, im Gegensatz zu biochemischen Verfahren, eine Identifizierung innerhalb von 1-2 Arbeitstagen statt Wochen [Kirschner et al. 1993, Holberg-Peterson et al. 1999, Patel et al. 2000]. Darüber hinaus eröffnete die Untersuchung der 16S- RNA Sequenz auch neue Blickfelder bezüglich der Phylogenie des Genus *Mycobacterium*. So entspricht das Runyonsche Schema der Gruppenbildung langsam wachsender Mykobakterien keiner natürlichen Ordnung, vielmehr besitzt das phänotypische Merkmal der Wachstumsgeschwindigkeit phylogenetische Qualität [Rogall et al. 1990, Stahl et al. 1990].

Leider ist die beschriebene Methode nicht nur mit hohen Kosten verbunden, es fehlt auch häufig an klinischer Relevanz bzgl. vieler im Routinelabor identifizierter Spezies.

Ein weiteres Problem stellt die relativ niedrige Polymorphologie innerhalb der 16S-rDNA-Gensequenz dar. So haben einige klinisch relevante Spezies völlig identische Sequenzen,

andere zeigen sehr hohe Ähnlichkeit in ihren Sequenzen [Kim et al. 1999, Roth et al. 1997]. Darüber hinaus ist eine Verbesserung der Software und ein einfacher Zugang zu qualitätskontrollierten und zuverlässigen Datenbanken für eine korrekte Datenanalyse unerlässlich [Böttger 1996, Maidak et al. 1996, Turenne et al. 2001].

1.3.3. Andere Methoden anhand alternativer Zielsequenzen

Aufgrund einiger Nachteile im Hinblick auf die Methode durch Sequenzierung des 16S-rDNA-Gens, rückt die Entwicklung einfacherer Sequenzanalyseverfahren in den Vordergrund. Hierzu zählt die **Hybridisierung durch Gensonden, das LineProbeAssay und das GenoTypeAssay³ oder die Analyse durch Restriktions Fragment Längen Polymorphismus.**

Hybridisierung durch Gen-Sonden ist ein schnell und häufig angewandtes Verfahren [De Beenhouwer et al. 1995, Kox et al. 1995 und 1997, Labombardi et al. 1997, Sanguinetti et al. 1998, Alcaide et al. 2000]. Es beruht auf der spezifischen Bindung von Nukleinsäuresequenz-Einzelsträngen mit gentechnologisch hergestellten und mit Biotin markierten komplementären DNS-Strängen. Für die Detektion der Mykobakterien durch Sonden ist die 16S rDNA Sequenz als Genabschnitt gut geeignet [De Beenhouwer et al. 1995, Kox et al. 1995 und 1997, Alcaide et al. 2000,]. Diese Methode deckt jedoch nur einen relativ kleinen Bereich an mykobakteriellen Spezies ab [De Beenhouwer et al. 1995, Kox et al. 1995 und 1997] und zeigt teilweise Kreuzreaktionen unter den einzelnen Spezies [Emler et al. 1995].

Zur molekulargenetischen Identifizierung von Mykobakterien stellt das LineProbeAssays (LiPA) eine Alternative zu den DNA Sonden-Tests dar [Miller et al. 2000, Johansen et al. 2002, Mijs et al. 2002]. LiPAssays verwenden im Gegensatz zum AccuProbe Verfahren nicht die 16S-rDNA-Sequenz als Genabschnitt, sondern hybridisieren anhand des amplifizierten 16S-23S rDNA-Spacers. Das LiPA ist jedoch mit einem höheren Arbeitsaufwand verbunden [Ruiz et al. 2002].

Die aktuellste Entwicklung bzgl. der Identifizierung durch Hybridisierung stellt das kommerziell als Kit erhältliche GenoType Assay⁴ dar. Die Isolation der Spezies basiert auch hier auf der Genamplifikation des 16S-23S-rDNA-Spacers mit anschließender Hybridisierung der mit Biotin markierten DNA-Amplifikate. Der Vorteil dieses Verfahrens gegenüber GeneProbe DNA-Sonden und LiPAssays, liegt in der Möglichkeit, einen

³ HAIN Lifescience

⁴ Hain Diagnostika, Nehren, Germany

größeren Bereich an mykobakteriellen Spezies in einem einzigen Test zu identifizieren [Richter et al. 2006]. Darüber hinaus ermöglicht die Methode die Detektion verschiedener mykobakterieller Spezies aus einem einzigen klinischen Isolat. Es sind mittlerweile 23 (Genotype Produktreihe CM) plus 14 (Genotype Produktreihe AS) NTM durch die Sondentechnik in Form von Strips (Genotype Produktreihe, HAIN 2007) kommerziell erhältlich.

Bei der Analyse durch **Restriktions Fragment Längen Polymorphismus** wird ein Gen oder ein Gensegment amplifiziert, dessen Produkt durch Endonukleasen verdaut und schließlich durch Gelelektrophorese sichtbar gemacht und analysiert wird. Es sind hierzu verschiedene genetische Ziele, wie z.B. das *rpoB* [Kim et al. 1999, Kim et al. 2001, Kontos et al. 2002], *dnaJ* [Takewaki et al. 1993], *gyrB* [Kasai et al. 2000], *recA* [Blackwood et al. 2000], 16S-23S-rDNA Spacer [Lappayawichit et al. 1996, Roth et al. 1998] und heat-shock proteine 65 gen (*hsp65*) [Steingrube et al. 1995, Swanson et al. 1996, Steingrube et al. 1997, Kim et al. 2005] untersucht worden.

Von den genannten Gensequenzen ist bis jetzt das ***hsp65* Gen** am besten erforscht, und die Daten wurden durch Aufnahme neuer, vor allem schnell wachsender Spezies in den letzten Jahren verbessert (z.B. *M. chelonae* und *M. abscessus*) [Devallois et al. 1997, Ringuet et al. 1999, Kim et al. 2005]. Die auf dem *hsp65* Gen basierende PCR-RFLP Analyse ist allerdings auch mit einigen Schwierigkeiten verbunden. So treten teilweise neue Bandenmuster in der Gelelektrophorese auf, welche vorher noch nicht beschrieben wurden oder die Unterschiede zwischen den einzelnen Bandgrößen sind zu gering für eine zuverlässige Unterscheidung [Wilson et al. 1998, Forbes et al. 1999, Richter et al. 1999]. Zudem haben alle aktuellen molekularen Herangehensweisen, Mykobakterien zu differenzieren einen gemeinsamen Nachteil: Die benutzten Primer sind nicht spezifisch. Die folglich unerwünschte Amplifikation von anderen gram-positiven Bakterienkontaminanten wie Korynebakterien stellen im klinischen Bereich häufig eine weitere Schwierigkeit dar.

1.4. Fragestellung

Wegen der hier beschriebenen Identifizierungsproblematik durch die ungenauen biochemischen und chemotaxonomischen Verfahren, der relativ hohen Kosten und Aufwand der Sequenzierung des 16s-rDNA-Gens bei relativ niedriger Polymorphologie

innerhalb der 16S-rDNA-Gensequenz, der unzureichenden *hsp65* Gen basierenden PCR-RFLP Analyse, war das Ziel dieser Arbeit, den 16S-23S Internal Transcribed Spacer auf eine größere Anzahl von mykobakteriellen Spezies zu untersuchen und gleichzeitig deren Tauglichkeit für die Entwicklung eines PCR-RFLP-basierten Identifikations-Schemas [Lappaywichit et al. 1996, Sanguinetti et al. 1998] mit entsprechend einfacher und kostengünstiger Methodik zu prüfen.

Wir setzten uns drei unmittelbare Ziele:

1. Die Entwicklung und Evaluation neuer Primer für eine genusspezifische Amplifikation.
2. Die Aufstellung eines weitestgehend zuverlässigen diagnostischen Algorithmus zur Identifikation eines breiten Spektrums an mykobakteriellen Spezies.
3. Für die Diagnose der PCR-RFLP-basierten Identifikation sollen maximal drei Endonukleasen benutzt werden.

Es wurden 678 mykobakterielle Stämme innerhalb 48 Spezies zur Unterscheidung auf Inter-Spezies-Ebene und Grad der Abweichung einzelner Muster auf Intraspezies-Ebene mit einem neuen auf RFLP basierendem Ansatz untersucht.

2. Material / Methoden

2.1. Bakterienstammsammlung

Für die Arbeit wurden insgesamt 811 Bakterienstämme verwendet. In Tabelle 4 ist die umfangreich angelegte Stammsammlung aufgelistet. Es wurden 122 Spezies innerhalb 37 Gattungen untersucht, davon 286 Referenzstämme und 525 klinische Isolate. Sechs klinische Nokardien-Isolate wurden nur bis zu ihrem Genus identifiziert. Nicht mykobakterielle Spezies wurden hauptsächlich aus der Gattung Aktinomyceten ausgewählt, da sie nahe Verwandte der Mykobakterien darstellen.

Die Zahl der untersuchten Mykobakterien beläuft sich auf 678 Stämme (179 Referenzstämme und 499 klinische Isolate), davon 48 definierte Spezies und 5 *M. spp.* Letztere konnten weder durch biochemischen Nachweis noch über bekannte 16S-rDNA-Sequenzen zugeordnet werden [Springer et al. 1996].

Tab. 4. Referenzstämme und klinische Isolate der verwendeten Bakterien dieser Arbeit

Genus	Spezies	Anzahl der Stämme	Referenzstämme ^a	Anzahl der klinischen Isolate
<i>Actinomadura</i>	<i>madurae</i>	1	DSM 43067 T	
	<i>pelletieri</i>	1	DSM 43383 T	
<i>Actinomyces</i>	<i>israelii</i>	3	DSM 43320 T, S293	1
	<i>meyeri</i>	1		1
	<i>naeslundii</i>	2	DSM 43013 T	1
	<i>neuui</i>	1	DSM 8577 T	
	<i>viscosus</i>	2	DSM 43327 T	1
	<i>orientalis</i>	2	DSM 40040 T, 43387	
<i>Arcanobacterium</i>	<i>haemolyticum</i>	3	DSM 20595 T, S333	1
	<i>pyogenes</i>	1	DSM 20630 T	
<i>Prevotella</i>	<i>buccae</i>	1		1
	<i>disiens</i>	1		1
<i>Bacteroides</i>	<i>fragilis</i>	1	DSM 2151 T	
<i>Cellulomonas</i>	<i>cellulans</i>	1	DSM 43879 T	
	<i>turbata</i>	2	DSM 20577 T, S330	
<i>Clostridium</i>	<i>glycolicum</i>	1		1
	<i>perfringens</i>	1		1
<i>Corynebacterium</i>	<i>diphtheriae</i>	2	DSM 44123 T	1
	<i>jeikeium</i>	2	DSM 7171 T	1
	<i>pseudodiphthericum</i>	1		1
	<i>renale</i>	1	DSM 20688 T	
	<i>striatum</i>	2	DSM 20668 T	1

(noch Tabelle 4)

<i>Corynebacterium</i>	<i>urealyticum</i>	2	DSM 7109 T	1
	<i>xerosis</i>	5	DSM 20743 T, 20170	3
<i>Dermatophilus</i>	<i>congolensis</i>	1	DSM 44180 T	
<i>Dietzia</i>	<i>maris</i>	1	DSM 43672 T	
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	3	DSM 1103, 5923, ATCC 9637	
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	1	DSM 2570	
<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum</i>	1	DSM 20482 T	
<i>Gordonia</i>	<i>aichensis</i>	1	DSM 43978 T	
	<i>amarae</i>	2	DSM 43392 T, 43391	
	<i>bronchialis</i>	1	DSM 43247 T	
	<i>hirsuta</i>	1	DSM 44140 T	
	<i>hydrophobica</i>	1	DSM 44015 T	
	<i>rubropertinctus</i>	2	DSM 43197 T, 10347	
	<i>sputi</i>	2	DSM 43896 T, 43979	
	<i>terrae</i>	5	DSM 43249 T, 46040, 43342, 43568, 43569	
<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	1	ATCC 49247	
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	1	S331	
<i>Listeria</i>	<i>ivanovii</i>	1	S302	
	<i>monocytogenes</i>	3	S303, 305, 306	
<i>Mycobacterium</i>	<i>abscessus</i>	9	DSM 44196 T, 43492, 43493, S322-324	3
	<i>asiaticum</i>	3	DSM 44056, 44292, 44297	
	<i>aurum</i>	2	DSM 43999 T, S283	
	<i>avium</i>	111	DSM 44156 T, DSM 44133 T	109
	<i>bohemicum</i>	2	DSM 44277	1
	<i>celatum</i>	15	DSM 44243 T, S274, 275	12
	<i>chelonae</i>	14	DSM 43804 T, 43217, 43276, 43483, 43484, 43487, 43488-43490, 46626, S268	3
	<i>chlorophenolicum</i>	1	DSM 43826 T	
	<i>conspicuum</i>	1	DSM 44136 T	
	<i>duvalii</i>	1	DSM 44244 T	
	<i>faracinogenes</i>	20	DSM 43637 T, M9, 15, 16, 39, 52, 57, 191, 217, 269, 274, 275, 281, 285, 612, 687, 785, N710, 715, 725	
	<i>flavescens</i>	7	DSM 43991 T, S318, 523-527	
	<i>fortuitum</i>	26	DSM 46621 T, 44220 T, M205, 368, 390, N723, S113, S485, 487-493	11
	<i>gastri</i>	5	DSM 43505 T, 43506, S227-229	
	<i>genavense</i>	11		11
	<i>gordonae</i>	48	DSM 44160 T	47
	<i>haemophilum</i>	3		3
	<i>hassiacum</i>	1	DSM 44199 T	
	<i>hodleri</i>	1	DSM 44183 T	
	<i>interjectum</i>	1	DSM 44064 T	

(noch Tabelle 4)

<i>Mycobacterium</i>	<i>intermedium</i>	4	DSM 44049 T	3
	<i>intracellulare</i>	34	DSM 43223 T, S138, 347	31
	<i>kansasii</i>	52	DSM 44162 T	51
	<i>lentiflavum</i>	5	DSM 44195 T, 44194, S136, 360	1
	<i>malmoense</i>	11	DSM44163 T, S217	9
	<i>marinum</i>	16	DSM 44344 T, 43518, 43519, 43824, 44345, S287	10
	<i>mucogenicum</i>	1	DSM 44124 T	
	<i>neoaerum</i>	1	DSM 44074 T	
	<i>nonchromogenicum</i>	4	DSM 44164 T, S264-266	
	<i>obuense</i>	1	DSM 44075 T	
	<i>parafortuitum</i>	4	DSM 43528 T, 43526, 43527, S528	
	<i>peregrinum</i>	17	DSM 43271 T, M418-420, S254, 486, 494-496	8
	<i>phlei</i>	5	DSM 43239 T, 43214, 44018	2
	<i>porcinum</i>	1	DSM 44242 T	
	<i>rhodesiae</i>	1	DSM 44223 T	
	<i>scrofulaceum</i>	11	DSM 43992 T, 43226, 43512, 43513, S343, 244	5
	<i>senegalense</i>	10	DSM 43656 T, 43658,, M266, 555, N714, 717-718, 721, 728, S114	
	<i>shimoidei</i>	3	DSM 44152 T, S234	1
	<i>simiae</i>	15	DSM 44165 T, S137, 140, 141, 146, 148, 149	8
	<i>smegmatis</i>	2	DSM 43756 T, 43299	
	sp.	2	M511, 516	
	sp. (<i>gastrii</i>) ^b	10	DSM 43221, 43507, S230-233, R230-233,	
	sp. (<i>malmoense</i>)	2	S222, 279	2
	sp. (<i>scrofulaceum</i>)	5	S245, 313-314, 316, R39	5
	sp. (<i>xenopi</i>)	2	S369, 504	2
	<i>szulgai</i>	8	DSM 44166 T, S97	6
	<i>terrae</i>	9	DSM 43227 T, S280-281, 353	5
	<i>triplex</i>	2	S139	1
	<i>triviale</i>	2	DSM 44153 T	1
	<i>tuberculosis</i>	90	DSM 44156	89
	<i>ulcerans</i>	3	ATCC 19423 T, S219	1
	<i>vaccae</i>	4	DSM 43292 T, 43229, 43514, S345	
	<i>xenopi</i>	59	DSM 43995 T	58
<i>Nocardia</i>	<i>asteroides</i>	12	DSM43757 T, 43003-43005, 43208, 43244, 43289, S308, 328, ATCC 23824	2
	<i>brasiliensis</i>	2	DSM 43758 T, 43009	
	<i>brevicatena</i>	1	DSM 43024 T	
	<i>carnea</i>	2	DSM 43397 T, 40840	
	<i>corynebacterioides</i>	1	DSM 20151 T	
	<i>farcinica</i>	4	DSM 43665 T, 43666, S304, 327	

(noch Tabelle 4)

<i>Nocardia</i>	<i>nova</i>	1	ATCC 33726	
	<i>otitidiscaviarum</i>	3	DSM 43242 T, 43010, 43398	
	<i>pseudobrasiliensis</i>	1	DSM 44290 T	
	<i>seriolae</i>	1	DSM 44129 T	
	<i>sp.</i>	6		6
<i>Nocardioides</i>	<i>albus</i>	1	DSM 43109 T	
<i>Nocardiopsis</i>	<i>dassonvillei</i>	1	DSM 43111 T	
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>anaerobius</i>	1	DSM 2949	
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	1	DSM 1117	
<i>Pseudonocardia</i>	<i>autotrophica</i>	2	DSM 535 T, 43082	
<i>Rhodococcus</i>	<i>equi</i>	2	DSM 20307 T, S307	
	<i>rhodochrous</i>	1	DSM 43241 T	
	<i>ruber</i>	1	DSM 43338 T	
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	3	DSM 43762 T, S325, 326	
<i>Saccharomonospora</i>	<i>glauca</i>	1	DSM 43769 T	
	<i>viridis</i>	1	DSM 43017 T	
<i>Saccharopolyspora</i>	<i>rectivirgula</i>	1	DSM 43747 T	
<i>Saccharothrix</i>	<i>aerocolonigenes</i>	1	DSM 40034 T	
<i>Skermania</i>	<i>piniformis</i>	1	DSM 43998 T	
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	2	DSM 2569, 1104	
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	2	ATCC 6303	1
<i>Streptomyces</i>	<i>albus</i>	1	DSM 40313T	
	<i>somaliensis</i>	1	DSM 40738 T	
<i>Thermoactinomyces</i>	<i>vulgaris</i>	1	DSM 43016 T	
<i>Tsukamurella</i>	<i>paurometabolum</i>	3	DSM 20162 T, 44119, S329	
	<i>pulmonis</i>	1	DSM 44142 T	
	<i>tyrosinosolvans</i>	1	DSM 44234 T	
<i>Turicella</i>	<i>otitidis</i>	1	DSM 8821 T	
		Geamt	811	525

^a ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md.; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany; M and N, strain collection, Department of Microbiology, The Medical School, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK; R, strain collection, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg, Regensburg, Deutschland; S, strain collection, Institut für Mikrobiologie und Immunologie, Krankenhaus Zehlendorf, Berlin, Germany.

^b Vorläufig benannt als *M. sp.* auf der Basis von pheno- und genotypischen Merkmalen (im Text genauer beschrieben)

2.1.1. Identifikation der klinischen Isolate durch

2.1.1.1. Kultur und konventionelle Methoden

Für die Anzucht der Mykobakterien aus klinischen Patientenproben dienten entweder Löwenstein-Jensen-Nährmedien, BACTEC-12B-Kulturflaschen oder BACTEC-13A-Kulturflaschen als Nährmedien.

Sowohl die Referenzstämme als auch auf Agar- oder im Flüssigmedium angewachsene Patientenstämme wurden auf Middlebrook 7H11-Agar unter aeroben Bedingungen bei 37 °C subkultiviert. Zur vorläufigen Identifizierung der Gattung und einem Teil der Spezies wurden die Mykobakterien mittels konventioneller biochemischer Verfahren mit dem Ziel der Bestimmung charakteristischer phenotypischer Merkmale untersucht [Kent et al. 1985].

2.1.1.2 Sequenzierung des 16S-rDNA-Gens sowie 16S-23S Gen-Spacers

Praktisch alle Referenzstämme und alle klinischen Isolate – mit der Ausnahme von *M. avium*, *M. tuberculosis*, 23 *M. gordonae* und 14 *M. xenopi* Isolaten – wurden in der variablen Region A und B des 16S rDNA Gens sequenziert [Kirschner et al. 1993, Shinnick et al. 1994, Roth et al. 1998]. Zur besseren Verständlichkeit wurde die fast komplette 1.5 kbp 16S rDNA in einigen wenigen Stämmen mit einzigartigen oder unharmonischen RFLP Mustern (jeweils ein klinisches Isolat von *M. kansasii*, *M. phlei* und *M. triviale* und die Referenzstämme *M. flavescens* S526 und S318 und *M. parafortuitum* DSM 43526) und solche mit ungeklärter Taxonomie (M511, S245, S279, S369 und S504) sequenziert, dessen Methode anderswo genau beschrieben wurde [Schröder et al. 1997]. Um die Sequenzdaten bzgl. des 16S-23S-rDNA-Spacers noch zu erweitern, wurde eine Anzahl von Stämmen auch innerhalb dieser Region sequenziert [Roth et al. 1998]. Einige DSM Referenzstämme, deren Klassifikation sich anlehnd an die RFLP-Muster als falsch erwies, wurden nach partieller Sequenzierung und der Analyse von Fettsäuren mittels Gas Chromatography und der Analyse von Mycolsäuren durch High-Performance Liquid Chromatography neu klassifiziert [Miller et al. 1997, Müller et al. 1998].

2.2. Material

2.2.1. Nährmedien

BACTEC-12B-Kulturflaschen	Middlebrook 7H12# 4402018, Becton Dickinson Diagnostic Instruments
BACTEC-13A-Kulturflaschen	Middlebrook 7H12# 4402004, Becton Dickinson Diagnostic Instruments
Löwenstein-Jensen-Nährböden	BB1™ Löwenstein-Jensen Medium+PACT # 4320502, Becton Dickinson Diagnostic Instruments
Middlebrook 7H11-Agar	Bacto-Mycobacteria 7H11-Agar: 21 g 7H11 Agarbasis, # Difco 0838-19-9), 5 ml Glycerin, # Merck 104094 900 ml Aqua dest. Middlebrook OADC, # BBL431186

2.2.2. Reagenzien

Agarosegel 1,8%	9 g Nusieve, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland, # 50092 ad 500 ml TBE (1x), Ethidiumbromid (0,001%) Biozym, # 50092? Oldendorf, Deutschland
Small Agarosegel 4%	ad 500ml TBE (1x), Ethidiumbromid (0,001%)
Aqua ad inject. (Proteinase K und PCR-Reagenzien)	100 ml: Delta select,# 789105 Deutschland
Aqua ad inject. (übrigen Reagenzien und Puffer)	1 Liter, Delta-Pharma, # 18702K
Auftragspuffer für die Elektrophorese	50 mg Bromphenolblau (0,05%) 3,7 g EDTA 46,7 ml Glycerol, (Merck # 4094) (50%) ad 100 ml Aqua bidest
Bovines Serum Albumin (BSA)	Albumin, Bovine, Sigma, # A-6003
Chloroform	Merck, # 2431.1000
Elektrophoresepuffer (TBE) (10x) pH= 8.0	108 g Tris-Base (Pharmacia, # 17-1321-01) 55 g Borsäure (Pharmacia, # 80-1128-86) 40ml EDTA 0,5 M (Pharmacia, # 80-1128-85) ad 1000 ml Aqua dest.

Ethanol 70%	73 ml abs. Ethanol, Merck, # 818760; ad 27 ml Aqua ad inject.
Ethidiumbromid	Merck, # 11615
Glasbeads (in Tris-Puffer)	Sigma, # G4649 20-30 ml fünfmal waschen in A. dest., anschl. zweimal waschen mit Tris 10 mM resuspendieren in Tris 10 mM
Leiter (100 bp)	GibcoBRL 100bp DNA Ladder, # 15628-019
Leiter (gebrauchs-fertig)	Eigene Herstellung Für den Einsatz im Agarosegel 5 µl pro Tasche nehmen (0,5 µg). Ansatz: 350 µl TBE (1x, ohne EB ⁵) 100 µl Loadingbuffer 50 µl Leiter
Loading buffer (LB)	Eigene Herstellung Bromphenolblau 50 mg (Sigma, # B-0126) Glycerol 46,7 ml EDTA 3,7 g mit NaOH alkal. (pH 8,3 pH-Meter), dest. (Milli) ad 100 ml.
Phenol pH 8	Biometra, Amresco, # 220945 bidestilliert, gesättigt in 0,1 Volumenteil Tris (pH 8)
Syber Green I, 1000-fach	Biozym Diagnostic GmbH
Tris 10 mM pH 8.3	0,888 g Tris-HCL (Sigma, # T-6666)
Triton -X-100 (1%)	10 ml Triton -X-100 (100%) ad 1000 ml Aqua ad inject.
Triton -X-100 (100%)	Sigma, # T6878
Tween 80	Merck, # 822187
Verdünnungsmedium	0,25 mg BSA ⁶ 0,025 ml Tween 80 ad 100 ml Aqua dest.

⁵ Ethidiumbromid

⁶ Bovines Serum Albumin

2.2.3. PCR-Reaktionsansatz (Master-Mix)

dNTP's (500x) 100 mM je NTP	Je ein Volumenanteil: dATP (Amersham Biosciences, # 27-2050-01) dCTP (Amersham Biosciences, # 27-2060-01) dGTP (Amersham Biosciences, # 27-2070-01) dUTP (Amersham Biosciences, # 27-2040-01)
Master-Mix ^A	1,5 mM MgCl ₂ 10 mM Tris 50 mM KCl je 200 µM dNTPs je 12 pM Primer 1 U <i>Taq</i> -Polymerase, Pharmacia, Freiburg, Deutschland 0,2 U UNG
<i>Taq</i> DNA Polymerase	5 U/ µl, Pharmacia, Freiburg, Deutschland, # 27-0799
Uracil-DNA-Glykosylase	1 U/ µl, Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland, # 18054-015

(A) Herstellung des Mastermix

Auf Eiswasser wurde in einer Sicherheitswerkbank der Mastermix vorrätig hergestellt. Dazu werden 16,580 ml Aqua dest. (Delta select) mit 2,5 PCR Puffer, 10x (15 mM MgCl₂, 100 mM Tris, 500 mM KCl), 25 µl Triton X 1% und 195 µl BSA 13% [Forbes et al. 1996] gemischt, aliquotiert (11x 1640,5 µl in 2 ml Sarstedt Röhrchen) und eingefroren. Die dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) wurden zu gleichen Volumenanteilen gemischt [Verdünnung um den Faktor 4 (25 mM)]. Vor Gebrauch wurden die dNTP's aufgetaut und 1:20 – durch Zugabe von 646 µl Aqua dest. (Delta select) – verdünnt. Vor der PCR wurden zu dem 1640,5 µl Mastermix 340 µl des verdünnten dNTP-Gemisches (Endkonzentration: 0,2 mM) pipettiert. Letzteres wurde mit einem Tropfen Öl überlagert.

Zu jedem Ansatz des Mixes (46,6 µl) werden kurz vor der Amplifikation 75 ng von jedem Primer, 1 U der *Thermus Aquaticus* DNA Polymerase, und 0,2 µl der UNG⁷ zugesetzt. Der Mix ist ca. 2-4 Wochen bei +4 °C haltbar.

⁷ Uracil-DNA-Glycosylase

2.2.4. Pipetten, Spritzen und Röhrchen

Combitips (0,5ml, 1,25ml, 2,5 ml)	Eppendorf # 0030048.393/.210/.016
Lock-Safe Eppis, (1,5ml)	Eppendorf, # 0030120.086
Mastertips 480	Eppendorf, # 0030001.320
Mikro-Schraubgef��e, (1,5/2ml)	Sarstedt, # 72.692.105/72.693.105
Multikanalpipette (50-300�l)	Labsystems, # 4510030
Multipetten(0,5-10�l, 10-100�l, 100-1000�l)	Eppendorf, # 4910000.085/.042/.069
PCR Tubes in caps, (0,2 ml)	Robbins Scientific, # 16-01137CL
Varipette	Multipette-Eppendorf, # 4780
Zentrifugen-Röhrchen, (14 ml)	Falcon, Becton Dickinson, # 4-2095-5
Zentrifugen-Röhrchen, (4 ml)	Greiner, # 115261

2.2.5. Geräte und Filme

Brutschrank	Heraeus 002
Elektrophorese-Kammer	Biometra Agargel Maxi
Transilluminator	Vilber Courmat TF20C
Thermoblock	Eppendorf Thermostat 3400
Polaroidkamera	Polaroid 667
Thermocycler	Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9600
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK 156
Zentrifuge	Eppendorf Mikro-Kühlzentrifuge 5402, Heraeus Christ Minifuge

**Verwendete Enzyme und deren Puffer zur Verdauung der PCR-Produkte
s. Kap. 2.5.2**

2.3. DNA-Gewinnung

DNA wurde als Substrat der PCR aus Bakterienkultursuspensionen benötigt. Die DNA der Bakterien wurde dazu von Zellmaterial einer im Durchmesser 1-2 mm großen Bakterienkolonie einer Subkultur auf Middlebrook 7H11-Agar gewonnen.

1 ml Bakteriensuspension wurde 10 Minuten mit 10900 Umdrehungen zentrifugiert und das daraus resultierende Pellet mit vier Tropfen DynaBeads überlagert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und durch 10mM Tris ersetzt (Waschritt, zweimal durchgeführt).

Die Trismenge wurde dann bis auf 100 µl abgesaugt. Die Probe wurde jeweils einige Sekunden im Vortexgerät gerüttelt und nachfolgend in ein Ultraschallgerät (15 min) eingebracht. Nach Überschichtung mit zwei Tropfen Öl wurde der Ansatz 15 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die extrahierte DNA konnte maximal eine Woche bei + 4 °C gelagert werden. Falls sie bis zu diesem Zeitpunkt nicht für die PCR verbraucht wurde, musste sie bei -80 °C eingefroren werden.

2.4. Amplifikation des 16S-23S rDNA Spacers

2.4.1. Primer

Für die Amplifikation eines Teils des 16S-23S-rDNA-Spacers wurden folgende Primer verwendet:

Sp1: 5'-ACC TCC TTT CTA AGG AGC ACC-3'

(AAGGA entspricht dem Beginn der Spacersequenz)

Sp2: 5'-GAT GCT CGCAAC CAC TAT CCA-3'

(Positionen 210 bis 190 der M. tuberculosis Spacersequenz, EMBL accession number L15623)

2.4.2. Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation wurde mit einem 50 µl Reaktionsmix durchgeführt: er enthält 46,6 µl des Mastermixes (16,580 ml Aqua dest. (Delta select), 2,5 PCR Puffer, 10x (15 mM

MgCl₂, 100 mM Tris, 500 mM KCl), 25 µl Triton X 1% und 195 µl BSA 13% sowie die dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dUTP,) Jeder Mix wird mit einem Tropfen Öl überlagert. Kurz vor der Amplifikation kommen 75 ng von jedem Primer, 1 U der Thermus Aquaticus DNA Polymerase, 0,2 µl der UNG⁸ und 5µl DNA hinzu.

Als **Positivkontrolle** wurden jedesmal in einem der Ansätze 5 µl DNA-Flüssigkeit pipettiert.

Als **Negativkontrolle** wurde ein Ansatz ohne DNA mitgeführt. Direkt aus dem Eiswasser kommend werden die Proben einige Sekunden zentrifugiert und in den Thermocycler PolyChain II oder GenAmp 9600 (für Tubestrips, kein Öl erforderlich) gestellt. Die Thermocycler-Programmierung durchläuft folgende Schritte:

1. Initiale Denaturierung für 5 min bei 96 °C
2. Es folgen 38 Zyklen:
 - 1 min Denaturierung bei 94 °C
 - 60 sec Annealing bei 62 °C
 - 60 sec Extension bei 72 °C.

Räumliche Trennung:

In Anlehnung an die Empfehlungen der DGHM MiQ 1 wurde für die Durchführung der PCR eine räumliche Trennung der Arbeiten vor der Amplifikation und Arbeiten nach der Amplifikation zur Vermeidung von Kontamination eingehalten und generell aerosolgeschützte Pipettenspitzen (Biozym, 692066, 692150, 692079) verwendet [Roth et al. 1997].

2.5. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

2.5.1. Verwendete Enzyme

Das RFLP Schema wurde basierend auf den kompletten 16S-23S rDNA Spacer-Sequenzen entwickelt. Dazu wurden alle Sequenzen mit Hilfe der DNASIS Software (Hitachi) auf Schnittstellen mit ca. 80 Restriktionsenzymen untersucht. Die gesammelten Schnittstellen wurden tabellarisch ausgewertet. Entstandene Schnittmuster wurden experimentell überprüft und folgende geeignete Enzyme ausgewählt:

Hae III Sigma, Diesenhofen, Deutschland

⁸ Uracil-DNA-Glykosylase

Cfo I	Sigma, Diesenhofen, Deutschland
Taq I	Sigma, Diesenhofen, Deutschland
Msp I	Sigma, Diesenhofen, Deutschland
Dde I	Promega, Madison, Wis.
Ava II	Amersham, Braunschweig, Deutschland.
Hinf I ⁹	Amersham, Braunschweig, Deutschland.

2.5.2. Verdauung der PCR-Produkte mittels Endonukleasen

Es wurden je 8,8 µl des PCR Produktes mit 0,2 µl (2 units) der jeweiligen Enzyme und 1 µl des dazugehörigen Puffers (SH-Puffer, 10x, Sigma, Nr.: B 3657 / SL-Puffer, 10x, Sigma, Nr.: B3782 / D-Puffer, 10x, Promega, Nr.: R004A / SM Puffer, 10x, Sigma, Nr.: B 3158) versetzt. Für die enzymatische Verdauung wurden die Ansätze bei 37 °C für einen Stunde in einen Brutschrank inkubiert. Das Enzym Taq benötigte 62 °C zur Verdauung.

2.6. Nachweis der Amplifikate durch Gelelektrophorese

2.6.1. Nachweis der PCR-Produkte

Der Nachweis der PCR Produkte wurde mittels Elektrophorese in einem Agarosegel durchgeführt. Für die Auftrennung der PCR-Produkte wurde 1,8% Agarose verwendet. Die Agarose wurde in der Mikrowelle in 1xTBE Puffer vollständig gelöst und mit Ethidiumbromid im Verhältnis 1/1000 versetzt. Nach kurzer Abkühlung wurde sie in der Elektrophoresekammer gegossen. 8 µl der PCR-Produkte wurden vor dem Auftragen mit 2 µl Loading Buffer versetzt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Als Laufpuffer wurde 1xTBE und als Molekulargewichtsmarker eine 100bp Leiter (GibcoBRL 100bp DNA Ladder, 15628-019) verwendet. Die PCR-Produkte wurden im Gel ca. 30 Minuten bei 80V (Spannungsquelle: LKB-Bromma 2197 Power Supply) aufgetrennt. Auf einem Transilluminator wurde das Gel über UV-Licht der Wellenlänge von 254 nm beurteilt und mit einem Polaroidbild (Polaroid, 667) dokumentiert.

2.6.2. Nachweis der verdauten PCR-Produkte

Der Nachweis der verdauten PCR-Produkte bzw. der Bandengrößen der verdauten PCR-Produkte wurde mittels Elektrophorese in 4%-igem Small Agarosegel durchgeführt. Die Agarose wurde in der Mikrowelle in 1xTBE Puffer vollständig gelöst und mit

⁹ Für die Restriktion durch Hinf I wurde dUTP im PCR Ansatz durch dTTP ersetzt

Ethidiumbromid im Verhältnis 1/500 versetzt. Nach kurzer Abkühlung wurde sie in die Elektrophoresekammer (Biometra Agargel Maxi) gegossen. 8 µl der verdauten PCR-Produkte wurden vor dem Auftragen mit 2 µl Loading Buffer versetzt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Als Laufpuffer wurde 1xTBE verwendet. Die verdauten PCR-Produkte wurden im Gel ca. 2-3 Stunden bei 65 V (Spannungsquelle: LKB-Bromma 2197 Power Supply) aufgetrennt. Auf einem Transilluminator (Vilber Courmat TF20C) wurde das Gel über UV-Licht der Wellenlänge von 254 nm dargestellt. Die Bandengrößen wurden visuell beurteilt, zum Größenvergleich liefen daher Kontrollen wie eine 100bp Leiter (GibcoBRL 100bp DNA Ladder, 15628-019) und die Type strains von *M. avium*, *M. intracellulare* und *M. kansasii* mit. Die Dokumentation erfolgte durch Polaroidaufnahmen.

2.7. Aufnahme von Nukleotidsequenz accession numbers

Die 16S RNA Gensequenzen der *M. spp.* Stämme S245 (MCRO 33; *scofulaceum*), S318 (*M. flavescens*), und S 369 (*M. xenopi*) wurden in der Gen-Daten-Bank unter den Accessionnumbers AF 152559, AF 174289 , AF174290 gespeichert. Die Kulturen mit den Nummern S245, S279, S369, S318 und S522 wurden in der Stammsammlung der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland unter den Nummern 444227, 44429, 44428, 44430 und 44431 gespeichert.

3. Ergebnisse

3.1. Qualitätskontrolle

3.1.1. Positivkontrollen

Die Positivkontrollen konnten alle erfolgreich amplifiziert werden.

3.1.2. Negativkontrollen

Die Negativkontrollen lieferten ohne Ausnahme negative Resultate.

3.2. Spezifität der Primer für den 16S-23S-rDNA Spacer

Alle in Tabelle 4 aufgeführten Bakterien wurden mit den Primern Sp1 (5'-ACC TCC TTT CTA AGG AGC ACC-3') und Sp2 (5'-GAT GCT CGC AAC CAC TAT CCA-3') auf eine mögliche Amplifikation im 16S-23S-rDNA Spacer Abschnitt getestet. **Mit Ausnahme von *Gordonia terrae* war kein Bakterium, welches nicht der Gattung *Mycobacterium* angehörte, amplifizierbar. Alle Mykobakterien hingegen ließen sich ohne Ausnahme amplifizieren.** Die Größe der Amplifikate variierte zwischen 200 Basenpaaren (bp) für die Spezies *M. xenopi* bis zu 330 bp (*M. neoaurum*). *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale* und alle schnell wachsenden Mykobakterien zeigten über 250 bp grosse Fragmente.

3.3. Spezifität der RFLP-Muster

Alle Amplifikate wurden zunächst mit *HaeIII* auf spezifische Schnittmuster getestet. Dieses Enzym wurde für die erste Schnittrunde ausgewählt, da es – zusammen mit der Kenntnis über die Amplifikatgrößen – die meisten unterschiedlichen RFLP-Muster ergeben würde. Von 58 erkennbaren *HaeIII* Mustern, waren durch ihre Einzigartigkeit 49 (84%) Muster schon bezeichnend und ausreichend für die Identifikation auf Speziesebene. Die *HaeIII* spezies-spezifischen Muster sind in Abb. 1 und 2 hervorgehoben. Die *HaeIII* Muster der langsam wachsenden Mykobakterien, *M. fortuitum* und *M. peregrinum* sind in der Abb. 3 und 4 dargestellt.

Mit Ausnahme der in Abb. 3, Spalte 3 und 4, 6 und 7, 13 und 16, 18 und 19, oder 24 und 25 sichtbaren minimalen Bandenunterschiede von 3 bis 9 Basenpaaren, erzeugte die Restriktion mit *HaeIII* hauptsächlich zwei bis drei DNA-Fragmente, deren Bandengrößen

Abb. 1

PCR Produkt	HaeIII Fragmente [Spalte Nr. in Abb. 3]	CfoI	DdeI	TaqI	Spezies und RFLP Genotyp	Nr. der Stämme	
205	130, 70	[10] — 0	<i>M. xenopi</i>	(59)	
212	95, 75, 42	— B	<i>M. kansasii</i> III	(0)	
217-220	168, 51	[17] — 144, 75	<i>M. asiaticum</i>	(3)	
	113, 57, 51	[8] — 0	<i>M. tuberculosis</i>	(90)	
	137, 52, 33	[11] — A	<i>M. interjectum</i>	(1)	
	138, 85	[12] — 0	<i>M. intermedium</i>	(4)	
	95, 85, 42	[6] — A	— A (Avall)	<i>M. kansasii</i> IV	(9)	
	92, 85, 42	[7]	A	— A	<i>M. avium</i>	(111)
			C	<i>M. bohemicum</i>	(2)	
			0	— A	<i>M. intracellulare</i> I	(19)
			C	<i>M. scrofulaceum</i> Ia	(10)	
	127, 93	[9]	0	— A	<i>M. intracellulare</i> IIa	(14)
			C	<i>M. scrofulaceum</i> Ib	(1)	
			A	<i>M. sp. (scrofulaceum)</i>	(5)	
	92, 75, 52	[5] — 0	<i>M. intracellulare</i> IIb	(1)	
	85, 74, 42	[3]	— C	<i>M. malmoense</i>	(11)	
0	<i>M. sp. (malmoense)</i>	(2)				
85, 71, 64	[2]	A	— A	<i>M. kansasii</i> IIa	(5)	
		B	<i>M. szulgai</i>	(8)		
80, 79, 63	[1] — D	<i>M. sp. (xenopi)</i>	(2)		
149, 71	[14] — A	<i>M. kansasii</i> IIb	(10)		
225	85, 80, 42	[4] — 0	0 (MspI)	<i>M. simiae</i>	(15)	
			A	<i>M. genavense</i>	(11)	
			A	<i>M. lentiflavum</i>	(5)	
			A	<i>M. triplex</i>	(2)	
231	146, 85	[13] — A	<i>M. gastris</i>	(5)	
237	152, 85	[16] — A	<i>M. kansasii</i> VI	(4)	
230	151, 79	[15] — B	<i>M. shimoidei</i>	(3)	
211	No restriction	[18] — 0	<i>M. gordonae</i>	(48)	
220	No restriction	[19]	0	— A	<i>M. kansasii</i> I	(23)
			0	<i>M. marinum/ulcerans</i>	(16/3)	
			A	— A (HinfI)	<i>M. kansasii</i> V/M. leprae	(1/0)
224	No restriction	[20] — A	— E	<i>M. celatum</i>	(15)	
231	No restriction	[21] — B	<i>M. sp. (gastris)</i>	(10)	
234-237	No restriction	[22] — 0	D	<i>M. conspicuum</i>	(1)	
			A	<i>M. haemophilum</i>	(3)	
305	No restriction	[21]	212, 86	<i>M. triviale</i> I	(1)	
			180, 80, 40	<i>M. triviale</i> II	(1)	
310	175, 90, 48	[25]	236, 40, 30	— 180, 127 ..	<i>M. nonchromogenicum</i> I	(3)	
			236, 70	— 180, 127 ..	<i>M. nonchromogenicum</i> II	(1)	
318	97, 80, 44	[23] — 0	— 0	<i>M. terrae</i> I	(1)	
314	170, 94, 50	[24]	244, 70	— 254, 60	<i>M. terrae</i> II	(2)	
			0	<i>M. terrae</i> III	(5)	
			190, 60, 55	— 0	<i>M. terrae</i> IV	(1)

Abb. 1. Algorithmus der RFLP Muster von 28 langsam wachsenden mykobakteriellen Spezies und 4 *Mycobacterium* sp. mit unklarem taxonomischen Status aus PCR-amplifizierten 16S-23S rDNA Spacer Sequenzen (547 Stämme). PCR Produkte und Restriktionsfragmente sind in Molekulargrößen in Basepaaren aufgeführt. HaeIII spezies-spezifische Muster sind durch Umrahmung in Kästchen hervorgehoben. CfoI Muster A-D: A 126-144, 91-96 (Verdauungsgrößenunterschiede in Abhängigkeit von der Größe des PCR-Produkts); B 129-1146,83; C 126,63,30; D 160,62; DdeI Muster A-E: A 120, 90; B 120, 80; C 120, 70; D 120, 100; E 214; *TaqI* Muster A: 155, 70; 0: keine Restriktion. Die Wildtypen wurden zum Genotyp I zugeordnet, wenn mehr als ein Muster in einer Spezies vorkam. Genotypen Ia und Ib oder IIa und IIb deuten auf große genetische Ähnlichkeit innerhalb eines Typen, gleichzeitig kommen jedoch auch neue RFLP Genotypen durch Verlust oder Erwerb einer *HaeIII* Schnittstelle zustande, was wiederum durch die allelische Mikroheterogenität zu erklären ist. *M. leprae* und *M. kansasii* III RFLP Muster wurden aus der Nukleotid Sequenz Annahme-Nr.: X56657 (EMBL) erschlossen und die *M. kansasii* Genotyp III Muster aus der Nukleotid Sequenz Annahme -Nr. Sequenz in der Publikation von Alcaide et al. [Alcaide et al. 1997]. Für eine detaillierte Beschreibung der *AvaII*, *HinfI*, und *MspI* Muster von *M. sp.* siehe Text.

Abb. 2

PCR Produkt	<i>HaeIII</i> Fragmente [Spalten Nr. in Abb. 4]	<i>CfoI</i>	<i>TaqI</i>	Spezies und RFLP Genotyp	Nr. der Stämme
257	No restriction	No restriction	226, 31	<i>M. abscessus</i>	(9)
			No restriction	<i>M. chelonae</i> I	(3)
			136, 121	<i>M. chelonae</i> II	(10)
			121, 104, 31	<i>M. chelonae</i> III	(1)
279, 257	170, 148, 109	[3] —	257, 200, 79	<i>M. fortuitum</i> I	(2)
280	172, 108	[5] —	No restriction	<i>M. fortuitum</i> II	(4)
			280, 200, 80	<i>M. fortuitum</i> III	(1)
298, 257	148, 109, 80	[2] —	257, 165, 133	<i>M. fortuitum</i> IV	(1)
257	148, 109	[1] —	No restriction	<i>M. fortuitum</i> V	(6)
			174, 72	<i>M. senegalense</i>	(10)
298, 280	170, 110, 78	[4] —	199, 165, 133, 81	<i>M. fortuitum</i> VI	(2)
300, 281	191, 172, 109	[6] —	205, 167, 133, 76	<i>M. fortuitum</i> VII	(1)
			281, 167, 133	<i>M. fortuitum</i> VIII	(2)
282	110, 86, 49, 33	[7] —	No restriction	<i>M. fortuitum</i> IX	(1)
296	108, 80	[8] —	155, 141	<i>M. fortuitum</i> X	(6)
305, 270	173, 115, 97	[9] —	305, 189, 81	<i>M. peregrinum</i> I	(11)
275	175, 100	[10] —	191, 84	<i>M. peregrinum</i> II	(5)
288	173, 115	[11] —	204, 84	<i>M. peregrinum</i> III	(1)
276	160, 86	—	194, 71,	<i>M. smegmatis</i>	(2)
305	103, 85	—	No restriction	<i>M. flavescens</i> I	(1)
300	203, 97	—	No restriction	<i>M. flavescens</i> II	(4)
	192, 109, 97, 91	—	297, 210, 70	<i>M. flavescens</i> III	(2)
285	187, 91	—	181, 107	<i>M. hassiacum</i>	(1)
290	130, 110, 50	—	No restriction	<i>M. sp.</i> (M511, M516)	(2)
295	No restriction	—	214, 70	<i>M. duvalii</i>	(1)
297	208, 89	—	195, 102	<i>M. chlorophenicum</i>	(1)
300	190, 110	—	168, 132	(Aval) <i>M. porcinum</i>	(1)
				<i>M. farcinogenes</i>	(20)
305	125, 90, 60, 30	—	No restriction	<i>M. obuense</i>	(1)
	189, 107	—	221, 63	<i>M. phlei</i> I	(4)
			221, 85	<i>M. phlei</i> II	(1)
315	121, 115, 47, 35	—	No restriction	<i>M. rhodesiae</i>	(1)
308	179, 46, 50, 33	—	No restriction	<i>M. vaccae</i>	(4)
310	115, 50, 30	—	No restriction	<i>M. parafortuitum</i> I	(1)
	115, 90, 45, 30	—	No restriction	<i>M. parafortuitum</i> II	(3)
320	230, 90	—	No restriction	<i>M. hodleri</i>	(1)
330	205, 130, 125, 60	—	240, 230, 100	<i>M. mucogenicum</i>	(1)
330, 310	110, 105, 90, 50, 45	—	310, 210, 130	<i>M. neoaurum</i>	(1)
330, 320	125, 110, 105, 80	—	No restriction	<i>M. aurum</i>	(2)

Abb. 2. Algorithmus der RFLP Muster von 21 schnell wachsenden Mykobakterien und einem Schnellwachser (*M. sp.*) mit unklarer Taxonomie aus PCR-amplifizierten 16S-23S rDNA Spacer Sequenzen. Details werden in der Erläuterung zu Abb. 1 gegeben.

leicht durch die Inspektion mit dem bloßen Auge des Gels beurteilt werden konnten. Da keine Primer-Dimer¹⁰ Formationen festgestellt wurden, konnten auch kleine Fragmente (bis 30 bp) für die Klassifikation der RFLP-Muster genutzt werden. Die übriggebliebenen neun *HaeIII* Muster, welche keine endgültige Bestimmung der Spezies ergaben, benötigten eine weitere Analyse mit zusätzlichen Endonukleasen.

Daher wurde bei allen Testorganismen eine Digestion mit *CfoI* durchgeführt. Obwohl die *CfoI* Muster für die definitive Identifikation der meisten Spezies nicht mehr benötigt wurden – vor allem nicht für die schnell wachsenden Mykobakterien –, ist als praktische Routine die umgehende gleichzeitige Restriktion durch beide Enzyme empfehlenswert, da die Verlässlichkeit der Ergebnisse durch ein Enzym zunimmt, wenn es durch eine zweite, durch Endonukleasen durchgeführte Analyse bestätigt wird. Dementsprechend sind alle Speziesmuster, welche durch die Verdauung durch *HaeIII* und *CfoI* entstanden sind, in Abbildung 1 und 2 dargestellt. Aus dem erstellten Algorithmus für langsam wachsende Mykobakterien (Abb. 1) wird ersichtlich, dass eine präzise Schätzung der Fragmente nach Restriktion mit *CfoI* im Allgemeinen nicht notwendig ist. Das besondere Charakteristikum für dieses Enzym beschränkte sich eher auf die Frage, ob ein Amplifikat geschnitten wurde oder nicht.

Einige Spezies wie *M. avium*, *M. chelonae*, *M. kansasii* und *M. simiae* benötigten aufgrund ihrer hohen Sequenzsimilarität mit ihren engsten Verwandten eine weitere Analyse durch *DdeI*, *TaqI* oder *AvaII* für ihre genaue Identifikation. Dieses wird auf Abb. 1,2 und 3 veranschaulicht. Vier dieser Cluster (Abb. 3, Spalten 2,7,9 und 22) wurden allein durch das Enzym *DdeI* aufgelöst. Weitere drei wurden durch *Taq I* differenziert (Abb. 3, Spalten 3 und 19), wobei *TaqI* nicht zur Unterscheidung von *M. genavense*, *M. lentiflavum* und *M. triplex* beitrug. Wenn es nötig ist, können diese drei Spezies, welche eine sehr hohe Spacer-Sequenzsimilarität von 95 % haben, durch die Verdauung mit *MspI* getrennt werden: *M. simiae* und *M. lentiflavum* Spezies wurden einmal geschnitten (139 und 86bp) und *M. genavense* und *M. triplex* wurden zweimal geschnitten (114, 86 und 25; und 86,79 und 60bp). Die Endonukleasen *AvaI* und *HinfI* könnten in Ausnahmefällen hilfreich sein, vor allem für weitere wissenschaftliche Fragestellungen sowie für die Archivierung von Referenzstämmen. Für die Beurteilung von *M. kansasii* im Vergleich zu *M. leprae* kann *HinfI*, für die Unterscheidung von *M. porcinum* und *M. farcinogenes* *AvaI* eingesetzt

¹⁰ Primer-Dimer sind das Produkt von nicht spezifischen Annealing- und Elogationsprozessen, welche sobald und vor allem auftreten können, wenn sie bei Raumtemperatur zusammengemischt werden.

werden. Ein Isolat dieses spezifischen *M. kansasii* Genotyps und der *M. porcinum* type strains wurden getestet: *M. kansasii* wurde in die Fragmente von 116bp und 105bp geteilt, *M. porcinum* in Fragmente der Größe von 215bp und 85bp geschnitten. Weder *M. farcinogenes*, noch *M. leprae* Stämme wurden geschnitten. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen der Datenbanksequenzen. Schließlich ist noch das Enzym *AvaI* in Abb. 1 zu finden: Für *M. avium*, *M. kansasii* IV und *M. bohemicum* steht aufgrund deren hoher Ähnlichkeit in ihren *HaeIII* Mustern, *AvaI* für den optionellen Gebrauch zur Verfügung. *M. avium* wurde durch *AvaI* verdaut (144 und 75bp), *M. kansasii* IV und *M. bohemicum* nicht. *M. marinum* und *M. ulcerans* besitzen identische Spacer Sequenz [Alcaide et al. 1997, Roth et al. 1998] und konnten daher nicht mit dieser Methode differenziert werden.

3.4. Reklassifizierung von vier Referenzstämmen

Mittels der RFLP-Methode des 16S-23S-Spacer-Amplifikats wurden vier Referenzstämme, welche fälschlicherweise als *M. fortuitum* (DSM 43276 und 46626), *Nocardia farcinica* (DSM 43231), und *M. thermoresistibile* (DSM 43644) registriert waren, als *M. chelonae* (ursprünglich DSM 43276 und 46626), *M. senegalense* (ursprünglich DSM 43231) und *M. phlei* diagnostiziert. Die partielle 16S-rDNA-Sequenzierung und die Analyse von Fett- und Mycolsäuren ergaben eine völlige Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen. Daraufhin wurden diese Stämme neu klassifiziert (die Namen in Tabelle 4 sind solche nach der Reklassifizierung).

3.5. Taxonomisch unklare Stämme

3.5.1. Schnell wachsende Mykobakterien

Zwei schnell wachsende Stämme, welche als *M. sp.* (Referenzstämme M511 und M516) bezeichnet wurden, hatten im Vergleich zu anderen schnell wachsenden Mykobakterien im 16S-23S-Spacer einzigartige Muster. Daten zur Bestimmung des exakten Phenotyps lagen nicht vor, die komplette 16S-rDNA-Sequenzanalyse enthüllte jedoch drei Austauschtripletts im Vergleich zu *M. smegmatis*: ACA → ATA, TAG → TGG und TTA → TGA in den Positionen 137, 162 und 1075 der Referenzsequenz (EMBL X52922). Dies könnte auf eine neue Spezies hinweisen.

3.5.2. Langsam wachsende Mykobakterien

Es wurden vier Gruppen, welche langsam wachsende Stämme mit unklarem taxonomischem Status umfassen, gebildet und vorläufig als *M. sp.* benannt (s. Tabelle 4, die Namen der am nächsten verwandten Spezies sind provisorisch in Klammern gesetzt). Obwohl diese Nomenklatur keine bestimmte taxonomische Stellung aufweist, deuten phenotypische und genotypische Daten zusammen mit dem im Folgenden ausführlich beschriebenen Ergebnis eines einzigartigen Spacer-RFLP-Musters auf eine Separation dieser Gruppen von etablierten Spezies:

- (i) *Mycobacterium sp. (gastri)*. Zehn Referenzstämme, welche ursprünglich entweder als *M. kansasii* oder *M. gastri* eingeordnet wurden, vereinigten sich in einem RFLP Genotyp (Abb. 3, Spalte 21). Ausser den Stämmen S230 bis S233, welche vorher als *M. gastri* Spacer Genotyp Mga B charakterisiert worden sind [Roth et al., 1998], wurden alle anderen dieser Stämme in der Spacer Region sequenziert. Daraus ergab sich, dass die vier *M. kansasii* Stämme und zwei *M. gastri* Stämme (DSM 43221 und 43507) zum Spacer *M. kansasii* Genotyp IV zuzuschreiben sind [Alcaide et al., 1997], **(die Tabelle 5 zeigt Ergebnisse dieser Arbeit zusammen mit schon verfügbaren Daten)**. Aufgrund der 1-Nukleotid Substitution in der Position 223 (ACT→ AAT), haben die Spacer Genotyp Sequenzen IV und Mga B einen Ähnlichkeitswert von 99,9%, die Sequenzen Mga B und Mga A (*M. gastri* Urstamm Sequenz) zeigen einen Ähnlichkeitswert von 98% (4-Nukleotid Unterschiede). Eine vorsichtige, neue Einschätzung der biochemischen Tests haben gezeigt, dass diese Stämme nicht in der Lage waren Tween 80 zu hydrolysieren (beide *M. gastri* und *M. kansasii* hydrolysieren jedoch Tween 80), während eindeutig positive Tests für *M. kansasii* (Nitratreduktion, Katalase und Photochromogenität) nur schwach positive Tween Hydrolyse Ergebnisse zeigten. Folglich wurden diese Stämme als unbestimmt oder neu in der Taxonomie nahe der Spezies *M. gastri* vermutet, wie auch durch ihre 16S-23S rDNA Sequenz bewiesen wurde [Alcaide et al. 1997, Roth et al. 1998]. Im Gegensatz dazu hydrolysierten alle *M. kansasii* Stämme Tween 80 und ihre Spacer Sequenzen zeigen ausreichende Diversität, um als drei typische Untergruppen aufzutauchen (Dendogramm nicht gezeigt): Sequenzgenotypen (Sequevare) I zusammen mit II, und III zusammen mit Mka B und Mka C als separate Gruppe, während Typ V den höchsten Grad an Ähnlichkeit mit *M. kansasii* Typ IV zeigt (90%). Die Auflösung der 16S-rDNA-

*Hae*III PCR-RFLP Muster der langsam wachsenden Mykobakterien

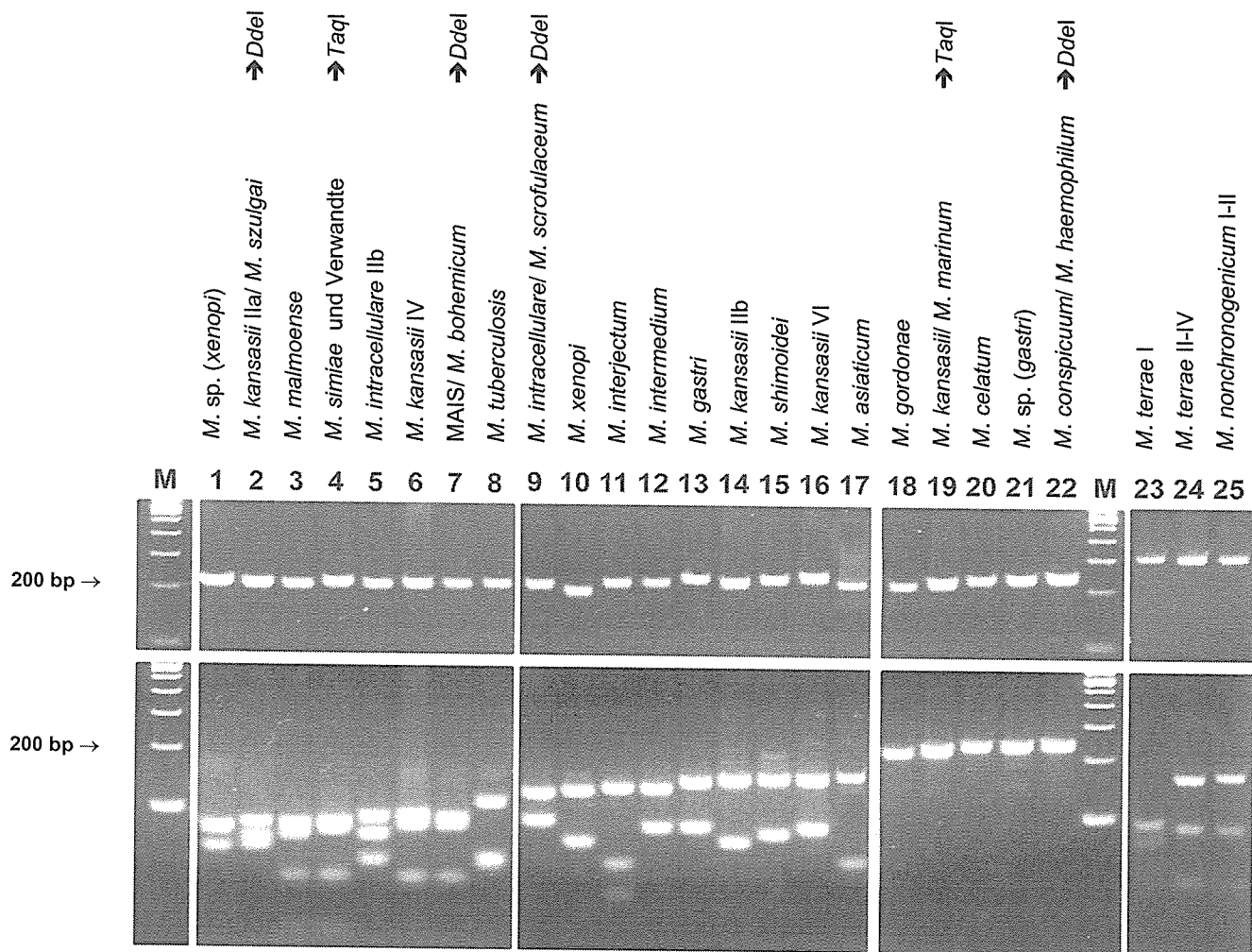


Abb. 3.

Gelelektrophorese und *Hae*III RFLP Muster der langsam wachsenden Mykobakterien der PCR-amplifizierten 16S-23S rDNA Spacersequenzen (das obere Feld zeigt die PCR Produkte ohne Restriktion). Die molekularen Bandengrößen sind in Abb. 1 angezeigt. Die Muster sind in der Reihenfolge nach zunehmender Größe des größten Fragments angelegt. M, molekularer Größenmarker (100 bp Leiter). MAIS, *M. avium-intracellulare-scrofulaceum*.

HaeIII PCR-RFLP-Muster von *M. fortuitum* und *M. peregrinum*

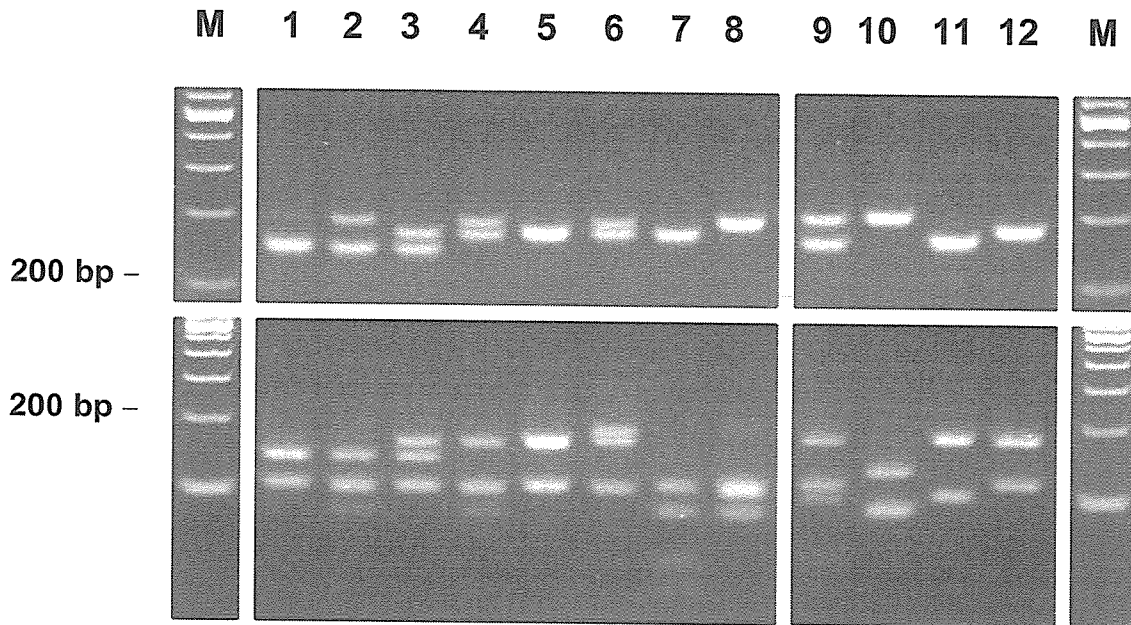


Abb. 4.

Gelelektrophorese und *HaeIII* RFLP Muster von *M. fortuitum* (Spalten 1-8) und *M. peregrinum* (Spalten 9-11) der PCR-amplifizierten 16S-23S rDNA Spacersequenzen (das obere Feld zeigt die PCR Produkte ohne Restriktion). Die Muster sind in der Erläuterung zu Abb. 2 beschrieben.

M: molekularer Bandenmarker (100-bp Leiter)

Sequenzen innerhalb dieser Einheiten war gering (Tabelle 5). Es wurden kleine Varianten in der variablen Region B gefunden und folglich bestätigt, wie auch von Richter et al. beschrieben [Richter et al. 1999]. Die „full-length 16S-rDNA Sequenzierung“ eines bestimmten Stammes, dessen AccuProbe Ergebnis negativ war (Stamm S522 mit dem Spacer Typ Mka C), machte es unwahrscheinlich, es hier mit einer unbekanntem, neuen Spezies zu tun zu haben, da er völlige Gleichheit mit der *M. kansasii* Urtyp Sequenz stromabwärts der variablen Region B zeigt (s. Tabelle 5).

- (ii) ***Mycobacterium sp. (malmoense)***. Zwei klinische skotochromogene Isolate, welche phänotypisch *M. malmoense* gleichen, zeigten eine 16S-rDNA Sequenz mit neun Substitutionen im Vergleich zu der von *M. malmoense*: CCC CGA→CCA CTT, GGG→GTG, ACG→ATG, TGG→TAG, CCT TGT→CCCCGT und TCG→TTG in den Positionen 141, 159, 220, 601, 1062 und 1403 der Referenz Sequenz (EMBL X52930). Diese Stämme könnten Subspezies von *M. malmoense* repräsentieren und interessanterweise tauchten sie als unverkennbare RFLP Genotypen nahe derer von *M. malmoense* auf.
- (iii) ***M. sp. (scrofulaceum)***. Fünf klinische Isolate zeigten, phänotypisch eng verwandt mit *M. scrofulaceum* (einziger physiologischer Unterschied war das mangelnde Wachstum bei 25 °C), einen RFLP Genotyp der *M. scrofulaceum* sehr ähnlich war aber unterscheidbar (s. Abb. 5). In passender Korrelation hierzu, besaßen diese eine charakteristische 16S rDNA Sequenz. Diese Sequenz war identisch mit der MCRO 33 Sequenz, welche zuvor publiziert wurde [Springer et al. 1996] und typischerweise die gleiche Identität mit *M. scrofulaceum* in der variablen Region A und die gleiche Identität mit *M. simiae* in Region B aufweist (Deletion von 12 Nukleotiden).
- (iv) ***M. sp. (xenopi)***. Zwei Stämme, S369 und S504, die aus Sputum von Pneumonie-Patienten isoliert wurden, zeigten identische komplette 16S rDNA Sequenzen, mit höchster Ähnlichkeit zu der des *M. xenopi* Urtyps (97%). Die fehlende Arylsulfatase-Aktivität (2 Wochen) und negative Nikotinamidase und Pyrazinamidase waren die Gründe der Unstimmigkeiten mit *M. xenopi*. Die RFLP Ergebnisse waren ein wenig anders als die von *M. xenopi* und stellten ein eigenes *HaeIII* Muster dar (s. Abb. 3)

Tabelle 5. Ergebnisse des 16S-23S Spacer Genotyps für *M. kansasii* und *M. gastrii* im Vgl. zu der 16S RNA und dem hsp65 Gen

Spezies und RFLP Genotypen	16S-23S Spacer (Anzahl der analysierten Stämme)			16S rDNA Sequenzvarianten nt 461-469 ^b	AccuProbe neue Version	hsp65 Gen ^c	
	Sequenz sequevar ^a	EMBL No.	Genotyp			Restriktionsfragmente BsfE II	HaeIII
<i>M. kansasii</i>	I (23)	I /Mka A (6)	X97632/ L42262	<i>M. kansasii</i> /gastri CGG GTT <u>C</u> T C	Positive	I	231, 212 127, 103, 78
	II (15)	II (7)		CGG GTT <u>G</u> T C	Positive	II	231, 133, 79 127, 103 (70)
	IV (9)	Mka B (2)	L42263	CGG GTT <u>I</u> T C	Positive	III	231, 133, 79 127, 94, 69
	V (1)	Mka C (1)	L42264	CGG GTT <u>I</u> C C	Negative	VI	231, 133, 79 127, 103, 69
	VI (4)	V (1)		<i>M. kansasii</i> /gastri	Positive	V	325, 125 140, 100, 80
	<i>M. sp. (gastri)</i>	(10)	IV Mga B (4)	Y14182	<i>M. kansasii</i> /gastri <i>M. kansasii</i> /gastri	Positive	IV
(5)		Mga A (4)	X97633	<i>M. kansasii</i> /gastri	Negative		231, 133, 79/ 127, 103, 69

^a Genotypen I bis IV und Mga A und B entsprechend der Literaturangaben 1 und 22. Sequevare Mka B und C Sequenzen wurden in der EMBL Datenbank 1995 (unpublizierte Daten) registriert und später wissenschaftlich bestätigt [Richter et al. 1999]

^b Bezieht sich nur auf die partielle 16S rDNA Sequenzierung innerhalb der variablen Region B. Unterstrichende Basen zeigen Substitutionspositionen an

^c Entsprechend der Literaturangaben 1, 18 und 20. Fettgedruckte Nummern zeigen identische Muster an. Das *HaeIII* 70 bp Fragment war in keinen Isolaten anwesend [Alcaide et al. 1997].

3.6. Intraspezies Stabilität von Spacersequenzen

Intraspezies Spacer Sequenz Polymorphismus scheint häufiger bei schnell wachsenden Mykobakterien als bei langsam wachsenden Mykobakterien vorzukommen. Tatsächlich besitzen viele der schnell wachsenden Mykobakterien, von denen viele Stämme innerhalb einer Spezies untersucht wurden, mehr als ein RFLP Muster. Wie schon von der bekannten Variabilität in der 16S rDNA zu erwarten, war *M. fortuitum* mit einer erheblichen Variabilität assoziiert, welche zu acht verschiedenen *Hae*III Mustern führte (Abb. 1). Alle teilten die 108-110 bp Bande und manche von ihnen wiesen aufgrund ihrer Interoperon Variabilität typische PCR Produkte mit zwei unterschiedlichen Größen auf. Diese Merkmale zusammen mit den *Cfo* I Ergebnissen, lieferten die korrekten Ergebnisse in allen Fällen. *M. fortuitum* subsp. *Acetamidolyticum* (DSM 44220) wurde zum RFLP Genotyp II zugeteilt, und ein Stamm mit einer 16S Signatur von *M. fortuitum* biovariant 3 wurde zum RFLP Genotyp VII zugewiesen.

Das Auftreten von RFLP Genotypen, die anders als die Genotypen des Urtyps von *M. flavescens* und *M. parafortuitum* Referenzstämmen sind (Abb. 2), wurde mit dem bis jetzt unbekanntem Sequenz-Polymorphismus des 16s RNA Gens assoziiert. *M. flavescens* II (S526) und III (S318) hatten identische 16S Sequenzen, aber unterschieden sich mit 23 Nukleotiden von der Urtypsequenz, welches die Frage zur „Spezies-Integrität“ dieser Referenzstämmen aufwirft. *M. parafortuitum* RFLP Genotyp II (DSM 43526) zeigte sechs Basen Substitutionen im Vergleich zur Typestrain (Urtyp) 16S rDNA Sequenz: fünf Unterschiede in der „Signatur“ Sequenz der variablen Region A (AAT AGG ATC GGC TTC ATG GTC) und ein „ mismatch“ (GAA→GGA) in der Position 882 der Referenzsequenz (EMBL X93183). „Full-length“ 16S rDNA Sequenzen von *M. phlei* und *M. triviale* RFLP Genotypen II (jeweils ein Stamm) zeigte völlig gleiche Identität von 100% mit den jeweiligen Typestrain Sequenzen.

Von den langsam wachsenden Mykobakterien wurden nur *M. kansasii*, der *M. terrae* Komplex und, zu einem geringeren Grade, *M. intracellulare* und *M. scrofulaceum* durch eine genetische Heterogenität charakterisiert, welche zu mehr als einem RFLP Muster innerhalb einer Spezies führten. Für viele langsam wachsende Spezies, wie z.B. *M.-avium* complex, *M. simiae*, *M. gordonae* (letzter geführt bei EMBL accession numbers L42258 bis 42261) und *M. xenopi* wurden Intraspezies-Sequenz-Variationen beschrieben [Frothingham et al. 1993, Roth et al. 1998]. Davon abgesehen hatten die allelischen

Heterogenitäten keine nachteilige Auswirkung auf den klar arrangierten RFLP Algorithmus. Trotzdem wurde eine bestimmte Auswahl von Stämmen sequenziert, um das Auftreten von Sequenzdiversitäten besser einschätzen zu können. Wir suchten Spezies aus, bei denen eine Diversität aufgrund Sequenzvariationen in der 16S rDNA und auch im *hsp 65 Gen* erwartet werden könnte. **Die Ergebnisse sind zusammen mit publizierten Sequenzen in Abb. 5 gruppiert aufgeführt.** Die Reproduktivität und folglich der Grad der Stabilität der Spacer Sequenzen wurde bestätigt, da diese Sequenzen völlige Übereinstimmung mit publizierten Daten ergaben [Frothingham et al. 1993, Frothingham et al. 1994]; auch wenn einige neue Sequenzen gefunden wurden (MAC J-L und Mgo E und F in Abb. 5). Von 81 untersuchten *M. avium* Stämmen fielen 44 auf die Mav A und 37 auf die Mav B Sequenzen. Die Spacer Sequenzen von sechs *M. celatum*-Isolaten waren alle identisch. Die Positionen der Restriktionsstellen, welche spezies-spezifische oder subspezifische RFLP Genotypen erzeugen, befinden sich in den konservativen Stamm-loop Regionen. Im Falle *M. intracellulare* zum Beispiel erhalten diese bestimmte Sequenzmotive, welche in subspezifischen Gruppen – verwandt mit entweder Min oder Mac Sequenzen –, gefunden wurden und der Reihe nach zu Formationen von zwei RFLP-Genotypen führten. Diese Cluster enthalten eine größere Zahl an Sequenzen, welche durch eine hohe Rate an Substitutionen in den variablen Regionen gekennzeichnet ist, wie zum Beispiel bei Antiterminationselementen (Position 130-160) oder innerhalb der Helices 2,5 und 6 (Abb.5). Die letzten zwei liegen außerhalb des 16S-23S Spacerteils, welches durch die Primer Sp1 und Sp2 amplifiziert wurden. Eine einzige sporadische Mutation mit der Erzeugung einer neuen Restriktionsstelle innerhalb der Helix 2 wurde nur einmal beobachtet (Mac K mit RFLP Genotyp *M. intracellulare* Iib [Abb. 5]). Obwohl das Auftreten von Substitutionen in der Stammregion selten erwartet wird, haben wir Substitutionen bei der Transition von Helix 3 zu der Stammsequenz gefunden (Position 76 [Abb. 5]). So wurden *M. kansasii* und *M. scrofulaceum* in zwei RFLP Genotypen aufgesplittet, welche demselben Mutationsereignis zuzuschreiben sind.

Schließlich stellt die große Zahl der Stämme, welche innerhalb einer Spezies studiert wurden mit Assoziation zu nur einem RFLP Muster – trotz Sequenz Heterogenitäten –, wie z.B. bei *M. gordonae* oder *M. xenopi*, einen festen Beweis dar, dass der Grad der Stabilität der RFLP Muster sehr hoch ist.

Abb. 5

Spezies and Sequevar	Anzahl	15	Helix 2	45	68 Helix 3	Stamm	86 I21	Stamm	Helix 4
<i>M. avium</i> [Mav A-E]	(81)	AAAGCACCCC	--AACTGGTGGGGTGGAGGCC		ACGGG	GGCCGGGT	GCGC	TTGGCCCTGAGA	CAA
<i>M. intracellulare</i> [Mac A]	(3)TTA
[Mac B/D]	TTA
[Mac C]	TTA
[Mac E]	TTA	..AA	..AA	..AA	..AA	..AA
[Mac F]	TTA	..AA	..AA	..AA	..AA	..AA
[Mac H]	TTA	..AA	..AA	..AA	..AA	..AA
[Mac I]	TTAA	..AA	..AA	..AA	..AA
[Mac J]	(1)TTA
[Mac K]	(1)TTGA
[Mac L]	(2)TTTAA	..AA	..AA	..AA	..AA	..AA
[Min A-C]	(5)TT
[Min D]	TT
<i>M. scrofulaceum</i> [Msc A]	(1)	G
[Msc B]	(1)	G
<i>M. sp. (scrofulaceum)</i>	(4)	G
<i>M. sp. (scrofulaceum)</i>	(1)	G
<i>M. bohemicum</i>	(2)ATT	G
<i>M. kansasii</i> RFLP IIa	(6)	GTA
<i>M. kansasii</i> RFLP IIb	(1)	GTA
<i>M. celatum</i>	(6)AGCT	GT
<i>M. gordonae</i> [Mgo A]	(2)	GTA
[Mgo B/C/F]	(2)	GTA
[Mgo D]	(1)	GTA
[Mgo E]	(2)	GTA

Abb. 5. Sequenzstabilität und Mikroheterogenität der 16S-23S rDNA Spacer Sequenzen in konservativen und variablen Regionen mit Relevanz für die Spaltungstätigkeit von HaeIII (GGCC) und Cfo I (GCGC). Sequenzen, welche in dieser Arbeit nicht gefunden wurden, jedoch anderswo publiziert wurden, sind enthalten [Good et al. 1985, Frothingham et al. 1993, De Smet et al. 1995]. Die jeweiligen Sequevar Bezeichnungen sind in eckigen Klammern aufgeführt und die Anzahl der Stämme mit runden Klammern versehen. Sequevare, welche zusammen auf einer Zeile stehen zeigen Basen Substitutionen. Diese sind in anderen Regionen des Spacers lokalisiert und hier nicht abgebildet. Von Mav A bis E und Min A bis C wurden nur Mav A oder B und Min A gefunden. Innerhalb sieben untersuchten *M. gordonae* Isolaten wurde kein Mgo B Sequevar gefunden.

3.7. Abgrenzung der Spezies *Gordona terrae* von Mykobakterien durch die Endonuklease Hae III

Mit Ausnahme von *Gordona terrae*, wurde kein weiteres Bakterium außerhalb der Gattung Mykobakterien durch die ausgewählten Primer amplifiziert. *G. terrae* zeigt jedoch ein eigenes, spezifisches Hae III Muster. Da Hae III als erstes Enzym für die Durchführung des RFLP ausgewählt wurde, konnte man *G. terrae* sofort nach der Amplifikation im ersten Restriktionsschnitt sicher identifizieren. Von den fünf *G. terrae* Stämmen zeigten drei ein PCR-Produkt von 315-bp und zwei eines von 330-bp. Das HaeIII Muster der ersten drei ergab Schnittstellen bei 200, 170 und 130bp, der weiteren zwei, Schnittstellen bei 185 und 160bp.

4. Diskussion

4.1. Notwendigkeit einer breiten Auswahl von Isolaten für die Realibilität von Primern und des Algorithmus

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer neuen molekularen Methode zur Identifizierung von Mykobakterien, die einerseits in der Lage ist, alle Taxone zuverlässig und mit hoher Genauigkeit bis zum Spezieslevel zu identifizieren. Andererseits sollte sie einfach zu handhaben sein, mit der Absicht in Routinelaboratorien angewendet werden zu können. Deshalb war es wichtig, ein möglichst breites Spektrum an Spezies in die Arbeit aufzunehmen. Es sind eine Vielzahl von Referenzstämmen und klinischen Isolaten innerhalb einer Spezies untersucht worden. Dies war erstens notwendig, um die Zuverlässigkeit der neu gewählten Primer zu bestimmen, deren genetischer Ort tendenziell häufigere Sequenzrearrangements aufgrund einer höheren Evolutionsrate aufweist [Gürtler et al. 1996, Roth et al. 1998]. Zweitens, je mehr klinische Isolate untersucht werden, um so sicherer lässt sich ein gültiger Algorithmus erstellen: das Auftreten von unterschiedlichen RFLP Mustern durch Sequenzpolymorphismus innerhalb einer Spezies kann besser analysiert und eventuell neu auftretene Muster in Subgruppen aufgeteilt werden.

4.2. Die Auswahl der Primer

Bei der Auswahl der Primer war es wichtig, durch die einmalige PCR-Amplifikation aller zu testenden Isolate nur positive PCR-Ergebnisse bei Amplifikation von Mykobakterien zu erhalten, damit eine Genuspezifität für diese Gattung zu erreichen und im selben Schritt zwischen schnell und langsam wachsenden Mykobakterien unterscheiden zu können.

4.2.1. Genuspezifität

Es ist mit der Auswahl der Primer Sp1/2 gelungen, die Gattung Mykobakterien nach PCR und damit noch vor der Restriktion, sicher von anderen nicht mykobakteriellen Spezies abzugrenzen und damit eine Genuspezifität zu erlangen. Einzige Ausnahme stellt allerdings *Gordona terrae* dar, welche sich jedoch nach dem im direkten Anschluss der PCR folgenden Schritt (Restriktion mit *Hae III*) durch ihr eigenes spezifisches *Hae III* Muster sicher erfassen lässt.

4.2.2. Die Unterscheidung zwischen schnell wachsenden und langsam wachsenden Mykobakterien

Neben der Genuspezifität der gezeigten Primer, waren die Größenunterschiede der PCR Amplifikate äußerst nützlich, da sie dadurch auf einfachste Weise die Unterscheidung zwischen langsam wachsenden und schnell wachsenden Mykobakterien vor Restriktion auf den ersten Blick ermöglichen. Zur Erklärung dazu sei erwähnt, daß die langsam wachsenden Mykobakterien immer Bandengrößen unter, die schnell wachsenden über 250 bp zeigen. Darüber hinaus ist dieses neue, wertvolle Charakteristikum hilfreich, um gemischte Kulturen zweifelsfrei zu erkennen. Wenn zum Beispiel eine Kultur ein relevantes pathogenes *Mycobacterium* wie *M. malmoense* enthält, kann es bei gleichzeitigem Überwachsen von *M. fortuitum* oder *M. terrae* erkannt werden, da, unabhängig von gemischten Mustern, *M. fortuitum* und *M. terrae* weit größere PCR-Produkte als 220bp besitzen (s. Abb. 1 u. 2).

4.3. Intraspeziesstabilität der RFLP-Muster von langsam wachsenden Mykobakterien im Vergleich zum *hsp65* Gen

Methode

Bezüglich der Intraspeziesstabilität der RFLP-Muster ist die Spacer-basierende Methode, was die expandierenden Gruppen der Stämme innerhalb der langsam wachsenden Spezies (wie z. B. *M. tuberculosis*, *M. gordonae*, *M. avium* oder *M. xenopi*) anbetrifft, erfolgreich gewesen (s. Abb. 1): Diese Keime werden häufig in Routinelaboratorien gefunden und es ist zufriedenstellend, dass, abgesehen von wenigen Ausnahmen, alle Stämme innerhalb einer Spezies mit nur einem RFLP Muster assoziiert sind. Ganz anders stellten sich die Ergebnisse der *hsp65* Gen RFLP-Methode dar, bei der eine größere Zahl an RFLP-Mustern innerhalb einer Spezies auftreten (z.B. sechs Muster für *M. gordonae*), [Devallois et al. 1997, Taylor et al. 1997]. Die Erkennung von gut differenzierbaren *M. kansasii* Subgruppen (Tab. 5), welche durch einzigartige Spacer RFLP-Genotypen genau definiert werden konnten, korreliert mit vorhergegangenen Publikationen [Alcaide et al. 1997, Picardeau et al. 1997, Richter et al. 1999]. Im Vergleich dazu kann die *hsp65* Gen RFLP-Methode die klinisch relevanten Subspezies *M. kansasii II* und Mka C von dem nicht pathogenen *M. gastri* nicht unterscheiden (Tab. 5). Als einer von wenigen Nachteile des 16S-23S Spacers ist die komplette Sequenzidentität von *M. marinum* und *M. ulcerans* zu nennen. Dies ist jedoch aus klinischer Sicht ein zu vernachlässigendes Problem insofern, als diese Spezies unter völlig unterschiedlichen epidemiologischen Bedingungen auftreten [Frothingham et al. 1996].

4.4. Intraspeziesstabilität der RFLP Muster von schnell wachsenden Mykobakterien

Die Sequenzvariabilität unter den schnell wachsenden Mykobakterien war erheblich (Abb. 2). Es wurden zwar viele schnell wachsende auf speziesspezifischer Ebene erkannt (Abb. 2), es ist aber zu erwarten, dass weitere RFLP-Muster gefunden werden, sobald mehr Stämme analysiert werden. Dies könnte besonders auf den *M. terrae*- *M. nonchromogenicum*-complex oder auf schnell wachsende Spezies wie *M. neoaurum* zutreffen, welche zwar speziesspezifische Ergebnisse liefern, jedoch könnte die geringe Anzahl der untersuchten Stämme die tatsächliche genetische Heterogenität unterschätzen. Daraus erschließt sich, daß die Daten für die meisten schnell wachsenden Mykobakterien noch nicht ausreichend sind und einer weiteren Untersuchung bedürfen.

Ähnliche Beobachtungen wurden unter Einsatz des *hsp65* Gens als genetisches Ziel gemacht [Ringuet et al. 1999]. Es wäre interessant, die biologische Signifikanz der Spacer RFLP-Genotypen im Vergleich mit den Urtypen (type strains) zu validieren. Da die Sequenzierungsdaten für schnell wachsende Mykobakterien immer noch sehr unvollständig sind [Ringuet et al. 1999, Springer et al. 1996], liegt es nahe, nach weiteren RFLP Muster Genotypen von eventuell unbekanntem infrasubspezifischen 16S rDNA Genotypen zu suchen. Hinweisend dafür sind die RFLP-Muster von *M. flavescens* und *M. parafortuitum* (Abb. 2), wobei hier dringend weitere Untersuchungen dieser Spezies notwendig sind, denn die Referenzstämme wurden in dieser Arbeit nicht durch biochemische Verfahren gegengetestet. Neben phylogenetischer und auch taxonomischer Bedeutung, könnten solche RFLP-Subtypen sowohl klinisch, physiologisch als auch epidemiologisch signifikante Subdivisionen widerspiegeln, wie es schon für *M. chelonae* oder auch *M. avium* complex beschrieben wurde [Frothingham et al. 1993, Frothingham et al. 1994, De Smet et al. 1995]. Einige zusätzliche RFLP-Genotypen innerhalb einer Spezies zeigen eventuell keine phänotypischen Korrelationen bei den üblichen physiologischen Tests. Dies lässt sich durch die höhere phylogenetische Auflösung der 16S-23S Spacer Sequenzen erklären. Auch eine genotypische Korrelation bei der Sequenzierung der kompletten 16S rDNA kann aus diesem Grund fehlen. Ein Beispiel dafür ist 16S rDNA Sequenzierung von *M. phlei* und *M. triviale* RFLP Genotypen II.

4.5. Vor- und Nachteile der Methode im Vergleich zum *hsp65* Gen

Die starke Ähnlichkeit von *M. avium*, *M. bohemicum* und *M. kansasii* II weist ein unerwünschtes Defizit der hier angewandten Methode auf, zumal *M. avium* eines der am häufigsten isolierten Mitglieder des Genus *Mycobacterium* darstellt. Bei vorsichtig angewandter Gelelektrophorese durch fachkundiges Personal unseres Labors wurde die oben genannte Spezies jedoch nicht verwechselt (Abb. 3, vgl. Spalten 6 und 7). Schließlich ergab sich durch die Anwendung eines dritten Enzyms eine eindeutige Übertragung der jeweiligen Spezies in allen Fällen. Darüber hinaus sei erwähnt, dass *M. bohemicum* und *M. kansasii* RFLP Genotyp IV (Sequevar Mka B) in der Klinik kaum vorkommen [Alcaide et al. 1997, Richter et al. 1999]. Von einem möglichen Versagen der Methode in diesem Falle kann in den meisten Laboratorien, die Gensonden für *M. tuberculosis* und *M. avium* benutzen, abgesehen werden. Wenn allerdings die RFLP-Methode als einziger Nachweis zur Identifikation von Mykobakterien gilt, sollte den Untersuchern für die Unterscheidung dieser Muster dieses Phänomen präsent sein, indem sie die Gele länger laufen lassen, als es für *M. avium* als interner Standard empfohlen wird. In diesem Zusammenhang soll hiermit verdeutlicht werden, dass für die vollständige Beurteilung von Zuverlässigkeit und die Differenzierungsfähigkeit dieser Methode eine äußerst umsichtige Inklusion der eng verwandten Spezies absolut entscheidend ist. Dass es notwendig war, bei einigen Gruppen zusätzliche Enzyme zu verwenden, wurde nur bemerkt, da die Untersuchung eng verwandter Mykobakterien ein weiteres Anliegen im Rahmen dieser Arbeit darstellte (z.B. *M. simiae* zusammen mit *M. lentiflavum* und *M. triplex*). Anscheinend ist die Verschiedenartigkeit der Spacer-Sequenzen im Gegensatz zur *hsp65* Gen nicht in allen Gruppen auf Spezieslevel hoch genug, um eine Separation durch nur zwei Verdauungsschritte zu gewähren. Dennoch ist anzunehmen, dass dieser Nachteil durch die insgesamt einfache Handhabung der Methode für die Mehrzahl der anderen Spezies sowie den großen Informationsgehalt, der aus der Verdauung mit *HaeIII* resultiert, kompensiert wird. Die RFLP Ergebnisse für die Spezies wie *M. lentiflavum*-*M. triplex*, *M. bohemicum* (welche eng verwandt mit *M. avium* ist), *M. interjectum*-*M.m intermedium*, *M. farcinogenes* oder *M. obuense* wurden bis jetzt noch nicht durch Untersuchungen mit dem *hsp65* Gen berichtet [Telenti et al. 1993, Steingrube et al. 1995, Devallois et al. 1997, Steingrube et al. 1997, Taylor et al. 1997, Troesch et al. 1999]. Diese Tatsache mag darauf hinweisen, dass die *hsp65* Gen Daten noch zu vervollständigen sind.

4.6. Die Bedeutung der RFLP-Methode in Bezug auf die mykobakterielle Taxonomie

Eines der wichtigsten Ergebnisse aus dieser Arbeit ist die Tatsache, dass die gezeigte Methode das Potential für den Gebrauch in der mykobakteriellen Taxonomie besitzt. Es ist interessant, dass die Spezies, die nahe verwandt miteinander sind, sich in den gleichen oder ähnlichen *Hae* III Mustern gruppieren. Beispiele dafür liefern *M. avium* complex zusammen mit *M. bohemicum*, *M. simiae* und Verwandte, *M. fortuitum* und *M. senegalense* und ähnliche *Hae* III Muster wurden für *M. terrae* und *M. nonchromogenicum* gefunden. Im Gegensatz dazu besitzt ein Taxon eindeutig ein klar erkennbares *Hae* III Muster, welches eventuell eine neue Spezies repräsentieren könnte (*Mycobacterium* sp. *xenopi* genannt), was wiederum durch eine niedrige 16S rDNA Similarität von nur 97% mit *M. xenopi* angedeutet wird. Ein ähnlicher Fall ist für *M. flavescens* zu beobachten. Es treten bei sechs *M. flavescens* Referenzstämmen *Hae*III Muster auf, die sich maßgeblich vom Typestrain (Urtyp) Muster unterscheiden. Diese Tatsache weist auf eine genetische Disintegrität dieser Gruppe hin, was auch später durch die Sequenzierung der 16S rDNA bestätigt wurde. Bakterien, die provisorisch als Subspezies galten, zum Beispiel *M. sp. malmoense*, traten im Gegensatz dazu als einzigartig identifizierbare Einheit auf und teilten trotzdem das gleiche *Hae*III Muster mit den meisten nahen Verwandten. Unabhängig von der taxonomischen Validität dieser Beobachtungen, spiegeln sie den hohen Grad des konservativen Charakters der Spacer Sequenz wider und bekräftigen damit die vorher diskutierte Meinung, dass die 16S-23S rDNA Spacer-Analyse eine Bereicherung für die mykobakterielle Phylogenie darstellt [Frothingham et al. 1993, Frothingham et al. 1994, Roth et al. 1998]. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Spacer-Sequenzanalyse gut mit den 16S rDNA Sequenzdaten korreliert. Es wurden noch keine gültigen Beschreibungen von neuen Spezies oder Subspezies ausgearbeitet, aber die *M. kansasii*- *M. gastri* und *M. flavescens* Fälle demonstrieren die Praktikabilität der Methode, neue Taxone zu identifizieren, bevor ein genaueres und arbeitsintensives Forschen mit vergleichenden Sequenzen (oder solchen, die die numerische Taxonomie involvieren) begonnen wird. Das Problem eines pigmentierten *M. gastri*-Stammes wurde schon von Anz und Schröder 1970 beschrieben [Anz et al. 1970]. Später wurde diese Diskussion wieder aufgenommen und als eine genetische Heterogenität von *M. kansasii* entdeckt [Alcaide et al. 1997, Richter et al. 1999]. Die teilweise etwas verwirrende

Nomenklatur der verschiedenen Publikationen ist in Tabelle 5 aufgeführt. Es sei hierzu bemerkt, dass die Spacer-basierenden Methoden allen anderen genetischen Ansätzen überlegen scheinen, inklusive der 16S rDNA Methode, welche nicht in der Lage ist, zu den Genotypen, die gefunden worden sind, analytisch vorzudringen. Ebenfalls weist die AccuProbe Sondenmethode insofern Mängel auf, als sie eine *M.kansasii* Subgruppe nicht identifizieren kann, während die taxonomisch undeterminierte Subgruppe mit dem Spacer Genotyp IV positive Ergebnisse erbringt. Die letztere Untersuchung hat allerdings keine Auswirkung auf die Klinik, da diese Keime bis jetzt nur als Probe aus der Umwelt isoliert wurden [Alcaide et al. 1997].

5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, eine neue molekulare Methode zu entwickeln, welche in nur einem Schritt das Genus *Mycobacterium* von anderen nahe verwandten Genus abgrenzt und in wenigen weiteren Schritten alle Taxone weitgehend zuverlässig und genau auf Spezieslevel identifiziert. Sie sollte darüber hinaus schnell und einfach in der Handhabung sein sowie keine hohen Kosten verursachen, so daß diese Methode sich zur Anwendung in Routinelaboratorien eignet.

Das 16S-23S rDNA PCR-RFLP Verfahren stellt eine vielversprechende, neue Methode zur zuverlässigen und einfachen Identifikation von Mykobakterien dar, die z.B. der weit angewandten *hsp65* Gen Methode aufgrund eindeutiger Vorteile überlegen ist:

Es ist gelungen, mit der Auswahl der Primer Sp1/2, die Gattung Mykobakterien nach PCR und damit noch vor der Restriktion, sicher von anderen nicht mykobakteriellen Spezies abzugrenzen und damit eine Genusspezifität zu erlangen. Um die Zuverlässigkeit der neu gewählten Primer zu bestimmen, wurde ein breites Spektrum an Spezies in die Arbeit aufgenommen (Tab. 4). Es wurden insgesamt 678 mykobakterielle Stämme innerhalb 48 Spezies mit einer Vielzahl von Referenzstämmen und klinischen Isolaten zur Unterscheidung auf Inter-Spezies-Ebene und auf Intraspezies-Ebene mit diesem neuen auf 16S-23S rDNA PCR RFLP basierendem Ansatz erfolgreich untersucht. Das Ziel wurde erreicht, mit Hilfe von lediglich drei Endonukleasen Abweichung spezifischer Muster einzelner mykobakteriellen Spezies zu differenzieren.

Neben dem typischen Bandenmuster der jeweiligen Spezies (Hauptziel der Dissertation), stellen die Größenunterschiede der Amplifikate einen weiteren Vorteil dar, insofern als alle langsam wachsenden Mykobakterien immer Bandengrößen unter, die schnell wachsenden über 250 bp zeigten. Es ist dadurch möglich, diese beiden Mykobakteriengruppen sofort nach Amplifikation zu unterscheiden. Dies ermöglicht zudem, im Einzelfall pathogene langsam wachsende Mykobakterien, wie z.B. *M. malmoense* in einer Kultur zu erkennen, auch wenn sie von schnell wachsenden, wie z.B. *M. fortuitum* überwuchert werden (beispielhaft, s. Abb. 1 und 2).

Im Vergleich zu neuen technisch aufwendigen und kostenintensiven Methoden wie die DNA Probe Arrays [Troesch et al. 1999], hat die hier entwickelte Methode den Vorteil, dass sie einfach anzuwenden, insbesondere kostengünstig ist und dabei ein breites diagnostisches Spektrum an Mykobakterien erfasst. Die 16S-23S rDNA PCR-RFLP

Methode eignet sich sehr gut für den Gebrauch in der mykobakteriellen Taxonomie. Spezies, die nahe miteinander verwandt sind, gruppieren sich interessanterweise in den gleichen oder ähnlichen *Hae* III Mustern. Im Gegensatz dazu besitzt ein hier untersuchtes neu entdecktes Taxon eindeutig ein klar erkennbares *Hae* III Muster, welches eventuell eine neue Spezies repräsentieren könnte (*M. sp. xenopi* genannt). Es wurden noch keine gültigen Beschreibungen von neuen Spezies oder Subspezies ausgearbeitet, aber die *M. kansasii*- *M. gastri*- und *M. flavescens*-Fälle z.B. demonstrieren die Praktikabilität der Methode, neue Taxone zu identifizieren, bevor ein genaueres und arbeitsintensives Forschen mit vergleichenden Sequenzen (oder solchen, die die numerische Taxonomie involvieren) begonnen wird.

Abgesehen von der allelischen Diversität, wurden zufriedenstellende Intraspezies-Stabilitäten von erkennbaren RFLP Mustern vorgeführt: Bis auf wenige Ausnahmen konnten expandierende Gruppen von Stämmen innerhalb der langsam wachsenden Spezies (z.B. *M. tuberculosis*, *M. gordonae*, *M. avium* oder *M. xenopi*) mit je nur einem RFLP Muster assoziiert werden. Bei der *hsp65* Gen Methode traten bis zu sechs unterschiedliche RFLP-Muster innerhalb einer Spezies auf (*M. gordonae*).

Im Gegensatz hierzu war die Sequenzvariabilität unter den schnell wachsenden Mykobakterien größer. Es werden zwar spezies-spezifische Ergebnisse geliefert, es ist allerdings zu erwarten, dass mehr RFLP Muster gefunden werden, sobald mehr Stämme analysiert werden. Das Entdecken von Korrelationen spezifischer genetischer Subspezies zur Klinik, sollte ein Anreiz für weitere Forschung auf diesem Gebiet sein.

6. Literatur

1. **Alcaide F, Richter I, Bernasconi C, Springer B, Hagenau C, Schulze-Röbbecke R, Tortoli E, Martín R, Böttger E, and Telenti A.** 1997. Heterogeneity and clonality among isolates of *Mycobacterium kansasii*: implications for epidemiological and pathogenicity studies. *J Clin Microbiol* **35**: 1959-1964
2. **Alcaide F, Benites MA, Escribe JM, Martin R.** 2000. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/BacT systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe. *J Clin Microbiol* **38**: 398-401
3. **Anz W, and Schröder K-H.** 1970. Photochromogenic strains of *Mycobacterium gastri* *Zbl Bakteriol* **214**: 553-554
4. **Bailey WC.** 1983. Treatment of atypical mycobacterial disease. *Chest* **84**: 625-628
5. **Beam ER, and Kubica GP.** 1968. stimulatory effects of carbon dioxide on the primary isolation of tubercle bacilli on agar containing medium. *Am J Clin Pathol* **50**: 395-397
6. **Benson CA.** 1994. Disease due to the *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS: epidemiology and clinical symptoms. *Clin Infect Dis* **18**: S218-S222
7. **Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2004.** Robert Koch-Institut Berlin, 2006
8. **Blacklock ZM, Dawson DJ, Kane DW, McEvoy D.** 1983. *Mycobacterium asiaticum* as a potential pulmonary pathogen for humans: a clinical and bacteriological review of five cases. *Am Rev Resp Dis* **127**: 241-244
9. **Blackwood KS, He C, Gunton J, Tzrenne CY, Wolfe J, Kabani AM.** 2000. Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol* **P**. 2846-2852
10. **Bloom BR, Murray JL.** 1992. Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. *Science* **257**: 1055-1064

11. **Böttger EC.** 1989. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *Microbiology letters.* **65:** 171-176
12. **Böttger EC, Teske A, Kirschner P, Bost S, Chang HR, Beer V, Hirschel B.** 1992. Disseminated „*Mycobacterium genavense* infection“ in patients with AIDS. *Lancet.* **340:** 76-80
13. **Böttger EC.** 1996. Approaches for identification of microorganisms. *ASM News.* **62:** 247-250
14. **Brander E, Jantzen E, Huttunen R, Julkunen A, and Katila M-L.** 1992. Characterization of a distinct group of slowly growing mycobacteria by biochemical tests and lipid analysis. *Int J Syst Bacteriol* **30:** 1972-1975
15. **Butler WR, O'Connor SP, Yakrus MA, Smithwick RW, Plikaytis BB, Moss CW, Floyd MM, Woodly CL, and Kilburn JO.** 1993. *Mycobacterium celatum* sp. nov. *Int J Sys Bacteriol* **43:** 539-548
16. **Butler WR, and Guthertz LS.** 2001. Mycolic Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography for Identification of *Mycobacterium* species. *Clin Microbiol Rev* **14:** 704-726
17. **CDC (Centers of Disease control): Marks S, Magee E, Robison V.** Div of tuberculosis elimination. 2007. Reported HIV Status of Tuberculosis Patients – United States, 1993-2005. *MMWR* **56:** 1103-1106
18. **Collins CH, Grange JM, Noble WC, Yates MD.** 1985. *Mycobacterium marinum* infections in man. *J Hyg (Camb.)* **94:** 135-149
19. **Colville A.** 1993. Retrospective review of culture-positive mycobacterial lymphadenitis cases in children in Nottingham, 1979-1990. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **12:** 192-195
20. **Cook V J, Turenne Y, Wolfe J, Pauls R, Kabani A.** 2002. Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: cost analysis. *J Clin Microbiol* **P.1010-1015**
21. **Cox H, Hargreeves S, Ismailov G.** Effect on multidrug resistance on global tuberculosis control. *Lancet* 2003; 1858-1859

22. **David E, Griffith TA, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Dayley C, Gordin F, Holland SM, Hordburgh R, Huittt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ jr, Winthrop K**, on behalf of the ATS Mycobacterial Ciseases Subcommittee. 2007. An official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. American Thoracic Society Documents. *Am J Resp Care Med* **175**: 367-416
23. **Davidson PT**. 1981. International conference on atypical mycobacteria. *Rev Infect Dis* **3**: 813-1103
24. **De Beenhouwer H, Liang Z, de Rijk P, van Eekeren C, and Portaels F**. 1995. Detection and identification of mycobacteria by DNA amplification and oligonucleotide-specific capture plate hybridization. *J Clin Microbiol* **33**: 2994-2998
25. **De Cock KM, Chaisson RE**. 1999. Will DOTS do it? a reapraisal of tuberculosis control in countries with high rates of HIV infection. *Int J Tuberc Lung Dis* **3**: 457-465
26. **De Smet AL, Brown IN, Yates M, and Ivanyi J**. 1995. Ribosomal internal transcribed spacers are identical among *mycobacterium avium-intracellulare* complex isolates from AIDS patients, but vary among isolates from elderly pulmonary disease patients. *Mircobiology* **141**: 2739-2747
27. **Devallois A, Goh KS, and Rastog N**. 1997. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol* **35**: 2969-2973
28. **Deutsches Institut für Normung, Normenausschuss Medizin (NAMed)** DIN 58943 Teil 3: Kulturelle Methoden zur Isolierung von Mykobakterien, Teil 7: Modifiziertes Löwenstein-Jensen Kulturmedium zur Anzüchtung von Tuberkulosebakterien, Teil 8: Empfindlichkeitsprüfung von Tuberkulosebakterien gegen Chemotherapeutika, Teil 9: Mindestanforderungen zur Identifizierung von Tuberkulosebakterien, Teil 32, Mikroskopische Methoden zum Nachweis von Mykobakterien (1980-2007). DIN Deutsches Institut für Normung e.V Berlin (Beuth)
29. **Dooley SW, Jarvis WR, Martone WJ, Snider DE, CDC**. 1992. Multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Intern Med* **117**: 257-259

30. **Drake TA, Herron Jr RM, Hindler JA, Berlin OGW, and Bruckner DA.** 1988. DNA probe reactivity of *mycobacterium avium* complex isolates from patients with and without AIDS. *Diagn Microbiol Inf Dis* **11**: 125-128
31. **Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC.** 1999. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* **282**: 677-686
32. **Emler S, Ninet B, Rohner P, Auckenthaler R, Jäger D, and Hirschel B.** 1995. Molecular basis for cross-reactivity between a strain of *mycobacterium terrae* and DNA probes for *mycobacterium tuberculosis* complex. *Eur J Microbiol Inf Dis* **14**: 627-629
33. **Falkinham JO.** 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* **9**: 177-215
34. **Forbes BA, Hicks KS, and Kiska DL.** 1999. Utility of PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP) to identify mycobacterial species in a routine clinical laboratory setting, abstr. O37, p. 62. In Abstracts of the 9th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease 1999. *Clin Microbiol Infect* **5**, Suppl. 3
35. **Forbes BA, Hicks KE.** 1996. Substances interfering with direct detection of *mycobacterium tuberculosis* in clinical specimen by PCR: effects of bovine serum albumin. *J Clin Microbiol* **34**: 2125-2128
36. **Frothingham R, and Wilson KH.** 1993. Sequence-based differentiation of strains in the *mycobacterium avium* complex. *J Bacteriol* **175**: 2818-2825
37. **Frothingham R, and Wilson KH.** 1994. Molecular phylogeny of the *mycobacterium avium* complex demonstrates clinically meaningful divisions. *J Infect Dis* **169**: 305-312
38. **Good RC.** 1985. Opportunistic pathogens in the genus *mycobacterium*. *Ann Rev Microbiol* **39**: 347-369
39. **Gürtler V, and Stanisch VA.** 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* **142**: 3-16

40. **Grange JM.** 1996. *Mycobacteria and human disease.* Arnold, a member of Hodder Headline group, London
41. **Goren MB, Grange JM, Aber VR et al.** 1982. Role of the lipid content and hydrogen peroxide susceptibility in determining the guinea-pig virulence of *mycobacterium tuberculosis*. *British J Experimental Pathology* **63**: 693-700
42. **Guthertz LS, Damsker B, Bottone EJ, Ford EG, Midura TF, and Janda JM.** 1989. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infections in patients with and without AIDS. *J Inf Dis* **160**: 1037-1041
43. **Haddad MB, Wilson TW, Ijaz K, Marks SM, Moore M.** 2005. Tuberculosis and Homelessness in the United States, 1994-2003. *JAMA*; **293**: 2762-6
44. **Harmsen D, Dostal S, Roth A, Niemann S, Rothgänger J, Sammeth M, Albert J, Frosch M, Richter E.** 2003. RIDOM: Comprehensive and public sequence database for identification of *mycobacterium* species. *Bio Med Central* **3**: 26
45. **Hernandez SM, Morlock GP, Butler R, Crawford JT, Cooksey RC.** 1999. Identification of *mycobacterium* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis using fluorescence capillary electrophoresis
46. **Horsburgh Jr JR, Mason III UG, Farhi DC, Iseman MD.** 1985. Disseminated infection with *mycobacterium avium-intracellulare*: a report of 13 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*.**64**: 36-48
47. **Horsburgh Jr JR.** 1996. Epidemiology of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Semin Respir Infect* **11**: 244
48. **Johansen IS, Lundgren B, Pontopippan Thyssen J, Ostergaard Thomsen V.** 2002. Rapid differentiation between clinically relevant mycobacteria in microscopy positive clinical specimens and mycobacterial isolates by Line Probe Assay. *Diag Microbiol Inf Dis* **43**: 297-302
49. **Idigoras P, Péres-Trallero E, Alcorta M, Gutiérrez C, Muñoz-Baroja I.** 1995. Rapid Detection of Tuberculous and Non-Tuberculous Mycobacteria by Microscopic Observation of Growth on Middlebrook 7H11 Agar. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **14**: 6-10
50. **Inderlied CB, Kemper CA, and Bermudes LEM.** 1993. The *mycobacterium avium* complex. *J Clin Microbiol* **30**: 1049-1050

51. **Kasai H, Ezaki T, Harayama S.** 2000. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences . J Clin Microbiol **P 301-308**
52. **Kennedy TP, Weber DJ.** 1994. Nontuberculous mycobacteria: an underappreciated cause of geriatric lung disease. Am J Respir Crit Care Med **149**: 1654-1658
53. **Kent PT, and Kubica GP.** 1985. Public health mycobacteriology – A guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services publication (CDC) 86-8230. Centers for Disease Control, Atlanta, Ga
54. **Kim B-J, Lee S-H, Lyu M-A, Kim S-J, Bai G-H, Kim S-J, Chae G-T, Kim E-C, Cha C-Y, and Kook Y-H.** 1999. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol **37**: 1714-1720
55. **Kim B-J, Lee K-H, Park B-N, Kim S-J, Bai GH, Kook YH, Kim SJ.** 2001. Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol **P.2102-109**
56. **Kim H, Kim SH, Shim TS, Kim MN, Bai GH, Park YG, Lee SH, Cha CY, Kook YH, Kim BJ.** 2005. PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm targeting 644 bp Heat Shock Protein 65 (*hsp65*) gene for differentiation of mycobacteria spp. J Clin Microbiol Methods **62**: 199-209
57. **Kirschner P, and Böttger EC.** 2000. Species identification of mycobacteria using rDNA sequencing. Methods in molecular biology, **101**. Mycobacteria protocols. Humana Press Inc., Totowa, N.J
58. **Kirschner P, Meier A, and Böttger EC.** 1993. Genotypic identification and detection of mycobacteria – facing novel and uncultured pathogens, page 173-190. In D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover, and T.J. White (ed.). Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. American society for Microbiology, Washington, D.C
59. **Kirschner P, Springer B, Vogel U, Meier A, Wrede A, Kiekenbeck M, Bange FC, and Böttger EC.** 1993. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. J Clin Microbiol **31**: 2882-2889

60. **Kontos F, Petinaki E, Gitti, Z, Costopoulos C, Anagnostou S, Tselentis I, Maniatis AN.** 2002. Combined use of the fully automated Bactec MGIT 960 system and a PCR-restriction fragment polymorphism analysis for routine detection and identification of mycobacteria from clinical samples. *J Microbiol Methods* **52**: 137-140
61. **Kox LFF, van Leeuwen J, Knijper S, Jansen HM, and Kolk AH.** 1995. PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Microbiol* **33**: 3225-3233
62. **Kox LFF, Jansen HM, Kuijper S, and Kolk AH.** 1997. Multiplex PCR assay for immediate identification of the infecting species in patients with mycobacterial disease. *J Clin Microbiol* **35**: 1492-1498
63. **Kunitz F, Brodhun B, Hauer B, Haas W, Loddenkemper R.** 2007. Die aktuelle Tuberkulosesituation in Deutschland und die Auswirkungen der globalen Situation. *Pneumologie* 2007;**61**: 467-477
64. **Labombardi VJ, Carter L, Massarella S.** 1997. Use of Nucleic acid probes to identify mycobacteria directly from Difco ESP-Myco bottles. *J Clin Microbiol* P.1002-1004
65. **Lappayawichit P, Rienthong S, Rienthong D, Chuchottaworn C, Chaiprasert A, Panbangred W, Saringcarinkul H, and Palittapongarnpim P.** 1996. Differentiation of *mycobacterium* species by restriction enzyme analysis of amplified 16S-23S ribosomal DNA spacer sequences. *Tubercle Lung Dis.* **77**: 257-263
66. **Lefrancier P, Choay J, Derien M, and Ledermann I.** 1977. Synthesis of N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, an adjuvant of the immune response, and of some N-acetyl muranyl peptide analogs. *Int J Peptide and Protein Resaerch* **9**: 249-57
67. **Lehmann KB, and Neumann R.** 1896. Atlas und Grundriß der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik, 1 Edition München: J. F. Lehmann
68. **Levy-Frebault V, Portaels F.** 1992. Proposed minimal standards for the genus *mycobacterium* and for description of new slowly growing *mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 315-323

69. **Loddenkemper R.** 2007. 125 Jahre nach der Entdeckung des Tuberkelbazillus durch Robert Koch – neue Probleme in der weltweiten Bekämpfung der Tuberkulose; *Pneumologie* 2007; **61**: 145-147
70. **Longo MC, Berninger MS, Hartley JL.** 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase-chain reactions. *Gene* 93,125
71. **Maloney JM, Gregg CR, Stephens DS, Manian FA, Rimland D.** 1987. Infections caused by *mycobacterium szulgai* in humans. *Rev Infect Dis* **9**: 1120-1126
72. **Maidak BL, Olsen GJ, Larsen N, Overbeek R, McCaughey MJ, and Woese CR.** 1996. The ribosomal database project (RDP). *Nucleic Acid Res* 24: 82-85
73. **Markowitz N, Hansen NI, Hopewell PC, et al.** 1997. Incidence of tuberculosis in the United states among HIV-infected persons. *Ann Intern Med* **126**: 123-32
74. **Meier A, Kirschner P, Schröder K-H, Wolters J, Kroppenstedt RM, Böttger EC.** 1993. *Mycobacterium intermedium* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 204-209
75. **Middlebrook G, Reggiardo Z, Tigertt WD.** 1977. Automatabl radiometric detection of growth of *mycobacterium tuberculosis* in selective media. *Am Rev Respir Dis* **115**: 1066-1069
76. **Miller N, Infante S, Cleary T.** 2000. Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA Assay for identification of Mycobacterial Species from BACTEC 12B Bottles. *J Clin Microbiol* P.1915-1919
77. **Mijs W, De Vreese K, Devos A, Pottel H, Valgaere A, Evans C, Norton J, Parker D, Rigouts I, Portaels F, Reischel U, Watterson S, Pfyffer G, Rossau R.** 2002. Evaluation of a commercial Line Probe Assay for identification of *mycobacterium* species from liquid and solid culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**: 794-802
78. **Miller JL.** 1997. Sherlock Mycobacteria, Identification by High Performance Liquid Chromatography. Training Manual. MIDI, Inc. Newark, Del
79. **MiQ.** Nukleinsäure-Amplifikationstechniken. Roth A, Mauch H, Göbel UB. Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, Nr. 1. Hg. Mauch H, Lütticken R. 2. Aufl., Urban & Fischer, München – Jena 2001

80. **Müller K-D, Schmid EN, and Kroppenstedt RM.** 1998. Improved identification of mycobacteria by using the Microbial Identification System in combination with additional trimethylsulfonium hydroxide pyrolysis. *J Clin Microbiol* **36**: 2477-2480
81. **Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller AM.** 1998. Medical microbiology, Mosby, 3rd edition. Missouri
82. **McNeil MR, and Brennan PJ.** 1991. Structure, funktion and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts of possibilities arising from recent structural information. *Research in Microbiology* **142**: 451-63
83. **Mc Neil MR, Besra GS, Brennan PJ.** 1996. Chemistry of the Mycobacterial cell wall. in Rom, Garay: Tuberculosis. 1. edition
84. **Nolte FS, and Metchock B.** 1995. *Mycobacterium*, p. 400-437. In P.R. Murry, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover & R.H. Yolken ed., Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. ASM Press, Washington, D.C
85. **O'Brian RJ.** 1989. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial disease. *Clin Chest Med* **10**: 407-418
86. **Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutierrez J, and Rüsç-Gerdes S.** 1997. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol* **35**: 364-368
87. **Picardeau M, Prod'Hom G, Raskine L, LePennec MP, and Vincent V.** 1997. Genotypic characterization of five subspecies of *M. kansasii*. *J Clin Microbiol* **35**: 25-32
88. **Pitchnek AE, Fertel D, Bloch AB.** 1988. Mycobacterial disease: epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Chest Med* **10**: 425-441
89. **Portaeles F, de Rijk P, Jannes G, Lemans R, Mijs W, Riquouts L, and Rossau R.** 1996. The 16S-23S rRNA spacer, a useful tool for taxonomical and epidemiological studies of the *M. chelonae* complex. *Tubercle Lung Dis* **77** (Suppl. 2): 17-18
90. **Reischl U, Emler S, Horak Z, Kaustova J, Kroppenstedt RM, Lehn N, and Naumann L.** 1998. *Mycobacterium bohemicum* sp. Nov., a new slow-growing scotochromogenic mycobacterium. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 1349-1355

91. **Reisner BS, Gatson AM, Woods GL.** 1994. Use of Gen-Probe Accu Probes to identify *Mycobacterium avium complex*, *Mycobacterium tuberculosis complex*, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium goodii* directly from BACTEC TB broth cultures. *J Clin Microbiology* **32**: 2995-2998
92. **Research Committee of the British Thoracic Society.** 2003. Pulmonary disease caused by *M. mageritense* in HIV negative patients: 5-year follow up of patients receiving standardized treatment. *Eur Respir J* **20**: 478-482
93. **Richter E, Rüschoff S, Hillebrand D.** 2006. Evaluation of the GenoType *Mycobacterium* assay for identification of mycobacterial species from cultures. *J Clin Microbiol* **44**: 1769-1775
94. **Richter E, Niemann S, Rüschoff S, and Hoffner S.** 1999. Identification of *M. kansasii* by using a DNA probe (AccuProbe) and molecular techniques. *J Clin Microbiol* **37**: 964-970
95. **Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, Varnerot A, Vincent V, Berche P, Gaillard JL, and Pierre-Audigier C.** 1999. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* **37**: 852-857
96. **Rogall T, Flohr T, and Böttger EC.** 1990. Differentiation of mycobacterial species by direct sequencing of amplified DNA. *J Gen Microbiol* **136**: 1915-1920
97. **Rogall T, Wolters J, Flohr T, and Böttger EC.** 1990. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int J Sys Bacteriol* **40**: 323-330
98. **Roth A, Fischer M, Hamid HE, Ludwig W, Michalke S, and Mauch H.** 1998. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol* **36**: 139-147
99. **Roth A, Reischl U, Schönfeld N, Naumann L, Emler S, Fischer M, Mauch H, Loddenkemper R, and Kroppenstedt R.** 2001. *Mycobacterium heckeshornense* sp. nov., a new pathogenic slowly growing mycobacterial sp. Causing cavitary lung disease in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol* **38**: 4102-4107.

100. **Ruiz P, Gutierrez J, Zerolo FJ, and Casal M.** 2002. GenoType *mycobacterium* assay for identification of mycobacterial species isolated from human clinical samples by using liquid medium. *J Clin Microbiol* **40**: 3076
101. **Runyon EH.** 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Medical Clinics of North America* **43**: 273-90
102. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-91
103. **Salfinger M, Kafader FM.** 1992. Mycobacteriaceae. in Burkhardt (Hrsg.) *Mikrobiologische Diagnostik*
104. **Sanguinetti M, Pasteraro B, Ardito F, Zanetti S, Cingolani A, Sechi L, De Luca A, Ortona L, and Fadda G.** 1998. Routine use of PCR-reverse cross-blot hybridisation assay for rapid identification of *mycobacterium* species growing in liquid media. *J Clin Microbiol* **36**: 1530-1533
105. **Sneath PHA, Sokal RR.** 1973. *Numerical taxonomy.* W. H. Freeman, San Francisco
106. **Schreiber J, Burckhardt U, Rüscher-Gerdes S, Amthor M, Richter E, Zugehör M, Rosahl W, Ernst M.** 2001. Nicht-tuberkulöse Mykobakteriose der Lungen durch *mycobacterium smegmatis*. *Pneumologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York. **55**: 238-243
107. **Schönfeld N, Fischer M, Kaiser D, Mauch H, Loddenkemper R.** 1994. Nicht-tuberkulöse Mykobakteriose durch *M. shimoidei*. *Pneumologie Suppl.2.* **48**: 677
108. **Schönfeld N, Schaberg T, Loddenkemper R.** 1996. Neue Entwicklungen bei nicht-tuberkulösen Mykobakteriosen. *Pneumologie* **50**:313-322
109. **Schönfeld N, Matthiesen W.** 1999. Nicht-tuberkulöse Mykobakteriosen. In: Konietzko N, Loddenkemper R (Hrsg.). *Tuberkulose.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 235-246
110. **Schröder K-H, Naumann L, Kroppenstedt RM, and Reischl U.** 1997. *Mycobacterium hassiacum* sp. nov., a new rapidly growing thermophilic *mycobacterium*. *Int J System Bacteriol* **47**: 86-91

111. **Selik RM, Starcher ET, and Curran JW.** 1987. Opportunistic disease reported in AIDS patients: frequencies, associations and trends. *AIDS* **1**: 175-182
112. **Shinnick TM, and Good RC.** 1994. Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **13**: 884-901
113. **Springer B, Kirschner P, Rost-Meyer G, Schröder K-H, Kroppenstedt RM, and Böttger EC.** 1993. *Mycobacterium interjectum*, a new species isolated from a patient with chronic lymphadenitis. *J Clin Microbiol* **31**: 3083-3089
114. **Springer B, Tortoli E, Richter I, Grünwald R, Rüscher-Gerdes S, Uschmann K, Suter F, Collins MD, Kroppenstedt RM, and Böttger EC.** 1995. *Mycobacterium conspicuum* sp. nov., a new species isolated from patients with disseminated infections. *J Clin Microbiol* **33**: 2805-2811
115. **Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger EC.** 1996. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* **34**: 296-303
116. **Stahl DA, and Urbance JW.** 1990. The division between fast-and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J Bacteriol* **172**: 116-124
117. **Steingrube VA, Gibson JL, Brown BA, Zhang Y, Wilson RW, Rajagopalan M, and Wallace RJ.** 1995. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* **33**: 149-153
118. **Steingrube VA, Wilson RW, Brown BA, Jost KC, Blacklock Z, Gibson JL, and Wallace RJ.** 1997. Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *actinomadura*, *gordonia*, *nocardia*, *rhodococcus*, *streptomyces*, and *tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* **35**: 817-822
119. **Swanson DS, Pan X, Musser J.** 1996. Identification and subspecific differentiation of *mycobacterium scrofulatum* by automated sequencing of a region of the gene (hsp65) a 65-kilodalton heat-shock protein. *J Clin Microbiol* **P. 3151-3159**

120. **Taylor TB, Patterson C, Hlae Y, and Safranek WW.** 1997. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J Clin Microbiol* **35**: 79-85
121. **Takewaki S, Okuzumi K, Manebe I, Tanimura M, Miyamura K, Nkahara K, Yazaki Y, Ohkubo A, Nagai R.** 1994. Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial *dnaJ* gene and PCR – restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacterial species. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 159-166
122. **Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, and Bodmer T.** 1993. Rapid Identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* **31**: 175-178
123. **Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarenne S, Gingeras TR, Kaplan PM, Cros P, and Mabilat C.** 1999. *Mycobacterium species* identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* **37**: 49-55
124. **Torkko P, Suutari M, Suomalainen S, Paulin L, Larsson L, and Katila M-L.** 1998. Separation among species of *mycobacterium terrae* complex by lipid analysis: comparison with biochemical tests and 16S rRNA sequencing. *J Clin Microbiol* **36**: 499-505
125. **Torkko P, Suomalainen S, Iivavanaen E, Suutari M, Tortoli E, Paulin L, and Katila M-L.** 2000. *Mycobacterium xenopi* and related organisms isolated from steam waters in Finland and description of *mycobacterium botniense* sp.nov. *Int J Evol Microbiol* **50**: 283-289
126. **Tortoli E.** 2004. Clinical features of infections caused by new nontuberculous mycobacteria, Part 1. *Clinical Microbiological Newsletter* **26**: 12
127. **Tortoli E.** 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy, the new mycobacterial of the 1990`s. *Clin Microbiol Rev* **16** (2): 319-354
128. **Tortoli E, et al.** 2001. *Mycobacterium doricum*-new species. *Int J Syst Bacteriol* **51**: 2011
129. **Tortoli E, Bartoloni A, Burrini C, Colombrita D, Mantella A, Pinsi G, Simonetti MT, Swierczynski G, and Böttger EC.** 1996. Characterisation of an isolate of the newly descibed species *mycobacterium interjectum*. *Zentralbl Bakteriol* **283**: 286-294

130. **Tortoli E, Piersimoni C, Bacosi D, Bartoloni A, Betti F, Bono L, Burrini C, De Sio G, Lacchini C, Mantella A, Orsi PG, Penati V, Simonetti MT, and Böttger EC.** 1995. Isolation of the newly described species *mycobacterium M. celatum* from AIDS patients. *J Clin Microbiol* **33**: 137-140
131. **Tortoli E, Kirschner P, Bartoloni A, Burrini C, Manfrin V, Mantella A, Scagnelli M, Scarpaio C, Simonetti MT, and Böttger EC.** 1996. Isolation of an unusual *mycobacterium* from an AIDS patient. *J Clin Microbiol* **34**: 2316-2319
132. **Tsang, AY, Denner J, Brennan PJ, McClatchy JK.** 1992. Clinical and epidemiological importance of typing of *mycobacterium avium* complex isolates. *J Clin Microbiol* **30**: 470-484
133. **Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A.** 2001. Necessity of quality-controlled 16S r RNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *mycobacterium* species. *J Clin Microbiol* **39**: 3637-3648
134. **Turenne CY, Cook VJ, Burdz TV, Pauls RJ, Thibert L, Wolfe JN, and Kabani A.** 2004. *Mycobacterium parascrofulaceum* sp. nov., novel slowly growing, scotochromogenic clinical isolates related to *mycobacterium simiae*. *Int J of Syst and Evolutionary Microbiology* **54**, part 5, pp. 1543-1551
135. **Turenne CY, Wallace RJ, Behr MA.** 2007. *Mycobacterium avium* in the postgenomic Era. *Clin Microbiol Rev* **20**: 205-209
136. **Wallace RJ.** 1994. Recent changes in taxonomy and disease manifestations of the rapidly growing mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **13**: 953-960
137. **Wallace Jr RJ, Nash DR, Mtsukamura, Blacklock ZM, Bilcox VA.** 1988. Human disease due to *mycobacterium smegmatis*. *J Infect Dis* **152**: 52-59
138. **Wayne LG, and Kubica GP.** 1986. The mycobacteria. In: Sneath P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M. E., Holt, J. G.(ed): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore. P.: 1436-1457
139. **Wayne LG, and Sramek HA.** 1992. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin Microbiol Rev* **5**: 1-25
140. **Wayne L, Good R, Krichevsky M, Blacklock Z, David H, Dawson D, Gross W, Hawkins J, Levy-Frebault V, McManus C, Portaels F, Rüsck-Gerdes S, Schröder K, Silcox V, Tsukamura M, van den Breen L, and Yakrus M.** 1991.

- Forth report of the cooperative open-ended study of slowly growing mycobacteria of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int J Syst Bacteriol* **41**: 463-472
141. **Welch DF, Guruswamy AP, Sides SJ, Shaw CH, Gilchrist MJR.** 1993. Timely culture for Mycobacteria which utilizes a microcolony method. *J Clin Microbiol* **31**: 2178-2184
 142. **World Health Organisation.** 2006. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report. Geneva: World Health Organisation (WHO/HTM/TB/2006 362)
 143. **Wilson RW, Steingrube VA, Brown BA, and Wallace RJ.** 1998. Clinical application of PCR-restriction enzyme pattern analysis for rapid identification of aerobic actinomycete isolates. *J Clin Microbiol* **36**: 148-152
 144. **Woese KH.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271
 145. **Wolinski E.** 1979. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Respir Dis* **119**: 107-159
 146. **Wolinski E.** 1992. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. *Clin Infect Dis* **15**: 1-12
 147. **Woods GL, Washington II JA.** 1987. Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects. *Rev Infect Dis* **9**: 275-294
 148. **Young LS.** 1988. *Mycobacterium avium* complex infections. *J Infect Dis* **157**: 863-867
 149. **Young LS, Inderlied CB, Berlin OG, and Gottlieb MS.** 1986. Mycobacterial infections in AIDS patients, with an emphasis on the *Mycobacterium avium* complex. *Rv Inf Dis* **8**: 1024-1033
 150. **Zakowski P, Fligiel S, Berlin GW, and Johnson Jr L.** 1982. Disseminated *Mycobacterium avium*-intracellular infection in homosexual men dying of acquired immunodeficiency. *JAMA* **248**: 2980-2982
 151. **Zeligman I.** 1972. *Mycobacterium marinum* granuloma. A disease acquired in the tributaries of Chesapeake Bay *Arch Dermatol.* **106**: 26-31

7. Anhang

Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. Harald Mauch möchte ich mich für die Bereitstellung der Arbeit, für stetigen Rat inhaltlich und formal sowie die viele Zeit, die er dafür investierte und für die Ermunterung, wissenschaftlich zu arbeiten, bedanken.

Für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanke ich mich auch bei dem Team des Instituts für Mikrobiologie, Immunologie und Laboratoriumsmedizin der Lungenklinik Heckeshorn, jetzt Helios Klinikum Emil von Behring.

Weiterer Dank gebührt Frau Schulz für die große Hilfe bei der formalen Ausgestaltung sowie ihr orthografisches Korrektiv.

Ich danke Herrn Dr. Roth für die wesentlichen konzeptionellen Ideen zu dieser Arbeit, für die ständige Anleitung zum strukturierten Arbeiten und wissenschaftlichen Denken sowie viel zusätzliche Stunden, die er dafür investiert hat.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Anna Streubel, an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Datum: 19.9.2008

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

1. Novel Diagnostic Algorithm for Identification of Mycobacteria Using Genus-Specific Amplification of the 16S-23S rRNA Gene Spacer and Restriction Endonucleases #8220” im Journal of Clinical Microbiology