

Wissenschaftliche Einrichtungen Veterinary Public Health
Institut für Fleischhygiene und -technologie
Fachbereich Veterinärmedizin
Freie Universität Berlin

**Eignung unterschiedlicher Primer und DNA-Extraktionsmethoden
zum PCR-Nachweis von Vertretern des
Mycobacterium avium-intracellulare-Komplexes (MAIC)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Robin Großpietsch
Tierarzt aus Berlin

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3398

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard Fries
Zweiter Gutachter: PD Dr. Irmgard Moser
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Mycobacterium avium complex, polymerase chain reaction, pig diseases

Tag der Promotion: 17.08.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-004-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild vorne © Sashkin - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	- 1 -
2	LITERATUR	- 2 -
2.1	Die Familie der Mycobacteriaceae	- 2 -
2.1.1	Taxonomie und Nomenklatur	- 2 -
2.1.2	Die Gattung <i>Mycobacterium</i>	- 2 -
2.1.3	Der <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> -Komplex (MAIC)	- 7 -
2.1.4	Vorkommen, Epidemiologie und Bedeutung der Mykobakterien bei Tier und Mensch.....	- 8 -
2.1.4.1	Vorkommen und Epidemiologie (insbesondere beim Schwein).....	- 8 -
2.1.4.2	Mykobakterien beim Schwein.....	- 12 -
2.1.4.3	Mykobakterien beim Rind.....	- 15 -
2.1.4.4	Mykobakterien beim Geflügel.....	- 16 -
2.1.4.5	Mykobakterien bei anderen Tierarten.....	- 17 -
2.1.4.6	Mykobakterien beim Menschen.....	- 18 -
2.1.5	Pathologie und Klinik (Schwein).....	- 22 -
2.1.5.1	Pathogenese	- 22 -
2.1.5.2	Pathomorphologie	- 23 -
2.1.5.3	Histopathologie.....	- 24 -
2.1.5.4	Klinische Symptomatik	- 25 -
2.1.6	Fleischhygienerechtliche Bestimmungen	- 27 -
2.1.6.1	Rechtsgrundlage	- 27 -
2.1.6.2	Fleischuntersuchungsstatistik.....	- 29 -
2.2	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	- 31 -
2.2.1	Grundlagen der PCR.....	- 31 -
2.2.2	Nachweis des amplifizierten Produktes	- 32 -
2.2.3	Faktoren, die die PCR beeinflussen	- 32 -
2.2.3.1	Temperatur und Zeit.....	- 32 -
2.2.3.2	Reaktionskomponenten.....	- 33 -
2.2.3.3	Primer.....	- 34 -
2.2.3.4	Target-DNA	- 34 -
2.2.3.5	Kontaminationen	- 35 -
2.2.3.6	Inhibitoren.....	- 36 -
2.3	Diagnostik von Mykobakterien	- 39 -
2.3.1	Konventionelle Diagnostik von Mykobakterien	- 40 -
2.3.1.1	Probenentnahme	- 40 -
2.3.1.2	Mikroskopie	- 40 -
2.3.1.3	Kulturelle Anzucht.....	- 41 -
2.3.1.4	Differenzierung von Mykobakterien	- 44 -
2.3.2	Molekularbiologische Diagnostik von Mykobakterien	- 46 -
2.3.2.1	Genetische Grundlagen des MAIC.....	- 46 -
2.3.2.2	Molekularbiologisch bedeutsame Zielsequenzen	- 47 -
2.3.2.3	Molekularbiologische Nachweismethoden.....	- 57 -
2.4	Fragestellungen dieser Arbeit	- 65 -

3	MATERIAL UND METHODEN	- 66 -
3.1	Arbeitsmaterialien	- 66 -
3.1.1	Verwendete Mikroorganismen.....	- 66 -
3.1.2	Nährmedien zur Stammhaltung und Kultivierung.....	- 66 -
3.1.3	Reagenzien zur Isolierung der DNA und für die PCR.....	- 67 -
3.1.4	Arbeitsgeräte und Labormaterial.....	- 69 -
3.2	Untersuchungsablauf	- 70 -
3.2.1	Untersuchungsschema.....	- 70 -
3.2.1.1	Vorversuch: Überprüfung der in der Literatur beschriebenen PCR-Protokolle.....	- 70 -
3.2.1.2	Hauptversuch (Teil A): Vorgehen zur Ermittlung der Nachweisgrenzen bei Verwendung von Reinkulturen.....	- 71 -
3.2.1.3	Hauptversuch (Teil B): Vorgehen zur Ermittlung der Nachweisgrenzen bei Vorhandensein von Lymphknotenmatrix ..	- 72 -
3.2.2	Methoden der DNA-Freisetzung.....	- 75 -
3.2.2.1	Kochen.....	- 75 -
3.2.2.2	Chloroform/ Phenol-Extraktion.....	- 76 -
3.2.2.3	Ultraschallbehandlung mit anschließendem Kochen.....	- 78 -
3.2.2.4	High Pure PCR Template Kit.....	- 78 -
3.2.3	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	- 80 -
3.2.3.1	Durchführung der PCR (allgemein).....	- 80 -
3.2.3.2	Primerabhängige PCR-Bedingungen.....	- 81 -
3.2.3.3	Gelelektrophorese.....	- 84 -
4	ERGEBNISSE	- 86 -
4.1	Keimzahlbestimmung der verwendeten Mykobakterien- Bouillonkulturen	- 86 -
4.2	Vorversuch: Mögliche Primer-/ Stammkombinationen	- 89 -
4.3	Hauptversuch (Teil A): Ergebnisse bei der Verwendung von Reinkulturen	- 90 -
4.4	Hauptversuch (Teil B): Ergebnisse bei Vorhandensein von Lymphknotenmatrix	- 98 -
4.5	Berechnung der Nachweisgrenzen	- 105 -
5	DISKUSSION	- 114 -
5.1	Fragestellung/ Versuchsziel.....	- 114 -
5.2	Versuchsaufbau.....	- 115 -
5.3	Eingesetzte Stämme.....	- 116 -
5.4	Eingesetzte Zellaufschlussverfahren.....	- 118 -
5.5	Bewertung der Primer.....	- 121 -
5.6	Bewertung der erzielten Nachweisraten.....	- 124 -
5.7	Folgerungen/ Konsequenzen.....	- 125 -
6	ZUSAMMENFASSUNG	- 126 -
7	SUMMARY	- 128 -
8	LITERATURVERZEICHNIS	- 130 -
9	ANHANG	- 160 -
10	DANKSAGUNG	- 163 -

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	=	<u>A</u> qua <u>b</u> idest <u>i</u> llata
A. dest.	=	<u>A</u> qua <u>d</u> est <u>i</u> llata
BCG	=	<u>B</u> acillus <u>C</u> almette <u>G</u> uérin, attenuiertes <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
bp	=	<u>B</u> asen <u>p</u> aare
BPB	=	<u>B</u> rom <u>p</u> henol <u>b</u> lau
d	=	<u>d</u> ays (= Tage)
dATP	=	<u>D</u> esoxy <u>a</u> denosin <u>t</u> riphosphat
dCTP	=	<u>D</u> esoxy <u>c</u> ytidin <u>t</u> riphosphat
dGTP	=	<u>D</u> esoxy <u>g</u> uanosin <u>t</u> riphosphat
DNA	=	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleinsäure (engl. - <u>a</u> cid)
dNTP	=	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleotid <u>t</u> riphosphat
dTTP	=	<u>D</u> esoxy <u>t</u> hymidin <u>t</u> riphosphat
DSM	=	<u>D</u> eutsche <u>S</u> ammlung von <u>M</u> ikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
EDTA	=	<u>E</u> thylen- <u>d</u> iamine- <u>t</u> etra <u>a</u> cetic- <u>a</u> cid (= Ethylendiamintetraessigsäure)
Fa.	=	<u>F</u> irma
FIHG	=	<u>F</u> leisch <u>h</u> ygien <u>e</u> - <u>G</u> esetz
FIHV	=	<u>F</u> leisch <u>h</u> ygien <u>e</u> - <u>V</u> erordnung
IS	=	<u>i</u> nsertion <u>s</u> equ <u>e</u> nce (= Insertionssequenz)
KbE	=	<u>K</u> olonie <u>b</u> ildende <u>E</u> inheiten
M	=	<u>m</u> olar
M.	=	<u>M</u> ycobacterium
MAIC	=	<u>M</u> ycobacterium <u>a</u> vium- <u>i</u> ntracellulare- <u>K</u> omplex
M. a.	=	<u>M</u> ycobacterium <u>a</u> vium subspezies
min.	=	<u>M</u> inute(n)
ml	=	<u>M</u> illiliter
mM	=	<u>m</u> illimolar
MTC	=	<u>M</u> ycobacterium <u>t</u> uberculosis-Komplex
OACD	=	Supplement für Mykobakterien, bestehend aus: <u>O</u> leinsäure, Rinder- <u>A</u> lbumin, <u>C</u> atalase und <u>D</u> extrose
PCR	=	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction (= Polymerasekettenreaktion)
p.i.	=	<u>p</u> ost <u>i</u> nfectionem (= nach Infektion)
rpm	=	<u>r</u> otations <u>p</u> er <u>m</u> inute (= Umdrehungen pro Minute)
rRNA	=	<u>r</u> ibosomale <u>R</u> ibo <u>n</u> ukleinsäure
SDS	=	<u>S</u> odium- <u>D</u> odecyl- <u>S</u> ulfate (= Natriumdodecylsulfat)
sec.	=	<u>S</u> ekunde(n)
subsp.	=	<u>S</u> ub <u>s</u> pezies
Taq	=	<u>T</u> hermus <u>a</u> quaticus
UV-Licht	=	<u>u</u> ltraviolett <u>e</u> s Licht

1 Einleitung

Mykobakterien, insbesondere diejenigen aus dem *Mycobacterium avium-intracellulare*-Komplex (MAIC), gelten als die häufigsten Erreger bakterieller Infektionen bei immunsupprimierten Patienten (DÜZGÜNES et al. 1996) und haben damit als Gegenstand des Interesses an Bedeutung gewonnen. Auch bei Tieren sind Mykobakterien des MAIC von Relevanz als Krankheitserreger, die zur Geflügeltuberkulose, Paratuberkulose beim Rind und Mykobakteriose beim Schwein führen können. Dies führt auch zu wirtschaftlichen Schäden durch Verluste bereits während der Nutzungsperiode (Paratuberkulose) als auch durch Untauglichkeitsbeurteilungen nach der Schlachtung der Tiere.

Das ubiquitäre Vorkommen der Vertreter des MAIC erschwert gesicherte Aussagen über denkbare Zusammenhänge zwischen den Infektionen bei Tier und Mensch; Übertragungen vom Tier auf den Menschen können nicht ausgeschlossen werden (DEUTZ und KÖFER 1999).

Allem voran die gesundheitliche, aber auch die wirtschaftliche Bedeutung der MAIC-Infektionen machen es erforderlich, brauchbare Nachweismethoden für die Vertreter des MAIC zu etablieren, die deutlich schneller zu einem Ergebnis führen als die langwierigen kulturellen Methoden, die für den Nachweis von Mitgliedern dieser Gattung derzeit erforderlich sind. Eine sichere und schnelle Nachweisteknik würde auch die Überwachung geschlachteter Tiere erleichtern: Der amtliche Tierarzt am Schlachtbetrieb verfügt bei der Diagnostik der Mykobakteriose zurzeit lediglich über die Mittel der Adspektion und Incision. Allerdings kann die rein visuelle Beurteilung veränderter Lymphknoten keine absolut sichere Diagnoseerhebung garantieren (SCHLIESSER 1978; ALFREDSON u. SKJERVE 1993; FISCHER 1999). Eine geeignete Nachweismethode für Mykobakterien wäre demnach aus Sicht des überwachenden Tierarztes wünschenswert.

Hinsichtlich der PCR-Anwendung zum Nachweis atypischer Mykobakterien können der Literatur diverse DNA-Extraktionsmethoden und Primer entnommen werden, die in ihrer Spezifität und Sensitivität unterschiedlich bewertet werden. Der Arbeits- und Zeitaufwand in der Mykobakteriendiagnostik würde durch den Einsatz der PCR direkt aus Probenmaterial deutlich reduziert werden.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, für den Nachweis verschiedener Mykobakterien aus dem MAIC eingesetzte Primer sowie unterschiedliche Zellaufschlussverfahren vergleichend auf Eignung in vitro zu testen.

2 Literatur

2.1 Die Familie der *Mycobacteriaceae*

2.1.1 Taxonomie und Nomenklatur

Die Familie der *Mycobacteriaceae* gehört – zusammen mit den *Actinomycetaceae*, den *Nocardiaceae*, den *Streptomycetaceae* und anderen – zur Ordnung der *Actinomycetales*, dort eingeteilt in die Unterordnung *Corynebacterineae*. Aufgrund des Zellwandaufbaus können in dieser Unterordnung 8 verschiedene Familien (*Corynebacteriaceae*, *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Segmiliparaceae*, *Tsukamurellaceae* und *Williamsiaceae*) unterschieden werden (EUZÉBY 2009).

Die Familie der *Mycobacteriaceae* besteht aus der einzigen Gattung *Mycobacterium*, in der zur Zeit 142 Spezies und 11 Subspezies definiert sind (EUZÉBY 2009).

2.1.2 Die Gattung *Mycobacterium*

Mykobakterien sind gerade bis leicht gekrümmte, unbewegliche Stäbchen von 0,2-0,6 x 1,0-10,0 µm Größe. Verzweigte Filamente können zwar auftreten, sind aber nicht typisch (SELBITZ 1992). Im Gegensatz zu vielen Aktinomyzeten erzeugen sie kein Luftmyzel und keine Sporen. Sie besitzen einen oxydativen (aeroben) Stoffwechsel.

Gemeinsames Merkmal der verschiedenen Spezies ist die so genannte Säure- und Alkoholfestigkeit. Sie besteht darin, dass bei bestimmten Färbeverfahren Karbolfuchsin (eine Mischung von basischem Fuchsin und Phenol) mit freien Mykolsäuren in der Zellwand eine Komplexbildung eingeht, die einer Entfärbung mit salzsaurem Alkohol standhält. Diese Eigenschaft ist allerdings nicht bei allen Spezies und auch nicht in allen Wachstumsphasen in gleicher Weise ausgeprägt. Auch der nur schwache Ausfall der Gramfärbung beruht auf dem besonderen Bau der Zellwand, die hohe Anteile von Lipiden einschließlich wachsartiger Verbindungen mit chloroformlöslichen Mykolsäuren aus langen, verzweigten Ketten von 60-90 C-Atomen beinhaltet (SALFINGER u. KAFADER 1992; SELBITZ 1992).

Als sichere Unterscheidungskriterien zu nahe verwandten Gattungen gelten für Mykobakterien die Säurefestigkeit, das Vorhandensein von Mykolsäuren und ein Guanin- und Cytosinanteil in der DNA zwischen 61 und 71 % als international anerkannte Minimalstandards (LÉVY-FRÉBAULT u. PORTAELS 1992).

Nur wenige der über hundert Mykobakterienspezies sind obligat oder fakultativ pathogen, meist handelt es sich um Saprophyten, die weit verbreitet in der Umwelt vorkommen.

Man unterscheidet zwischen den klassischen (typischen) Tuberkulose-Erregern (*Mycobacterium tuberculosis*-Komplex [MTC]: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*), dem Lepra-Erreger (*M. leprae*), den Erregern des *Mycobacterium avium-intracellulare*-Komplexes (MAIC): *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. intracellulare* und einer Gruppe von so genannten atypischen Mykobakterien.

In der älteren Literatur werden die Mykobakterienspezies in *M. tuberculosis* typus humanus, -typus bovis und -typus gallinaceus unterteilt. Der Begriff „atypical mycobacteria“ (BUHLER u. POLLAK 1953) wird in der angloamerikanischen Sprache verwandt (BRENNAN 1981) oder als Übersetzung „atypische Mykobakterien“ in der deutschen Sprache für den Begriff der „mycobacteria other than tubercle bacilli“ (MOTT) angewendet (RUNYON 1981).

Der Begriff „atypische Mykobakterien“ nimmt nicht auf taxonomische Gegebenheiten Bezug. Mit ihm werden alle Vertreter erfasst, die nicht Erreger von Tuberkulose, Paratuberkulose und Lepra sind. Ausgangspunkt dieser Begriffsbestimmung war der beim Menschen im Vergleich zur Tuberkulose atypische klinische Verlauf (SELBITZ 1992). Anstelle der unpräzisen Sammelbezeichnung „atypische Mykobakterien“ wurde die Benennung der Gruppe als „Nichttuberkulöse Mykobakterien“ (engl. Nontuberculous mycobacteria [NTM]) oder „Mycobacteria other than tubercle bacilli“ (MOTT) vorgeschlagen (SALFINGER u. KAFADER 1992).

Eine Einteilung der Mykobakterien kann nach verschiedenen Kriterien erfolgen. Hierzu zählen nach SCHLIESSER (1985) in erster Linie:

- Wachstumseigenschaften, insbesondere Temperaturabhängigkeit des Wachstums und Wachstumsgeschwindigkeit
- Pigmentierung mit und ohne Lichteinwirkung
- Sauerstoffbedarf
- Koloniemorphologie
- für Gruppen oder einzelne Spezies typische StoffwechsellLeistungen, Enzymaktivitäten sowie unter Umständen auch Resistenzen gegen Chemotherapeutika (Antituberkulotika)

Nach Untersuchungen über die seuchenhygienische, epizootiologische und lebensmittelhygienische Bedeutung der bei Tieren und Menschen vorkommenden Mykobakterien unterteilt SCHLIESSER (1976) sie in vier Gruppen:

1. der sog. *M. tuberculosis*-Komplex (RUNYON 1974) mit *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum* und *M. microti*
2. der *M. avium-intracellulare*-Komplex (RUNYON 1974)
3. Mykobakterien, die nicht Tuberkulose oder „Avium-Mykobakteriose“ hervorrufen
4. *M. paratuberculosis*, den Erreger der JOHNE'schen Krankheit der Wiederkäuer und der Paratuberkulose der Vögel (nach heutiger Einteilung *M. avium* subsp. *paratuberculosis*)

Nach einem von RUNYON (1974) vorgeschlagenen Schema werden atypische Mykobakterien ebenfalls in vier Gruppen eingeteilt. Diese Einteilung basiert zum einen auf der Wachstumsgeschwindigkeit (langsam wachsende Mykobakterien brauchen mehr als sieben Tage, um sichtbare Kolonien zu bilden), zum anderem auf dem Pigmentbildungsverhalten:

I photochromogene Mykobakterien

bilden in der Natur nur unter Lichteinwirkung gelbes Pigment, wachsen langsam (3-4 Wochen), kommen bei Tieren eher selten vor, können beim Mensch gelegentlich eine Mykobakteriose hervorrufen (z.B. *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. simiae*)

II skotochromogene Mykobakterien

bilden auch in der Dunkelheit gelbes bis gelb-orangefarbenes Pigment, wachsen langsam (10-14 Tage), kommen in der Natur weit verbreitet vor (z.B. *M. aquae*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*)

III nicht photochromogene Mykobakterien

pigmentlos, wachsen langsam (2-4 Wochen), *M. avium* und *M. intracellulare* werden zu dieser Gruppe gerechnet

IV schnell wachsende Mykobakterien (4-6 Tage)

sind als Saprophyten in der Natur verbreitet (in Heu, Gras, Wasser, Darminhalt von Tieren usw., z.B. *M. smegmatis*, *M. fortuitum*)

Epidemiologisch bedeutsam ist die Unterscheidung von obligaten Parasiten und Saprophyten. Die eindeutige Abgrenzung der bei Menschen und Säugetieren als Zoonosen auftretenden Tuberkulosen (*M. tuberculosis*, *M. bovis*) von der Geflügeltuberkulose (*M. avium*) sowie den durch die in den Runyon-Gruppen I-IV zusammengefassten Erregern verursachten Mykobakteriosen ist von entscheidender Bedeutung. *M. avium* nimmt insofern eine besonde-

re Stellung ein, da diese Art einerseits die Geflügeltuberkulose verursacht, andererseits bei Säugetieren und Menschen als Erreger von Mykobakteriosen auftritt (SELBITZ 1992).

Atypische Mykobakterien sind auch als Ursache von möglichen „paraspezifischen Tuberkulinreaktionen“ von Interesse (BISPING 1998).

Die genaue Identifikation der verschiedenen Mykobakterien-Arten stützt sich auf biochemische Kriterien, auf die Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, auf die Chromatographie von Lipidextrakten und des langsamen Wachstums wegen vermehrt auf molekularbiologische Methoden (Hybridisierungen und PCR). Die Hauptmerkmale der wichtigsten Mykobakterien-Spezies sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Literatur

Tabelle 2.1 Hauptmerkmale einiger wichtiger Mykobakterien-Spezies (nach BISPING u. AMTSBERG 1988)

Gruppe nach RUNYON	Kulturelle Eigenschaft	Wichtige Spezies	Habitat/ Lebensform	Hauptsächlich befallene Arten
-	Langsam wachsend (3-8 Wochen)	<i>M. tuberculosis</i>	Parasit Mensch	Mensch, Hund, Kanarienvogel, Psittaziden
-	Langsam wachsend (3-8 Wochen)	<i>M. bovis</i>	Parasit Rind	Zahlreiche Tierarten, inkl. Mensch
-	Langsam wachsend (3-4 Wochen)	<i>M. caprae</i>	Parasit Rind und Wildtiere	Zahlreiche Tierarten, inkl. Mensch
-	Langsam wachsend	<i>M. microti</i>	Parasit Nagetiere	Nagetiere, (Lagomorphe, Kalb, Katze)
-	Nicht anzüchtbar	<i>M. leprae</i>	Parasit Mensch und Gürteltier	Mensch
I	Langsam wachsend, photochromogen	<i>M. kansasii</i>	Saprophyt Leitungswasser	(Mensch, Hirsch, Schwein, Rind)
I	Langsam wachsend, photochromogen	<i>M. simiae</i>	Saprophyt	(Mensch, Affe)
I	Langsam wachsend, photochromogen	<i>M. marinum</i>	Saprophyt	(Fisch, Amphibium, aquatische Säugetiere)
II	Langsam wachsend, skotochromogen	<i>M. scrofulaceum</i>	Saprophyt, weit verbreitet, Erdboden, Wasser	(Mensch, Schwein, Rind)
III	Langsam wachsend, nicht chromogen	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	Parasit Vögel	Vögel (zahlreiche Tierarten, Mensch)
III	Anspruchsvoll, langsam wachsend, nicht chromogen	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Parasit Wiederkäuer	Wiederkäuer, Kaninchen, (Mensch?)
III	Langsam wachsend, nicht chromogen	<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	Parasit Vögel	Vögel, Säugetiere, (Mensch)
III	Langsam wachsend, nicht chromogen	<i>M. intracellulare</i>	Saprophyt Erdboden, Wasser	(Vögel, Mensch, Schwein, Rind)
III	Langsam wachsend, nicht chromogen	<i>M. ulcerans</i>	Saprophyt Erdboden, Wasser	(Mensch, Katze)
IV	Schnell wachsend	<i>M. fortuitum</i>	Saprophyt Erdboden, Pflanzen, Wasser, Darm von Tieren	(Mensch, Rind, Schwein, Hund, Katze)
IV	Schnell wachsend	<i>M. chelonae</i>	Saprophyt Erdboden, Pflanzen, Wasser, Darm von Tieren	(Mensch, Schildkröten, Fisch, Rind, Schwein, Katze)
IV	Schnell wachsend	<i>M. phlei</i>	Saprophyt Erdboden, Pflanzen, Wasser, Darm von Tieren	(Mensch, Rind, Katze)
IV	Schnell wachsend	<i>M. smegmatis</i>	Saprophyt Erdboden, Pflanzen, Wasser, Darm von Tieren	(Mensch, Rind, Katze)

(in Klammern) = selten betroffen

2.1.3 Der *Mycobacterium avium-intracellulare*-Komplex (MAIC)

M. avium und *M. intracellulare* gehören zur Runyon-Gruppe III und besitzen viele gemeinsame Merkmale, die eine exakte Trennung nicht leicht machen. So können sie weder durch morphologische und spezielle biochemische Eigenschaften bzw. StoffwechsellLeistungen, noch mittels Phagenmuster voneinander getrennt werden (CRAWFORD et al. 1981a).

Eine Differenzierung ist jedoch mit Hilfe molekularbiologischer Methoden möglich (THIERRY et al. 1993; DEVALLOIS et al. 1997; DVORSKÁ et al. 2001).

Den Begriff *Mycobacterium avium-intracellulare*-Komplex (MAIC) verwenden einige Autoren, um die enge Verwandtschaft zwischen *M. avium* und *M. intracellulare* zu dokumentieren (WOLINSKY 1979; KUBICA u. WAYNE 1984; DEDIÉ 1993; METCHOCK et al. 1999; HAHN et al. 2001), oder um damit auszudrücken, dass *M. intracellulare* nicht klar von *M. avium* getrennt werden konnte (MEISSNER et al. 1974). In BERGEY'S MANUAL (WAYNE u. KUBICA 1986) sind beide als selbständige Spezies aufgeführt, es wird aber die Einschränkung gemacht, dass einige Serovaren, die *M. intracellulare* zugeordnet sind, zu *M. avium* gehören könnten. Weiterhin wird zum Teil auch der Begriff des MAIS-Komplexes gebraucht, um die Stämme von *M. scrofulaceum* (Serovaren 41-43) wegen ihrer Verwandtschaft zum *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum*-Komplex zusammenzufassen (HAWKINS 1977; HAUTMANN u. LOTTI 1995).

Die Unterteilung des MAIC in 28 Serovaren erfolgt nach der Einteilung von WOLINSKY und SCHAEFER (1973) und WOLINSKY (1979).

Nach SAITO et al. (1989), THOREL et al. (1990), BÖTTGER (1991), HAMPSON et al. (1991) und KOMIJN et al. (1999) werden die Serovaren 1-6 und 8-11 (+ Serovar 21 bei SAITO et al. 1989) zu *M. avium* und die Serovaren 7, 12-20 und 22-28 zu *M. intracellulare* (ohne S 16 bei BÖTTGER 1991) zugeordnet.

Nach neueren Untersuchungen werden die Serovaren 1,2 und 3 zu *M. avium* subsp. *avium* und die Serovaren 4-6, 8-11 und 21 zu *M. avium* subsp. *hominissuis* zugeordnet (MATLOVA et al. 2003, s. Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2 Serovareneinteilung des MAIC (nach MATLOVA et al. 2003)

Spezies	Serovaren
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	1-3
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	4-6, 8-11, 21
<i>M. intracellulare</i>	7, 12-20, 22-28

Die neueste anerkannte Einteilung beruht auf Genomanalysen, basierend auf der „Restriction fragment length polymorphism“-Technik (RFLP, Polymorphiestudien), DNA-Mustern und auf phenotypischen Studien (THOREL et al. 1990; MIJS et al. 2002). Hierbei wird die Spezies *M. avium* in vier Subspezies unterteilt:

- *M. avium* subsp. *avium*, die hauptsächlich bei Vögeln vorkommt
- *M. avium* subsp. *silvaticum*, die in wildlebenden Warmblütern vorkommen
- *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, die nur bei Säugetieren vorkommt und
- *M. avium* subsp. *hominissuis*, von MIJS et al. (2002) beschriebene Subspezies, die vorwiegend beim Menschen, beim Schwein und in der Umwelt vorkommt

2.1.4 Vorkommen, Epidemiologie und Bedeutung der Mykobakterien bei Tier und Mensch

Infektionen mit *M. avium* werden bei Säugetieren gemeinsam mit anderen Erkrankungen durch atypische Mykobakterien in Abgrenzung zur Tuberkulose als Mykobakteriosen bezeichnet. Säugetiere besitzen gegenüber diesen Erregern eine relativ geringe Empfänglichkeit. Am ehesten machen sich Infektionen mit *M. avium* und anderen atypischen Mykobakterien bei Rindern und Schweinen bemerkbar, wo sie in dreierlei Hinsicht Bedeutung haben (SELBITZ 1992):

1. Als Verursacher parallergischer Reaktionen, durch die die Überwachung der Rindertuberkulose erschwert wird
2. Als Verursacher von Verkalkungsherden in Lymphknoten des Kopfes, des Darmes und der Tonsillen, die bei der Fleischuntersuchung auffallen und zu Beanstandungen führen
3. Als Erreger von Mastitiden bei Kühen (selten)

2.1.4.1 Vorkommen und Epidemiologie (insbesondere beim Schwein)

Dank ihrer lipidhaltigen Zellwand sind Mykobakterien umweltbeständig und sehr resistent gegen chemische Desinfektionsmittel und Trockenheit. Pathogene Arten können unter günstigen Bedingungen mehrere Monate außerhalb ihres Wirtes überleben. Die Überlebensdauer im Boden in 2 cm Tiefe betrug nach GYLSTORFF (1987) 2 bis 9 Jahre, in Wasser mehr als drei Monate. In Exkreten der Lunge oder im Kot sind Mykobakterienzellen bis zu 150 Tagen lebensfähig (SAXER u. VONARBURG 1951). SCHLIESSER und WEBER (1973) stellten eine Überlebensdauer für nicht hühnervirulente Stämme von *M. avium* bei 18-22°C von 169 bis 214 Tagen fest.

Als Hauptreservoir werden der Erdboden (BEERWERTH u. KESSEL 1976; DEDIÉ 1993; SZEWZYK et al. 2000) und das Wasser (VON REYN et al. 1993; FALKINGHAM et al. 2001; MATLOVA et al. 2003) angesehen. Als weitere Infektionsstellen kommen Kompost und Sägespäne in Frage.

Die Übertragung von *M. avium* oder *M. intracellulare* auf Schweine kann über lebende oder unbelebte Vektoren geschehen. Bei den unbelebten Vektoren sind als wichtigste Sägespäne bzw. Sägemehl zu nennen (SZABO et al. 1974, BEERWERTH u. KESSEL 1976, THOEN u. KARLSON 1986, BÖHM et al. 1988; MATLOVA et al. 2003). DALCHOW und NASSAL (1979) gelang die Anzüchtung von Mykobakterien aus Sägemehl nach 4 Jahren Lagerung. Eine hohe Nachweisrate besteht auch bei Torf und Torfprodukten (KAZDA 2000; MATLOVA et al. 2005; TRCKOVA et al. 2006).

Tabelle 2.3 zeigt Nachweise von atypischen Mykobakterien aus Umweltproben. Aufgeführt sind auch Proben (Futtermittel), die heute in dieser Form nicht mehr gestattet sind.

Literatur

Tabelle 2.3 Vorkommen von atypischen Mykobakterien in Umweltproben

Reservoir	<i>M. sp.</i>	Serovaren	Bemerkungen	Quellen
Sägemehl	<i>M. avium</i>	2 und 3	Ausgangskontamination der Baumrinde festgestellt	KAUKER u. RHEINWALD (1972)
	<i>M. avium</i>	8 und 9	-	PIENING et al. (1972), DALCHOW u. NASSAL (1979)
	<i>M. avium</i>	1, 4, 8, 9	-	JØRGENSEN (1978b)
	<i>M. avium</i>	1 und 4	-	WINDSOR et al. (1984)
	<i>M. avium</i>	-	Mykobakterien anzüchtbar nach 4 Jahren Lagerung	DALCHOW u. NASSAL (1979)
	<i>M. avium</i>	-	-	MATLOVA et al. (2003)
Arthropoden	<i>M. avium</i>	-	aus Holzrinde, Sägemehl, Weiden, Feldern, Wäldern und Stallungen	EYSING (1977)
Trinkwasser	<i>M. avium</i>	4 und 8	-	VON REYN et al. (1993)
	<i>M. avium</i>	-	optimaler Temperaturbereich 20-45°C	FALKINGHAM et al. (2001)
	<i>M. avium</i>	4-6, 8-11, 21	-	MATLOVA et al. (2003)
Schlamm, Boden, Abwasser	RUNYON-Gruppe III	-	-	BEERWERTH u. KESSEL (1976)
Staub, Boden	<i>M. avium</i>	4, 6, 10	-	NEL (1981)
	<i>M. intracellulare</i>	13 und 14	-	NEL (1981)
Futtermittel für Schweine	<i>M. avium</i>	-	Tierkörpermehl, Fischmehl, Eiweißkonzentrat	KAUKER u. RHEINWALD (1972)
	<i>M. avium</i>	-	Gerste, Sonnenblumen, Saatmehl	BÖHM et al. (1988)
	<i>M. avium</i>	-	Ungekochte Abfälle, Schlachthofreste	THOEN u. KARLSON (1986)
	<i>M. avium</i>	8	Teigabfälle	DALCHOW (1988)
Torf und Torfprodukte	<i>M. avium</i>	4 und 6	-	BAUER et al. (1999)
	<i>M. avium</i>	8	Torfwasser	KAZDA (2000)
	<i>M. avium</i>	4, 6, 8 und 9	-	MATLOVA et al. (2005)
	<i>M. avium</i>	-	Torpackungen, u.a. deklariert als Schweinefutter	TRCKOVA et al. (2006)
Pflanzen, Einstreu, Futter	<i>M. intracellulare</i>	7, 14, 16, 17	-	NEL (1981)

Bei der Übertragung von *M. avium* und *M. intracellulare* auf Schweine ist besonders das Geflügel einschließlich des Wildgeflügels als lebende Vektoren zu nennen. Eine Übertragung von Mykobakterien des MAIC über kontaminierten Vogelkot wird von vielen Autoren für wahrscheinlich gehalten (THOEN u. KARLSON 1986; PAVLIK et al. 2000; DVORSKA et al. 2003; MATLOVA et al. 2003).

Eine weitere Übertragungsmöglichkeit von *M. avium* und *M. intracellulare* besteht in der Ausscheidung der Erreger durch die Schweine selbst und somit einer Übertragung von Tier zu Tier. In Australien stellten TAMMEMAGI und SIMMONS (1969) bei Schweinen eine Ausscheidung von *M. avium* (Serovar 6) über Urin und Kot fest. Eine Exkretion über die Milch hielten sie ebenfalls für möglich. COLE et al. (1980) konnten bei infizierten Tieren jedoch keine Ausscheidung von Mykobakterien über die Milch in den ersten drei Tagen p.p. oder über die Plazenta nachweisen. BILLE und LARSEN (1973) berichteten über eine kongenitale Infektion von *M. avium* bei Schweinen.

Die Serovaren 2 und 8 sind im Schweine- und Hühnerkot (PIENING et al. 1972; BEERWERTH u. KESSEL 1976 [ohne Serovarangabe]) bzw. nur im Schweinekot (Serovar 8) (DALCHOW 1988) nachgewiesen worden. ENGEL et al. (1978) fanden die Serovaren 8, 3+9 und 4 im Schweinekot und stellten fest, dass Sägespäne ein prädisponierender Faktor für eine Darmmykobakteriose beim Schwein sein könnten. Andererseits konnten BEERWERTH und POPP (1971) in infizierten Schweinebeständen keine Mykobakterien aus dem Kot isolieren.

JØRGENSEN et al. (1972a und b) wiesen *M. avium* Serovar 2 im Bronchialsekret und in getrocknetem Kot infizierter Schweine nach und diskutierten die Möglichkeit einer Infektion über den Respirationstrakt, da die Autoren auch gelegentlich tuberkulöse Lungenveränderungen diagnostizieren konnten. Im Staub oder mittels Luftfilter konnten aber keine Mykobakterien ermittelt werden.

Bei einer experimentellen Infizierung (JØRGENSEN 1978a) mit *M. avium* Serovar 2 konnte der Autor den Erreger im Kot zwischen dem 10. und 65. Tag p.i. feststellen, wobei die höchste Keimzahl im Kot in der Mitte dieses Zeitraumes ermittelt werden konnte. Bei den Kontakttieren konnten makroskopische und histologische Veränderungen beobachtet werden. Bei 15 Ferkeln von infizierten Sauen, die auf kontaminiertem Stroh, Sägemehl oder -spänen gehalten worden sind, wies der Autor den Erreger kulturell nach.

ELLSWORTH et al. (1980) fanden *M. avium* Serovar 1 bei experimentell infizierten Tieren im Kot zwischen dem 2. und 9. Tag und ab dem 20./23. Tag p.i. Am 69. Tag p.i. konnten keine Erreger mehr aus dem Kot isoliert werden. Des Weiteren konnte *M. avium* auf den Tonsillen nachgewiesen werden. Bei der Sektion stellten die Autoren Läsionen in Form von Ulzerationen in der Darmschleimhaut fest. Eine mögliche Erregerausscheidung außerhalb der oben

genannten Zeiten ist jedoch sehr wahrscheinlich, da aus Tupferproben, die bei der Sektion am Tag 70 p.i. aus dem gesamten Dünndarmbereich einschließlich des Ileum-Zäkalbereichs genommen wurden, *M. avium* isoliert werden konnte. Die Autoren diskutierten einen Zusammenhang zwischen Keimzahlen/ g Kot und dem Gelingen eines kulturellen Nachweises.

Die MAIC-Infektionen bei Schweinen sind relativ eng verbunden mit kontaminierter Umwelt oder Futter, Einstreumaterial und Boden. Die direkte Übertragung von Schwein zu Schwein scheint eher keine Rolle zu spielen (SCHLIESSER 1985).

2.1.4.2 Mykobakterien beim Schwein

M. bovis und *M. tuberculosis* haben heutzutage in Deutschland ihre Bedeutung am Infektionsgeschehen der Schweine mit Mykobakterien weitestgehend verloren.

Die Infektion der Schweine durch *M. bovis* spielt bei der Schweinetuberkulose nach SCHLIESSER (1967 u. 1976), RICHTER (1967), SEEGER und SCHACK-STEFFENHAGEN (1967) sowie LESSLIE et al. (1968), bedingt durch die erfolgreichen Bekämpfungsmaßnahmen der Rindertuberkulose, keine Rolle mehr. Die durch *M. tuberculosis* bedingte Tuberkulose bei Schweinen manifestiert sich nach THOEN und KARLSON (1986) nur bei direktem Kontakt zwischen einem mit *M. tuberculosis* infizierten Menschen und einem Schwein. Auch ihre Bedeutung ist wegen der geringen Tuberkuloseinzidenz als gering einzustufen.

Der Hauptanteil der Infektionen bei Schweinen mit Mykobakterien wird durch die Erreger des *M. avium-intracellulare*-Komplexes (MAIC) verursacht (ELLSWORTH et al. 1980; THOEN u. KARLSON 1986; GÜNTHER 1987). Die Veränderungen beschränken sich dabei meist auf Lymphknoten des Verdauungskanals, Generalisationen können aber vorkommen.

Nach LESSLIE et al. (1968) stiegen die durch *M. avium* verursachten Mykobakterieninfektionen bei Schweinen von 44 % im Jahre 1955 auf 92 % im Jahre 1966 an. Zugrunde lagen hier die makroskopisch veränderten Organe mit Verdacht auf Tuberkulose. BECKER (1963) bezifferte den Anteil von MAIC-Vertretern bei Mykobakterieninfektionen auf 60 %, bei JANETSCHKE (1964) betrug er 97,3 %, bei RICHTER (1967) 95 % und bei FISCHER (1999) betrug der Prozentsatz 99,98 %.

SCHLIESSER (1976) stellte in einem Überblick dar, dass in den USA prozentual häufiger Serovar 1 und die Serovaren 7, 8, 9, 10/11 von *M. avium-intracellulare* vorkommen als in Deutschland bzw. Europa. Des weiteren referierte SCHLIESSER (1976), dass in Australien

Literatur

M. avium Serovar 6, in Südafrika die Serovaren 4, 10/11 und in Japan die Serovaren 8, 9 und 10/11 häufiger vorkommen als in Europa. CORNER et al. (1981) konnten die Serovaren 6, 7, 8, 9, 11, 12, 18 und 25 in Australien nachweisen.

Das Vorkommen von *M. avium* und *M. intracellulare* bei veränderten Organen mit Verdacht auf Mykobakteriose ist in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Literatur

Tabelle 2.4 Mykobakterien bei Schweinen (natürliche Infektion, chronologisch)

Quellen	Land	Erreger	Häufigkeit	Erläuterung
SEEGER u. SCHACK- STEFFENHAGEN (1967)	D	<i>M. avium</i>	93,06 %	Schlachtorgane mit oder ohne Veränderungen
TAMMEMAGI u. SIMONS (1968)	Australien	<i>M. avium</i> S 6	k. A.	k. A.
JØRGENSEN et al. (1972b), JØRGENSEN (1978b)	Däne- mark	<i>M. avium</i> S 2 <i>M. avium</i> S 4, 6, 8, 9 u. 14	häufig selten	k. A. k. A.
PIENING et al. (1972)	D	<i>M. avium</i> S 2 <i>M. avium</i> S 3, 4, 8+9	77 % 23 %	k. A. k. A.
TSUKAMURA u. NEMOTO (1973)	Japan	<i>M. avium</i> S 4 + 8	k. A.	Mandibular- und Darm- lymphknoten
YACHIDA u. SHIMIZU (1973)	Japan	<i>M. avium</i> S 8	k. A.	k. A.
COLE et al. (1975)	USA	<i>M. avium</i> S 1, 2, 10, 4 + 8	in abneh- mender Häufigkeit	k. A.
SIMON (1976)	Kanada	<i>M. avium</i> S 4	k. A.	k. A.
THOEN et al. (1976b)	USA	<i>M. avium</i> S 2, 1, 4, 8 und Doppelserovare	in abneh- mender Häufigkeit	k. A.
ENGEL et al. (1978)	Holland	<i>M. avium</i> S 2	k. A.	k. A.
MERKAL u. CRAWFORD (1979)	USA	<i>M. avium</i> S 1, 2, 4, 8 u. 10	k. A.	k. A.
BERGMANN u. HOLMBERG (1979)	Schwe- den	<i>M. avium</i> S 3 <i>M. avium</i> S 2	häufig selten	k. A.
DALCHOW u. NASSAL (1979)	D	<i>M. avium</i> S 8, 9, 8+9, und 3+9	k. A.	Schlachtorgane mit oder ohne Veränderungen
CORNER et al. (1981)	Australien	<i>M. avium</i> S 6, 9, <i>M.</i> <i>intrac.</i> S 7 18, Dop- pelinfectionen 6+12, 8+12, 11+25	k. A.	Darm-, Mandibular-, Mammar- und Hoden- lymphknoten, Leber, Uterus
NEL (1981)	Südafrika	<i>M. avium</i> S 8, 4, 4+8 u. 10, <i>M. intracellu- lare</i> S 24	in abneh- mender Häufigkeit	k. A.
SAXEGAARD (1981)	Norwegen	<i>M. avium</i> S 8	k. A.	k. A.
THOEN et al. (1981)	USA	<i>M. avium</i> S 2, 1, 8, 4, 10, 9, 3/ 5, 6, 11 <i>M. intracellulare</i> S 12, 14, 16, 17, 18	in abneh- mender Häufigkeit vereinzelt	k. A.
WINDSOR et al. (1984)	England	<i>M. avium</i> S 4 u. 6	k. A.	k. A.
BÖHM et al. (1988)	Jugosla- wien	<i>M. avium</i> S 4	k. A.	k. A.
THOREL et al. (1997)	Frank- reich	<i>M. avium</i>	k.A.	Mandibular- und Darm- lymphknoten
CVETNIC et al. (1998)	Kroatien	<i>M. avium</i> S 2, 3, 8	89,3 %	Mandibular- und Darm- lymphknoten
FISCHER (1999)	D	<i>M. avium</i> S 8, 4, 3, 2, 9 u. 10	99,98 %	Mandibular- und Darm- lymphknoten
PAVLIK et al. (2003)	Tschechi- en	<i>M. avium</i> S 2 + 3 <i>M. avium</i> S 4, 8+9	55,7 % 39,2 %	Mandibular- und Darm- lymphknoten
MATLOVA et al. (2005)	Tschechi- en	<i>M. avium</i> S 2,6,8+9 <i>M. intracellulare</i>	83,5 % 3,3 %	Mandibular- und Darm- lymphknoten

k. A. = keine Angaben; S = Serovar

Vorkommen in Deutschland grau hinterlegt

2.1.4.3 Mykobakterien beim Rind

Die durch *M. bovis* hervorgerufene Rindertuberkulose tritt weltweit auf und gilt als eine der wichtigsten Tierseuchen und Zoonosen. Die Rindertuberkulose ist in der Bundesrepublik Deutschland eine anzeigepflichtige Tierseuche (Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen), Therapieversuche sind ebenso wie Schutzimpfungen verboten. In Deutschland wurde *M. bovis* durch ein in den 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts gestartetes Bekämpfungsprogramms erfolgreich zurückgedrängt. Die Bekämpfungsmaßnahmen basierten auf der Entdeckung von infizierten (auch nicht erkrankten) Tieren mit Hilfe des Tuberkulin-Tests und ihrer Ausmerzung. Beide deutschen Staaten sind seit 1961 (West) bzw. 1971 (Ost) offiziell frei von Rindertuberkulose (MATTHIAS 1980). Dem vereinigten Deutschland wurde am 17.12.1996 von der EU der Status „amtlich frei von Rindertuberkulose“ zuerkannt (Entscheidung 97/76/EG). Dies bedeutet nach Definition der EU, dass 99,9 % der Rinderherden seit 10 Jahren amtlich frei von Rindertuberkulose sind und in höchstens 0,1 % der Bestände jährlich infizierte Tiere entdeckt werden dürfen.

Die *M. bovis* nah verwandte Spezies *M. caprae* wurde zunächst als eine Subspezies von *M. tuberculosis* beschrieben (ARANAZ et al. 1999) und später als Subspezies von *M. bovis* angesehen (NIEMANN et al. 2002). Mittlerweile wird *M. caprae* als eigenständige Spezies dem *M. tuberculosis*-Komplex zugerechnet (ARANAZ et al. 2003). *M. caprae* wurde hauptsächlich bei Rindern und diversen anderen Tierarten (Ziege, Pferd, Schwein, Hund, Katze) in Mittel- und Südeuropa beobachtet (PRODINGER et al. 2005), wobei vor allem Wildtiere (z.B. Rotwild oder Wildschweine) ein bedeutendes Reservoir und somit eine Gefahr zum Wiederaufleben der Tuberkulose in Rinderbeständen darstellen. Infektionen beim Menschen mit *M. caprae* scheinen selten zu sein und traten vorwiegend bei älteren Patienten auf (PRODINGER et al. 2005).

Obwohl MAIC-Infektionen beim Rind klinisch gesehen von untergeordneter Bedeutung sind, sind sie die am häufigsten aus granulomatösen Lymphknoten isolierten Mykobakterien (PAVLIK et al. 2002). Nach SCHLIESSER (1985) stellen atypische Mykobakterien wegen der Ausbildung von Kreuzreaktionen beim Tuberkulintest das Hauptproblem in der weltweiten Bekämpfung der Rindertuberkulose dar. Den Anteil falsch-negativer Ergebnisse durch Vertreter des MAIC bezifferte SCHLIESSER (1985) auf zwei Drittel.

M. avium subsp. *paratuberculosis* ist der Erreger der Paratuberkulose (JOHNE'sche Krankheit) bei Rind (und Schaf). Sie ist gekennzeichnet durch eine sehr lange Inkubationszeit.

Obwohl sich die Tiere bevorzugt in den ersten 30 Lebenstagen infizieren, werden klinische Erscheinungen in der Regel erst bei über zweijährigen Rindern und Schafen manifest. In erster Linie handelt es sich um eine intestinale Infektion mit produktiver Enteritis, die zur Verdickung der Darmschleimhaut vor allem in Ileum und Zäkum führt. Hauptsymptome sind chronische Abmagerung und intermittierende Durchfälle (SELBITZ 1992).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Paratuberkulose beim Rind und Morbus Crohn beim Menschen wurde erstmals durch CHIODINI (1989) dargestellt. Bei Morbus Crohn handelt es sich um eine Krankheit mit entzündlichen Veränderungen des Verdauungstraktes, die sich vom Mund bis zum Anus erstrecken können. Sie verläuft in Schüben und spielt sich bevorzugt am Übergang von Dünndarm zu Dickdarm ab. In Deutschland leiden schätzungsweise 170.000 Menschen an Morbus Crohn (MARTIN u. BRÄUNIG 2002).

2.1.4.4 Mykobakterien beim Geflügel

Die Geflügeltuberkulose ist weltweit verbreitet und wird hauptsächlich durch Vertreter des MAIC ausgelöst (THOREL et al. 1997). In der Schweiz wurde dagegen *M. genavense* als häufigste Mykobakterien-Spezies in Wirtschaftsgeflügel ermittelt (HOOP et al. 1996; HOLSBOER-BUOGO et al. 1997). Weiterhin konnten *M. fortuitum*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. gordonae* aus veränderten Organen von Wild- und Hausvögeln isoliert werden, wengleich diese eine untergeordnete Rolle spielen (THOEN et al. 1977; HOOP et al. 1996). Während sich die durch *M. avium* ausgelösten Erkrankungen bei Säugetieren auf Einzelfälle beschränken, werden bei Vögeln seuchenhafte Infektionskrankheiten ausgelöst. Deshalb gehört die Tuberkulose des Geflügels in der Bundesrepublik Deutschland zu den meldepflichtigen Tierkrankheiten (Verordnung über meldepflichtige Krankheiten).

Die jährlichen Meldungen in den Jahren 1991 bis 1998 (zwischen 129 und 261, Tabelle 2.5) betrafen vornehmlich Privathaltungen von Rassegeflügel und Legehennen mit weniger als 20 Tieren sowie Einzeltiere aus Wildgehegen und Tierparks. In der modernen Geflügelintensivhaltung spielt die *M. avium*-Infektion keine Rolle (MARTIN u. SCHIMMEL 2000).

Tabelle 2.5 Anzahl der gemeldeten Fälle an Geflügeltuberkulose in Deutschland (BfR 1998)

Jahr	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
Zahl der Meldungen	261	232	202	171	198	129	154	172

Die höchste Empfänglichkeit besitzen Hühnervögel, gefolgt von Tauben, beim Wassergeflügel ist sie am geringsten. Auch Wildvögel, besonders Greifvögel, sind betroffen. Zu Häufungen kann es bei Volierenhaltung kommen. Geflügeltuberkulose tritt besonders bei extensiver Haltung von Hühnern, schlechten hygienischen Bedingungen und überalterten Beständen auf. Die Serovar 2 besitzt die höchste Virulenz für Hühner (SELBITZ 1992).

Die Infektion erfolgt überwiegend oral über das Futter, Wasser und kontaminiertes Erdreich, in dem die Erreger länger als ein Jahr infektionstüchtig bleiben. Aerogene Infektionen sind selten. Der Primärherd befindet sich daher meist im Darm, es erfolgt eine hämatogene Generalisation, der Krankheitsverlauf gestaltet sich chronisch. Nach langer Inkubationszeit zeigen sich uncharakteristische Allgemeinsymptome, Durchfälle, Lahmheiten und Hängenlassen der Flügel. Über den Darmkanal erfolgt eine erhebliche Erregerausscheidung. Bei der Sektion lassen sich tuberkulöse Granulome in Darm, Leber, Milz, gelegentlich anderen Organen und häufig auch dem Knochenmark nachweisen. Für die Diagnostik ist in der Regel der mikroskopische Nachweis von säurefesten Stäbchen ausreichend; in vivo kann die Diagnose mittels Tuberkulintest am Kehllappen bzw. Objektträger-Schnellagglutination mit Frischblut gestellt werden (SELBITZ 1992).

Eine Behandlung ist generell abzulehnen, am sichersten ist der Austausch des gesamten Bestandes, infizierte Ausläufe müssen langfristig gesperrt werden. Als Prophylaxemaßnahmen werden Haltungshygiene, regelmäßige Reinigung und Desinfektion, Vermeidung der Überalterung des Bestandes und laufende Gesundheitsüberwachung beschrieben (SELBITZ 1992).

2.1.4.5 Mykobakterien bei anderen Tierarten

Die Mykobakteriose von Schaf und Ziege ähnelt weitgehend der des Rindes, es dominieren exsudative Veränderungen im Lungenbereich. Bei Ziegen ist auch die Eutertuberkulose zu beobachten, bei Farmhirschen kann die Erkrankung größere Bedeutung erlangen. Die Tuberkulose des Pferdes hat wie die der Fleischfresser proliferativen Charakter. Vorwiegend sind Darm, Lunge, Tonsillen, Kehlgangs- und Retropharyngeallymphknoten betroffen. Bei Hunden und Katzen ist der Darm häufiger betroffen als die Lunge, beachtet werden müssen ferner Mykobakteriosen der Halslymphknoten mit Durchbrüchen und Hauttuberkulosen mit bis in die Unterhaut reichenden Geschwüren (SELBITZ 1992).

Infektionen mit Vertretern des MAIC bringen bei den anderen Haustierarten nur selten klinische Erscheinungen mit sich (Tabelle 2.6). Beim Pferd wurden bei MAIC-Infektion Abmage-

rung, Durchfall, Anorexie und Hypoproteinämie als Symptome beschrieben, auch Aborte können ausgelöst werden (CLINE et al. 1991; HELIE u. HIGGINS 1996). FLORES et al. (1991) beschrieben das Auftreten einer diffusen granulomatösen Dermatitis, die vor allem auf der Haut von Kopf, Nacken, Rücken und Bauch auftrat. Eine generalisierte *M. avium*-Infektion wurde bei einem immunsupprimierten zweijährigen Pferd in Norwegen beschrieben (GUNNES et al. 1995).

Tabelle 2.6 Mykobakterien bei Mensch und Tier (nach BISPING 1992)

Tierart	MAIC	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>
Mensch	(+, ++)	++	++
Rind	- (+)	- (+)	++
Schaf	- (+)	- (+)	++
Ziege	- (+)	+ (++)	++
Pferd	- (+)	- (+)	++
Schwein	+ (++)	- (+)	++
Hund	-	++	++
Katze	-	+ (++)	++
Huhn	++	-	-

- = keine tuberkulösen Veränderungen, + = Lokalinfection, oft nur Lymphknotenveränderungen, ++ = fortschreitende Tuberkulose (Generalisation), () = selten auftretend

M. intracellulare wurde bei einigen Primatenarten isoliert, die als klinische Symptome Abmagerung, Anämie und Abgeschlagenheit zeigten. In den meisten Fällen waren makroskopisch erkennbare Läsionen an Lungen- und Mesenteriallymphknoten sichtbar (FLEISCHMAN et al. 1982; GOODWIN et al. 1988).

2.1.4.6 Mykobakterien beim Menschen

Mykobakterien können beim Menschen drei Erkrankungsformen hervorrufen:

- Tuberkulose (*M. tuberculosis*-Komplex),
- Lepra (*M. leprae*) und
- Mykobakteriose (atypische Mykobakterien).

Atypische Mykobakterien wurden zwar schon seit den 40er Jahren des vergangenen Jahrhunderts als seltene Krankheitserreger (z.B. bei chronischen Lungenprozessen, Lymphadenopathien bei Kindern, Haut- und Weichteilinfektionen) beim Menschen beschrie-

ben, ihre Bedeutung hat jedoch in den letzten Jahren, bedingt durch die steigende Zahl immunsupprimierter Patienten, stark zugenommen (O'BRIEN et al. 1987; YATES et al. 1993; POZNIAK et al. 1996; TANAKA et al. 1997). So gelten beispielsweise Mykobakterien als häufige Ursache für opportunistische, bakterielle Infektionen bei AIDS-Patienten (DÜZGÜNES et al. 1996), nicht selten mit tödlichem Ausgang. Weitere systemische prädisponierende Erkrankungen sind Diabetes mellitus, langfristige immunsuppressive Therapien sowie Kollagenosen (Autoimmunerkrankungen des Bindegewebes). Lokal prädisponierend sind verschiedene Lungenerkrankungen. Generell gehören auch alte Menschen, Kinder unter 12 Jahren und Transplantationspatienten zum gefährdeten Personenkreis (SCHÜTT-GEROWITT 1996).

In Deutschland war in den letzten Jahren ein rückläufiger Trend bei der humanen Tuberkulose zu verzeichnen (Tabelle 2.7). Im Jahr 2009 wurden insgesamt 4.444 Tuberkulosen registriert, was einer Inzidenz von 5,4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner entsprach. Die Analyse der demographischen Daten zeigte, dass Männer deutlich häufiger an einer Tuberkulose erkrankten als Frauen. Die Inzidenz lag bei männlichen Patienten etwa 1,5-mal höher als bei weiblichen Patienten. Dieser geschlechtsspezifische Unterschied manifestierte sich vor allem durch die höhere Erkrankungshäufigkeit bei Männern ab einem Alter von 40 Jahren (RKI 2003-2009).

Tabelle 2.7 Gemeldete humane Tuberkulosefälle und Inzidenzen in Deutschland (RKI 2003-2009)

Jahr	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
gemeldete Tuberkulosen	7.184	6.583	6.045	5.402	5.020	4.543	4.444
Inzidenz Gesamt	9,3	8,0	7,3	6,6	6,1	5,5	5,4
Inzidenz Männer	11,0	9,7	9,1	7,8	7,3	6,9	6,6
Inzidenz Frauen	6,5	6,3	5,7	5,3	4,9	4,2	4,3

Inzidenz = Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner

Da Erkrankungen durch atypische Mykobakterien in Deutschland im Gegensatz zur Tuberkulose nicht meldepflichtig sind, gibt es hier keine genauen Zahlen. Die Prävalenz in den USA wurde auf 1,8 pro 100.000 geschätzt (SCHIEFERSTEIN 2006). In den USA traten MAIC-bedingte Infektionen bei 30-60 % aller AIDS-Patienten auf (SCHÜTT-GEROWITT 1996). In

anderen Ländern lagen die Werte bei 17-50 % (DAWSON 1990; NASSOS et al. 1991; NIGHTINGALE et al. 1992). Bei AIDS-Patienten aus Afrika wurde MAIC nur selten gefunden, obwohl MAIC aus dem Erdboden und dem Wasser in vielen afrikanischen Ländern isoliert werden konnte. Vorhandene Antikörper gegen *M. bovis* (Tuberkuloseerkrankung) könnten hierfür eine Ursache sein (MORRISSEY et al. 1992; VON REYN et al. 1993).

Bei HIV-Erkrankten kommt es häufig zur Erregerausbreitung und zum Krankheitsausbruch, überwiegend vom besiedelten Darm aus, wenn die T-Helferzell-Zahl unter 100 pro μ l Blut absinkt (NIGHTINGALE et al. 1992; SCHÜTT-GERWITT 1996; HORSBURGH 1997).

Die klinischen Symptome sind wie bei der Tuberkulose Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsabnahme, hinzu kommen Durchfälle und Bauchschmerzen. Bei der Untersuchung weisen die Patienten meist eine Milz- und Leberschwellung und oft auch vergrößerte intraabdominale Lymphknoten auf. Es werden praktisch alle Organe befallen, Erreger können aus dem Knochenmark und/ oder aus Organpunktaten (insbesondere Leberpunktat) nachgewiesen werden. Patienten mit den angegebenen klinischen Symptomen sollten behandelt werden, auch wenn nur eine vorübergehende Besserung der Symptomatik und keine Lebensverlängerung erreicht werden konnte (SCHÜTT-GEROWITT 1996). Wegen der hohen Resistenz der Erreger ist die Therapie jedoch problematisch. Folgende Substanzen kommen für die Therapie in Frage: Rifabutin, Ethambutol, Clofazimin, Sparfloxacin, Amikacin und v.a. die Makrolide Clarithromycin und Azithromycin, für die als einzige eine Korrelation zwischen In-vitro-Empfindlichkeit und klinischer Wirkung nachgewiesen werden konnte (SCHÜTT-GEROWITT 1996).

Bei HIV-negativen Patienten verursacht MAIC vor allem drei Krankheitsbilder:

- Lymphadenitiden,
- chronische Lungenerkrankungen und
- disseminierte Erkrankungen (sehr selten) (BENSON 1994; HORSBURGH 1997).

Zu chronischen Lungenerkrankungen durch ubiquitäre Mykobakterien kommt es bei nicht immunsupprimierten Patienten meist nach einer Vorschädigung der Lunge wie Pneumokoknosen oder Tuberkulose. Neben dem MAIC wird hier v.a. *M. kansasii* gefunden. Die klinischen Symptome entsprechen denen der Tuberkulose. Aufgrund der geringeren Resistenz gegenüber Antituberkulotika erweist sich die Therapie für *M. kansasii* einfacher als bei MAIC. Lymphadenitiden treten bei Kindern wesentlich häufiger auf als bei Erwachsenen und werden v.a. durch Vertreter des MAIC, *M. scrofulaceum* oder *M. malmoense* hervorgerufen. Der Lymphknotenbefall ist meist einseitig zervikal, die Therapie erfolgt medikamentös oder chi-

Literatur

urgisch durch Lymphknotenexstirpation. Haut- und Weichteilinfektionen werden v.a. durch *M. marinum* und die schnell wachsenden Arten *M. chelonae* und *M. fortuitum* ausgelöst.

Über die pathogene Signifikanz wichtiger Mykobakterienspezies beim Menschen mit entsprechendem Krankheitsbild gibt Tabelle 2.8 Auskunft.

Tabelle 2.8 Pathogene Signifikanz von Mykobakterien aus menschlichem Untersuchungsmaterial (nach SALFINGER u. KAFADER 1992)

Vorkommen	Spezies	Krankheitsbilder
immer	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. africanum</i> <i>M. bovis</i> <i>M. bovis</i> (BCG) <i>M. leprae</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. ulcerans</i>	Lungen- und extrapulmonale Tuberkulose Tuberkulose, hauptsächlich in Afrika Lungen- und extrapulmonale Tuberkulose Lymphadenitiden, Osteitiden Lepra Hautinfektionen (insbes. Israel, Australien) Lungeninfektionen Hautinfektionen (hauptsächlich Australien, Tropen)
häufig	<i>M.-avium-intracellulare-Komplex (MAIC)</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. simiae</i> <i>M. xenopi</i>	Lungen- und extrapulmonale Infektionen, Lymphadenitiden Lungeninfektionen (hauptsächlich Nordeuropa) iatrogene Abszesse iatrogene Abszesse Lungeninfektionen Hautinfektionen (Aquarien, Schwimmbäder) Lymphadenitiden Lungeninfektionen Lungeninfektionen
selten	(verschiedene Krankheitsbilder – jeweils Einzelfälle bekannt): <i>M. flavescens</i> – <i>M. gastri</i> – <i>M. gordonae</i> – <i>M. nonchromogenicum</i> – <i>M. phlei</i> – <i>M. smegmatis</i> – <i>M. terrae</i> – <i>M. triviale</i> – <i>M. vaccae</i>	

2.1.5 Pathologie und Klinik (Schwein)

2.1.5.1 Pathogenese

Die durch *M. avium* oder *M. intracellulare* bedingte Verlaufsform der Mykobakteriose bei Schweinen ist abhängig von der Resistenzlage im Zusammenhang mit der Aktivierbarkeit des Immunsystems des betroffenen Tieres, dem Zeitfaktor nach der Infektion, der Erregermenge bzw. der Häufigkeit der Exposition und möglicherweise von der Serovar, mit der die Infektion stattgefunden hat (LEINEMANN et al. 1993; THOREL et al. 2001).

Die Mykobakteriose beim Schwein ist durch eine Granulombildung gekennzeichnet, die eine Abwehrmaßnahme des Körpers auf den Erregerbefall darstellt. Ein Granulom (knötchenartiger Zellhaufen) entsteht durch eine herdförmige entzündliche Reaktion des Körpers auf eine schwer zu eliminierende Noxe. Dies geschieht durch eine konzentrische Umlagerung verschiedener Zellen um die Noxe. Es handelt sich um aktivierte Makrophagen oder um Epitheloidzellen, die beide zum mononukleären Phagozytensystem zu zählen sind. Die Makrophagen in der Epitheloidzone neigen dazu, sich im späteren Verlauf zu symplasmatischen Zellverbänden zusammenzulagern, den sog. Riesenzellen. Des Weiteren lagern sich um den histozytären Ring immunkompetente Zellen, vorwiegend T-Lymphozyten, an. Die Granulome haben i.d.R. die Neigung zur Abkapselung mittels einer fibrinösen Schicht und zur Nekrose (Verkäsung) mit eventueller Verkalkung der nekrotischen Zone.

Die granulomatöse Entzündung ist daher das Resultat der Wechselwirkung zwischen auslösender Noxe, in diesem Fall *M. avium-intracellulare*, sowie seitens des Wirtes Entzündungszellen und der sekundären Immunreaktion. Die Erreger liegen i.d.R. intrazellulär in den Makrophagen vor. Die immunologische Reaktion des Wirtes beruht auf der zellvermittelten allergischen Reaktion vom verzögerten Typ.

Je nach Resistenz- und Immunitätslage des Wirtes findet eine Heilung, eine Frühgeneralisation durch lympho-hämatogene Abschwemmung oder eine Exazerbation statt. Durch die Exazerbation kann es zu einer Spätgeneralisation mit einer möglichen darauf folgenden chronischen Organtuberkulose kommen. Die Manifestation im Organ kann sich als vollständiger Primärkomplex, d.h. als tuberkulöser Herd im befallenen Organ und in regionalen Lymphknoten oder als unvollständiger Primärkomplex ausbilden, d.h. nur die regionalen Lymphknoten sind betroffen, und im Primärorgan sind die Veränderungen abgeheilt oder nicht feststellbar (SCHULZ u. TRAUTWEIN 1990).

Bei der Mykobakteriose des Schweines entsteht i.d.R. ein unvollständiger Primärkomplex, d.h. der Schaden an der Eintrittsstelle (z.B. Darm) ist gering, regeneriert sich schnell und kann somit nicht mehr nachgewiesen werden (SEEGER u. SCHACK-STEFFENHAGEN

1967; WEISS u. RUDOLPH 1988). Bei der postmortalen Untersuchung ist dann nur der veränderte Lymphknoten makroskopisch sichtbar.

Die Mykobakteriose kann oral, aerogen, über die äußere Haut, über den Strichkanal und Milchgänge, über Geschlechts- und Harnwege, über das Auge und mittels einer omphalogenen Infektion übertragen werden (SELBITZ 1992).

In der Hauptsache erfolgt die Infektion beim Schwein durch orale Aufnahme der Mykobakterien (MATLOVA et al. 2003). Daher finden sich die ersten Manifestationen entlang des Verdauungstraktes und seiner Lymphknoten sowie der Tonsillen. Dementsprechend sind die Lymphknoten und das lymphatische Gewebe des Pharynxbereiches zuerst betroffen. Von den Lymphknoten mit Veränderungen rangieren an erster Stelle die Kehlganglymphknoten (*Lnn. mandibulares*), gefolgt von den Retropharyngeallymphknoten (*Lnn. retropharyngeales mediales et laterales*). Außerdem können auch die Tonsillen (*Tonsilla palatina*) verändert sein (ELLSWORTH et al. 1980).

In der Submukosa des Darmes können sich diffuse zelluläre Proliferationen mit möglichen Ulzerationen in das Darmlumen bilden, durch die der Erreger ausgeschieden werden kann (ELLSWORTH et al. 1980; THOEN u. KARLSON 1986), und zusätzlich manifestiert sich der Erreger in den Gekröselymphknoten (*Lnn. mesenteriales*). Hier kann er nach WEISS und RUDOLPH (1988) einen unvollständigen Primärkomplex bilden und von dort hämatogen oder lymphogen in andere Organe wie Leber, Milz und Lunge abgesiedelt werden.

Granulomatöse Läsionen manifestieren sich nach einer Inkubationszeit von mindestens sechs Wochen an einem oder mehreren Lymphknoten bzw. den Mandeln (THOREL et al. 2001).

2.1.5.2 Pathomorphologie

Pathomorphologisch besteht große Ähnlichkeit der Avium-Mykobakteriose mit der Tuberkulose beim Schwein (SCHULZ 1987).

Die pathologisch- anatomischen Veränderungen in den Lymphknoten bestehen meistens in miliaren käsigen und/ oder kalzifizierten speckig-gelben Herden.

Nach einer Infektion von Schweinen mit *M. avium*-Serovar 2 (JØRGENSEN 1978 a) bzw. *M. avium*-Serovar 6 (TAMMEMAGI u. SIMMONS 1969) zeigten die Lymphknoten Veränderungen in Form einer multiplen granulomatösen Lymphadenitis, sie konnten im weiteren Verlauf des Krankheitsprozesses verkäsen und z.T. kalzifizieren oder narbig ausheilen.

Veränderungen im Lungengewebe sind zwischen hirsekorn- und walnussgroß und vom umgebenden Gewebe gut abgegrenzt. Sie liegen in Form von Knoten vor, die vereinzelt oder

multipel subpleural oder tief im Gewebe liegen können. Die Farbe ist i.d.R. speckig-gelb. In der Leber kommen miliare subkapsuläre wie auch interlobuläre Herde mit käsigem und/ oder kalzifiziertem Zentrum vor (JØRGENSEN et al. 1972 a; WEISS u. RUDOLPH 1988).

GÜNTHER (1987) beschrieb die Veränderungen in den Lymphknoten als kleine bis über bohngroße grau- bis weißgelbe Knötchen mit leicht vorwölbender Oberfläche. Die Schnittfläche dieser Knötchen zeigte ein nekrotisches Zentrum von bröckeliger Konsistenz, das von einer bindegewebigen Kapsel umgeben war.

2.1.5.3 Histopathologie

ELLSWORTH et al. (1980) stellten fokale mikroskopische Läsionen in Form von nicht-einkapselten Granulomen in den Tonsillen, in Lymphfollikeln und in der Mukosa des Dünndarmes fest.

Bei experimentellen Infektionen mit *M. avium*-Serovar 2 wies JØRGENSEN (1978a) 65 Tage p.i. in den Lymphknoten Epitheloidtuberkel mit käsigem oder kalzifiziertem Inhalt und mit einer Tendenz zur Demarkation und Organisation mit fibrinösem Gewebe nach. Der Autor stellte ebenfalls Epitheloidtuberkel ohne käsigen bzw. kalzifizierten Inhalt fest. In den Peyer'schen Platten fand er bei allen Tieren Mikrogranulome und bei zwei von fünf Tieren Ulzerationen. 149-177 Tage p.i. zeigten die Veränderungen eine käsig-kalzifizierte Struktur, umgeben von Epitheloidzellen, Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten, um die sich wiederum eine bindegewebige Kapsel gebildet hatte.

Bei experimentellen Infektionen fanden COLE et al. (1980) mikroskopische Veränderungen schon am 64. Tag p.i. in den Mesenteriallymphknoten und ab dem 83. Tag p.i. im Dünndarm. Große Läsionen wurden ab dem 85. Tag p.i. in den Mesenteriallymphknoten beobachtet (keine Angaben zur Art der Veränderungen).

Dies entspricht etwa den Ergebnissen von JØRGENSEN (1978a), der ab dem Tag 67-68 p.i. fleischig-käsige und ab dem Tag 103-153 p.i. käsig-kalzifizierte Granulome besonders im Bereich der Peyer'schen Platten fand.

THOEN et al. (1976 a und b) fanden nach 92 Tagen p.i. bei experimentellen Infektionen mit *M. avium*-Serovar 8 histopathologisch Veränderungen in den Zervikallymphknoten mit einer dicken Bindegewebskapsel, die Makrophagen und Granulozyten umgab. In den Mesenteriallymphknoten beobachteten die Autoren eine nicht vollständig ausgebildete Bindegewebskapsel, in deren Innerem sich Granulozyten befanden, um die sich Makrophagen und Fibroblasten angesammelt hatten. Einige Granulom-ähnliche Veränderungen waren hingegen durch Epitheloidzellen und Langerhans'sche Riesenzellen mit geringer oder z.T. auch fehlender Proliferation des Bindegewebes charakterisiert.

Histologisch waren nach THOEN et al. (1979) bei einer experimentellen Infektion mit Serovar 4 nach 80 Tagen in den Lymphknoten granulomatöse Läsionen in Form eines verkästen und nekrotischen Zentrums zu beobachten. Dieses war von Makrophagen, Granulozyten, Langerhans'schen Riesenzellen und Epitheloidzellen umgeben und von einer Bindegewebskapsel eingeschlossen. Die Granulome in der Leber waren durch Epitheloidzellen und Langerhans'schen Riesenzellen sowie durch verkäsende Nekrosen charakterisiert.

NETO et al. (1988) stellten bei Gekröselymphknoten von Schweineschlachtkörpern mit makroskopischen tuberkulösen Läsionen zu 100 % histopathologische Veränderungen fest, zu 66 % wurden bakteriologisch Mykobakterien nachgewiesen. Von diesen 66 % waren 90 % dem MAIC zuzuordnen. Auch ohne makroskopische tuberkulöse Läsionen konnten bei 4 von 30 Schlachttieren histopathologische Veränderungen diagnostiziert und bei 8 von 30 Tieren Mykobakterien kulturell angezüchtet werden.

2.1.5.4 Klinische Symptomatik

Nach GÜNTHER (1987) kann eine *M. avium*-Infektion unbemerkt bleiben, und nur bei einer Erkrankung der Retropharyngeal- bzw. Mesenteriallymphknoten können Schluckbeschwerden bzw. chronische Darmbeschwerden auftreten oder die Tiere bleiben im Wachstum zurück.

RENAULT (1989), WENTZ et al. (1990), LEINEMANN et al. (1993) und THOREL et al. (2001) gehen davon aus, dass es in der Regel zu keiner klinischen Erkrankung nach einer Infektion mit Mykobakterien des MAIC kommt.

PLONAIT und BICKHARDT (1988) sahen selten klinische Symptome, und nach diesen Autoren kann es nur bei einer Generalisierung zu Symptomen wie Abmagerung, Fieber, Knotenbildung im Gesäuge oder Schwellung der Hoden kommen. Differentialdiagnostisch kommen chronische Erkrankungen der Lunge, des Darmkanals und der Harnorgane in Frage.

THOREL et al. (2001) berichten, dass, falls klinische Symptome auftreten, erhöhte Temperatur, Anorexie und deutliche Gewichtsverluste beobachtet werden können.

Da die klinischen Symptome zu einer Diagnosestellung nicht ausreichen, kommt beim Schwein als weitere Diagnosemöglichkeit am lebenden Tier die Tuberkulinprobe in Frage. Sie basiert auf der zellvermittelten Immunität im Rahmen einer Reaktion vom verzögerten Typ (ROLLE u. MAYR 1984) und wird durch Tuberkuline (Synonym: Sensitine) hervorgerufen (MAGNUSSON 1984). Diese Reaktion reicht aber nicht aus, um einzelne Mykobakterienspezies voneinander zu differenzieren, da die Spezifität dieser Sensitine zu gering ist.

SCHLIESSER (1985) empfahl bei Säugetieren die Vergleichsmethode mit Rinder- und Geflügeltuberkulin (comparative-tuberculin test, Simultanprobe), um unspezifische Tuberkulinreaktionen in Form von Parallergien ausschließen zu können.

LESSLIE et al. (1968) injizierten den Schweinen 0,1 ml „avian“ und 0,1 ml „mammalian purified protein derivate“ (PPD) intradermal jeweils auf einer Seite in die Ohrhaut. Eine Hautdickenzunahme um 3 mm oder eine ödematöse Schwellung wurden als positive Reaktion bewertet. Eine eindeutige Diagnose war den Autoren zufolge erst nach 48 h möglich. Mit dieser Methode untersuchten auch THOEN und KARLSON (1986) Schweine, um Reaktionen mit beiden Tuberkulinen erkennen zu können. Sie legten als Kriterien für eine Tuberkulinreaktion Rötung, Schwellung und Nekrose fest.

JØRGENSEN et al. (1972b) und GÜNTHER (1987) hingegen lasen die Hautdicke schon nach 24 h ab.

PLONAIT und BICKHARDT (1988) empfahlen eine Messung nach 24 bis 48 h, wobei sie vorher und nachher die Hautdicke mit einem Kutimeter ermittelten. Eine Tuberkulinreaktion lag vor, wenn die Hautdicke um mehr als 2 mm zugenommen hatte und die Injektionsstelle schmerzhaft war.

2.1.6 Fleischhygienerechtliche Bestimmungen

2.1.6.1 Rechtsgrundlage

Die fleischhygienische Bedeutung, die der Tuberkulose bzw. Mykobakteriose der Schlacht-tiere zugemessen wurde, hat im Laufe der Zeit und im Wandel der wissenschaftlichen An-schauungen manchen Wechsel erfahren. Ein zeitlich geordneter Rückblick ist in Tabelle 2.9 dargestellt.

Die seit 1. Januar 2006 gültige Verordnung (EG) Nr. 854/2004 sieht in Kap. IX, Nr. E, Pkt. 1 vor, dass Tiere, die positiv oder nicht eindeutig auf Tuberkulin reagieren oder andere Gründe für einen Tuberkuloseverdacht aufweisen, getrennt von anderen Tieren zu schlachten sind, wobei Vorkehrungen zu treffen sind, um das Risiko der Kontaminierung anderer Schlacht-körper, der Schlachtlinie und des Schlachthofpersonals auszuschließen.

Bei Vorliegen von Tuberkuloseläsionen in der post-mortem-Untersuchung sind je nach Aus-breitungsgrad der Veränderungen zwei Beurteilungsmöglichkeiten vorgesehen (EU-Verordnung 854/2004, Kap. IX, Nr. E, Pkt. 2):

- Werden bei der Fleischuntersuchung an mehreren Organen oder mehreren Körper-teilen lokalisierte Tuberkuloseläsionen festgestellt, so ist sämtliches Fleisch der be-troffenen Tiere genussuntauglich zu erklären.
- Wird in den Lymphknoten nur eines Organs oder Körperteils eine Tuberkuloseläsion festgestellt, müssen nur das befallene Organ oder der befallene Körperteil und die zugehörigen Lymphknoten für genussuntauglich erklärt werden.

SCHLIESSER (1978) und FISCHER (1999) gaben zu bedenken, dass eine makroskopische Unterscheidung von humanpathogenen und nicht-humanpathogenen Mykobakterien bei der Fleischuntersuchung nicht möglich ist. Deshalb könne rein pathomorphologisch auch keine Differenzierung zwischen Tuberkulose und Mykobakteriose erfolgen. Nach MÜLLER und SCHARNER (1998) läge es letztlich in der Entscheidung des Tierarztes vor Ort, welche pathomorphologischen Bilder er der Tuberkulose zuordnet und welche nicht.

Literatur

Tabelle 2.9 Geschichte der fleischhygienischen Beurteilung der Tuberkulose bzw. Mykobakteriose (nach LÜCKER et al. 1997)

Mittelalter	Genuss des Fleisches der sog. „Perlsüchtigen Rinder“ war verboten, Perlsucht wurde als Form der Syphilis bei Tieren angesehen
18. Jahrhdt.	Alle die „Perlsucht“ betreffenden Verbote werden aufgehoben
03.06.1900	Reichsgesetz, betreffend die Schlachtvieh- und Fleischbeschau und Ausführungsbestimmungen des Bundesrates dazu (Konzept i.W. nach VON OSTERTAG) <i>Untauglich</i> bzw. <i>bedingt tauglich</i> das ganze geschlachtete Tier bei: <ul style="list-style-type: none"> - hochgradiger Abmagerung (§ 33 Nr. 8) - Erscheinungen einer frischen Blutinfektion (§ 34 Nr. 1, § 37 Nr. 1b) - Vorhandensein ausgedehnter Erweichungsherde (§ 35 Nr. 4) <i>Untauglich nur die veränderten Fleischteile</i> (§ 35 Nr. 4): <ul style="list-style-type: none"> - Organtuberkulose, auch wenn nur die zugehörigen Lymphknoten verändert sind - „das gleiche gilt von Fleischstücken, sofern sie sich nicht bei genauerer Untersuchung als frei von Tuberkulose erweisen“
29.10.1940 01.11.1940	Fleischbeschaugesetz Ausführungsbestimmungen A (AB. A, Konzept i.W. nach NIEBERLE) Begriffsbestimmungen („örtliche Tuberkulose“ und „Miliartuberkulose“) <i>Untauglich</i> bzw. <i>bedingt tauglich</i> das ganze geschlachtete Tier bei: <ul style="list-style-type: none"> - vollständiger Abmagerung (§ 32 Nr. 17 und § 36 II Nr. 1 AB. A)) - akuter Miliartuberkulose (§ 36 II Nr. 1 AB. A) <i>Untauglich nur die veränderten Fleischteile</i> (§ 34 Nr. 4 AB. A): <ul style="list-style-type: none"> - bei Tuberkulose der Gekröselymphknoten auch zugehöriger Darmabschnitt und Gekrösefett - bei Tuberkulose der Lunge oder eines zugehörigen Lymphknotens auch Luftröhre und Kehlkopf - sind ausschließlich Fleischlymphknoten betroffen, ist der Tierkörper als tauglich zu beurteilen
01.08.1960	Beurteilung der Tuberkulose grundsätzlich <i>bedingt tauglich</i> (§ 36 (1) Nr. 1 AB. A) soweit nicht schon <i>untauglich</i> nach § 32 (1) Nr. 17 oder § 34 Nr. 4 AB. A
1961, 1965	Merkblätter der Bundesministerien zur Differenzierung zwischen „echter“ Tuberkulose von den sog. tuberkuloseähnlichen Formen
18.12.1973	Der Tierkörper von Schweinen ist als <i>tauglich</i> zu beurteilen bei vereinzelt Veränderungen in einem Kehlgangs- oder Gekröselymphknoten, die durch Mykobakterien verursacht sein können (§ 34 (1) Nr. 20 AB. A)
09.12.1977	Der Begriff „Generalisierte“ Tuberkulose wird eingeführt (§ 32 Nr. 27 AB. A)
13.04.1986 30.06.1986	Fleischhygienegesetz (FIHG) Fleischhygiene-Verordnung (FIHV) <ul style="list-style-type: none"> - bei Knochentuberkulose ist das ganze geschlachtete Tier als <i>untauglich</i> zu beurteilen (FIHV Anl. 1 Kap. IV Nr. 7.1) - als <i>untauglich</i> zu beurteilen sind bei herdförmigen Veränderungen, die bei Rindern oder Schweinen durch Mykobakterien verursacht sein können, in Kehlgangslmyphknoten: Kehlkopf, Luftröhre, Lunge sowie in Gekröselymphknoten: der gesamte Darm einschließlich des Gekrösefettes (FIHV Anl. 1 Kap. IV Nr. 10.2)
01.01.1996	Beurteilung „ <i>bedingt tauglich</i> “ entfällt (FIHG) Bisherige Beurteilung „ <i>bedingt tauglich</i> “ nun „ <i>untauglich</i> “ (FIHV Anl. 1 Kap. IV Nr. 7.1); Beurteilung nach FIHV Anl. 1 Kap. IV Nr. 10.2 bleibt unberührt
01.01.2006	Verordnung (EG) Nr. 854/2004 Begriff „Tuberkuloseläsionen“ eingeführt, Beurteilung nach Kap. IX, Nr. E, Pkt. 2: <ul style="list-style-type: none"> - sind mehrere Organe oder Körperteile betroffen, so ist sämtliches Fleisch <i>untauglich</i> - ist ein Organ oder Körperteil betroffen, dann ist nur das befallene Organ oder Körperteil einschließlich Lymphknoten <i>untauglich</i>

2.1.6.2 Fleischuntersuchungsstatistik

Nach SEEGER und SCHACK-STEFFENHAGEN (1967) waren 1965 0,3 % der Schweine am Schlachtbetrieb wegen „Tuberkulose“ beanstandet worden. Nach einer Untersuchung von SCHLIESSER (1976 und 1978) ist der Prozentsatz wegen „Tuberkulose“ beanstandeter Schweine von 0,35 % im Jahre 1962 auf 0,059 % im Jahre 1975 gesunken.

Die Tabellen 2.10 und 2.11 geben das Auftreten der zwei die Mykobakterien betreffenden Beurteilungsmöglichkeiten (nach Fleischhygiene-Verordnung) von 1999 bis 2006 wieder. Mykobakterien spielten demnach nur bei den Tierarten Schwein, Rind und Schaf eine Rolle. Gut erkennbar ist die besondere Bedeutung beim Schwein. Das lokale Auftreten von Mykobakterien lag mit rund 0,2-0,3 % (entspricht ca. 100.000 bis 126.000 Tiere/ Jahr) beim Schwein höher als bei den beiden anderen Tierarten (hier Werte von 0,001-0,071 %). Ausnahme stellt das Jahr 2002 beim Rind dar, in dem mit 0,27 % ähnlich hohe Werte wie beim Schwein aufgeführt sind.

Auch bei der Beurteilung Tuberkulose wies das Schwein die höchste Prävalenz auf. Es wurden Werte von 0,001-0,002 % aufgeführt (ca. 500-900 Tiere/ Jahr), also zwei Zehnerpotenzen niedriger als bei der (lokalen) Mykobakteriose. Auch beim Rind wurde bei der Fleischuntersuchung in Deutschland noch Tuberkulose diagnostiziert (9-16 Fälle/ Jahr).

Im Jahr 2007 wurde die Fleischhygienestatistik überarbeitet und der Punkt „durch Mykobakterien verursachte herdförmige Veränderungen“ ab 2007 nicht mehr erfasst. Die Diagnose „Tuberkulose“ ist in der Kategorie „Krankheiten OIE-Liste“ weiterhin vorhanden.

Abweichend von dieser offiziellen Untersuchungsstatistik stellte FISCHER (1999) bei 1,3 Mio. untersuchten Schlachtschweinen im Jahr 1996 eine Mykobakteriose-Prävalenz von 1,85 % fest, ein 8,4-fach höherer Wert als in der Fleischuntersuchungsstatistik des betreffenden Jahres. LÜCKER et al. (1997) fanden Mykobakterien in 0,58 % der untersuchten Schlachtschweine. Als Gründe für die Diskrepanz zwischen der Fleischuntersuchungsstatistik und eigener Untersuchung nennt FISCHER (1999) u.a. Personalmangel, hohe Bandgeschwindigkeit sowie ungenügende Ausbildung der Fleischkontrolleure.

WEBER und SCHLIESSER (1974) konnten Erreger des MAIC in Lymphknoten von Schlachtschweinen nachweisen, die in der Fleischschau keine tuberkulösen Veränderungen aufgewiesen haben. Auch SIRIMALAISUWAN (2004) gelang der Nachweis von Mykobakterien aus makroskopisch unveränderten Lymphknoten.

Literatur

Tabelle 2.10 Beurteilung „durch Mykobakterien verursachte herdförmige Veränderungen“
(FIHV, Anl. 1, Kap. IV, Pkt. 10.2; STATISTISCHES BUNDESAMT 2000-2007)

Tierart	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Schwein ~ 42 Mio.*	101.949 0,241 %	104.598 0,250 %	96.171 0,229 %	126.135 0,295 %	103.642 0,240 %	121.322 0,279 %	119.643 0,266 %	101.682 0,218 %
Rind ~ 4 Mio.*	634 0,016 %	577 0,015 %	2.043 0,051 %	10.696 0,273 %	2.570 0,071 %	2.084 0,056 %	1.729 0,051 %	87 0,003 %
Schaf ~ 1 Mio.*	151 0,016 %	48 0,005 %	39 0,004 %	11 0,001 %	279 0,029 %	1.608 0,161 %	44 0,004 %	44 0,004 %

* geschlachtete Tiere pro Jahr

Tabelle 2.11 Beurteilung „Tuberkulose“
(FIHV, Anl. 1, Kap. IV, Pkt. 7.1; STATISTISCHES BUNDESAMT 2000-2007)

Tierart	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Schwein ~ 42 Mio.*	886 0,0021 %	623 0,0015 %	594 0,0014 %	478 0,0011 %	618 0,0014 %	560 0,0013 %	284 0,0006 %	226 0,0005 %
Rind ~ 4 Mio.*	10 0,0003 %	16 0,0004 %	9 0,0002 %	11 0,0003 %	44 0,0012 %	15 0,0004 %	7 0,0002 %	13 0,0004 %
Schaf ~ 1 Mio.*	2 0,0002 %	0 -	4 0,0004 %	1 0,0001 %	0 -	0 -	0 -	0 -

* geschlachtete Tiere pro Jahr

2.2 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.1 Grundlagen der PCR

PCR steht für „Polymerase Chain Reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion). Sie ist eine molekularbiologische Methode zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäuren definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen (SAIKI 1989).

Das Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion, das 1985 erstmals beschrieben wurde, beruht auf drei aufeinander folgenden Teilschritten.

- Der ursprüngliche DNA-Doppelstrang (das „template“) wird durch Hitze in zwei Einzelstränge getrennt (Denaturierung).
- Bei geringerer Temperatur hybridisieren spezifische Oligonukleotide (Primer, d.h. kurze DNA-Fragmente) an die DNA-Einzelstränge (Annealing).
- Beginnend an den Primern, wird mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase durch den Einbau von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) ein neuer, zum Ursprungsstrang komplementärer Strang gebildet (Extension).

Durch zyklische Wiederholung dieses Prozesses folgt eine exponentielle Zunahme von DNA-Fragmenten der durch die zwei Primer festgelegten Länge und Sequenz.

Um die PCR auch für RNA nutzen zu können, muss die RNA mittels Reverser Transkriptase in DNA überführt werden (WRBA et al. 2007).

Aufgrund ihrer Hitzestabilität hat sich die DNA-Polymerase des in heißen Quellen (z.B. im Yellowstone-Nationalpark) vorkommenden Bakteriums *Thermus aquaticus* (*Taq*-DNA-Polymerase) als Amplifikationsenzym besonders bewährt. Dieses Enzym arbeitet in einem Temperaturbereich mit einem Optimum bei 72°C. Da die Polymerase-Kettenreaktion nicht innerhalb der Zelle (in vivo), sondern in einem Reaktionsgefäß (in vitro) abläuft, wird diese Art der Nukleinsäurevermehrung auch als In-vitro-DNA-Amplifikation bezeichnet.

Bei der Auswahl des Probenmaterials spielt es eine untergeordnete Rolle, ob die Zielsequenz in einer vitalen oder inaktivierten Zelle oder in ein Zellgenom integriert ist. Die spezifische Vermehrung von Nukleinsäurefragmenten kann unmittelbar nach DNA-Isolierung z.B. aus frischen, lysierten Zellen, Serum, Plasma, Liquor, Hautgeweben oder in manchen Fällen auch direkt aus klinischem Probenmaterial ohne weitere Vorbehandlung erfolgen.

Theoretisch erreicht man nach 30 Zyklen einen Amplifikationsfaktor von etwa 10^9 ; in der Praxis werden jedoch aufgrund des Aktivitätsverlustes der *Taq*-Polymerase, des Verbrauches von Primern und Nukleotiden und aufgrund des sog. Plateau-Effektes (Hemmung der DNA-Polymerase durch die steigende Konzentration der DNA-Amplifikationsprodukte im Reakti-

onsansatz) Werte um 10^6 erzielt. Aufgrund ihrer extrem hohen Sensitivität und universellen Einsetzbarkeit hat sich die PCR in kurzer Zeit in vielen Bereichen der Labordiagnostik etabliert (MAYER et al. 1994).

2.2.2 Nachweis des amplifizierten Produktes

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches und Anfärbung mit Hilfe spezieller Färbemittel (z.B. Ethidiumbromid) sind die amplifizierten DNA-Fragmente als Banden im Gegensatz zu nicht amplifizierten DNA-Bereiche bzw. überschüssigen dNTPs zu erkennen. Neben ihrer spezifischen Größe können die Amplifikationsprodukte nach der Polymerase-Kettenreaktion durch Hybridisierung mit internen Sonden (Southern-Blot), durch Spaltung mit spezifischen Restriktionsenzymen oder durch Sequenzierung (Bestimmung der Nukleotidsequenz) genau charakterisiert werden. Über eine erneute Amplifikation der PCR-Produkte erreicht man noch höhere Vermehrungsraten der eingesetzten „template“-Nukleinsäure und damit eine zusätzliche Steigerung der Sensitivität. Nach der 10^4 -fachen Verdünnung des ursprünglichen Amplifikationsansatzes und einer erneuten Zugabe von *Taq*-Polymerase sowie entsprechenden Oligonukleotid-Primern können erneut 25 bis 30 PCR-Zyklen durchgeführt werden. In der Regel wird im Rahmen solcher Re-Amplifikationen ein Primerpaar verwendet, das innerhalb der Sequenz der ursprünglichen Amplifikationsprodukte hybridisiert („nested“-PCR) (MAYER et al. 1994).

2.2.3 Faktoren, die die PCR beeinflussen

2.2.3.1 Temperatur und Zeit

Die ersten Schritte bei der PCR bestehen aus Denaturierung des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge und Anhybridisierung der Primer (Annealing). Wichtig sind hierbei die Denaturierungs- und Annealingtemperatur. Die Annealingtemperatur bestimmt die Spezifität der Anhybridisierung der Primer. Eine zu niedrige Annealingtemperatur führt zu einer Anhybridisierung der Primer an einer falschen Stelle des DNA-Einzelstranges (Mispriming), welches unspezifische Amplifikationen zur Folge hat (BEJ et al. 1991). Temperaturunterschiede innerhalb des Wärmeblocks des verwendeten Thermocyclers wurden ebenfalls als Ursache für eine geringere Ausbeute beschrieben, weil sie zu Schmelzfehlern der DNA führen und somit keine Amplifikation abläuft (COMEY et al. 1991; TYLER et al. 1997). Dies kann jedoch durch den Zusatz von Formamid (reduziert den Schmelzpunkt der DNA) beho-

ben werden (COMEY et al. 1991), obwohl angenommen wird, dass dieser Zusatz ebenfalls negative Auswirkungen auf die Spezifität der Reaktion hat (WILSON 1997).

Weiterhin spielt die gewählte Zeitdauer der einzelnen Reaktionsschritte eine wichtige Rolle. Nach dem letzten Zyklus, üblich sind je nach Zielstellung 20-50 Zyklen, erfolgt die vollständige Renaturierung der DNA bei 72°C für 3-7 min. Danach wird die Probe bis zur Auswertung auf 4-8°C abgekühlt. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten größer als 1 kb kann der Primerextensionsschritt 1-7 min., abhängig von der Länge der Ziel-DNA, betragen (JEFFREYS et al. 1988).

2.2.3.2 Reaktionskomponenten

Zusätzlich zur Ziel-DNA, den Primern und der *Taq*-DNA-Polymerase (1-2,5 Einheiten) enthält ein Reaktionsansatz einen Standard- Reaktionspuffer, bestehend aus 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,4) und 1,5 mM MgCl₂.

Die optimale Magnesium-Konzentration in der Reaktionslösung muss durch Versuche festgestellt werden (1-10 mM), da es bei zu wenig freiem Magnesium in der PCR zu keiner Amplifikation kommt und andererseits bei zu viel freiem Magnesium unerwünschte Amplifikationen auftreten (WILLIAMS 1989). Die Konzentration der Desoxynucleotidtriphosphate (dNTP), bestehend aus gleichen Teilen von dATP, dTTP, dGTP und dCTP, beträgt 200 µM. Konzentrationen größer als 50 mM dNTP in der Reaktion hemmen die *Taq*-DNA-Polymerase (INNIS et al. 1988). Um die Verdunstung insbesondere während der Denaturierungsphasen zu minimieren und eine konstante Salzkonzentration zu gewährleisten, wird der Reaktionsansatz üblicherweise mit 50-60 µl Mineralöl (Paraffin) überschichtet.

Wird als Template in der PCR DNA mit einem hohen Guanin-Thymin-Gehalt verwendet, kann dies zu einer unzureichenden Denaturierung und in Folge hiervon zu einem Mispriming führen. Daher werden als Zusatzstoffe DNA-denaturierende Substanzen wie Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 1-10 % (WINSHIP 1989; BOOKSTEIN et al. 1990) oder 1,25-5 % Formamid (SARKAR u. SOMMER 1990) eingesetzt. Dies führt zu einer wesentlichen Verbesserung der Spezifität. HUNG et al. (1990) verwendeten zur Steigerung der Spezifität der PCR Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) in einer Konzentration von 1×10^{-4} – 1×10^{-5} M. Durch den Einsatz von 5-20 % Glycerol in der Reaktionslösung steigerten SMITH et al. (1990) die Ausbeute an PCR-Amplifikat. Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Amplifikationsrate in der PCR ist die Verwendung von T4 gene 32 protein, welches der Stabilisierung von Einzelstrang-DNA dient und dadurch ein verbessertes Primer-Annealing ermöglicht (PANACCIO u. LEW 1991; WIDJOJOATMODJO et al. 1992; TEBBE u.

VAHJEN 1993). PONCE und MICOL (1992) verbesserten die Amplifikation von langen DNA-Fragmenten (3 kb) durch Einsatz eines Tricine-Puffers, pH 8,4 ohne KCl.

2.2.3.3 Primer

Primer sind synthetisierte einzelsträngige Oligonukleotide, die normalerweise 15-30 Basen lang und komplementär zu den 3'-Enden der Ziel-DNA sind. Wichtig ist, dass die Primer keine komplementären Strukturen zueinander aufweisen, die speziell an ihren 3'-Enden länger als 2 Basen sind. In diesem Falle könnte in der PCR ein künstliches Produkt entstehen, wenn die 3'-Enden der beiden Primer miteinander hybridisieren und so einen Komplex (primed template) bilden. Während der Primer-Extension bildet sich dann ein kurzes, doppelsträngiges Produkt (Primer-Dimer).

Die Primer werden in einer symmetrischen PCR in Konzentrationen von 0,1-1 µM eingesetzt. Der Guanin-Cytosin-Gehalt der verwendeten Primer sollte 40-60 % betragen. Außerdem sollten die Primer keine langen Mononukleotidabschnitte aus Polypurinen oder Polypyrimidinen aufweisen, so dass beide Primer die gleiche Schmelztemperatur besitzen. Auffällige primerinterne Sekundärstrukturen, wie Stem- und Loop- Strukturen, sollten ebenfalls vermieden werden.

Die Annealingtemperatur (T_a) kann durch folgende Gleichung, ausgehend von der Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Primer, kalkuliert werden (SUGGS et al. 1981):

$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C} = 2^\circ\text{C} (A+T) + 4^\circ\text{C} (G+C) - 5^\circ\text{C}$$

2.2.3.4 Target-DNA

Die Menge der Ziel-DNA, die in der Regel in einer diagnostischen PCR eingesetzt wird, beträgt 0,05-1,0 µg. In dieser DNA sollte ein intakter DNA-Strang enthalten sein, um ein Annealing der Primer zu gewährleisten und die PCR zu starten. Die verwendete DNA sollte einen gewissen Reinheitsgrad besitzen, aber bei vielen Anwendungen ist eine exzessive Reinigung der DNA nicht notwendig (SAIKI 1989). Bei Anwendung der PCR zur Detektion von Mikroorganismen aus Umweltproben sind jedoch oft Substanzen vorhanden, die an die Ziel-DNA während der DNA-Gewinnung binden und in Folge die *Taq*-DNA-Polymerase hemmen. Dies führt zu einer erheblichen Verminderung der Sensitivität der PCR.

2.2.3.5 Kontaminationen

Paradoxerweise stellt die enorm hohe Leistungsfähigkeit auch einen wesentlichen Nachteil der Polymerase-Kettenreaktion dar, da selbst die geringste Kontamination unweigerlich zu falsch-positiven Ergebnissen führt. Die Aufarbeitung des Probenmaterials muss unter höchsten Reinheitsbedingungen und mit speziell konstruierten Pipetten („positive displacement“) oder mit Watte gestopften Pipettenspitzen erfolgen, da die Gefahr einer Verschleppung amplifizierten Materials („carry-over“, z.B. über Aerosolbildung) und der damit verbundenen falsch-positiven Ergebnissen bereits bei einer Kontamination mit wenigen Molekülen gegeben ist. Dies bedingt eine Reihe zusätzlicher Kontrollansätze innerhalb jeder Versuchsreihe. Zur Verminderung der Kontaminationsgefahr werden verschiedene Maßnahmen wie z.B. räumliche Trennung der Arbeitsplätze zur Probenaufarbeitung, Amplifikation und Analyse der PCR-Produkte oder Bestrahlung mit hartem UV-Licht empfohlen, um innerhalb des diagnostischen Labors die Kontamination von neuem Probenmaterial mit bereits vorher amplifiziertem Material zu vermeiden (MAYER et al. 1994).

Strategien zur Vermeidung von Kontaminationen sind bei KWOK und HIGUCHI (1989) sowie bei HEINRICH (1991) ausführlich dargestellt. Wichtig ist, dass ausreichend Negativkontrollen mitgeführt werden, die keine DNA enthalten. An diesen Proben wird das Auftreten einer Kontamination erkannt. Ein Weg zur Vermeidung von Kontaminationen ist die Bestrahlung der Reaktionsgefäße mit UV-Licht bei 254-300 nm für 5-20 min., die schon den gesamten Reaktionsansatz (Prämix) außer der Template-DNA enthalten. Eventuell vorhandene DNA-Moleküle werden hierbei zerstört (SARKAR u. SOMMER 1990; CIMINO et al. 1990). Eine weitere Möglichkeit, Kontaminationen zu vermeiden, wird durch die Anwendung der so genannten „Hot Start“ PCR erreicht (BASSAM u. CAETANO-ANOLLES 1993). Da die *Taq*-Polymerase auch bei niedrigen Temperaturen aktiv ist und dann nur geringe Spezifität besitzt, kann es zu Beginn der PCR zur Synthese unerwünschter Produkte kommen, die anschließend exponentiell vermehrt werden. Beim „Hot Start“ wird die Polymerase erst nach dem initialen Denaturierungsschritt zugefügt oder aktiviert. Die Inaktivierung der Polymerase kann entweder durch eine Einbettung in Wachskügelchen erreicht werden, die während der Denaturierung schmelzen und das aktive Enzym freisetzen, oder durch neutralisierende monoklonale Antikörper, die spezifisch an die Polymerase binden und beim ersten Aufheizen denaturiert werden.

2.2.3.6 Inhibitoren

Der Hintergrund-DNA werden sowohl PCR-hemmende (LIENERT u. FOWLER 1992; TEBBE u. VAHJEN 1993; WILSON et al. 1994; ALVAREZ et al. 1995) als auch fördernde Eigenschaften durch eine mögliche Trägerfunktion für die Ziel-DNA bei der Präzipitation (STEFFAN u. ATLAS 1988; DICKINSON et al. 1995) zugeschrieben.

Weitere, die PCR störende Substanzen können mit der DNA-Extraktion in die PCR-Kaskaden hineingeschleppt werden. Beispiele für derartige Inhibitoren sind in Tabelle 2.12 aufgeführt.

Tabelle 2.12 In der Literatur beschriebene störende Substanzen bei der PCR-Reaktion

Material	Inhibitor	Literaturquelle
Klinisches Material	Blut, Nasenschleim, Urin, Sperma, Kot	PANACCIO u. LEW (1991)
Blut	Häm IgG EDTA Heparin Hohe Konzentration leukotriener DNA	AKANE et al. (1994) AL-SOUD et al. (2000) ROSSEN et al. (1992) IZRAELI et al. (1991) DE FRANCHIS et al. (1988)
Kot	Gallensalze und komplexe Polysaccharide Bilirubin, Gallensalze	LANTZ et al. (1997); MONTEIRO et al. (1997) WIDJOJOATMODJO et al. (1991)
Urin	Harnsäure	KHAN et al. (1991)
Milch	Proteinasen	POWELL et al. (1994)
Lebensmittel	Organische und phenolische Bestandteile, Glycogen, Fette, Ca ²⁺ Öl, Salz, Kohlenhydrate, Aminosäuren	WILSON (1997) ROSSEN et al. (1992)
Boden	Phenole, Huminsäuren	TSAI u. OLSON (1992)

Die auftretenden Mechanismen hierbei sind weitgehend ungeklärt (WILSON 1997), jedoch sind Möglichkeiten beschrieben, wie die Inhibitoren in die PCR-Reaktion eingreifen können. Dies kann auf der Ebene der Zelle, der Nukleinsäuren oder der Polymerase geschehen (ROSSEN et al. 1992; AKANE et al. 1994; KATCHER u. SCHWARTZ 1994; POWELL et al. 1994; WILSON 1997; AL-SOUD et al. 2000):

- Die Störung auf Ebene der Zelle verhindert die Zelllyse bei der DNA-Aufarbeitung und somit die Freisetzung der DNA
- Die Störung auf Ebene der Nukleinsäuren kann entweder durch deren Abbau oder Bindung erfolgen, wodurch diese der PCR-Reaktion nicht mehr zur Verfügung stehen
- Die Störung der Polymerase erfolgt durch Hemmung der Polymerase-Aktivität

Es konnte gezeigt werden, dass für die *Taq*-Polymerase bereits 0,0004 % Blut, 0,2 % Fleisch, 1.0 mM CaCl₂-Ionen im Amplifikationsansatz die Reaktion vollständig verhindern (AL-SOUD u. RÅDSTRÖM 1998).

Als weitere Störfaktoren werden auch Bestandteile der Zellwand von Bakterien, Fremd-DNA und auch Labormaterial wie Handschuhpuder (DE LOMAS et al. 1992), Plastik und Zellulose genannt (WILSON 1997).

Bei der Gewinnung von DNA aus Böden werden Phenole und Huminsäuren als Hemmstoffe genannt (TSAI u. OLSON 1992), wobei phenolische Gruppen N-substituierte Amide oder Quinone ausbilden, die sich kovalent an DNA binden. Bei Proben aus klinischem Material werden als Hemmstoffe für die *Taq*-DNA-Polymerase Blut, Nasenschleim, Urin, Sperma und Kotbestandteile genannt (PANACCIO u. LEW 1991). WIDJOJOATMODJO et al. (1991) nennen Bilirubin und Gallensalze als Bestandteile von Fäzes. Weniger als 50 µg/ml der Gallensalze Natriumglycocholat und Natriumtaurocholat hemmen bereits die PCR. ROSSEN et al. (1992) untersuchten verschiedene Lebensmittel auf ihre Hemmwirkung gegenüber der *Taq*-DNA-Polymerase. Hierbei wurde festgestellt, dass die Aktivität der Polymerase durch relativ hohe Gehalte an Öl, Salz, Kohlenhydraten und Aminosäuren in der Reaktionslösung nicht wesentlich eingeschränkt wird. Konzentrierte Anteile von Proteinen (auch hydrolysierte Proteine) und stark fetthaltige Produkte (Streichkäse) besitzen jedoch große Hemmwirkung. Die Mechanismen der Hemmung sind ungeklärt.

WEYANT et al. (1990) untersuchten die Wirkung ionischer und nicht ionischer Detergentien auf die *Taq*-Polymerase. Dabei stellen sie fest, dass unter anderem 0,1 % SDS in der PCR ausreicht, um das Enzym vollständig zu hemmen. ROSSEN et al. (1992) stellten eine Hemmwirkung schon bei 0,01 % SDS fest, die typische Konzentration in der DNA-Extraktionslösung wird mit 0,1-0,2 % angegeben. Weiterhin kann auch ein zu hoher RNA-Gehalt in der DNA-Präparation hemmend auf die PCR wirken (PIKAART u. VILLEPONTEAU 1993).

Mehrere Methoden wurden beschrieben, um irritierende Stoffe von der Template-DNA zu trennen. Diese umfassen entweder das Anreicherungsverfahren, die DNA-Extraktion oder die verwendete Polymerase.

Ein Vergleich kommerzieller und nicht-kommerzieller DNA-Extraktionsverfahren zum Nachweis von Hepatitis B-Viren aus Serum zeigte gute Nachweisraten mit dem QIAamp HCV Kit (Fa. Qiagen, Chatsworth, USA) und der Dialyse mit Millipore Filtern (KLEIN et al. 1997). Ebenfalls ist das Kochen von DNA zum Nachweis von *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* und *L. monocytogenes* in cerebrospinaler Flüssigkeit (OLCEN et al. 1995) sowie von Mykobakterien-DNA in Blutproben beschrieben (KULSKI u. PRYCE 1996).

Eine einfache Möglichkeit, Inhibitoren zu eliminieren, ist weiterhin die Verdünnung der Probe. Beim Nachweis von *Chlamydia trachomatis* in Urin führte dies zur Eliminierung der vorhandenen Inhibitoren (CHERNESKY et al. 1997). Eine Verminderung der Hemmstoffe kann durch Verdünnung der Probe oder durch eine aufwendige Reinigung der DNA erreicht werden. Sind die Hemmstoffe jedoch an die DNA gebunden, werden sie mitgereinigt und nicht entfernt.

Um Inhibitoren von der Ziel-DNA zu trennen, wurden die Gradientendichtezentrifugation, ein Zweiphasen-System und immunologische Techniken eingesetzt. Die Gradientendichtezentrifugation (LINDQVIST et al. 1997) trennt die vorhandenen Bakterien (*Shigella flexneri* bei Käse und Milch) vom Homogenat und den Inhibitoren. Das Zweiphasen-System besteht in der oberen Phase aus Polyethylenglycol und der unteren Phase aus Dextran. Hierbei konnten in Käse höhere Nachweisraten für *L. monocytogenes* in der Dextran-Phase nachgewiesen werden (LANTZ et al. 1994). Auch durch die magnetische Markierung von *L. monocytogenes* mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (magnetic immunopolymerase chain reaction) konnten die zu untersuchenden Bakterien von PCR-Inhibitoren getrennt werden (FLUIT et al. 1993).

Um die PCR-Reaktion durch Zugabe von reaktionsfördernden Substanzen zu unterstützen, können der Reaktion unter anderem Rinder Serum Albumin (BSA), Einzelstrang-DNA bindendes T4 Gen 32 Protein (gp32), organische Lösungsmittel, Proteinase Inhibitoren oder Betain (AL-SOUD u. RÅDSTRÖM 2000) zugesetzt werden.

Auch die Polymerase ist ein wichtiger Ansatzpunkt für Inhibitoren. Es konnten deutliche Unterschiede der Sensitivität zwischen unterschiedlichen Polymerasen in Gegenwart von Inhibitoren gezeigt werden. AL-SOUD und RÅDSTRÖM (1998) untersuchten neun thermostabile Polymerasen für den Nachweis von *L. monocytogenes* in Anwesenheit von 20 % Blut, 20 % Käse, 0,4 % Kot oder 0,2 % Fleisch. Die Ergebnisse zeigten, dass bei Anwesenheit von 20 % Blut keine Amplifikation mit der *Taq*- und *AmpliTaqGold*-Polymerase möglich war. Die Beimengung von Käse, Kot oder Fleisch wirkte sich dagegen unterschiedlich aus.

2.3 Diagnostik von Mykobakterien

Bei der Diagnostik von Mykobakterien (Nachweis- und Differenzierungstechniken) kommen gegenwärtig sowohl konventionelle als auch neuere, molekularbiologische Methoden zum Einsatz. Eine Übersicht zeigt Tabelle 2.13.

Tabelle 2.13 Übersicht gegenwärtig eingesetzter Nachweis- und Differenzierungstechniken von Mykobakterien (nach REISCHL u. NAUMANN 1996)

Methode	Prinzip	Dauer	Vorteile	Nachteile
Mikroskopie	Direktnachweis säurefester Stäbchen im Probenmaterial (Ziehl-Neelsen-Färbung)	ca. 3 h	schnell	keine Differenzierung und keine Aussage über Lebensfähigkeit möglich, geringe Sensitivität
Kultur	Anzucht auf Fest- und Flüssignährböden, Beurteilung von Koloniemorphologie und Pigmentbildung	positive Kultur meist nach 3-4 Wochen, sonst Bebrütung bis zu 8 Wochen	kostengünstig	langwierig
BACTEC®-Kulturverfahren	Anzucht und Messung der Freisetzung von radioaktivem ¹⁴ CO ₂	positive Kultur meist nach 10-12 Tagen, sonst Bebrütung bis zu 6 Wochen	schneller als konventionelle Kulturverfahren	kostenintensiver als konventionelle Kulturverfahren
MGIT®- Kulturverfahren	Anzucht und Fluoreszenzmessung von freigesetztem O ₂	positive Kultur meist nach 10-12 Tagen, sonst Bebrütung bis zu 6 Wochen	identisch dem BACTEC®- System, keine radioaktiven Substanzen	identisch dem BACTEC®- System, kontaminationsanfälliger
Biochemische Differenzierungsverfahren	Durchführung von mehreren biochemischen Tests	z.T. mehrere Wochen	kostengünstig	sehr arbeitsintensiv, nur aus Kultur möglich
HPLC-Analyse (Hochflüssigkeitschromatographie)	physikalisch- chemische Analyse von speziesspezifischen Mykolsäuren	1 Tag	schnell, kostengünstig und meist eindeutige Differenzierung	vorhergehende Kultivierung erforderlich; Interpretation der Analysedaten setzt hohe Erfahrung voraus
In vitro- Nukleinsäure- Amplifikation (PCR)	Direktnachweis durch Vermehrung der Erregernukleinsäure auf ein nachweisbares Niveau	3-5 h	schnell und einfach durchzuführen, hohe Sensitivität und Spezifität	kostenintensiv
DNA-Sequenzierung	Exakte Differenzierung über Bestimmung charakteristischer Nukleinsäuresequenzen	1 Tag	schnell und automatisierbar, sehr hohes diskriminatorisches Potential	kostenintensiv
Restriktions-Fragment Längen- Polymorphismus (RFLP)	Erstellung eines „genetischen Fingerabdrucks“ des Erregers	2 Tage	Abklärung epidemiologischer Fragestellungen, schnelle Identifizierung von wieder auftretenden (z.B. multiresistenten) Erregern	arbeits- und kostenintensiv

2.3.1 Konventionelle Diagnostik von Mykobakterien

2.3.1.1 Probenentnahme

Die Auswahl der Proben richtet sich nach der Organmanifestation. Zur Untersuchung sollte nur frisch entnommenes Material (Organproben, Lymphknoten, Sputum, Eutersekret, Kotproben, Einstreuproben) verwendet werden. Die ersten Proben sollten nach Möglichkeit vor Einleitung einer Chemotherapie gewonnen werden. Um das Überwachsen von anderen Bakterien in der Probe zu verhindern, muss die Probe so steril wie möglich entnommen werden, um Kontaminationen mit anderen Erregern oder Mykobakterien aus der Umwelt zu vermeiden (METCHOCK et al. 1999). Das Untersuchungsgut soll in einem sterilen und verschlossenen Versandbehälter zum Labor transportiert werden, ein schriftlicher Untersuchungsauftrag sowie Vorbericht sind beizufügen (AVID IX 1997).

2.3.1.2 Mikroskopie

Für die Diagnose von Mykobakterien mittels Mikroskopie wird die Eigenschaft der Säurefestigkeit ausgenutzt. Dieses Screening ist eine sehr schnelle und einfache Möglichkeit, säurefeste Bakterien in der Probe nachzuweisen (SALFINGER u. KAFADER 1992). Allerdings gibt es auch noch andere Erreger, die in der Färbung säurefest erscheinen (Rhodokokken, Nocardien, Corynebakterien, Cryptosporidien) und so nicht von Mykobakterien unterschieden werden können. Ferner kann man nicht zwischen Erregern des MTC und atypischen Mykobakterien unterscheiden. Darüber hinaus ist die Sensitivität von 40 % im Vergleich zur Kultur niedrig. Als Minimum müssen 5×10^3 bis 10^4 säurefeste Stäbchen pro ml in der Probe vorhanden sein, um ein positives Ergebnis in der Färbung zu erreichen, wohingegen die Mengen für einen Nachweis in der Kultur bei 10^1 bis 10^2 Erregern liegen (METCHOCK et al. 1999).

Die gebräuchlichste und spezifischste Methode der Färbung ist die Färbung nach ZIEHL-NEELSEN (ZN, Durchführung s. Anhang). Säurefeste Bakterien erscheinen dabei als rot gefärbte Stäbchen auf blauem Hintergrund. Neben der Färbung kann ein geübter Untersucher auch anhand der Anordnung oder dem Aussehen der säurefesten Stäbchen zwischen einzelnen Mykobakterien-Stäbchen unterscheiden bzw. einen Verdacht äußern. So bestimmt der Cordfaktor (Anwesenheit von Trehalose-6,6'-Dimycolat in der Bakterienzellwand) von *M. tuberculosis* eine bestimmte Anordnung der Stäbchen, die V-förmig oder palisadenartig sein kann und auch als zopfförmig bezeichnet wird. *M. kansasii* erscheint meistens ge-

bändert und die Stäbchen sind länger als die von *M. tuberculosis*. *M. xenopi* zeigt lange schlanke Stäbchen mit unregelmäßiger Lagerung, die an Vogelnester erinnern (SALFINGER u. KAFADER 1992).

Als Übersichtsfärbung hat sich die Fluoreszenzmikroskopie mittels Auramin gefärbter Präparate bewährt. Auramin ist ein Fluorochrom, das, wenn es an Mykolsäuren bindet, fluoresziert und resistent gegenüber der Entfärbung mit Alkohol ist. Aufgrund der Fluoreszenz kann das Präparat bei gleich bleibender Sensitivität durch eine geringere Anzahl an Gesichtsfeldern als nach der ZN-Färbung beurteilt werden, um die Diagnose „negativ für säurefeste Stäbchen“ zu stellen. Im Gegensatz zur ZN-Färbung ist bei der Auraminfärbung jedoch die Morphologie nicht so gut zu beurteilen, so dass im Zweifelsfall eine nachfolgende Bestätigung mit der ZN-Färbung erforderlich ist (DEDIÉ 1993).

2.3.1.3 Kulturelle Anzuchtung

Die Untersuchung auf Mykobakterien in der Kultur wurde lange Zeit als „Goldstandard“ in der bakteriologischen Diagnostik betrachtet (REISCHL u. NAUMANN 1996; TAYLOR et al. 2001). Aufgrund der Tatsache, dass die kulturelle Anzuchtung sehr zeitaufwändig ist, werden mittlerweile vermehrt molekularbiologische Methoden eingesetzt, die auf der Erkennung von DNA basieren (HOSEK et al. 2006).

2.3.1.3.1 Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials

Aufgrund des langsamen Wachstums ist zur Unterdrückung der Begleitflora eine Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials erforderlich. Die Vorbehandlung bewirkt eine Homogenisierung der Probe (z.B. bei Gewebe), eine Dekontamination der Begleitflora und eine Anreicherung der Mykobakterien durch Zentrifugation. Biopsieproben, Liquor und Blut brauchen nicht dekontaminiert zu werden, da sie primär steril sind.

Nach den Anforderungen des AVID IX (1997) sind zwei Vorbehandlungsmethoden möglich:

- Vorbehandlung mit Schwefelsäure: Für die Vorbehandlung kann Schwefelsäure mit einem Volumenanteil von 6 % verwendet werden. Zu einem Teil der in steriler Natriumchlorid-Lösung suspendierten Probe werden 6 Teile der Schwefelsäure-Lösung zugegeben. Nach einer Einwirkzeit von 10 ± 1 min. wird weitere 10 min. bei mindestens 3.000 U/ min. zentrifugiert. Die Gesamteinwirkung der Schwefelsäure bis zum Verimpfen darf 20 min. nicht überschreiten. Der Überstand wird entfernt, das Sediment nach Neutralisation mit Natronlauge mit Indikator verimpft. Bei Verimpfung mit einer Öse darf die Neutralisation entfallen.

- Vorbehandlung weniger kontaminierter Untersuchungsmaterialien: Weniger kontaminiertes Untersuchungsmaterial kann mit N-Acetyl-L-Cystein nach DIN 58943-3 vorbehandelt werden. Dazu gleiche Volumina Organsuspension oder flüssiges Untersuchungsmaterial (bis zu 100 ml) und Natriumhydroxid-N-Acetyl-L-Cystein-Lösung (NaOH-NALC) in einem Zentrifugenglas mischen und 25 min. unter Schütteln einwirken lassen, 20 ml Phosphatpufferlösung (nach SÖRENSEN 1/15 molar, pH 6,8) zugeben und 20 min. bei 4.000 g zentrifugieren, den Überstand verwerfen und das Sediment in 0,5-1,0 ml steriler Kochsalzlösung aufnehmen und verimpfen.

Nach SCHLIESSER (1985) haben sich neben Schwefelsäure (3-6 %) noch HCl (3 %) oder Papainlösung zur Vorbehandlung bewährt. Auch eine Kurzzeitbehandlung der Proben mit NaOH zur Dekontamination in Kombination mit Natrium-Laurylsulfat (SDS) wird als geeignet beschrieben (SALFINGER u. KAFADER 1992).

Das angereicherte, homogenisierte und bei Bedarf dekontaminierte Material wird auf verschiedene Nährböden überimpft.

2.3.1.3.2 Medien für den Mykobakteriennachweis

Zur Kultivierung von Mykobakterien stehen eine Reihe fester und flüssiger Medien zur Verfügung. Da kein Nährboden 100%-ige Sensitivität gewährleistet und die Ausbeute vom Inokulum abhängt, sollten zwei verschiedene Fest- und ein Flüssigmedium eingesetzt werden (REISCHL u. NAUMANN 1996; DIN-Norm 58943-3). Als sinnvoll bzw. optimal ist die Kombination von einem Medium auf Eibasis, einem Medium auf Agarbasis und einem Selektivmedium (z.B. 7H12-BACTEC®-Medium) zu erachten. Bei Proben von primär sterilen Bereichen wird die Verwendung von 2-3 Flüssigmedien empfohlen.

Feste Medien basieren auf der Grundlage von Ei oder Agar, wobei alle Malachitgrün enthalten, einen das Wachstum der Kontaminationsflora hemmenden Farbstoff (BISPING et al. 1985). Eiernährböden modifiziert nach LÖWENSTEIN-JENSEN, STONEBRINK oder GOTTSACKER besitzen eine gute Pufferkapazität und können toxische Stoffe im Untersuchungsmaterial inaktivieren.

Die Agarnährböden MIDDLEBROOK 7H10 und 7H11 eignen sich gut zur Vereinzelung und Differenzierung von Mykobakterien. Agarnährböden sind fast ohne Pufferwirkung und inaktivieren toxische Stoffe nur wenig. Bei Materialvorbehandlung mit Detergentien sind sie daher nicht geeignet, wohl aber nach NaOH-NALC- oder SDS-Vorbehandlung (SALFINGER u. KAFADER 1992; DEDIÉ 1993).

Die Kulturen werden sechs bis acht Wochen lang bei 37°C bebrütet und wöchentlich abgelesen. Eine erhöhte CO₂-Spannung (5-10 %) ist für das Wachstum förderlich (SCHLIESSER 1985). Bei Hinweisen auf *M. avium* oder *M. marinum* sollten zusätzlich feste Nährmedien bei 45°C bzw. 25°C inkubiert werden (AVID IX 1997). Von bewachsenen Kulturen ist ein Ziehl-Neelsen-Präparat anzufertigen, um zu überprüfen, ob es sich um säurefeste Stäbchen handelt (AVID IX 1997).

Der Vorteil fester Kulturmedien gegenüber der Flüssigkultur liegt darin, dass eine makroskopische Beurteilung der Kolonien möglich ist. Die Selektivität ist bei Festmedien höher und die Kontaminationsrate geringer (BOHRBEN 2003).

Als flüssige Kulturmedien eignen sich u.a. die 7H9-Bouillon nach MIDDLEBROOK, die DUBOS-Bouillon und das Substrat 30 nach KIRCHNER. Die Flüssigkultur besitzt im Gegensatz zu den festen Kulturmedien eine höhere Sensitivität und eine kürzere Wachstumszeit. Als Nachteil sind höhere Kontaminationsraten sowie ein höherer Kostenfaktor zu nennen (SALFINGER u. KAFADER 1992; ACKERMANN 2001).

Auch automatische Kultursysteme der Fa. Becton-Dickinson eignen sich für den Nachweis von Mykobakterien. Das radiometrische BACTEC®- System erlaubt den Nachweis von Mykobakterien in einem sehr frühen Stadium. Die durchschnittliche Detektionszeit wird für nicht-tuberkulöse Mykobakterien mit einer Dauer von sieben Tagen angegeben, für *M. tuberculosis* neun bis vierzehn Tage. Um das Wachstum zu beschleunigen, wird dem BACTEC 12B Medium ein Gemisch aus antimikrobiellen Stoffen (PANTA = Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim, Azlocillin) zugefügt (METCHOCK et al. 1999). Der Zusatz von radioaktiv markierter Palmitinsäure erlaubt die radiometrische Bestimmung des mykobakteriellen Wachstums.

Der Gebrauch dieser automatischen Kultursysteme hat die Nachweisrate und Detektionszeit von Mykobakterien deutlich verbessert (METCHOCK et al. 1999). Vor allem die im Direktausstrich negativen Proben für säurefeste Stäbchen und Proben von bereits behandelten Patienten mit chronischen Erkrankungen können mit diesen Systemen besser erfasst werden. Limitierend ist beim BACTEC®-System der Umstand, dass die Koloniemorphologie nicht beurteilt und Mischinfektionen nicht erkannt werden können, das Überwachsen durch Kontaminanten, hohe Kosten und die Verwendung von radioaktivem Material (BOHRBEN 2003).

Das MGIT®-System (Mycobacterial Growth Indicator Tube) der Fa. Becton-Dickinson ist nicht radiometrisch und eignet sich für alle klinischen Materialien. Eingebettet in Silikon am Boden des Nachweiströhrchens befindet sich eine fluoreszierende Verbindung, die auf das

Vorliegen von gelöstem Sauerstoff in der Bouillon anspricht. Anfänglich ist nur wenig Fluoreszenz nachweisbar, da die große Menge an aufgelöstem Sauerstoff die Emission der fluoreszierenden Verbindung absorbiert. Später nehmen die wachsenden, aktiv aspirierenden Mikroorganismen den Sauerstoff auf und die steigende Fluoreszenz kann vom Gerät gemessen werden. Die in das Gerät eingegebenen Röhren werden fortwährend bei 37°C inkubiert und die Fluoreszenz jede Stunde am Gerät gemessen. Positive Röhren werden vom Gerät angezeigt. Ein positives Röhren enthält etwa 10^5 bis 10^6 KBE pro ml (BECTON DICKINSON 1999). Die Kontaminationsraten sind mit diesem System allerdings deutlich höher als beim BACTEC®- System (METCHOCK et al. 1999).

2.3.1.4 Differenzierung von Mykobakterien

Mykobakterien sollten stets so weit wie möglich differenziert werden (BROSCH et al. 2002), in der veterinärmedizinischen Labordiagnostik geht es in erster Linie um die sichere Identifizierung von *M. bovis*, *M. tuberculosis* und *M. avium*.

Grundkriterien für die Differenzierung sind Wachstumsgeschwindigkeit, Koloniemorphologie und Pigmentbildung, hinzu kommen u.a. Temperaturabhängigkeit und Glycerinbedarf.

In der traditionellen (phänotypischen) Diagnostik erfolgt mit Hilfe von biochemischen Tests eine weitere Differenzierung der Spezies bzw. des Spezies-Komplexes. Hier sind vor allem der Niacin-, Nitratreduktase-, TCH- (Thiophen-2-Carbonsäure-hydrazid-) und Pyrazinamidase-Test zu nennen.

Tierversuche hatten ursprünglich in der Tuberkulosedagnostik einen sehr hohen Stellenwert. Sie können nicht zur Differenzierung der wichtigsten Arten herangezogen werden, aber sie ermöglichen den Nachweis sehr geringer Keimzahlen im Untersuchungsmaterial. Die Beobachtungszeit beträgt 6-8 Wochen (SELBITZ 1992).

Eine Übersicht der wichtigsten Differenzierungskriterien ist in Tabelle 2.14 dargestellt.

Literatur

Tabelle 2.14 Differenzierungskriterien von Vertretern der Gattung Mycobacterium (nach BISPING u. AMTSBERG 1988 und SELBITZ 1992)

	Merkmal	<i>M. bovis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>
Wachstumseigenschaften	Wachstumsintensität ¹⁾	dysgonisch	eugonisch	eugonisch
	Glyzerinbedarf	-	+	+
	Wachstum bei 44-45°C	-	-	+
Morphologie	Kolonieform	klein, rund, feucht	trocken, krümelig	schmierig, goldgelb, kraterförmig
	Verreibbarkeit der Kolonie	leicht	schwer	leicht
Biochemie	Hemmung durch Toluidinblau	+	+	-
	Hemmung durch TCH ²⁾	+	-	-
	Säurebildung aus Glycerin	-	+	-
	Niacin-Test	-	+	-
	Nitratreduktion	-	+	-
	Pyrazinamidase-Test	-	+	+
Tierversuch ³⁾	Meerschwein	++	++	+/-
	Kaninchen	++	+	+
	Huhn	-	-	++

¹⁾ eugonisches Wachstum = schnell, üppig, sichtbare Kolonien nach 2-3 Wochen
dysgonisches Wachstum = langsam, spärlich, sichtbare Kolonien nach 4 Wochen

²⁾ TCH = Thiophen-2-Carbonsäure-hydrazid

³⁾ Pathogenität für Versuchstiere; ++ = generalisierte Infektion, + = lokale Infektion, +/- = unregelmäßige Pathogenität (lokal/ negativ), - = keine Pathogenität

2.3.2 Molekularbiologische Diagnostik von Mykobakterien

Der bereits erwähnte „Goldstandard“ für die Diagnostik von Mykobakterien beruhte bisher auf dem kulturellen Nachweis (REISCHL u. NAUMANN 1996; TAYLOR et al. 2001). Mittlerweile werden aber auch vermehrt molekularbiologische Methoden eingesetzt (HOSEK et al. 2006).

Die Mikroskopie des Direktmaterials dient als „Screening“ und ist sehr einfach und schnell durchzuführen. Allerdings ist diese Methode nicht sehr sensitiv. Notwendig sind mindestens 10^3 - 10^4 Keime pro ml, um ein positives Präparat zu ergeben, und eine Speziesdiagnose ist nicht möglich. Die Kulturverfahren sind hochsensitiv (10^1 - 10^2 lebende Keime pro ml sind ausreichend, um ein positives Ergebnis zu erzielen), aber sie sind sehr langwierig und erfordern mindestens zwei bis acht Wochen bis zur endgültigen Diagnose (METCHOCK et al. 1999).

Ein idealer diagnostischer Test würde Mykobakterien direkt aus Patientenmaterial detektieren und differenzieren, um die lange Zeit bis zur endgültigen Diagnose aus der Kultur zu verkürzen (METCHOCK et al. 1999). Bis heute gibt es keine Methode, die als allgemein anerkannter Standard in der molekularbiologischen Mykobakteriendiagnostik gelten könnte.

2.3.2.1 Genetische Grundlagen des MAIC

Typisch für den MAIC sind Insertionssequenzen (IS), die in mehreren Kopien vorliegen. Sie sind Bestandteile des mykobakteriellen Genoms und ermöglichen durch ihr Vorkommen die Zuordnung zu einzelnen Spezies oder Subspezies (GRANGE 1996).

Eine Insertionssequenz kann nicht den Phänotyp verändern; eine Transposition, die etwa 1×10^5 - 10^7 Zellen pro Generation stattfindet, kann aber sehr wohl dazu führen. Bedingung ist, dass durch die Insertion ein anderes Gen inaktiviert wird (PATE u. OCEPEK. 2003). Die eigentliche Funktion dieser IS liegt bis auf weiteres im Dunkeln, sie werden von manchen Autoren mit pathogenen Eigenschaften einiger Mykobakterien assoziiert (KUNZE et al. 1991).

Plasmide werden oft in der Literatur erwähnt (CRAWFORD et al. 1981b, CRAWFORD u. BATES 1986). Nach MEISSNER und FALKINHAM (1986) enthielten 50 % der klinischen Isolate Plasmide sowie 20 % der aus der Umwelt isolierten Mykobakterien.

Da biochemische Tests wenig Aufschluss über eine genaue Zuordnung einzelner Spezies und Subspezies des MAIC geben, hat sich der molekulargenetische Nachweis mehr und mehr durchgesetzt (MENENDEZ et al. 2001).

2.3.2.2 Molekularbiologisch bedeutsame Zielsequenzen

Einige der folgenden Gensequenzen sind als MAIC-spezifisch anzusehen. Über sie ist eine Differenzierung innerhalb des Komplexes möglich. Komplex-spezifische Gene geben nach MENENDEZ et al. (2001) eine bessere Auskunft über einzelne Isolate als spezies-spezifische Gene wie die 16S rRNA-Gen oder die *hsp65*-Sequenz.

Insertionssequenzen (IS)

Insertionselemente sind ein geeignetes und hilfreiches Werkzeug, um Vertreter des MAIC voneinander zu unterscheiden und zu klassifizieren (COLLINS et al. 1997; ELLINGSON et al. 2000; BARTOS et al. 2006). TURENNE et al. (2007) gaben jedoch zwei Probleme zu bedenken: Zum einen könne es noch einige IS in Vertretern des MAIC geben, die aufgrund noch nicht vollständiger Charakterisierung der Stämme bisher nicht entdeckt wurden. Zum anderen seien IS naturgemäß mobile Elemente, so dass ein Risiko der Übertragung zu oder von anderen nicht verwandten Bakterien bestehe. Die IS variieren in ihrer Anzahl an Kopien und ihrer Lokalisation auf dem Genom. Ferner zeichnen sie sich durch einen geringen Grad an Polymorphismus aus (DVORSKÁ et al. 2001).

Die Identifizierung der Insertionselemente IS986 und IS6110 brachte den Durchbruch in der molekularen Diagnostik des MTC. Die Analyse des IS6110 wird als Standard-Zielsequenz zur Unterscheidung innerhalb des MTC verwendet (VAN SOOLINGEN 2001).

Im Falle des MAIC können Insertionssequenzen zur Differenzierung einzelner Subspezies herangezogen werden. Hier sind vor allem IS900 (*M. avium* subsp. *paratuberculosis*), IS901 (*M. avium* subsp. *avium*) und IS1245 (*M. avium* subsp.) von Bedeutung. Die IS1141 ist typisch für *M. intracellulare* (MCADAM et al. 1994).

- **IS900**

IS900 war die zuerst beschriebene Insertionssequenz innerhalb der Gattung *Mycobacterium* (COLLINS et al. 1989; GREEN et al. 1989). Sie wurde aus einem humanen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Isolat isoliert, das von einem an Morbus Crohn erkrankten Patienten stammte.

IS900 wird als spezifisch für *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* angesehen und wurde in der RFLP zur Typisierung dieser Subspezies eingesetzt. Basierend auf den IS900 RFLP-Mustern wurde *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in zwei Hauptgruppen unterteilt: Die Isolate zeigten ein Rind- (C) oder ein Schaf- (S) assoziiertes Profil (COLLINS et al. 1990; BAUERFEIND et al. 1996; PAVLIK et al. 1999; COUSINS et al. 2000; WHITTINGTON et al. 2000). Einige Autoren beschrieben noch einen dritten RFLP Genotyp, den sie intermediär (I) bezeichneten, und der vom Schaf isoliert wurde (DE LISLE et al. 1992; BAUERFEIND et al. 1996).

IS900 ist die mit Abstand am häufigsten verwendete Zielsequenz beim molekularen Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* und wurde in verschiedenen PCR-Anwendungen genutzt:

- Direkte PCR (VARY et al. 1990; MARSH u. WHITTINGTON 2001; SECHI et al. 2005)
- In situ-PCR (SANNA et al. 2000)
- Sequence/ hybridization capture PCR (MILLAR et al. 1995; MARSH et al. 2000; MARSH u. WHITTINGTON 2001; HALLDORSDDOTTIR et al. 2002)
- Nested PCR (RYAN et al. 2002; BULL et al. 2003a; NASER et al. 2004)
- Real-time PCR (FANG et al. 2002; RAJEEV et al. 2005)

Die hier erwähnten Quellen repräsentieren nur einen kleinen Teil der insgesamt existierenden Literatur.

Es existieren jedoch ähnliche Elemente bei anderen Mykobakterien, z.B. bei *M. terrae*, *M. xenopi*, *M. scrofulaceum* und *M. chelonae*, so dass Kreuzreaktionen mit IS900 Primern auftreten können (COUSINS et al. 1999; ELLINGSON et al. 2000; TASARA et al. 2005). Diese Elemente sind nicht zu 100 % identisch mit IS900, einige Sequenzbereiche zeigen aber in verschiedenen Regionen variable Sequenzidentitäten. Deshalb ist eine Sequenzierung des amplifizierten Produktes notwendig, um sicherzustellen, dass IS900 auch tatsächlich vorliegt (TURENNE et al. 2007).

- **IS901 (und IS902)**

KUNZE et al. (1991) entdeckten die IS901 bei einem *M. avium* subsp. *paratuberculosis* Isolat. Dieses Element besitzt zu ungefähr 60 % die gleiche Sequenz wie IS900. Screenings einer größeren Anzahl an Isolaten zeigten, dass Isolate aus Vögeln und einigen Tieren dieses Element enthalten, während IS900 bei Isolaten aus AIDS Patienten und der Umwelt fehlt. Die Anzeichen dafür, dass einige *M. avium* Stämme höher pathogen sind als andere, wurde durch die Tatsache bekräftigt, dass *M. avium* Isolate eingeteilt werden können in IS901⁺ und IS901⁻ (DE LISLE et al. 2005). Die IS901-Sequenz wird zur Speziesdifferenzierung von *M. avium* subsp. *avium* (IS901⁺) und *M. avium* subsp. *hominissuis* (IS901⁻) genutzt (MIJS et al. 2002). Im Allgemeinen sind Isolate aus erkrankten Vögeln und Tieren mit makroskopischen Läsionen IS901⁺, während Isolate von Menschen, Schweinen oder Tieren ohne Läsionen IS901⁻ sind (BONO et al. 1995; COLLINS et al. 1997; O'GRADY 2000; PAVLIK et al. 2000). Die Virulenz von IS901⁺ Stämmen konnte auch experimentell bestätigt werden (PAVLIK et al. 2000; DVORSKA et al. 2003).

Zeitgleich zu den Publikationen zur IS901 veröffentlichten MOSS et al. (1992) die Entdeckung eines neuen Insertionselementes in *M. avium* subsp. *silvaticum* und bezeichneten dies als IS902. Sie stellten fest, dass IS902 in allen von ihnen getesteten *M. avium* subsp. *silvaticum* Stämmen vorhanden war. Andere Stämme aus dem MAIC wurden bei dieser Studie jedoch nicht geprüft. Ein Sequenzvergleich zwischen IS901 und IS902 erbrachte eine Identität beider Elemente von 99 %, und nach genaueren Untersuchungen bestehen die Unterschiede in einigen Sequenzlücken und dem GC-Wechsel bei vier Paaren. IS901 und IS902 sind höchstwahrscheinlich dasselbe Element, deshalb kann der Nachweis von IS902 nicht als gültiges Unterscheidungsmerkmal von *M. avium* subsp. *silvaticum* zu anderen Vertretern des MAIC akzeptiert werden. Vielmehr sollte das Vorhandensein von IS902 als „Existenz von IS901 oder verwandten Elementen“ interpretiert werden (TURENNE et al. 2007).

- **IS1245**

IS1245 wurde erstmals beschrieben von GUERRERO et al. (1995). Die Autoren stellten fest, dass IS1245 ebenso wie IS1311 bei den Subspezies von *M. avium* vorhanden, bei *M. intracellulare* dagegen fehlt. JOHANSEN et al. (2005) wiesen jedoch nach, dass *M. avium* subsp. *paratuberculosis* keine IS1245 besitzt, sondern dass hier aufgrund der großen Ähnlichkeit zur IS1311 Kreuzreaktionen weit verbreitet sind. Es konnte gezeigt werden, dass *M. avium* Isolate von Mensch und Schwein über eine große Anzahl an Kopien von IS1245 ver-

fügen (mehr als acht), während Isolate von Vögeln einschließlich *M. avium* subsp. *silvaticum* ein 3-Banden-Muster besitzen (GUERRERO et al. 1995). Die Tatsache, dass sich humane und porcine Isolate (heute als *M. avium* subsp. *hominissuis* bezeichnet) von aviären Isolaten unterscheiden, wurde durch zahlreiche Studien bekräftigt (RITACCO et al. 1998; KOMIJN et al. 1999; OLIVEIRA et al. 2003; THEGERSTRÖM et al. 2005; MÖBIUS et al. 2006). Außerdem konnte belegt werden, dass Isolate aus der Umwelt ähnliche Charakteristiken aufweisen wie die *M. avium*-Stämme von Mensch und Schwein (DVORSKA et al. 2002; MATLOVA et al. 2004). Eine Standardisierung der IS1245 RFLP wurde als Werkzeug zur molekularen Epidemiologie des MAIC vorgeschlagen (VAN SOOLINGEN et al. 1998). Um Kreuzreaktionen mit IS1311 auszuschließen, wurde diese Methode modifiziert, was zu der Erkenntnis führte, dass das 3-Banden-Muster der aviären *M. avium* Stämme in Wirklichkeit durch eine IS1245 und zwei IS1311 Kopien zustande kommen (JOHANSEN et al. 2005). Es bleibt abzuwarten, ob es zu einem epidemiologischen Mehrwert kommen würde durch Anwendung eines IS1245-spezifischen Protokolls anstelle eines Standardprotokolls (TURENNE et al. 2007).

Vor allem die IS1245 wird, wie oben beschrieben, meistens bei der RFLP eingesetzt (VAN SOOLINGEN et al. 1998). Die RFLP liefert allerdings nur dann brauchbare Ergebnisse, wenn eine genügend hohe Anzahl an Kopien der IS vorliegt. Bei zu wenigen sinkt die Unterscheidungskapazität (PESTEL-CARON u. ARBEIT 1998); zu viele Kopien erschweren dagegen die Interpretation des Ergebnisses (BAUER u. ANDERSEN 1999).

Das Vorkommen von IS1245 außerhalb des typischen Wirtes *M. avium* wurde dokumentiert, mit der Einschränkung, dass das Ergebnis nicht durch eine Sequenzierung bestätigt wurde, so dass es sich auch um verwandte Elemente wie z.B. IS1311 handeln könnte (BEGGS et al. 2000; KELLER et al. 2002). Einige *M. avium* Isolate wurden als IS1245 negativ beschrieben (BEGGS et al. 2000; LEBRUN et al. 2005; TURENNE et al. 2006).

KOMIJN et al. (1999) beobachteten, dass die DNA von 25 % der humanen Proben nicht mit IS1245 hybridisierten. Diese Proben stellten nach Ansicht der Autoren Subgruppen innerhalb des MAIC dar.

- **IS1311**

IS1311 wurde zum ersten Mal im Jahre 1994 als GenBank-Eintrag erwähnt (TURENNE et al. 2007), und seitdem für RFLP-Analysen genutzt (ROIZ et al. 1995; DEVALLOIS u. RASTOGI 1997). Diese IS ist in allen Subspezies von *M. avium* vorhanden (COLLINS et al. 1997), nicht jedoch in *M. intracellulare* (DEVALLOIS u. RASTOGI 1997; WHITTINGTON et al. 1998).

IS1311 ist zu 85 % identisch zu IS1245 (Beschreibung s. unten), wodurch es zu Kreuzreaktionen bei diesen beiden Elementen kommen kann (JOHANSEN et al. 2005). Die große Spannweite unter den *M. avium* Stämmen für dieses Element lässt vermuten, dass IS1311 eine ältere IS ist, die schon vor der Divergenz in die verschiedenen Subspezies in *M. avium* vorhanden war (WHITTINGTON et al. 1998). Durch RFLP von *M. avium* subsp. *paratuberculosis* konnten verschiedene Muster zugehörig zu Rinder- bzw. Schaf-Isolaten festgestellt werden (COLLINS et al. 1997). MARSH et al. (1999) entwickelten eine PCR mit nachfolgender Restriktionsanalyse (PCR-REA), mit der sie *M. avium* subsp. *paratuberculosis* Isolate schnell dem Rinder- oder dem Schaf- Typ zuordnen konnten.

- **Andere Insertionselemente des MAIC**

Für den MAIC wurden noch einige andere Insertionselemente beschrieben, deren Verteilung in den meisten Fällen bei den verschiedenen Vertretern des MAIC entweder unbekannt oder nur teilweise bekannt ist (TURENNE et al. 2007). Bei der nachfolgenden Beschreibung bezieht sich die Ähnlichkeit auf eine Identität von 80-85 % auf Nukleotidebene.

- **Selten vorkommende IS**

IS1110 wurde in einem Einzelisolat identifiziert, welches als *M. avium* LR541 bezeichnet wurde (HERNANDEZ PEREZ 1994). Dieses Element verfügt über einige Ähnlichkeit zu den IS900 und IS901 und wurde nur in einem kleinen Teil der *M. avium* Stämme gefunden. IS1110-ähnliche Elemente wurden für viele Mykobakterien-Spezies beschrieben, aber entweder wurde ihre Sequenz nicht vollständig bestätigt (HERNANDEZ PEREZ et al. 1997) oder sie wurden zwar bestätigt, korrespondierten aber nicht vollständig mit der eigentlichen IS1110 (STRATMANN et al. 2004; PAGNOUT et al. 2006). Auch in einem *M. intracellulare*-Stamm (als Va14 bezeichnet) wurde IS1110 nachgewiesen. Unglücklicherweise wurde bis heute keine IS identifiziert, die in allen Stämmen von *M. intracellulare* vorhanden ist (TURENNE et al. 2007).

IS1626 wurde wie IS901 und IS902 durch Southern Blotting von 66 MAIC Isolaten mit einer IS900 Sonde nachgewiesen (PUYANG et al. 1999) und besitzt einige Ähnlichkeiten mit IS900 und IS1613 (s. unten). IS1626 wurde bislang nur bei einem Stamm nachgewiesen, der nachträglich durch eine Vielzahl molekularbiologischer Tests als *M. avium* charakterisiert wurde. Allerdings wurde nicht geklärt, ob es sich dabei um *M. avium* subsp. *avium* oder um *M. avium* subsp. *hominissuis* handelte. Im Allgemeinen scheint dieses Element im MAIC selten vorzukommen.

Ein weiteres Element, über das nur wenige Informationen vorliegen, ist IS1613. Hier liegt bislang ein Eintrag in der GenBank vor (AJ011837), und eine Publikation erwähnt, dass dieser Stamm von einem an AIDS erkrankten Patienten isoliert wurde (BULL et al. 2003a), was darauf hindeutet, dass es sich möglicherweise um *M. avium* subsp. *hominissuis* handelt. Es ist sowohl IS900 als auch IS1626 ähnlich (TURENNE et al. 2007).

- **IS mit teilweise bekannter Verteilung**

Das Element IS1612 wurde identifiziert in einem Stamm *M. avium* subsp. *silvaticum* und in *M. avium* subsp. *avium* TMC724 (BULL et al. 2000). Es korrespondiert mit IS2534 (ECKSTEIN et al. 2003), gleichermaßen gefunden in *M. avium* subsp. *avium* TMC724. SIGUIER et al. (2006) wiesen diesem Element die Bezeichnung ISMav1 zu. ISMav1 kommt mindestens in einem *M. avium* subsp. *hominissuis*-Stamm, im *M. avium* subsp. *avium*-Typstamm sowie in der *M. avium* 104-Genomsequenz vor. Die Verteilung von ISMav1 unter den MAIC Isolaten ist unklar (TURENNE et al. 2007).

IS666 wurde in *M. avium*-Isolaten vom Mensch (36 %), Schwein (5 %), Rind (12 %) und aus der Umwelt (78 %) nachgewiesen, jedoch nicht in Isolaten vom Vogel (SANGARI et al. 2000). Deshalb ist IS666 wahrscheinlich nur einigen Untergruppen von *M. avium* subsp. *hominissuis* vorhanden, es kam in 21 % der getesteten *M. avium*-Stämmen vor.

IS1601 wurde in einer Studie beschrieben, die sich mit den genetischen Mechanismen befasste, die sich hinter der variablen Morphologie von *M. avium* verbergen (ECKSTEIN et al. 2000). Sie ist beteiligt am Wechsel der Kolonieoberfläche von der Glatt- („smooth“) zur Rauform („rough“), der bei einigen Stämmen beobachtet wird. IS1348 wurde ebenfalls durch ECKSTEIN et al. (2000) beschrieben. Beide Elemente kommen vor im *M. avium* 104-Genom, jedoch nicht in *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K-10. Deshalb scheinen diese Elemente mindestens in einigen *M. avium* subsp. *hominissuis* Stämmen vorzukommen, nicht aber in *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

ISMav2 ist möglicherweise ein *M. avium* subsp. *paratuberculosis*-spezifisches Element, da es in allen untersuchten *M. avium* subsp. *paratuberculosis*-Stämmen, jedoch nicht in *M. avium* subsp. *avium*-Stämmen vorkam (STROMMENGER et al. 2001; SHIN et al. 2004). IS901-negative Stämme wurden nicht untersucht, so dass das Vorkommen von ISMav2 in *M. avium* subsp. *hominissuis*-Isolaten unbekannt ist.

IS999 wurde in klinischen Humanisolaten, demnach wahrscheinlich *M. avium* subsp. *hominissuis* zugehörig, und in einem *M. avium* subsp. *avium*-Stamm nachgewiesen (LAURENT et al. 2002). Während die Verteilung in *M. avium* subsp. *paratuberculosis* nicht untersucht wurde, ist es im K-10-Genom nicht vorhanden.

Das Element ISMpa1, das zu 80 % Sequenzidentität mit IS1601 aufweist, wurde in allen untersuchten *M. avium* subsp. *paratuberculosis*-Stämmen gefunden, 2 von 13 getesteten MAIC Organismen waren positiv, jedoch keine anderen Mykobakterien-Spezies (OLSEN et al. 2004). Die tatsächliche Verteilung von ISMpa1 innerhalb des MAIC ist momentan noch ungewiss, da bisher nur ein geringer Teil an Isolaten untersucht wurde.

- **Nicht-IS-basierte Zielsequenzen des MAIC**

Neben den Insertionselementen gibt es noch weitere wichtige genetische Zielsequenzen, die zum Nachweis oder zur Differenzierung von MAIC-Vertretern genutzt wurden. Diese können eine attraktivere Option darstellen, da sie teilweise spezifischer sind als die Insertionselemente.

Eine Einzelkopiesequenz (F57) wurde als spezifisch für *M. avium* subsp. *paratuberculosis* beschrieben (POUPART et al. 1993), später wurde sie genutzt, um in einer Duplex-PCR zwischen dem *M. tuberculosis*-Komplex, *M. avium* und *M. avium* subsp. *paratuberculosis* zu differenzieren (COETSIER et al. 2000; GODFROID et al. 2005). Basierend auf F57 wurde eine Real-time PCR entwickelt zum Nachweis von *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in Milch, Kot oder Gewebe (TASARA u. STEPHAN 2005; BOSSHARD et al. 2006).

Eine weitere *M. avium* subsp. *paratuberculosis*-spezifische Zielsequenz wurde von ELLINGSON et al. (1998) beschrieben. Sie weist Ähnlichkeiten zur Familie der Hitzeschockprotein-Gene (heat shock protein genes) und wurde deshalb *hspX* bezeichnet. Die Spezifität von *hspX* für *M. avium* subsp. *paratuberculosis* wurde danach an einer großen Anzahl an MAIC-Stämmen mit verschiedenen genetischen und Wirtscharakteristiken bestä-

tigt (ELLINGSON et al. 2000). Um zwischen bovinen und ovinen *M. avium* subsp. *paratuberculosis* unterscheiden zu können, wurde ein PCR-Assay mit drei Primern entwickelt, mittels dessen PCR-Produkte unterschiedlicher Größe in einem Reaktionsansatz nachgewiesen werden konnten (COLLINS et al. 2002; DE LISLE et al. 2006).

- **DT1 / DT6**

In einem Versuch, eine *M. intracellulare*- und *M. avium*-spezifische Zielsequenz für den Einsatz in der klinischen Labordiagnostik zu finden, isolierten THIERRY et al. (1993) mit Hilfe von Southern Hybridisierung von genomischen Fragmenten aus einem aviären Typstamm zwei Fragmente, die spezifisch für den MAIC sind und nicht in anderen Mykobakterien-Spezies gefunden werden. Das Fragment DT1 war spezifisch für alle *M. intracellulare*-Isolate und die *M. avium* Stämme Serotyp 2 und 3, während DT6 spezifisch für alle *M. avium* Isolate war (THIERRY et al. 1993). Obwohl derzeit nicht bestätigt, waren die meisten getesteten *M. avium* Isolate humane klinische Isolate (TSANG et al. 1992), deshalb gehörten die meisten Stämme höchstwahrscheinlich zu *M. avium* subsp. *hominissuis*, was erklären würde, warum einige *M. avium* Stämme positiv für DT1 waren. Während DT1 ein Marker für *M. intracellulare* zu sein scheint (DEVALLOIS et al. 1996; SOLA et al. 1996) und möglicherweise ein Marker für *M. avium* subsp. *avium* ist, wurde DT1 auch in einigen anderen dem MAIC nahe verwandten Mykobakterien-Spezies gefunden (DEVALLOIS et al. 1997). In einigen *M. intracellulare* Isolaten fehlte DT1 jedoch (GARRIGA et al. 1999). DT1 zeigte keine Ähnlichkeiten zu *M. avium* 104 (die höchste Übereinstimmung war 61 %) und keine Ähnlichkeiten zu *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K-10. Umgekehrt wurde DT6 in beiden sequenzierten Genomen und in dem aviären Typstamm gefunden, es dient nunmehr als Marker für die Subspezies von *M. avium* (TURENNE et al. 2007).

Die Vergleiche verschiedener molekularbiologischer Methoden durch DEVALLOIS et al. (1997) zeigten, dass über die DT1/ DT6-PCR eine sehr genaue Identifikation einzelner Isolate möglich ist. Im Vergleich dazu schnitt die Analyse über die 16S rRNA schlechter ab (DEVALLOIS et al. 1997).

- **16S rRNA-Gen**

Eine häufig verwendete Zielsequenz für die Amplifikation ist das 16S rRNA-Gen. Dieses eignet sich besonders gut, da es sich in jedem zellulären Organismus befindet (WOESE 2003). Es besitzt hochkonservierte Sequenzbereiche (d.h. Sequenzbereiche völlig verschiedener

Mikroorganismen sind weitgehend identisch) sowie Genus-spezifische und Spezies-spezifische Bereiche, die zur Identifizierung der einzelnen Spezies genutzt werden können (BÖDDINGHAUS et al. 1990). Die Identifizierung ist mit dieser Methode schneller und zuverlässiger als die Differenzierung mit Hilfe biochemischer Tests (TROESCH et al. 1999). Häufig wird daher das 16S rRNA-Gen zum Nachweis der Gattung *Mycobacterium* und zur weiteren Identifizierung auf Speziesebene, v.a. bei langsam wachsenden Mykobakterien, genutzt (RINGUET et al. 1999).

Die über 130 bekannten Mykobakterien-Spezies sind bekannt dafür, nahezu ebenso viele verschiedene 16S rRNA-Gensequenzen zu besitzen. Zusätzlich wird vermutet, dass es viele andere mykobakterielle 16S rRNA-Genotypen gibt, die bis jetzt noch nicht als Spezies erkannt sind (TORTOLI et al. 2003; PAULS et al. 2003). Dennoch teilen sich die *M. avium* Subspezies (*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, und *M. avium* subsp. *hominissuis*) eine identische 16S rRNA-Gensequenz und können deshalb nicht durch 16S rRNA-Gensequenzierung differenziert werden. Die engste Verwandtschaft zu *M. avium* bezüglich der 16S rRNA-Gensequenz besitzen *M. colombiense* (6 bp Variation), *M. intracellulare* (9 bp), und *M. chimaera* (10 bp). Es wird angenommen, dass sie Teil des MAIC in klinischem Sinne sind. Restriktionsanalysen zu den Typstämmen von validierten Spezies zeigten, dass die nächst engsten Verwandten *M. bohemicum* (13 bp) und *M. malmoense* (17 bp) sind (TURENNE et al. 2007).

Ein Nachteil bei der Identifizierung von Mykobakterien über das 16S rRNA-Gen ist, dass einige Spezies gleiche Sequenzen besitzen und so nicht weiter voneinander differenziert werden können. Dazu gehören v.a. die klinisch bedeutsamen Spezies des MTC, *M. abscessus* und *M. chelonae*, *M. marinum* und *M. ulcerans* sowie *M. gastri* und *M. kansasii*. Für die Unterscheidung der sequenzgleichen Spezies müssen somit andere Zielstrukturen genutzt werden (SOINI u. MUSSER 2001).

- **32-kDa Mycobacterium-specific protein und**
- ***hsp65*-Gen (65 kDa heat shock protein)**

Das 32-kDa-Protein-Gen (SOINI et al. 1994), das 65 kDa- Hitzeschockprotein (*hsp65*)-Gen (KAPUR et al. 1995) und repetitive Elemente auf der DNA, wie die 16S-23S rRNA ITS (internal transcribed spacer)-Region (ROTH et al. 1998; RINGUET et al. 1999), enthalten genügend Sequenzunterschiede zur Unterscheidung der bedeutenden pathogenen Mykobakterien mit der Ausnahme des MTC.

Für jede Zielstruktur gibt es Vor- und Nachteile, jedoch eignen sich einige als sinnvolle Ergänzung, um auf Speziesebene weiter zu differenzieren. Das *hsp65*-Gen eignet sich insbesondere aufgrund der Variabilität zur Unterscheidung bei schnell wachsenden Mykobakterien, wie *M. chelonae* und *M. abscessus* (YAKRUS et al. 2001).

Ein Teil des 32-kDa Proteins wurde durch die PCR amplifiziert und sequenziert. *M. avium* und *M. intracellulare* zeigten dabei unterschiedliche Sequenzmuster.

Eine neue Gruppe innerhalb von MAIC (MAIX oder MAIC-other), wies eine spezifische Sequenz dieses Proteins auf, die sie von *M. avium* und *M. intracellulare* unterschied. Auf der Nukleotidsequenz dieses Proteins schien es variable Bereiche zu geben, die eine Identifizierung einzelner Isolate, die weder *M. avium*, noch *M. intracellulare* zugeordnet werden konnten, ermöglichten (SOINI et al. 1994).

- **mig-Gen (macrophage-induced-gene)**

Bis jetzt wurde nur ein Virulenzfaktor der MAIC-Isolate identifiziert, nämlich das mig-Gen (MEYER et al. 1998). Untersuchungen zeigten, dass alle *M. avium*-Stämme das mig-Gen beinhalten, aber kein Isolat der *M. intracellulare*-Stämme (MENENDEZ et al. 2001).

Diejenigen Isolate, die negativ für das mig-Gen waren, reagierten auch negativ auf die Hybridisierung mit der IS 1245, sie wurden über ihre *hsp65*-Sequenz als *M. intracellulare* identifiziert. Der Rest, der sowohl das mig-Gen als auch die IS 1245 enthielt, wurde *M. avium* zugeordnet (BEGGS et al. 2000).

- **MIRU-/ VNTR (mycobacterial interspersed repetitive units/ variable number of tandem repeat)**

MIRU-/VNTR-Sequenzen sind kurze, sich wiederholende Abschnitte mit einer Länge von jeweils 40-100 Basenpaaren. Die einzelnen Sequenzen können leicht variieren und kommen über das Genom verteilt an verschiedenen Loci vor. Erstmals beschrieben wurden sie bei *M. tuberculosis* (SUPPLY et al. 1997), nachfolgend bei *M. avium*-Subspezies (BULL et al. 2003b). Sie eignen sich gut zur Stammdifferenzierung, da die Anzahl der Kopien an einigen MIRU-Loci bei einzelnen Isolaten unterschiedlich ist (SUPPLY et al. 2000). Diese Methode ist PCR-basiert, automatisierbar und generiert einen numerischen Code als Ergebnis.

Tabelle 2.15 zeigt die Verteilung der zurzeit bekannten genomischen Elemente bei den verschiedenen MAIC-Vertretern.

Literatur

Tabelle 2.15 Vorkommen genetischer Elemente und Zielgene bei den verschiedenen MAIC-Vertretern (nach TURENNE et al. 2007)

Zielsequenz	IS Familie	Vorhandensein der Zielsequenz bei			
		<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	<i>M. intracellulare</i>
IS900	IS110	–	–	+	–
IS901	IS110	+	–	–	–
IS1245	IS256	+	+	–	–
IS1311	IS256	+	+	+	–
ISMav1	IS21	+/?	+/?	?	?
IS666	IS256	–	+ (21 %)	–	–
IS1601	IS256	?	+/?	?	?
ISMav2	IS481	–	?	+	–/?
IS999	IS3	–/?	+/?	–/?	?
ISMpa1	IS110	–/?	+/?	+	–/?
IS1110	IS110	?	+/?	?	?
IS1141	IS3	?	?	?	?
IS1626	IS110	?	–/?	?	?
IS1613	IS110	?	?	?	?
<i>hsp65</i>	–	–	–	+	–
F57	–	–	–	+	–
DT1	–	+/?	–/?	–	+
DT6	–	+	+	+	–
<i>mptD</i>	–	–	–	+	–

+ = vorhanden; – = nicht vorhanden; ? = unbekannt
 +/? (oder –/?) = vorhanden (oder nicht vorhanden) in einem oder einigen Stämmen, aber Verteilung insgesamt ist variabel oder unbekannt

2.3.2.3 Molekularbiologische Nachweismethoden

In den letzten Jahren wurden verstärkt Amplifikationstechniken von DNA oder RNA mit anschließender Sequenzierung oder Hybridisierung zur Identifizierung und Differenzierung von Mykobakterien eingesetzt (BOHRBEN 2003). Dabei wurde Kulturmaterial, aber auch Direktmaterial von Patienten verwendet. Diese Aussage gilt in der Humanmedizin insbesondere für den MTC (Sputumproben) und in der Veterinärmedizin v.a. für den Nachweis der Paratuberkulose beim Wiederkäuer (Kot- und Milchproben).

Häufig basiert die Nachweismethode auf der Polymerase-Kettreaktion (PCR), wobei sich die Zielstrukturen unterscheiden und abhängig von der jeweiligen Fragestellung (Speziesidentifikation, Resistenzbestimmung etc.) sind (VAN SOOLINGEN 2001). Die Entwicklung molekularbiologischer Techniken ermöglichte es nicht nur, Mykobakterien wesentlich schnell-

ler zu differenzieren, sondern auch ihren Verwandtschaftsgrad aufzudecken und phylogenetische Untersuchungen durchzuführen (BROSCH et al. 2002).

Für die weitere Differenzierung und Identifizierung der Amplifikate wurde eine große Anzahl an DNA-Fingerprint-Methoden entwickelt. Anfangs nutzte man die Analyse mittels Restriktionsendonukleasen. Hierbei wird die DNA an genau definierten Abfolgen von Nukleotiden durch Restriktionsenzyme gespalten und die resultierenden Fragmentmuster werden analysiert. Eine von TELENTI et al. (1993) beschriebene Identifizierung klinisch relevanter und häufig isolierter Mykobakterien beruht auf der Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen nach der PCR. Anhand der unterschiedlichen Fragmentgrößen kann dann eine Identifizierung erfolgen.

Beim Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) wird genomische DNA aus der Kultur isoliert und mit einem Restriktionsenzym verdaut. Die Fragmente werden anschließend mit einer spezifischen Sonde hybridisiert (VAN SOOLINGEN 2001).

Später wurden spezifische DNA-Sequenzen als Sonden verwendet, die zu der gesuchten Sequenz homolog waren. Die Sichtbarmachung der Sonden erfolgte nach dem Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)-Prinzip, radioaktiv oder durch Fluoreszenz (PATEL et al. 1997).

Die Spoligotyping-Methode basiert auf der Sichtbarmachung von bestimmten DNA-Spacern auf dem Direct Repeat-Genabschnitt (DR) der genomischen DNA. Die Region enthält eine unterschiedliche Anzahl dieser DR-Sequenzen sowie verschiedene Spacer innerhalb der DR-Sequenz. Durch Amplifizierung und anschließende Hybridisierung mit spezifischen Sonden entstehen je nach Spezies unterschiedliche Muster, die als Spoligotypes bezeichnet werden (NIEMANN et al. 2002). Das Spoligotyping eignet sich nur für die Differenzierung der MTC-Erreger in verschiedene Spezies und Subtypen.

Die auf der PCR basierende Sequenzierung von bestimmten Mykobakterien-DNA-Abschnitten gilt als Methode der Wahl für die Identifizierung der einzelnen Mykobakterienspezies (SOINI u. MUSSER 2001). Sie ist sowohl aus Kulturmaterial als auch direkt aus klinischen Proben möglich. Die Methode beruht auf der Amplifikation der DNA mit genusspezifischen Primern mittels PCR und anschließender Sequenzierung der Amplikons. Die Nukleotidsequenz des sequenzierten Organismus wird mit Referenzsequenzen verglichen. Die dabei am häufigsten verwendete Zielsequenz ist das 16S rRNA-Gen.

2.3.2.4 Die PCR zum Nachweis von Mykobakterien

- **Probenaufarbeitung und DNA-Freisetzung**

Vor jeder PCR muss die sich in den Zellen befindende DNA freigesetzt werden (DNA-Extraktion). Die Wahl einer adäquaten Zellaufschlussmethode ist von fundamentaler Wichtigkeit, da von ihrem Erfolg auch die nachfolgenden Schritte abhängen. Die optimale Extraktionsmethode hängt vom Probenmaterial ab und ist für jeden Probentyp unterschiedlich (HOSEK et al. 2006).

Die Isolation der DNA ist bei Mykobakterien schwieriger als bei anderen Bakterien, da Mykobakterien aufgrund der auf ihrer Peptidoglykanschicht aufgelagerten wachsartigen Substanzen in der Zellwand gegenüber einer Vielzahl von Lysispuffern resistent sind (WARDS et al. 1995; CORNEJO et al. 1998; MURRAY et al. 2002; HOSEK et al. 2006).

Zur DNA-Freisetzung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die sich in ihrer Wirkungsweise unterscheiden. Allgemein kann man diese Methoden in physikalische, chemische oder Kombination aus diesen beiden einteilen (HOSEK et al. 2006).

Mykobakterien können in den verschiedensten Körperflüssigkeiten und Geweben vorkommen, z.B. Milch, Blut, Sputum, Bronchialflüssigkeit, Zerebrospinalflüssigkeit, Kot oder Sperma (HOSEK et al. 2006). Für diese Probenqualitäten wurden jeweils diverse Aufarbeitungsmethoden beschrieben, Tab. 2.15 zeigt eine Auswahl dieser Techniken.

Die einfachste Art der Freisetzung von DNA aus Mykobakterien-Suspensionen war das Kochen in destilliertem Wasser für 10 bis 15 min. (TORTOLI et al. 2001; SVASTOVA et al. 2002).

Andere Autoren benutzten Kombinationen von verschiedenen Techniken. SAVIC et al. (1992) setzten bei Sputumproben gleichzeitig Enzyme, Siliziumkügelchen (< 150 µm) und Ultraschallbehandlung (20 kHz) ein. Zirkoniumkügelchen in Kombination mit Proteinase K-Verdau und anschließender Chloroform-/ Phenol-Extraktion wurde von ENGLUND et al. (2001) bei Isolaten aus Darmschleimhautproben eingesetzt.

Chemische Methoden werden allgemein eingesetzt, wenn eine höhere Reinheit der mykobakteriellen DNA erforderlich ist. Zentrifugierte Bakterien wurden dabei üblicherweise resuspendiert in TE Puffer, der Proteinase K (manchmal auch SDS) enthielt, welche die Zellwand verdauen konnte. Nach 3 h Inkubation wurden die Proteine mit 5M NaOH und

CTAB/ NaOH (CTAB [Cetyltrimethylammoniumbromid] in 0,7M NaOH) ausgefällt. Dieser Schritt wurde ausgeführt bei 65°C über 20 min. Anschließend wurde die DNA mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) und Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) aufgereinigt. Nach dem letzten Reinigungsschritt wurde die DNA mit Isopropanol bei -70°C für 1 h ausgefällt. Nach Zentrifugation und Waschen des DNA-Pellets mit 70% Ethanol wurde die DNA in Aqua dest. gelöst (HILL et al. 1972; PIERRE et al. 1991).

Eine ähnliche Vorgehensweise beschrieben PAVLIK et al. (1999) und DVORSKA et al. (2003). Diese Autoren setzten allerdings zusätzlich Lysozym ein, das vor der Proteinase K-Behandlung (mit SDS bei 65°C für 10 min.) für 3 h bei 37°C auf die Zellsuspension einwirkte.

GARRIGA et al. (1999) stellten eine vereinfachte Kombination aus den oben beschriebenen physikalischen und chemischen Methoden vor. Sie resuspendierten eine Öse Bakterien in alkalischer Lösung (0,5M NaOH und 0,05M Na-Citrat). Nach 10-minütiger Inkubation und anschließender Zentrifugation wurde das Pellet mit 0,5M Tris- HCl (pH 8,0) gewaschen, mit A. dest. resuspendiert und bei 95°C für 30 min. gekocht.

SOMERVILLE et al. (2005) benutzten eine Kombination aus Hitzeeinwirkung und Chloroform/ Phenol-Extraktion. Sie resuspendierten Koloniematerial in Tris-EDTA-Puffer (pH 8,0) und erhitzen die Suspension bei 80°C über 20 min. Danach erfolgte eine Zugabe von Lysozym und das Gemisch wurde 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde SDS und Proteinase K zugegeben, und nach kurzer Inkubation (20 min. bei 65°C) wurden CTAB und NaCl zugemischt. Die DNA wurde dann nach der von MOORE (1990) beschriebenen Methode mit Hilfe von Ethanol nach Chloroform-Isoamylalkohol-Reinigung (24:1) ausgefällt.

Tabelle 2.16 zeigt eine Auswahl von beschriebenen DNA-Aufarbeitungsmethoden bei verschiedenen Probenmaterialien.

Literatur

Tabelle 2.16 Auswahl beschriebener Methoden zur Aufarbeitung von Mykobakterien in verschiedenen Probenmaterialien (nach HOSEK et al. 2006)

Probenmaterial	Eingesetzte Methoden der DNA- Freisetzung	PCR- Sensitiv./ Nachweisgrenze	Quellen
Mykobakterien- Isolate	Kochen	k.A.	TORTOLI et al. (2001); SVASTOVA et al. (2002)
	Enzyme, Siliziumkügelchen, Ultraschall	95 %	SAVIC et al. (1992)
	Proteinase K (+SDS), NaOH + CTAB, CP	100 % bei >100 KbE/ ml	PIERRE et al. (1991)
	NaOH + Erhitzen (95°C)	100 %	GARRIGA et al. (1999)
	Kochen, Lysozym + SDS + Proteinase K, CP	k.A.	MOORE (1990); SOMERVILLE et al. (2005)
Sputum	Proteinase K + SDS, Erhitzen 65°C, CP	k.A.	FUKUSHIMA et al. (2003)
Milch	Immunomagnetische DNA- Separation	0,1–1,0 Zellen	ANTOGNOLI et al. (2001)
Blut	Einfrieren + Kochen, Lysozym + Proteinase K + HTAB, CP	k.A.	AHMED et al. (1998)
	TE- Kochen, CP	k.A.	NASER et al. (2004)
Gewebe (frisch)	Proteinase K, Tween 80, CTAB, CP	0,2–2,0 Genome	WARDS et al. (1995)
	Triton X-100 + EDTA + DTT, Suptilisin + Lysozym + Pro- nase + SDS	10 fg DNA von <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	SANDERSON et al. (1992)
	Zirkoniumkügelchen, Ultra- schall, Proteinase K, immuno- magnetische DNA- Separation	93% (konventio- nelle PCR), 71% LightCycler PCR	TAYLOR et al. (2001)
	Lysozym + SDS + Proteinase K, CP	230 Zellen/ g ge- spiktes Gewebe	SIVAKUMAR et al. (2005)
Gewebe (Formalin- fixiert)	Enzyme, Siliziumkügelchen	k.A.	BARTOS et al. (2006)
Gewebe (Paraffin- Block)	0,5 % Tween 20, Einfrieren + Kochen	88,2 %	WHITTINGTON et al. (1999)
	Xylen, SDS + Proteinase K, CP	90 %	MARCHETTI et al. (1998)
Kot	Einfrieren + Kochen, TE/ Tri- ton X-100	50 Zellen/ g	GARRIDO et al. (2000)

CP = Chloroform-/ Phenol-Extraktion; CTAB = Cetyltrimethylammoniumbromid; HTAB = Hexadecyltriammoniumbromid; SDS = Natrium-Dodecyl-Sulfat; TE = Tris- HCl + EDTA- Puffer; k.A. = keine Angaben

- **Primer zum Nachweis von Mykobakterien des MAIC**

In der Literatur werden diverse Primer zum Nachweis oder zur Differenzierung von atypischen Mykobakterien beschrieben. In Tabelle 2.17 ist eine Auswahl der vorhandenen Primer aufgeführt.

Genutzt werden unterschiedliche Zielregionen an der mykobakteriellen DNA, so dass die Primer sich in ihrer Spezifität unterscheiden. Am häufigsten werden die verschiedenen Insertionssequenzen (IS) eingesetzt, gefolgt von dem 16S rRNA-Gen, der DT1/ DT6-Region und vereinzelt anderen Genabschnitten wie z.B. *hsp65*- oder *f57*-Gen.

Auch hinsichtlich der DNA-Aufarbeitung kommen unterschiedliche Techniken zum Einsatz. Auffällig ist, dass als Ausgangsmaterial fast ausschließlich Kultur-Isolate verwendet wurden. Dabei handelt es sich entweder um Referenzstämme oder um Isolate, die aus klinischem Untersuchungsmaterial angezüchtet wurden.

Die bei den Arbeiten eingesetzten molekularbiologischen Techniken dienen entweder dem Erregernachweis (PCR, AccuProbe) oder der Differenzierung der verschiedenen Mykobakterien-Spezies bzw. Subspezies (RFLP, PFGE).

Tabelle 2.17 Auswahl eingesetzter Primer zum Nachweis oder zur Differenzierung von Mykobakterien des MAIC

Ziel-region	Primer-name	Nachgewiesene Spezies	Probenmaterial (Anzucht-Nährmedium)	DNA-Extraktion	Molekularbiologische Techniken	Quellen
IS	IS900	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratbc.</i>	Referenzstämme, tierische und Humanisolate (Tween-Albumin)	Kochen	RFLP	COLLINS et al. (1997)
	IS901	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>				
	IS1245	<i>M. avium</i> subsp.				
	IS1311	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratbc.</i>				
IS	IS900	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratbc.</i>	Referenzstämme, tierische und Humanisolate (Middlebrook 7H9)	verschiedene	PCR	ELLINGSON et al. (2000)
	IS901	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>				
	IS1245	<i>M. avium</i> subsp.				
IS	IS901	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	Schweine- und Humanisolate (Ogawa oder Middlebrook 7H11)	Kochen oder enzymatisch	RFLP	NISHIMORI et al. (1995)
IS	IS902	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	Referenzstämme und Humanisolate (MG3 Medium)	Kochen	PCR, Hybridisierung	MOSS et al. (1992)
IS	IS902	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	Referenzstamm (Middlebrook 7H9)	Chloroform/Phenol	PCR	HINES et al. (1998)
IS	IS1245	<i>M. avium</i> subsp.	Referenzstämme, tierische und Humanisolate (n.a.)	mechanisch (Glaskügelchen mit Ultraschall)	RFLP, PFGE	GUERRERO et al. (1995)
IS	IS1245	<i>M. avium</i> subsp.	Humanisolate (Middlebrook 7H9)	Chloroform/Phenol	RFLP, PFGE	PICARDEAU et al. (1996; 1997)
IS	IS1245	<i>M. avium</i> subsp.	Humanisolate (Middlebrook 7H9)	Chloroform/Phenol	PFGE	PESTEL-CARON u. ARBEIT (1998)
IS	IS1245	Genus <i>Mycobacterium</i>	Humanisolate (Middlebrook 7H9)	n.a.	PFLP	SECHI et al. (1999)
av3-Gen	MAV 1 +4	<i>M. avium</i> subsp. + <i>M. intracellulare</i>	Humanisolate, Blutproben (Middlebrook 7H12)	Kochen, Chlorof./ Phenol	PCR	KULSKI u. PRYCE (1996)

n.a. = nicht angegeben

Tabelle 2.17 (Fortsetzung) Auswahl eingesetzter Primer zum Nachweis oder zur Differenzierung von Mykobakterien des MAIC

Ziel-region	Primer-name	Nachgewiesene Spezies	Probenmaterial (Anzucht-Nährmedium)	DNA-Extraktion	Molekularbiologische Techniken	Quellen
16S rRNA	pA + pH	Genus <i>Mycobacterium</i>	Rinderisolate (Middlebrook 7H9)	Kochen	REA	HUGHES et al. (1993)
16S rRNA	S + P	<i>M. avium</i> subsp.	Referenzstämme und Humanisolate (Middlebrook 7H10)	Chloroform/ Phenol	PCR, Hybridisierung	VAN DER GIESSEN et al. (1993)
16S rRNA	MYCOB MAV MIN	langsam wachsende <i>M. avium</i> subsp. <i>M. intracellulare</i>	Referenzstämme und Humanisolate (Middlebrook 7H10)	mechanisch (Glaskügelchen mit Ultraschall)	PCR	CHEN et al. (1996)
16S rRNA	MYCOGEN MYCAV MYCINT	Genus <i>Mycobacterium</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>M. intracellulare</i>	Humanisolate (n.a.)	Kochen	Multiplex-PCR, AccuProbe	COUSINS et al. (1996)
16S-23S rRNA	Sp 1+2	Genus <i>Mycobacterium</i>	Referenzstämme und Humanisolate (n.a.)	mechanisch (Glaskügelchen mit Ultraschall)	RFLP, AccuProbe	ROTH et al. (2000)
DT6	AV 6+7	<i>M. avium</i> subsp.	Referenzstämme Middlebrook 7H9	Chloroform/ Phenol	PCR, Hybridisierung	THIERRY et al. (1993)
DT1	IN 38+41	<i>M. intracellulare</i>	Humanisolate (Löwenstein-Jensen)	Kochen, Chlorof./ Phenol	PCR, AccuProbe	DEVALLOIS et al. (1996)
DT6	AV 6+7	<i>M. avium</i> subsp.	Referenzstämme und Humanisolate (LJ oder Middlebrook 7H10)	mechanisch (Glaskügelchen mit Ultraschall)	REA	TELENTI et al. (1993)
DT1	IN38+41	<i>M. intracellulare</i>	Tierische und Humanisolate (Middlebrook 7H10)	Mechanisch (Glask. + US)	REA	MENDENHALL et al. (2000)
<i>hsp65</i> -Gen	Tb 11+12	Genus <i>Mycobacterium</i>	Klinische Isolate (Rind) (Formalin-fixiert)	Chloroform/ Phenol	Duplex-PCR	COETSIER et al. (2000)
<i>hsp65</i> -Gen	MKMTB13A +MPTBII	<i>M. avium</i> subsp. + <i>M. genavense</i>	Humanisolate (Middlebrook 7H10)	Chloroform/ Phenol		
f57-Gen	f57 a+b	<i>M. avium</i> ssp. <i>paratbc.</i>				
p34-Gen	myc 1+2	<i>M. tuberculosis</i>				
<i>mig</i> -Gen	mig	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	Humanisolate (Middlebrook 7H11)	Chloroform/ Phenol	PFGE, Sequenzierung, AccuProbe	BEGGS et al. (2000)

n.a. = nicht angegeben

2.4 Fragestellungen dieser Arbeit

Die meisten Arbeiten beziehen sich auf Koloniematerial. Eine Prüfung direkt aus Gewebe erscheint jedoch notwendig, um in der Überwachung etwa von Schweinebeständen auf MAIC, ein erhöhtes Maß an Sicherheit zu generieren.

Derzeit erfolgt hier lediglich eine Prüfung der Mandibularlymphknoten durch optische Inaugenscheinnahme nach Inzision.

Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, zu prüfen, ob sich durch entsprechende Kombination der als geeignet erkannten Primer mit entsprechender DNA-Aufschlussmethode eine praktikable Technik eröffnet.

Für diese Arbeit ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Welche Primer bzw. DNA-Aufarbeitungsmethoden zum Nachweis von Vertretern des *Mycobacterium avium*-intracellulare- Komplex (MAIC) sind vorhanden?
- Sind diese für den Einsatz bei der Arbeit mit Mykobakterien-Reinkulturen bzw. Lymphknotenmatrix geeignet?
- Welche Kombination von Primern und DNA-Aufarbeitungsmethode ist am besten für diese beiden Anwendungsbereiche geeignet?
- Ist die PCR-Anwendung ohne vorherige Isolierung und Anzucht der Mykobakterien zur Abkürzung der Diagnostik möglich?

3 Material und Methoden

3.1 Arbeitsmaterialien

3.1.1 **Verwendete Mikroorganismen**

Für die Untersuchungen wurden sechs Stämme verwendet, die bezogen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Deutschland:

Tabelle 3.1 Verwendete Stämme

Stammnummer	Taxonomische Bezeichnung	Herkunft
DSM 43223 ^T	<i>M. intracellulare</i>	Qualitätskontrollstamm (DIN 58959-7)
DSM 44156 ^T	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	Leber eines erkrankten Huhns
Feldstämme	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	Friedrich-Löffler-Institut (Jena)
DSM 44175 ^T	<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	Ringeltaube (<i>Columba palumbus</i>)
DSM 44153 ^T	<i>M. triviale</i>	Humanisolat: Sputum
DSM 43992 ^T	<i>M. scrofulaceum</i>	Halslymphknoten eines an Lymphadenitis erkrankten Kindes

Es handelte sich hierbei um Typstämme der einzelnen Spezies/ Subspezies.

Ausnahme ist *M. avium* subsp. *hominissuis*, bei dem kein Typstamm kommerziell erhältlich war. Hier wurden drei Feldstämme eingesetzt, die freundlicherweise vom Friedrich-Löffler-Institut (Jena) zur Verfügung gestellt wurden.

3.1.2 **Nährmedien zur Stammhaltung und Kultivierung**

Zur Anzucht der Kulturen wurden Middlebrook 7H9-Bouillon sowie Middlebrook 7H10-Agar als Schrägagarkultur (Rezepturen s. Anhang), beides in laborüblichen Reagenzgläsern, verwendet. Die Bebrütung erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C. Das Wachstum der Stämme wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Sobald eine Bouillon gut bewachsen war, erfolgte eine Subkultivierung auf Middlebrook 7H10-Agar. Damit wurde einem eventuellen Absterben der Keime durch Vergiftungsprozesse vorgebeugt. Außerdem wurde so sichergestellt, dass ständig eine gut bewachsene Bouillon für die Arbeitsanwendung zur Verfügung stand.

Die längerfristige Aufbewahrung der Stämme erfolgte unter Zusatz von 20 % Glycerin (Gefrierschutz) zum Flüssigmedium bei -25°C.

3.1.3 Reagenzien zur Isolierung der DNA und für die PCR

Zur DNA-Isolierung:

1. Tris-EDTA pH 8,0, bestehend aus
 - a. Tris- HCl pH 8,0; 1 M
 - i. Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan zur Analyse ($C_4H_{11}NO_3$), Puffersubstanz (Fa. Merck, Darmstadt, Art. 8382)
 - ii. Salzsäure rauchend 37 % (Fa. Merck, Darmstadt, Art. 317)
 - b. EDTA pH 8,0; 0,1 M (Ethylendiamintetraessigsäure), (Fa. Merck, Darmstadt, 8418)
2. SDS 10 % (Sodiumdodecylsulfat = Natriumdodecylsulfat, $C_{12}H_{25}NaO_4S$), (Fa. Boehringer, Mannheim, Art. 1028 693)
3. Proteinase K, 20 mg/ ml (Fa. Boehringer, Mannheim, Art. 1092 766)
4. NaCl-Lösung 5 M, Natriumchlorid zur Analyse (Fa. Merck, Darmstadt, Art. 6404)
5. CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid, $C_{19}H_{42}NBr$), (Fa. Sigma, Deisenhofen, Art. H-5882)
(Lösung: 4,1 g NaCl in 80 ml Wasser + 10 g CTAB ad 100 ml Aqua bidest.)
6. Chloroform/ Isoamylalkohol 24:1, Chloroform zur Analyse ($CHCl_3$), (Fa. Merck, Darmstadt, Art. 2445), Isoamylalkohol zur Analyse ($C_5H_{12}O$), (Fa. Merck, Darmstadt, Art. 979)
7. Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol 25:24:1 (Roti®-Phenol/ Chloroform), (Fa. Roth, Karlsruhe, Art. A 156)
8. Isopropanol (2-Propanol zur Analyse/ Isopropylalkohol), (Fa. Merck, Darmstadt, Art. 9634)
9. Ethanol absolut zur Analyse (Fa. Merck, Darmstadt, Art. 983)
10. Glaskügelchen für die Behandlung der Proben im Ultraschallbad (acid-washed glass beads), (Fa. Sigma, Deisenhofen, Art. G-4649)
11. High Pure PCR Template Preparation Kit (Fa. Roche Applied Science, Mannheim, Art. 11 796 828 001)
12. Tissue-Tücher (Fa. Roth, Karlsruhe, Art. 0087)

Material und Methoden

Für die PCR:

1. Puffer
 - a. F511 10 x Puffer mit $MgCl_2$, für DyNAzyme® DNA Polymerase (1 x enthält 10 mM Tris-HCl, pH 8,8 bei 25°C, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl und 0,1 % Triton X-100), (Fa. Finnzymes, Espoo, Finnland)
 - b. GeneAmp® 10 x Puffer II ohne $MgCl_2$, für AmpliTaq Gold® (1 x enthält 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl), (Fa. Roche, Mannheim)
2. $MgCl_2$ -Lösung, 25 mM (Fa. Roche, Mannheim)
3. Polymerase
 - a. F-500L DyNAzyme® I DNA Polymerase, 2 U/ μ l (Fa. Finnzymes, Espoo, Finnland)
 - b. AmpliTaq-Gold®, 5 U/ μ l (Fa. Roche, Mannheim)
4. Nukleotide, F-560L dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP je 10 mM), (Fa. Finnzymes, Espoo, Finnland)
5. Primer (Oligonukleotide), 100 μ M, hergestellt von Fa. MWG Biotech, Göttingen
6. Mineralöl (Fa. Sigma, Deisenhofen, Art. M-5904)

Zur Gelelektrophorese:

1. TBE-Stammlösung (Tris-Borat-EDTA, 10 x), bestehend aus
 - a. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 0,9 M ($C_4H_{11}NO_3$), Tris Ultra Qualität (Fa. Roth, Karlsruhe, Art. 5429)
 - b. Borsäure 0,9 M (H_3BO_3), Pufferan® (Fa. Roth, Karlsruhe, Art. 6943)
 - c. Na-EDTA 0,25 M (Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat), Titriplex® III zur Analyse (Fa. Merck, Darmstadt, Art. 8418)(10 x TBE: 109 g Tris + 55,6 g Borsäure + 9,3 g EDTA ad 1.000 ml A. bidest.)
2. Agarose SERVA für DNA-Elektrophorese (Fa. Feinbiochemica, Heidelberg, Art. 11404)
3. Bromphenolblau (BPB), (Fa. Merck, Darmstadt, Art. 8122)
4. DNA Molecular Weight Marker VI (0,15-2,1 kbp, 0,25 μ g/ μ l), (Fa. Boehringer, Mannheim, Art. 1062 590)
5. Ethidiumbromid (Fa. Sigma, Deisenhofen, Art. E-8751)

3.1.4 Arbeitsgeräte und Labormaterial

1. Brutschrank Heraeus BK 5060 E, 37°C (Fa. Heraeus , Hanau)
2. Arbeitstisch „Lamina“ Mod. HF 48 (Fa. Gelaire Flow Laboratories, Gruppo Flow s.p.a., Opera, Italien)
3. Wasserbäder
 - a. Typ 3047 (Fa. Köttermann, Uetze-Hänigsen)
 - b. GFL 1083 (Fa. GFL, Burgwedel)
4. Tischzentrifuge „Centrifuge 5415 C“ (Fa. Eppendorf, Hamburg, Art. 5415 26315)
5. Reagenzglasschüttler Vibrofix Typ VF 1 Electronic (Fa. Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Art. 516 431)
6. Blockthermostat BT 200 (Fa. Kleinfeld Labortechnik)
7. Ultraschallbad Sonorex Digital 10 P
8. Schwingmühle (Fa Retsch, Haan, Art. MM 200)
9. Thermocycler Biometra TRIO-Thermoblock (Fa. Biotron, Göttingen)
10. Gelkammer (Fa. Biotec-Fischer, Reiskirchen, Art. PHE 414)
11. Biometra Power Pack P25 (Fa. Biotron, Göttingen)
12. Horizontalschüttler
13. Transilluminator UV IS-20 (Fa. Pharmacia Biotech)
14. Video Copy Processor, Model P68E (Fa. Intas/ Mitsubishi)
15. Reprorativ mit Kammerschraube (Fa. Hama, Art. 6220)
16. Eppendorf-Reagenzgefäße 1,5 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg, Art. 0030 120.086)
17. PCR-Reagenzgefäße 0,5 ml, PCR-Softtubes (Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf, Art. 711 098)
18. Verschiedene Pipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg)
19. Pipettenspitzen (allgemeiner Gebrauch)
 - a. 101-1.000 µl (Fa. Eppendorf, Hamburg, Art. 0030 015.002 und Fa. Sterilin, Staffordshire, England, Art. BCT 70)
 - b. 5-100 µl (Fa. Eppendorf, Hamburg, Art. 0030 003.004 und Fa. Sterilin, Staffordshire, England, Art. BCT 30)
 - c. 0,5-10 µl (Fa. Eppendorf, Hamburg, Art. 0030 001.168 und Fa. Sterilin, Staffordshire, Art. BCT 20)
20. Pipettenspitzen (speziell für den PCR-Ansatz)
 - a. 1.000 µl SafeSeal-Tips® (Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf, Art. 692 079)
 - b. 100 µl SafeSeal-Tips® (Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf, Art. 692 066)
 - c. 10 µl SafeSeal-Tips® (Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf, Art. 692 150)

21. Kühlboxen „IsoTherm-System“

- a. für 24 Reagenzgefäße à 1,5 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg, Art. 3880 001.018)
- b. für 24 Reagenzgefäße à 0,5 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg, Art. 3880 000.011)

3.2 Untersuchungsablauf

3.2.1 Untersuchungsschema

Die Untersuchungen wurden eingeteilt in einen Vorversuch und einen zweigeteilten Hauptversuch.

Im Vorversuch wurden die in der Literatur beschriebenen Primer und PCR-Bedingungen anhand der dort beschriebenen Protokolle überprüft. Im Hauptversuch wurden die Nachweisgrenzen beim Einsatz verschiedener Aufarbeitungsmethoden und Primer ermittelt. Im ersten Abschnitt (Teil A) wurde mit Reinkulturen gearbeitet, im zweiten Abschnitt (Teil B) erfolgte die Prüfung unter Zugabe von Lymphknotenmaterial.

3.2.1.1 Vorversuch: Überprüfung der in der Literatur beschriebenen PCR-Protokolle

In diesem Abschnitt wurde, im Gegensatz zu den beiden Teilen des Hauptversuchs, als alleinige DNA-Extraktionsmethode die Kochmethode eingesetzt. Mit jedem der insgesamt 10 eingesetzten Primerpaare wurde eine PCR mit den sechs vorhandenen Stämmen durchgeführt. Die PCR-Bedingungen entsprachen dabei denen der angegebenen Quellen. Wurde ein annehmbares Ergebnis hinsichtlich der Qualität des UV-Bildes erreicht (deutliche Darstellung von nur einer Bande mit der erwarteten Amplifikat-Länge, keine Fehlamplikate), wurde eine zweite PCR unter gleichen Bedingungen zur Ergebnisbestätigung durchgeführt.

Die in der Literatur angegebenen PCR-Bedingungen erbrachten bei allen Primern zufriedenstellende Ergebnisse, so dass keine Änderungen im Protokoll (z.B. Erhöhung der Zyklenzahl oder Temperaturanpassungen) notwendig wurden.

Die im Vorversuch getesteten und verifizierten PCR-Bedingungen stellten die Grundlage für die Teile A und B dar und sind in den Tabellen 3.5, 3.6 und 3.7 dieses Kapitels niedergelegt.

3.2.1.2 Hauptversuch (Teil A): Vorgehen zur Ermittlung der Nachweisgrenzen bei Verwendung von Reinkulturen

Von den sechs getesteten Stämmen wurden je drei Ansätze für die Untersuchungen der Teile A und B durchgeführt.

a) Herstellen von dezimalen Verdünnungsreihen

Jeweils ausgehend von einer gut bewachsenen Bouillonkultur (Middlebrook 7H9-Bouillon, ca. 3-4 Wochen aerobes Wachstum bei 37°C) wurden dezimale Verdünnungsreihen in NaCl-Pepton-Röhrchen bis zur 7. Verdünnungsstufe angefertigt. Von jedem Verdünnungsansatz wurde die Gesamtkeimzahl mittels Spatelverfahren ermittelt.

Für die weitere Bearbeitung wurden aus jedem Verdünnungsröhrchen je 1 ml Flüssigkeit in sechs Eppendorf-Reagenzgefäße überführt (für je drei DNA-Aufarbeitungsmethoden in den Teilen A und B) und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

b) Berechnung der Gesamtkeimzahl (GKZ/ ml)

Ab der 4. Verdünnungsstufe wurden im Doppelansatz 0,1 ml Flüssigkeit auf Middlebrook 7H10-Platten ausgespatelt. Die Bebrütung der Platten erfolgte aerob bei 37°C, wobei die Petrischalen zwischen zwei sterilen Metalltablets auf feuchte Papiertücher gestellt wurden. Die Tücher wurden alle zwei bis drei Tage mit sterilem A. bidest. erneut befeuchtet, wodurch eine Austrocknung der Platten während der langen Bebrütungsdauer verhindert werden konnte. Diese lag, abhängig von der Bakterienspezies, zwischen 13 und 21 Tagen (Tab. 4.1). Sobald die Kolonien gut sichtbar gewachsen waren, wurden die Kolonien ausgezählt und die Gesamtkeimzahl pro ml mit folgender Formel bestimmt:

$$c = \frac{\sum c}{n_1 * 1 + n_2 * 0,1} * d * s$$

c	=	Anzahl der koloniebildenden Einheiten je ml
$\sum c$	=	Summe der Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen wurden
n_1	=	Anzahl der Petrischalen der niedrigsten Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen wurden
n_2	=	Anzahl der Petrischalen der nächst höheren Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen wurden
d	=	Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe
s	=	10 (Spatelfaktor)

Die Wachstumszeiten, Koloniezahlen und Gesamtkeimzahlen sind in Kapitel 4.1 aufgeführt. Zur Sicherstellung des Vorliegens von Reinkulturen wurde die Koloniemorphologie begutachtet und das Vorhandensein von säurefesten Stäbchen mit Hilfe der Ziehl-Neelsen-Färbung (Durchführung s. Anhang) überprüft.

c) Durchführung der PCR

Die DNA der Bakterien jeder Verdünnungsreihe wurde mit Hilfe der drei Zellaufschlussverfahren Kochen, Chloroform/ Phenol-Extraktion und Ultraschall mit Kochen (Beschreibungen s. Kapitel 3.2.2) freigesetzt. Die drei Ansätze der einzelnen Stämme wurden dann mit den passenden Primerpaaren (Tab. 4.4) einer PCR unterzogen.

3.2.1.3 Hauptversuch (Teil B): Vorgehen zur Ermittlung der Nachweisgrenzen bei Vorhandensein von Lymphknotenmatrix

Im zweiten Teilabschnitt erfolgte eine Vermischung der Bakterienverdünnungen mit Lymphknotenmaterial (gespikte Proben, Kniekehlymphknoten vom Schwein). Die Verdünnungen entsprachen denen aus Teil A, so dass eine erneute Keimzahlbestimmung nicht erforderlich war. Verwendet wurden jeweils die unverdünnte Bouillon sowie die Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-4} . Zur Untersuchung gelangten bei Teil B lediglich die Stämme *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis* und *M. intracellulare*, da diese drei Vertreter den Hauptteil der Infektionen beim Schwein ausmachen.

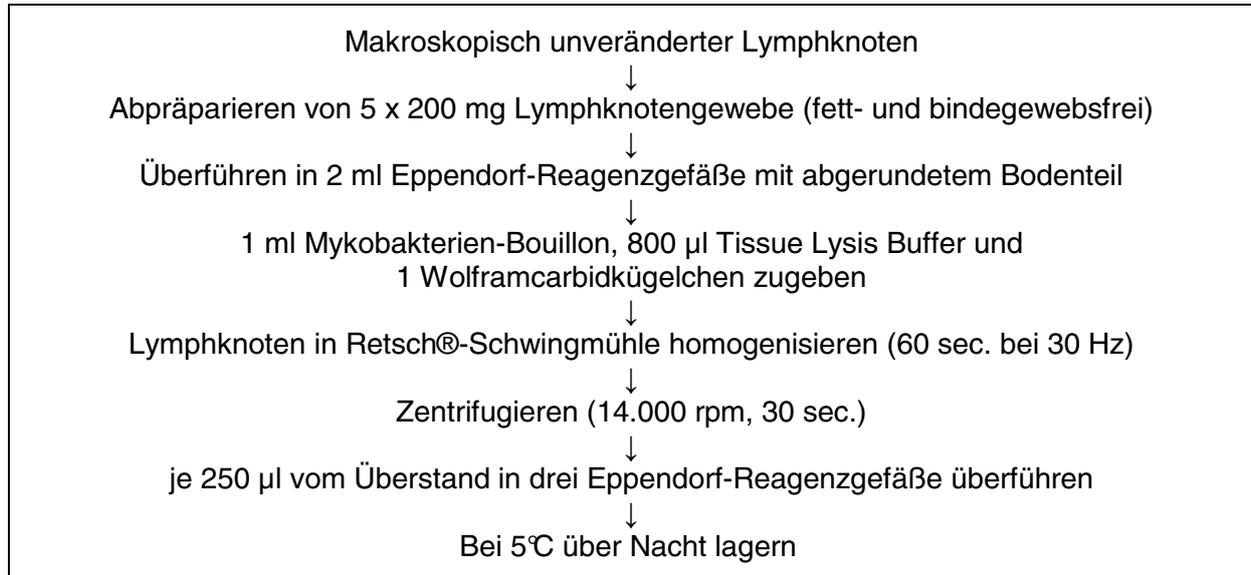
a) Behandlung der Lymphknoten

Bei den Lymphknoten handelte es sich um makroskopisch nicht veränderte Kniekehlymphknoten (*Ln. popliteus*) von Schlachtschweinen. Für jede Verdünnungsreihe wurde ein Lymphknoten verwendet. Mit Hilfe von sterilem Werkzeug (Scheren, Pinzetten) wurde für jede Verdünnungsstufe 200 mg Lymphknotengewebe in ein 2 ml Eppendorf-Reagenzgefäß mit abgerundetem Bodenteil überführt. Fett und umliegendes Bindegewebe wurden entfernt. Zu jeder Probe wurden 1 ml der Mykobakterien-Bouillon, 800 µl Tissue Lysis Buffer (im High Pure PCR Template Preparation Kit enthalten) sowie ein Wolframcarbid-Kügelchen gegeben. Anschließend wurden die Eppendorf-Reagenzgefäße in die Retsch®-Schwingmühle eingesetzt und darin 60 sec. mit einer Frequenz von 30 Hz geschüttelt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 30 sec. Jeweils 250 µl des Überstandes wurden in drei 1,5

Material und Methoden

ml Eppendorf-Reagenzgefäße überführt (für je drei DNA-Aufarbeitungsmethoden) und bei 5°C über Nacht gelagert (Abbildung 3.1). Diese Form der Aufarbeitung entspricht der Vorgehensweise von SEITERT (2003).

Abbildung 3.1 Aufarbeitung der Lymphknoten



b) Durchführung der PCR

Wie in Teil A wurde auch hier die Bakterien-DNA jeder Verdünnungsreihe mit Hilfe von drei Zellaufschlussverfahren freigesetzt: Kochen, Chloroform/ Phenol-Extraktion und PCR-Extraktionskit (Beschreibungen s. Kapitel 3.2.2). Daraufhin erfolgte die PCR jeden Ansatzes mit den passenden Primerpaaren.

In Tabelle 3.2 sind die drei verschiedenen Untersuchungsabläufe im Vergleich dargestellt.

Material und Methoden

Tabelle 3.2 Untersuchungsschema

	Vorversuch	Hauptversuch	
		Teil A	Teil B
Ausgangsmaterial	1 ml Bouillon, 1 Ansatz je Stamm	1 ml Bouillon, 3 Ansätze je Stamm	1 ml Bouillon + Lymphknoten, 3 Ansätze je Stamm
Verwendete Stämme	6 <i>M. intracellulare</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> <i>M. triviale</i> <i>M. scrofulaceum</i>	6 <i>M. intracellulare</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> <i>M. triviale</i> <i>M. scrofulaceum</i>	3 <i>M. intracellulare</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
Aufarbeitung des Ausgangsmaterials	Keine (unverdünnte Bouillon)	Dekadische Verdünnungsreihen bis 10 ⁻⁷	Präparation der Lymphknoten, Einmischen der Verdünnungsreihen bis 10 ⁻⁴
DNA-Extraktion	Kochen	Kochen Chloroform/ Phenol Ultraschall + Kochen	Kochen Chloroform/ Phenol DNA-Kit
PCR	10 Primer je Ansatz	10 Primer je Ansatz	10 Primer je Ansatz

3.2.2 Methoden der DNA-Freisetzung

Als Ausgangspunkt für die DNA-Isolierung diente immer eine Middlebrook 7H9-Bouillonkultur. Nach gründlicher Durchmischung mittels eines Reagenzglasschüttlers wurde 1 ml Bouillon in ein Eppendorfgesäß überführt.

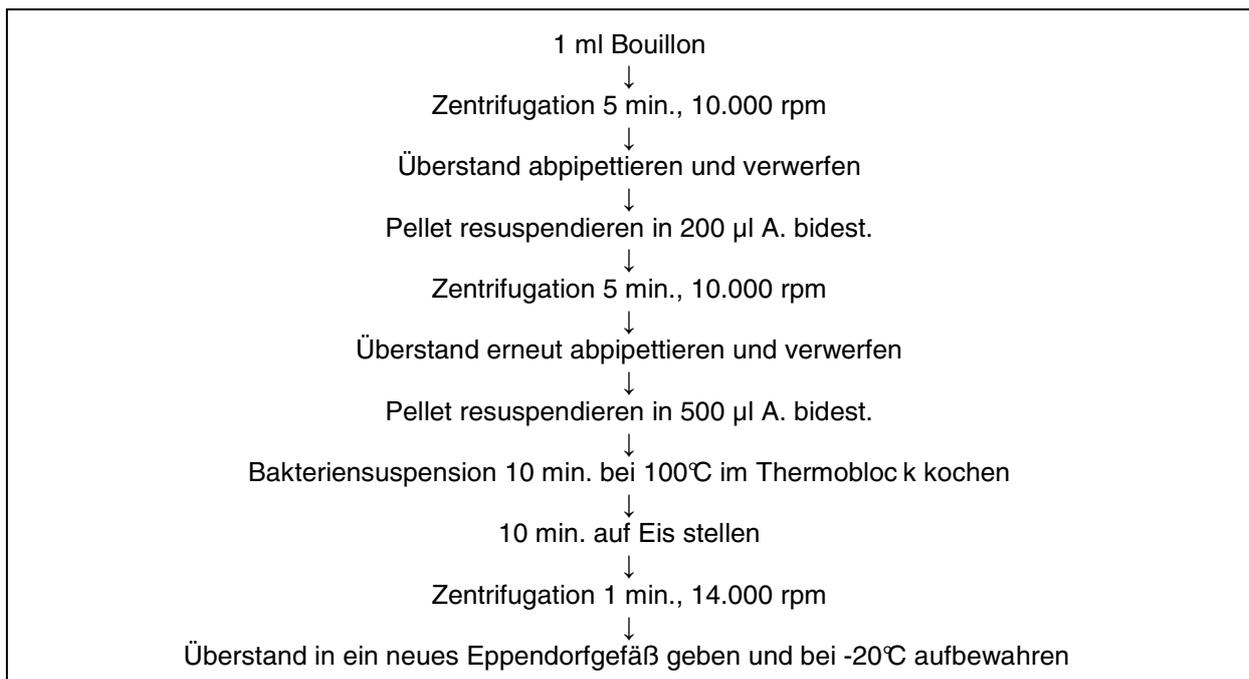
Im Verlauf der Untersuchungen wurden insgesamt vier Methoden der DNA-Isolierung angewendet, jeweils drei in Teil A (Kochen, Chloroform/ Phenol und Ultraschall + Kochen) und drei in Teil B (Kochen, Chloroform/ Phenol und DNA-Kit).

3.2.2.1 Kochen

Hierbei handelt es sich um eine allgemein gängige Methode, die in vielen Arbeiten in Variationen und ohne Quellenangabe eingesetzt wird:

1 ml Bouillonkultur wurde bei 10.000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abpipettiert und verworfen, das zurückbleibende Pellet wurde in 200 µl A. bidest. resuspendiert. Nach einer zweiten Zentrifugation (10.000 rpm für 5 min.) wurde der Überstand erneut abpipettiert und verworfen, das Pellet wurde diesmal in 500 µl A. bidest. resuspendiert. Zur Zerstörung der Bakterien wurde die Suspension dann für 10 min. bei 100°C im Thermoblock gekocht und anschließend für 10 min. in einen vorgekühlten Eisblock gestellt. Es folgte eine Zentrifugation für 1 min. bei 14.000 rpm. Der Überstand mit der darin enthaltenen DNA wurde mit Hilfe einer Pipette in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Die Lagerung der DNA erfolgte bis zum Gebrauch für die PCR bei -20°C im Gefrierschrank (Abbildung 3.2). Die Kochmethode wurde bei allen drei Untersuchungsabschnitten eingesetzt.

Abbildung 3.2 Fließschema Kochen (eingesetzt im Vorversuch und in den Teilen A und B)



3.2.2.2 Chloroform/ Phenol-Extraktion

Diese Art der DNA-Isolierung erfolgte nach MOORE (1990):

1 ml Bouillonkultur wurden im Eppendorf-Reagenzgefäß bei 10.000 rpm 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das verbleibende Pellet in 567 µl TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl SDS-Lösung (10 %) und 3 µl Proteinase-K-Lösung (20 mg/ ml) wurde dieser Ansatz 1 h bei 37°C im Wasserbad zwecks Lysierung der Bakterienzellen und DNA-Freisetzung inkubiert. Zur Vervollständigung der Lysis wurden 100 µl NaCl-Lösung (5 M) und 80 µl CTAB-Lösung zugefügt und nach gründlicher Durchmischung durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipettenspitze für weitere 10 min. im Wasserbad bei 65°C inkubiert.

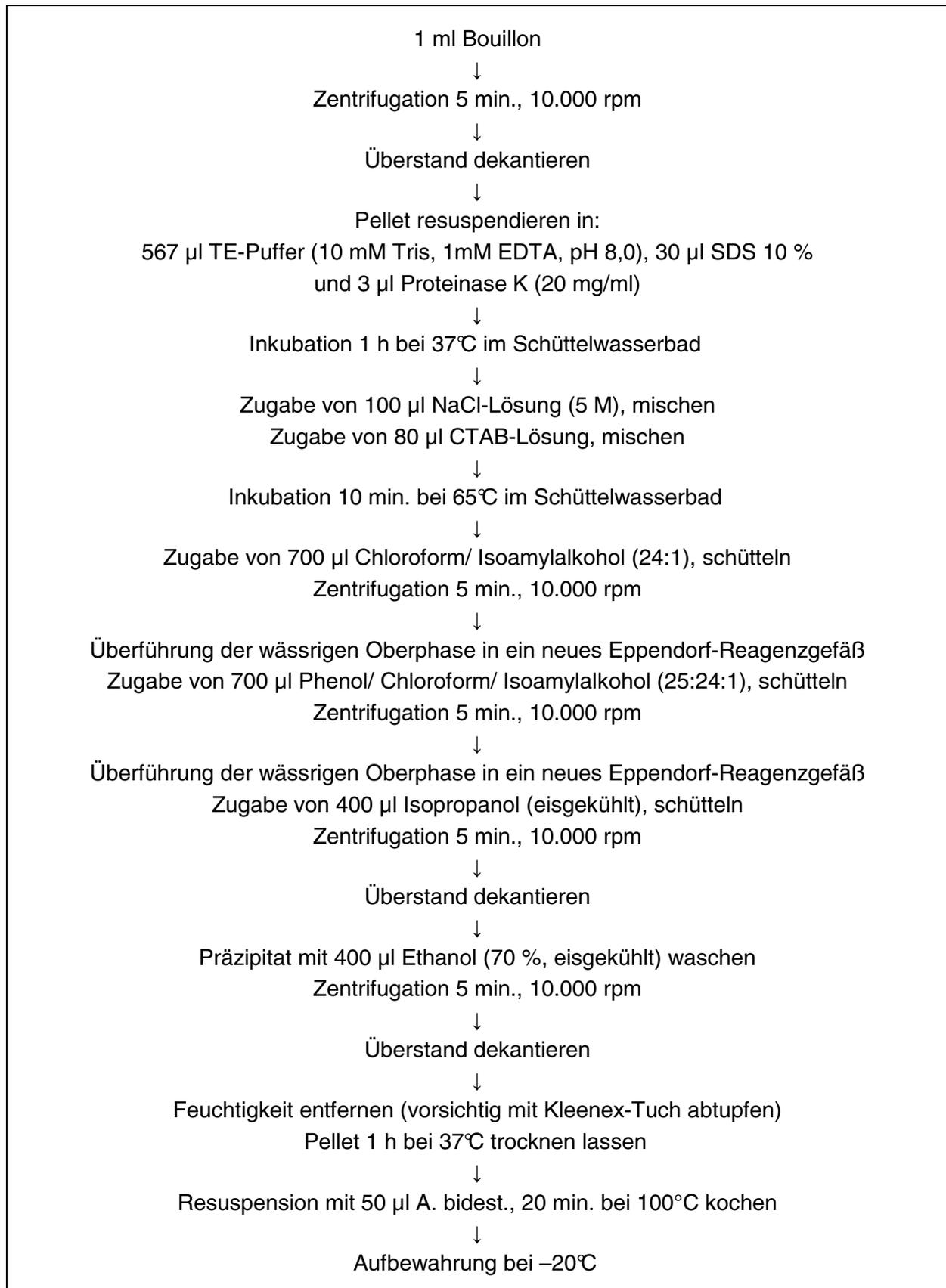
Nach Zugabe von 700 µl Chloroform/ Isoamylalkohol-Mischung (24:1) und kurzer manueller Schüttlung wurde der Ansatz bei 10.000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde anschließend vorsichtig mit Hilfe einer Pipette ohne Berührung der mittleren und unteren Phase in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt. Nach Zugabe von 700 µl Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) und manueller Aufschüttelung wurde erneut für 5 min. bei 10.000 rpm zentrifugiert und danach die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt. Die Arbeiten mit Beteiligung von Chloroform-Lösungen erfolgten unter dem Abzug.

Nach Zugabe von 400 µl Isopropanol wurde erneut 5 min. bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das hierbei entstandene Pellet wurde mit 400 µl eisgekühlter 70%iger Ethanollösung resuspendiert und der Überstand nach erneuter Zentrifugation (5 min. bei 10.000 rpm) dekantiert. Verbliebene Flüssigkeitsreste wurden mit Hilfe von Kleenex-Tüchern vorsichtig entfernt und das Pellet bei 37°C 1 h im Brutschrank getrocknet. Nach Resuspension des Pellets mit 50 µl A. bidest. wurde die DNA-Lösung 20 min. im Wasserbad gekocht und anschließend bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt (Abbildung 3.3).

Diese Art der DNA-Aufarbeitung kam in den Untersuchungsteilen A und B zum Einsatz.

Material und Methoden

Abbildung 3.3 Fließschema Chloroform/ Phenol-Extraktion (eingesetzt in den Teilen A und B)

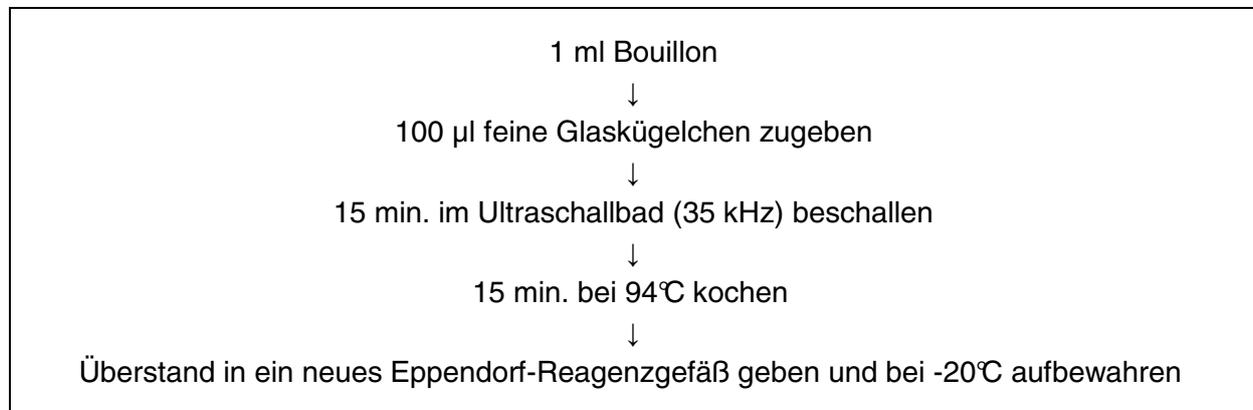


3.2.2.3 Ultraschallbehandlung mit anschließendem Kochen

Die dritte DNA-Aufarbeitungsmethode folgte den Angaben von ROTH et al. (1998) und wurde nur im Untersuchungsteil A eingesetzt:

Zu der Bouillonkultur (1 ml) wurden ca. 100 µl feine Glaskügelchen gegeben. Die Eppendorf-Reagenzgefäße wurden in ein Ultraschallbad eingesetzt und für 15 min. mit voller Leistung bei einer Wellenlänge von 35 kHz beschallt. Anschließend wurde das Gemisch 15 min. bei 94°C gekocht. Die sich im Überstand befindende DNA wurde in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt und bei -20°C im Gefrierschr ank aufbewahrt (Abbildung 3.4).

Abbildung 3.4 Fließschema Ultraschall und Kochen (eingesetzt in Teil A)



3.2.2.4 High Pure PCR Template Kit

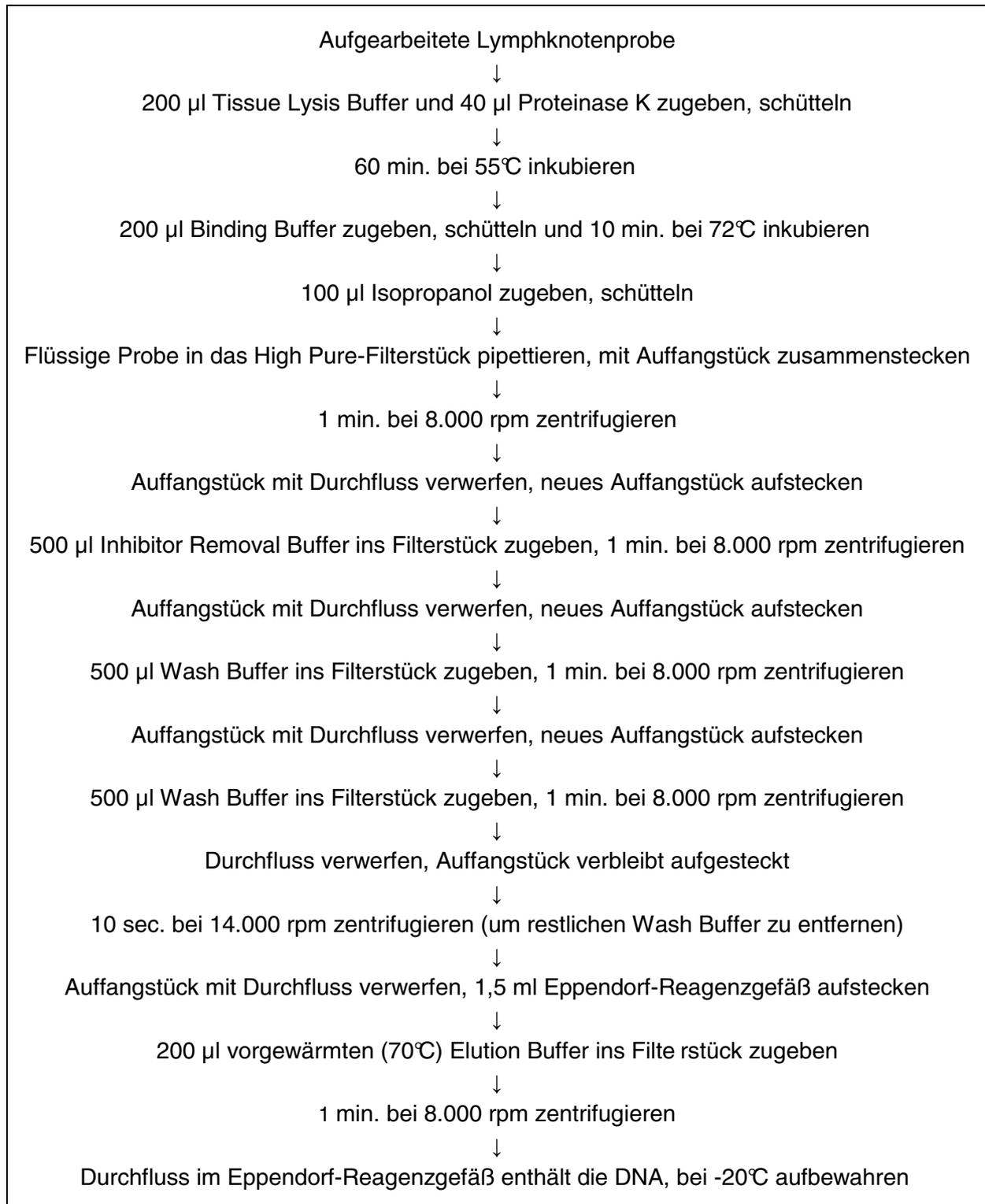
Bei der vierten DNA-Extraktionsmethode handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Kit der Fa. Roche Applied Science (High Pure PCR Template Preparation Kit).

Zur aufgearbeiteten Lymphknotenprobe (Beschreibung s. Kapitel 3.2.1.3) wurden 200 µl Tissue Lysis Buffer und 40 µl Proteinase K zum Zellverbau zugegeben und das Gemisch 60 min. bei 55°C erwärmt. Anschließend erfolgte nach Zugabe von 200 µl Binding Buffer und manueller Schüttelung eine 10-minütige Erhitzung bei 72°C. Danach wurden 100 µl Isopropanol zum Ansatz gegeben und die flüssige Probe in ein im Kit enthaltenes Filterstück überführt. Es folgten vier Zentrifugationsschritte (jeweils 1 min. bei 8.000 rpm), nach denen 500 µl Inhibitor Removal Buffer bzw. zwei Mal 500 µl Wash Buffer ins Filterstück gegeben wurden. Der beim Zentrifugieren anfallende Durchfluss wurde jeweils verworfen. Nach einer kurzzeitigen Zentrifugation (10 sec.) bei 14.000 rpm zum Entfernen von restlichem Wash Buffer wurden 200 µl vorgewärmter Elution Buffer (70°C) ins Filterstück gegeben, und die sich darin befindende DNA durch Zentrifugation für 1 min. bei 8.000 rpm in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt. Bis zur Verwendung wurde die DNA bei -20°C im Gefrier-

Material und Methoden

schränk gelagert. Dieser Ablauf entsprach den Angaben des Herstellers, das DNA-Kit kam ausschließlich in Teil B zum Einsatz (s. Abbildung 3.5).

Abbildung 3.5 Fließschema High Pure PCR Template Preparation Kit (Fa. Roche Applied Science, eingesetzt in Teil B)



3.2.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.3.1 Durchführung der PCR (allgemein)

a) Vorbereiten des PCR-Arbeitsplatzes

Vor Beginn der PCR wurde eine mindestens 30-minütige UV-Bestrahlung des Arbeitstisches mit allen bereit gestellten Arbeitsmaterialien (sterile Reagenzgefäße, Pipettenspitzen [Filtertips], PCR-Reagenzgefäße, Isolierbehälter für Kühlblöcke und dazugehörige Reagenzgefäßständer) durchgeführt. Die automatischen Pipetten wurden bereitgestellt (wegen Gefahr der Kunststoffschädigung nicht UV-bestrahlt). Alle Verbrauchsmaterialien mussten steril vorbereitet sein: Bidestilliertes Wasser, steril filtriert, Polymerase-Puffer, ggf. $MgCl_2$ -Lösung, Nucleotide, Primer (alles in kleiner, für die anstehende Untersuchung ausreichender Menge auf Eis), Polymerase (permanent auf Eis gehalten) und Mineralöl.

b) Vorbereiten des Thermocyclers

Programmieren des Thermocyclers: Eingabe des primerspezifischen Temperaturprogramms. Das gewünschte Programm wurde gestartet und nach Hochheizen auf 94/ 95°C pausiert, um die fertigen Ansätze später in den heißen Thermoblock setzen zu können.

c) Bereitstellen der Materialien

Bei diesen Arbeiten wurden Einweg-Handschuhe verwendet und ein Kittel, der nur im PCR-Labor getragen wurde. Den benötigten Reagenzien, die in einem Kühlblock bereitstanden, wurden noch ein Reagenzgefäß mit sterilem, bidestilliertem Wasser und ein leeres Reagenzgefäß (1,5 ml) für den Mastermix zugefügt. Die benötigten PCR-Reagenzgefäße für Proben, Positivkontrolle und Leerwert wurden vorbereitet. Dazu wurden so viele PCR-Reagenzgefäße wie nötig mit einer sterilen Pinzette aus dem Vorratsbehälter genommen, verschlossen im Reagenzgefäßständer platziert und beschriftet (Datum des Ansatzes, Primerbezeichnung, Proben- und Kontrollbezeichnung). Danach wurden die Reagenzgefäße zum Vorkühlen in einen Kühlblock gegeben.

d) Pipettieren des Reaktionsansatzes

Die Reagenzien wurden aufgetaut und im Kühlblock (0°C) kalt gehalten. In der angegebenen Reihenfolge wurden die einzelnen Reaktionskomponenten im Mastermix (= Mix aus allen Reagenzien ohne DNA in der für die vorgesehene Probenanzahl benötigten Menge) zu-

sammen pipettiert und mit einer Pipettenspitze sorgfältig gemischt: A. bidest., Polymerase-Puffer, evtl. MgCl₂ (bei Einsatz von Mg²⁺-freiem Puffer), dNTP, Forward und Reverse Primer und schließlich die Polymerase. Der Mastermix wurde auf die PCR-Reagenzgefäße verteilt (Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes minus Template-DNA), pro PCR-Reagenzgefäß 22,5 µl. Von der Template-DNA wurden 2,5 µl zugegeben (Proben-, Kontroll-DNA bzw. A. bidest. beim Leerwert). Zum Abschluss wurde auf jede Probe ein Tropfen Mineralöl geträufelt.

e) Amplifizieren der DNA

Die PCR-Reagenzgefäße wurden in den Heizblock des Thermocyclers gesetzt, fest hineingedrückt und es wurde kontrolliert, ob alle Deckel verschlossen sind. Das vorab gestartete und unterbrochene Programm wurde fortgesetzt. Das eingestellte Temperaturprogramm wurde durchlaufen, der letzte Programmschritt hielt den Ansatz konstant bei 4°C, der Aufbewahrungstemperatur bis zur Gelelektrophorese.

3.2.3.2 Primerabhängige PCR-Bedingungen

Alle PCR-Bedingungen (Mengen der PCR-Komponenten, Temperaturabfolge) entsprachen den Literaturangaben. Die PCR-Bedingungen (Reaktionskomponenten, Temperaturprogramm) waren abhängig vom jeweils eingesetzten Primerpaar. In Tabelle 3.3 sind die verwendeten Primer und ihre wichtigsten Eigenschaften aufgeführt, Tabelle 3.4 zeigt die entsprechende Basensequenz. Hergestellt wurden die Primer von der Fa. MWG Biotech, Ebersberg.

Tabelle 3.3 Eigenschaften der verwendeten Primer

Primername	Amplifikatlänge (bp)	DNA-Ansatzstelle	nachgewiesenes Taxon	Quellen
Mycob	978	16S rRNA	14 <i>M. sp.</i>	CHEN et al. (1996)
Mav	1.268	16S rRNA	<i>M. avium</i> subsp.	
Min	1.279	16S rRNA	<i>M. intracellulare</i>	
AV 6 / 7	187	DT 6	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	THIERRY et al. (1993)
IN 38 / 41	666	DT 1	<i>M. intracellulare</i>	
S + P	413	16S rRNA	<i>M. avium</i> subsp.	VAN DER GIESSEN et al. (1993)
IS 901	257	IS 901	<i>M. avium</i> subsp.	ELLINGSON et al. (2000)
IS 1245	427	IS 1245		
Maap	193	16S rRNA		
IS 902	252	IS 902	<i>M. avium</i> subsp.	MOSS et al. (1992)

Material und Methoden

Tabelle 3.4 Basenabfolge der verwendeten Primer

Primername	Basenabfolge
Mycob	5'-ATG CAA GTC GAA CGG AAA GG-3' 5'-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA-3'
Mav	5'-CCT CAA GAC GCA TGT CTT CT-3' 5'-ACA GCT CCC TCC CAA AAG GG-3'
Min	5'-CCT TTA GGC GCA TGT CTT TA-3' 5'-GCA CAG CTC CCT CCC AAG GG-3'
AV 6 / 7	5'-ATG GCC GGG AGA CGA TCT ATG CCG GCG TAC-3' 5'-CGT TCG ATC GCA GTT TGT GCA GCG CGT ACA-3'
IN 38 / 41	5'-GAA CGC CCG TTG GCT GGC CAT TCA CGA AGG AG-3' 5'-GCG CAA CAC GGT CGG ACA GGC CTT CCT CGA-3'
S + P	5'-GTC GAA CGG AAA GGC CT-3' 5'-CCG AGA AAA CCC GGA C-3'
IS 901	5'-AAG CCG AGG TGG TGT ATG T-3' 5'-AGG GAA GAT GGC GGT GCG CAT-3'
IS 1245	5'-GCC GCC GAA ACG ATC TAC-3' 5'-AGG TGG CGT CGA GGA AGA C-3'
Maap	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' 5'-ACC AGA AGA CAT GCG TCT TG-3'
IS 902	5'-CTG ATT GAG ATC TGA CGC-3' 5'-TTA GCA ATC CGG CCG CCC T-3'

A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

Die Komponenten für einen Reaktionsansatz sind in Tabelle 3.5 angegeben. Das Ansatzvolumen betrug immer 25 µl. Abzüglich der konstanten DNA-Menge von 2,5 µl verblieben für die restlichen PCR-Komponenten 22,5 µl. Die Mengen für einen Ansatz sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.5 Komponenten für einen Reaktionsansatz

Primer	Polymerase	Puffer	Mg ²⁺ -Konz.	dNTP-Konz.	Primer-Menge	Polymerase-Menge
Mycob Mav Min	DyNAzyme®	F-511, 10 x Puffer, mit MgCl ₂	1,5 mM	160 µM	1,6 µM	0,6 U
AV 6 / 7 IN 38 / 41	DyNAzyme®	F-511, 10 x Puffer, mit MgCl ₂	1,5 mM	200 µM	2,0 µM	1 U
S + P	DyNAzyme®	F-511, 10 x Puffer, mit MgCl ₂	1,5 mM	200 µM	1,0 µM	0,6 U
IS 901 IS 1245 Maap	Ampli Taq Gold®	GeneAmp®, 10 x Puffer, ohne MgCl ₂	1,5 mM	200 µM	0,4 µM	0,6 U
IS 902	Ampli Taq Gold®	GeneAmp®, 10 x Puffer, ohne MgCl ₂	1,5 mM	200 µM	1,2 µM	1 U

Material und Methoden

Tabelle 3.6 Mengen für einen Reaktionsansatz [μl], Gesamtvolumen 25 μl

Primer	Aqua bidest.	Polym.-Puffer	25 mM Mg^{2+}	10 mM dNTP	Forward Primer	Reverse Primer	Polymerase	Template-DNA
Mycob Mav Min	18,5	2,5	-	0,4	0,4	0,4	0,3	2,5
AV 6 / 7 IN 38 / 41	18,0	2,5	-	0,5	0,5	0,5	0,5	2,5
S + P	18,7	2,5	-	0,5	0,25	0,25	0,3	2,5
IS 901 IS 1245 Maap	15,9	2,5	2,5	0,5	0,5	0,5	0,12	2,5
IS 902	16,2	2,5	2,5	0,5	0,3	0,3	0,2	2,5

Auch das Temperaturprogramm war abhängig vom eingesetzten Primerpaar (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7 Temperaturprogramm

Primer	Initiale Denaturierung	Zyklusanzahl	Denaturierung	Annealing	Extension	Finale Extension	Kühlung
Mycob Mav Min	95°C 10 min.	40	94°C 1 min.	55°C 2 min.	72°C 3 min.	72°C 6 min.	4°C
AV 6 / 7 IN 38 / 41	95°C 10 min.	30	94 °C 1 min.	60°C 1 min.	72°C 1 min.	-	4°C
S + P	95°C 10 min.	35	95°C 1 min.	58°C 2 min.	72°C 3 min.	-	4°C
IS 901 IS 1245 Maap	94°C 10 min.	35	94°C 1 min.	65°C 15 sec.	72°C 2 min.	72°C 10 min.	4°C
IS 902	95°C 10 min.	35	94°C 1 min.	58°C 1 min.	72°C 3 min.	-	4°C

3.2.3.3 Gelelektrophorese

a) Vorbereiten des Gels

Aus einer 10-fach konzentrierten Stammlösung wurde 1 Liter 1 x TBE-Puffer (89 mM Tris und Borsäure, 2 mM EDTA) hergestellt. 1,4 g Agarose wurden in ein 250 ml-Reagenzgefäß eingewogen. Dazu wurden 100 ml 1 x TBE-Puffer gegeben und auf einem Magnetrührer unter Rühren gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Das Reagenzgefäß wurde zum Abkühlen in ein Wasserbad von ca. 55°C gestellt. Während die Agarose abkühlte, wurde die Gelkammer vorbereitet: Der Gelträger wurde in die Kammer eingelegt, die vordere und hintere Begrenzung wurden eingesetzt, die benötigten Kämme (1 oder 2 möglich) bereitgelegt und die Kammer auf eine plane Ebene (Nivelliertisch) gestellt. Mit einer Pipette wurde mit ca. 1 ml Agarose der Übergang zwischen Gelträger und Begrenzung abgedichtet. Die Agarose wurde auf den Gelträger gegossen und sofort der bzw. die Kämme eingesetzt. Das Gel ließ man dann für mindestens 30 Minuten erstarren.

b) Vorbereiten der Proben (PCR-Amplifikate)

Von jeder Probe wurden 8 µl mit 3 µl 6 x BPB- Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau und 40 % Saccharose in A. dest.) gemischt. Der DNA-Längenmarker für 2 Spuren pro Kamm (außen und innen) wurde zusammen pipettiert (750 ng DNA-Längenmarker, 3 µl Ladepuffer und 4 µl A. bidest./ Spur). Das Gel wurde mit 1 x TBE-Laufpuffer übergossen, der Puffer sollte eine Tiefe von ca. 0,5 cm über Gel haben.

c) Laden des Gels

Die Kämme wurden vorsichtig entfernt (die Slots mussten sauber begrenzt sein, der Boden der Slots unversehrt). Die Proben, die durch den Ladepuffer im spezifischen Gewicht schwerer waren als der Laufpuffer, wurden in die Slots pipettiert, wobei die Marker jeweils links und rechts außen angeordnet wurden. Die vordere und hintere Begrenzung des Gelträgers wurden entfernt.

d) Starten der Gelelektrophorese

Der Deckel der Gelkammer wurde aufgesetzt und die daran befindlichen elektrischen Anschlüsse an eine Spannungsquelle (Power Pack) angeschlossen (Plus an Plus- und Minus an Minus-Pol). Die Auftrennung der Proben erfolgte für ca. 60 min. bei konstanter Spannung von 8 V pro cm Elektrodenabstand.

Material und Methoden

e) Färben des Gels

Nach Abstellen der Spannung wurde das Gel mit dem Gelträger der Gelkammer entnommen und in ein Ethidiumbromid-Färbegrad (0,5 µg EtBr/ ml) gelegt. Die Färbung dauerte 20 min. und erfolgte unter leichten Schüttelbewegungen auf einem Horizontalschüttler (40 rpm). Das Gel wurde zum Entfernen von überschüssigem Farbstoff in A. dest. 15 min. entfärbt, ebenfalls bei leichten Schüttelbewegungen.

Beim Arbeiten mit Ethidiumbromid (EtBr) und Gegenständen, die damit in Berührung gekommen sind, ist das Tragen von Nitril-Einweghandschuhen vorgeschrieben (Latex-Handschuhe sind EtBr-durchlässig).

f) Dokumentation

Auf einem Transilluminator wurde das Gel mit UV-Licht (302 nm) durchleuchtet, die blauviolett fluoreszierenden DNA-Fragmente wurden mit einer digitalen Videokamera festgehalten. Die Bilddatei wurde mit dem Untersuchungsdatum bezeichnet (z.B. 040115 für das gespeicherte Gel-Ergebnis vom 15. Januar 2004). Die Dateien wurden auf dem angeschlossenen Netz-PC auf der Festplatte gespeichert und konnten von dort bei Bedarf ausgedruckt werden.

g) Auswertung des PCR-Ergebnisses (Sichtauswertung)

Die Größe des PCR-Amplifikats wurde anhand der Laufstrecke im Gel durch Vergleich mit dem DNA-Längenmarker ermittelt. Entsprach die Größe des PCR-Amplifikats der zu erwartenden Anzahl an Basenpaaren und deckte sich die Laufstrecke des Probenamplifikats mit der des Positivkontroll-Amplifikats, wurde die Probe positiv bewertet.

Tabelle 3.8 zeigt eine Zusammenfassung der Gelelektrophorese.

Tabelle 3.8 Überblick über die eingesetzte Elektrophorese-Technik

Gel	Agarose	Standard, Fa. Serva	Konzentration: 1,4 %
	Laufpuffer	TBE	Konzentration: 1 x
Vorbereitung der Proben	PCR-Amplifikat	-	Menge: 8 µl
	Ladepuffer	6x BPB	Menge: 3 µl
	DNA-Längenmarker	Nr. VI, Fa. Roche	Menge: 7,5 µl
Laufbedingungen	Spannung	-	150 Volt
	Laufzeit	-	60 min.
Färbung	Färben	Ethidiumbromid (0,5 mg/ ml)	20 min.
	Entfärben	A. dest.	15 min.

4 Ergebnisse

4.1 Keimzahlbestimmung der verwendeten Mykobakterien-Bouillonkulturen

Die Keimzahlen der in der PCR eingesetzten Bouillonkulturen wurden, wie in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben, mittels Spatelverfahren ermittelt.

Die Wachstumszeiten betragen je nach Spezies in Bouillon ca. 3-4 Wochen (deutliche Trübung des Flüssigmediums) und auf Festagarplatte ca. 2-3 Wochen (gut auszählbare Kolonien) (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1 Wachstumsdauer der eingesetzten Stämme [d]

Stämme	Ansatz	Wachstum in Bouillon	Wachstum auf Platte
<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	1.	21	18
	2.	22	14
	3.	21	17
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> DSM 44156 ^T	1.	28	18
	2.	29	17
	3.	29	17
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> Feldstämme	1.	28	13
	2.	28	13
	3.	28	13
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> DSM 44175 ^T	1.	29	21
	2.	27	20
	3.	24	20
<i>M. triviale</i> DSM 44153 ^T	1.	29	11
	2.	24	14
	3.	24	14
<i>M. scrofulaceum</i> DSM 43992 ^T	1.	22	13
	2.	20	17
	3.	21	17

Die Koloniezahlen der vier ausgezählten Verdünnungsstufen (10^{-4} bis 10^{-7}) sind aus Tabelle 4.2 zu ersehen (ausgezählte Rohwerte). Zur Berechnung der Keimzahlen wurden zwei Verdünnungsstufen verwendet, bei denen die Koloniezahlen zwischen 1 und 300 lagen.

Bis auf die drei Ansätze von *M. avium* subsp. *silvaticum* war bis zur 4. Verdünnungsstufe Rasenwachstum ausgebildet, bei *M. intracellulare*, *M. avium* subsp. *avium* und *M. avium* subsp. *hominissuis* auch bei der 5. Verdünnungsstufe.

Ergebnisse

Tabelle 4.2 Koloniezahlen pro Verdünnungsstufe

Stämme	An-satz	Verdünnungsstufe			
		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	1.	> 300 / > 300	~250 / ~250	15 / 21	4 / 6
	2.	> 300 / > 300	> 300 / > 300	97 / 123	20 / 22
	3.	> 300 / > 300	> 300 / > 300	135 / 157	12 / 10
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> DSM 44156 ^T	1.	> 300 / > 300	> 300 / > 300	52 / 80	10 / 10
	2.	> 300 / > 300	>300 / >300	60 / 52	9 / 7
	3.	> 300 / > 300	> 300 / > 300	57 / 42	5 / 1
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> Feldstämme	1.	> 300 / > 300	> 300 / > 300	52 / 57	7 / 7
	2.	> 300 / > 300	>300 / >300	27 / 43	2 / 7
	3.	> 300 / > 300	> 300 / > 300	51 / 41	7 / 4
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> DSM 44175 ^T	1.	143 / 141	12 / 14	0 / 0	0 / 0
	2.	54 / 47	4 / 7	1 / 0	0 / 0
	3.	77 / 58	10 / 6	0 / 0	0 / 0
<i>M. triviale</i> DSM 44153 ^T	1.	> 300 / > 300	108 / 86	14 / 12	0 / 0
	2.	> 300 / > 300	88 / 79	11 / 9	1 / 0
	3.	> 300 / > 300	38 / 46	8 / 6	0 / 0
<i>M. scrofulaceum</i> DSM 43992 ^T	1.	> 300 / > 300	186 / 159	12 / 19	2 / 1
	2.	> 300 / > 300	181 / 224	41 / 8	4 / 4
	3.	> 300 / > 300	183 / 194	14 / 18	2 / 1

> 300 = Rasenwachstum oder mehr als 300 Einzelkolonien, nicht ausgezählt

Fett gedruckt = die beiden zur Berechnung herangezogenen Verdünnungsstufen (Koloniezahl zwischen 1 und 300)

In Tabelle 4.3 sind die bei den insgesamt 18 Ansätzen ermittelten Gesamtkeimzahlen in KbE pro ml Bouillon und im dazu gehörenden dekadischen Logarithmus aufgeführt. Die Werte der unverdünnten Ausgangsbouillon lagen zwischen $5,1 \times 10^6$ und $1,4 \times 10^9$ Keimen/ ml.

M. intracellulare wies insgesamt die höchste Keimdichte auf (Mittelwert 8,85 log KbE/ ml), *M. avium* subsp. *silvaticum* wuchs am schlechtesten (Mittelwert 6,90 log KbE/ ml).

Die drei Ansätze der einzelnen Stämme zeigten jeweils ein annähernd gleiches Wachstum: Die Werte lagen bei *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis* und *M. scrofulaceum* im Bereich derselben Zehnerpotenz, bei *M. intracellulare*, *M. avium* subsp. *silvaticum* und *M. triviale* unterschieden sie sich in einer Zehnerpotenz.

Ergebnisse

Tabelle 4.3 Gesamtkeimzahlen [KbE/ ml und KbE log/ ml] der verwendeten Mykobakterien-Verdünnungsreihen

Stamm	1. Ansatz	2. Ansatz	3. Ansatz	Durchschnitt log
<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	2,1 x 10 ⁸ 8,32	1,2 x 10 ⁹ 9,08	1,4 x 10 ⁹ 9,15	8,85
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> DSM 44156 ^T	6,9 x 10 ⁸ 8,84	5,8 x 10 ⁸ 8,76	4,8 x 10 ⁸ 8,68	8,76
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> Feldstämme	5,6 x 10 ⁸ 8,74	3,6 x 10 ⁸ 8,56	4,7 x 10 ⁸ 8,67	8,66
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> DSM 44175 ^T	1,4 x 10 ⁷ 7,15	5,1 x 10 ⁶ 6,71	6,9 x 10 ⁶ 6,84	6,90
<i>M. triviale</i> DSM 44153 ^T	1,0 x 10 ⁸ 8,00	8,5 x 10 ⁷ 7,93	4,5 x 10 ⁷ 7,65	7,86
<i>M. scrofulaceum</i> DSM 43992 ^T	1,7 x 10 ⁸ 8,23	2,1 x 10 ⁸ 8,32	1,9 x 10 ⁸ 8,29	8,28

4.2 Vorversuch: Mögliche Primer-/ Stammkombinationen

Tabelle 4.4 gibt an, welche Stämme sich mit Hilfe der 10 eingesetzten Primerpaare durch die PCR nachweisen ließen. Der Nachweis der Stämme *M. triviale* und *M. scrofulaceum* war nur mit dem genusspezifischen Primer Mycob möglich. Für alle anderen Stämme ergaben sich mehrere Möglichkeiten der Primerauswahl. Die größte Anzahl an passenden Primern besaß mit 8 Möglichkeiten *M. avium* subsp. *avium* (Mycob, Mav, AV 6/7, S+P, IS 901, IS 1245, Maap und IS 902), gefolgt von *M. avium* subsp. *silvaticum* mit 7 und *M. avium* subsp. *hominissuis* mit 6 möglichen Primern.

Tabelle 4.4 Nachweismöglichkeiten der verschiedenen Stämme mit Hilfe der eingesetzten Primer

Stämme \ Primer	Mycob	Mav	Min	AV 6/7	IN 38/41	S + P	IS 901	IS 1245	Maap	IS 902
<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>M. a. avium</i> DSM 44156 ^T	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>M. a. hominissuis</i> Feldstämme	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>M. a. silvaticum</i> DSM 44175 ^T	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>M. triviale</i> DSM 44153 ^T	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. scrofulaceum</i> DSM 43992 ^T	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

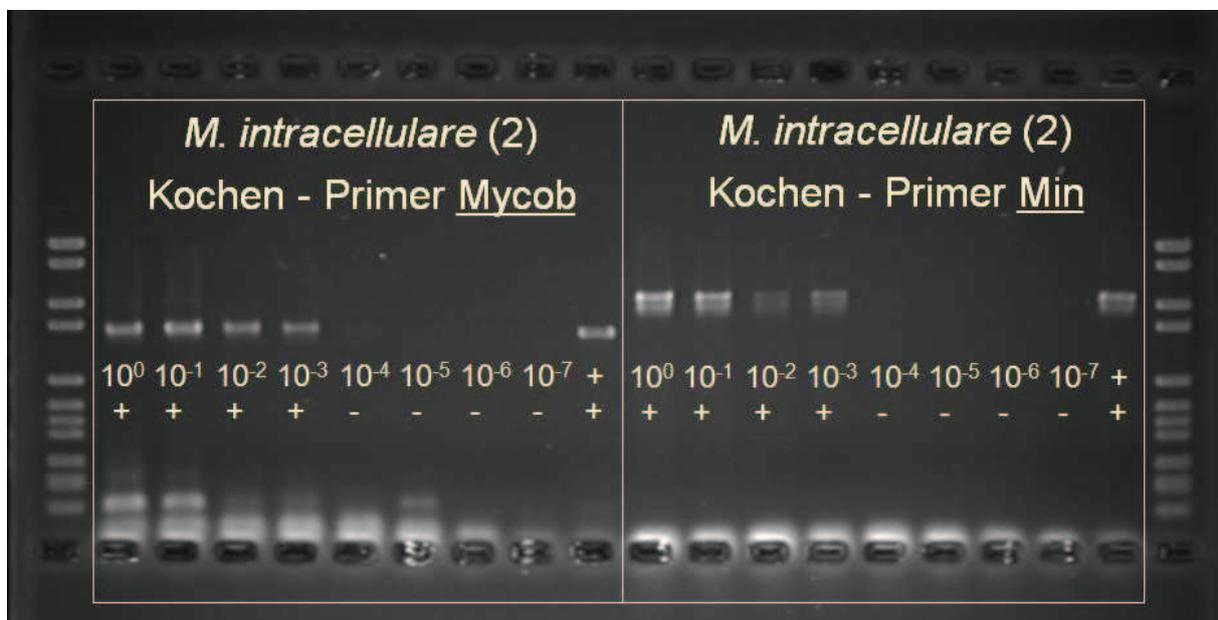
+ = Nachweis möglich, - = Nachweis nicht möglich

4.3 Hauptversuch (Teil A): Ergebnisse bei der Verwendung von Reinkulturen

In Teil A des Hauptversuchs wurden die Nachweisgrenzen der verschiedenen Primer und Zellaufschlussmethoden an den Verdünnungsreihen der sechs getesteten Mykobakterien-Bouillonkulturen überprüft. Insgesamt wurden in diesem Abschnitt 234 Verdünnungsreihen (26 Primer-/ Stammkombinationen x 3 Ansätze pro Stamm x 3 Aufarbeitungsmethoden) in der PCR getestet.

Die Ablesung der Ergebnisse nach PCR und Gelelektrophorese im UV-Bild lässt sich beispielhaft in Abbildung 4.1 erkennen. Hier sind zwei Ergebnisse der Kombination *M. intracellulare* (2. Ansatz) mit der DNA-Aufarbeitung Kochen dargestellt, links der Primer Mycob und rechts der Primer Min. In beiden Fällen sind jeweils vier Banden sichtbar, d.h. bis zur Verdünnungsstufe 10^{-3} ist ein Nachweis gelungen. Bei der mit + markierten Bande handelt es sich um die Positiv-Kontrolle, links und rechts im Bild sind die DNA-Längenmarker zu erkennen.

Abbildung 4.1: Beispiel für die Ablesung der Ergebnisse im UV- Bild (Kombination *M. intracellulare* [2. Ansatz] – Aufarbeitung Kochen – Primer Mycob und Min)



10⁰ bis 10⁻⁷ = Verdünnungsstufen

+ = Positiv-Kontrolle

Ergebnisse

Die Tabellen 4.5, 4.6 und 4.7 geben an, bis zu welcher Verdünnungsstufe ein Nachweis der Mykobakterien gelang. Jede Tabelle steht dabei für eine unterschiedliche Zellaufschlussmethode. Eine 0 im Kästchen bedeutet, dass mit der dazu gehörenden Kombination Zellaufschlussmethode – Primerpaar – Stamm lediglich die unverdünnte Ausgangsbouillon (10^0) positiv war, und die Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-7} hier negativ. Bei einer 1 im Kästchen waren sowohl die unverdünnte Ausgangsbouillon (10^0) als auch die 1. Verdünnungsstufe (10^{-1}) positiv, usw. Nicht mögliche Primer-/ Stammkombinationen (vergl. 4.2 Vorversuch) sind grau hinterlegt und wurden nicht getestet.

In den Abbildungen 4.2 - 4.4 sind die Ergebnisse als Balkendiagramme dargestellt. Auch hier steht jeweils eine Abbildung für eine DNA-Aufarbeitungsmethode. Auf der y-Achse sind die Primer aufgetragen, auf der x-Achse die Verdünnungsstufen von 10^0 bis 10^{-5} . Die farbigen Balken repräsentieren die sechs verwendeten Mykobakterien-Spezies, die Länge der Balken gibt an, bis zu welcher Verdünnungsstufe die Wiederfindung der eingemischten Mykobakterien gelang.

Aus den Ergebnissen ist zu erkennen, dass der Nachweis der Mykobakterien aus Bouillon-Reinkulturen mit jedem passenden der 10 eingesetzten Primern und allen drei Extraktionsmethoden möglich war.

Ergebnisse

Tabelle 4.5 Hauptversuch (Teil A): Ergebnisse der PCR bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „Kochen“ unter Verwendung von Reinkulturen

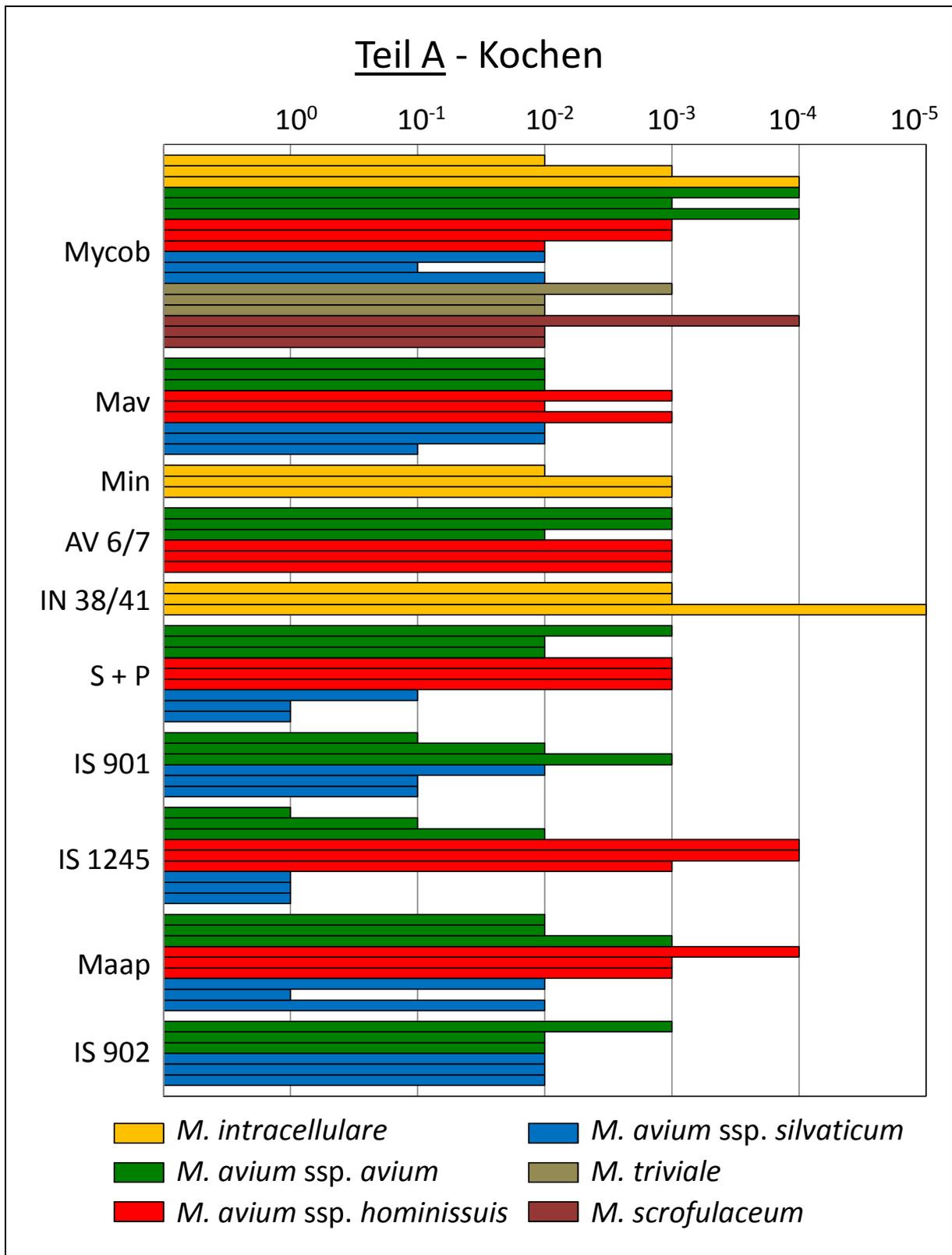
Stamm	Ansatz	GKZ/ ml	Kochen									
			Mycob	Mav	Min	AV 6/ 7	IN 38/ 41	S + P	IS 901	IS 1245	Maap	IS 902
<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	1	2,1·10 ⁸	2	ng	2	ng	3	ng	ng	ng	ng	ng
	2	1,2·10 ⁹	3	ng	3	ng	3	ng	ng	ng	ng	ng
	3	1,4·10 ⁹	4	ng	3	ng	5	ng	ng	ng	ng	ng
<i>M. a. avium</i> DSM 44156 ^T	1	6,9·10 ⁸	4	2	ng	3	ng	3	1	0	2	3
	2	5,8·10 ⁸	3	2	ng	3	ng	2	2	1	2	2
	3	4,8·10 ⁸	4	2	ng	2	ng	2	3	2	3	2
<i>M. a. hominissuis</i> Feldstämme	1	5,6·10 ⁸	3	3	ng	3	ng	3	ng	4	4	ng
	2	3,6·10 ⁸	3	2	ng	3	ng	3	ng	4	3	ng
	3	4,7·10 ⁸	2	3	ng	3	ng	3	ng	3	3	ng
<i>M. a. silvaticum</i> DSM 44175 ^T	1	1,4·10 ⁷	2	2	ng	ng	ng	1	2	0	2	2
	2	5,1·10 ⁶	1	2	ng	ng	ng	0	1	0	0	2
	3	6,9·10 ⁶	2	1	ng	ng	ng	0	1	0	2	2
<i>M. triviale</i> DSM 44153 ^T	1	1,0·10 ⁸	3	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	2	8,5·10 ⁷	2	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	3	4,5·10 ⁷	2	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng
<i>M. scrofulaceum</i> DSM 43992 ^T	1	1,7·10 ⁸	4	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	2	2,1·10 ⁸	2	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	3	1,9·10 ⁸	2	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng

0 = unverdünnte Bouillon (10⁰) positiv; 1 = 1. Verdünnungsstufe (10⁻¹) positiv; 2 = 2. Verdünnungsstufe (10⁻²) positiv usw.

ng = nicht getestet

Ergebnisse

Abbildung 4.2 Hauptversuch (Teil A): Ergebnisse der PCR bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „Kochen“ unter Verwendung von Reinkulturen



Ergebnisse

Tabelle 4.6 Hauptversuch (Teil A): Ergebnisse der PCR bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „Chloroform/ Phenol“ unter Verwendung von Reinkulturen

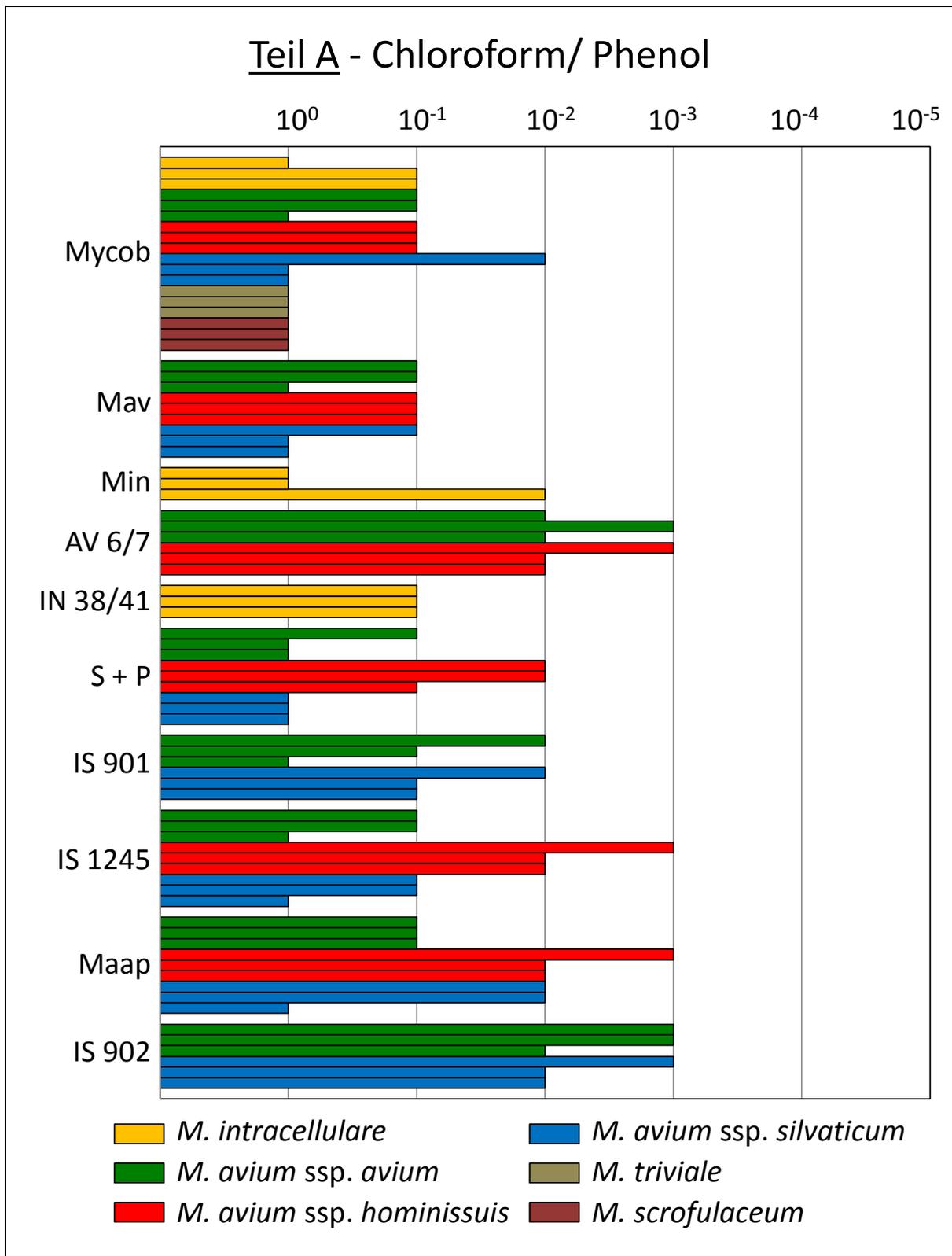
Stamm	Ansatz	GKZ/ ml	Chloroform/ Phenol									
			Mycob	Mav	Min	AV 6/ 7	IN 38/ 41	S + P	IS 901	IS 1245	Maap	IS 902
<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	1	2,1·10 ⁸	0	ng	0	ng	1	ng	ng	ng	ng	ng
	2	1,2·10 ⁹	1	ng	0	ng	1	ng	ng	ng	ng	ng
	3	1,4·10 ⁹	1	ng	2	ng	1	ng	ng	ng	ng	ng
<i>M. a. avium</i> DSM 44156 ^T	1	6,9·10 ⁸	1	1	ng	2	ng	1	2	1	1	3
	2	5,8·10 ⁸	1	1	ng	3	ng	0	1	1	1	3
	3	4,8·10 ⁸	0	0	ng	2	ng	0	0	0	1	2
<i>M. a. hominissuis</i> Feldstämme	1	5,6·10 ⁸	1	1	ng	3	ng	2	ng	3	3	ng
	2	3,6·10 ⁸	1	1	ng	2	ng	2	ng	2	2	ng
	3	4,7·10 ⁸	1	1	ng	2	ng	1	ng	2	2	ng
<i>M. a. silvaticum</i> DSM 44175 ^T	1	1,4·10 ⁷	2	1	ng	ng	ng	0	2	1	2	3
	2	5,1·10 ⁶	0	0	ng	ng	ng	0	1	1	2	2
	3	6,9·10 ⁶	0	0	ng	ng	ng	0	1	0	0	2
<i>M. triviale</i> DSM 44153 ^T	1	1,0·10 ⁸	0	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	2	8,5·10 ⁷	0	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	3	4,5·10 ⁷	0	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng
<i>M. scrofulaceum</i> DSM 43992 ^T	1	1,7·10 ⁸	0	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	2	2,1·10 ⁸	0	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	3	1,9·10 ⁸	0	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng

0 = unverdünnte Bouillon (10⁰) positiv; 1 = 1. Verdünnungsstufe (10⁻¹) positiv; 2 = 2. Verdünnungsstufe (10⁻²) positiv usw.

ng = nicht getestet

Ergebnisse

Abbildung 4.3 Hauptversuch (Teil A): Ergebnisse der PCR bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „Chloroform/ Phenol“ unter Verwendung von Reinkulturen



Ergebnisse

Tabelle 4.7 Hauptversuch (Teil A): Ergebnisse der PCR bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „Ultraschall mit anschl. Kochen“ unter Verwendung von Reinkulturen

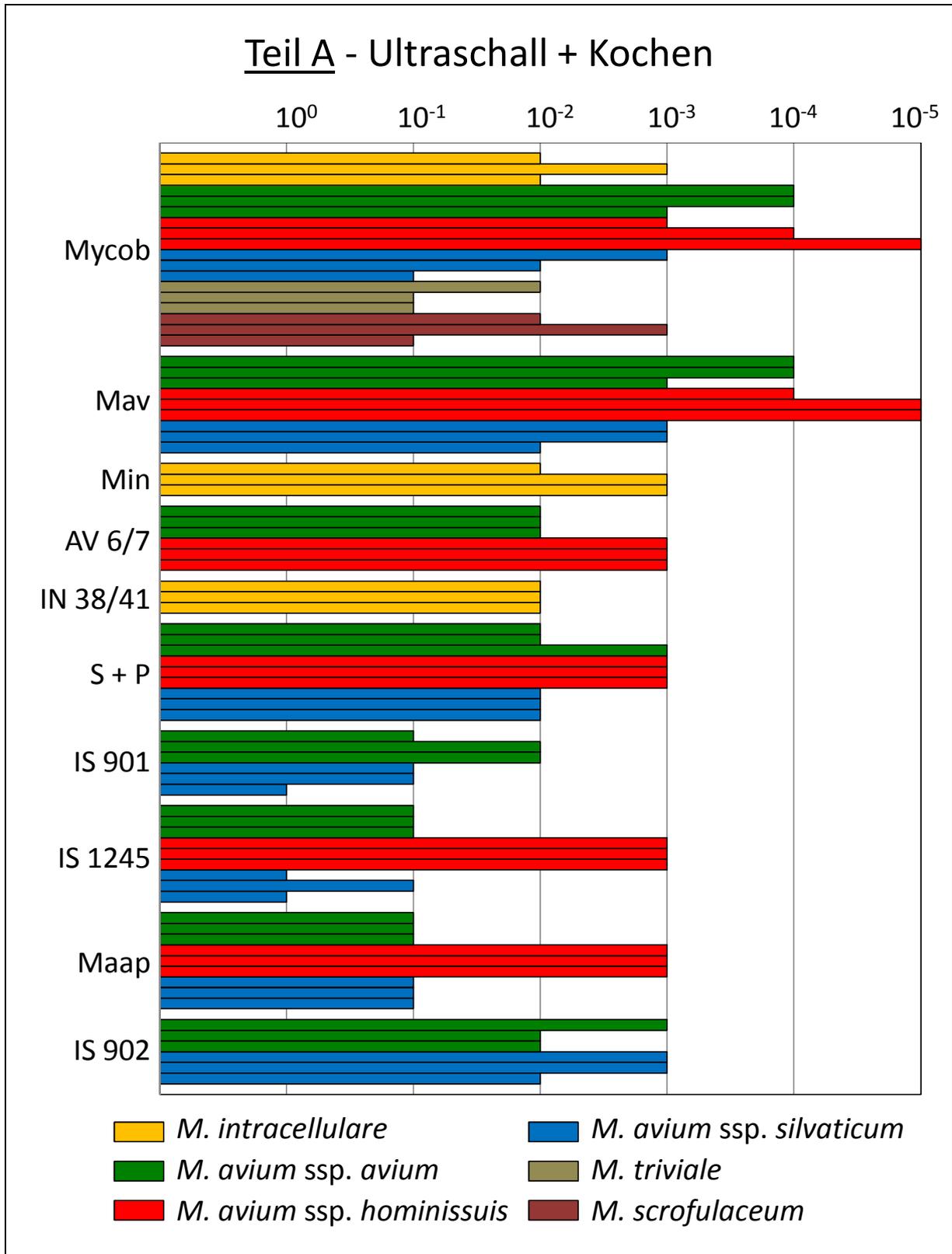
Stamm	Ansatz	GKZ / ml	Ultraschall + Kochen									
			Mycob	Mav	Min	AV 6/7	IN 38/41	S + P	IS 901	IS 1245	Maap	IS 902
<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	1	2,1·10 ⁸	2	ng	2	ng	2	ng	ng	ng	ng	ng
	2	1,2·10 ⁹	3	ng	3	ng	2	ng	ng	ng	ng	ng
	3	1,4·10 ⁹	2	ng	3	ng	2	ng	ng	ng	ng	ng
<i>M. a. avium</i> DSM 44156 ^T	1	6,9·10 ⁸	4	4	ng	2	ng	2	1	1	1	3
	2	5,8·10 ⁸	4	4	ng	2	ng	2	2	1	1	2
	3	4,8·10 ⁸	3	3	ng	2	ng	3	2	1	1	2
<i>M. a. hominissuis</i> Feldstämme	1	5,6·10 ⁸	3	4	ng	3	ng	3	ng	3	3	ng
	2	3,6·10 ⁸	4	5	ng	3	ng	3	ng	3	3	ng
	3	4,7·10 ⁸	5	5	ng	3	ng	3	ng	3	3	ng
<i>M. a. silvaticum</i> DSM 44175 ^T	1	1,4·10 ⁷	3	3	ng	ng	ng	2	1	0	1	3
	2	5,1·10 ⁶	2	3	ng	ng	ng	2	1	1	1	3
	3	6,9·10 ⁶	1	2	ng	ng	ng	2	0	0	1	2
<i>M. triviale</i> DSM 44153 ^T	1	1,0·10 ⁸	2	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	2	8,5·10 ⁷	1	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	3	4,5·10 ⁷	1	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng
<i>M. scrofulaceum</i> DSM 43992 ^T	1	1,7·10 ⁸	2	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	2	2,1·10 ⁸	3	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	3	1,9·10 ⁸	1	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng

0 = unverdünnte Bouillon (10⁰) positiv; 1 = 1. Verdünnungsstufe (10⁻¹) positiv; 2 = 2. Verdünnungsstufe (10⁻²) positiv usw.

ng = nicht getestet

Ergebnisse

Abbildung 4.4 Hauptversuch (Teil A): Ergebnisse der PCR bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „Ultraschall mit anschl. Kochen“ unter Verwendung von Reinkulturen



4.4 Hauptversuch (Teil B): Ergebnisse bei Vorhandensein von Lymphknotenmatrix

In Teil B des Hauptversuchs wurden die Nachweisgrenzen der verschiedenen Primer und Zellaufschlussmethoden an Verdünnungsreihen von Mykobakterien-Bouillonkulturen, in die Lymphknotenmatrix vom Schwein eingemischt wurden, geprüft. In diesem Abschnitt kamen nur die drei hauptsächlich beim Schwein vorkommenden Spezies/ Subspezies *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *avium* und *M. intracellulare* zum Einsatz. Insgesamt wurden hier 153 Verdünnungsreihen (17 Primer-/ Stammkombinationen x 3 Ansätze pro Stamm x 3 Aufarbeitungsmethoden) in der PCR getestet.

Analog zu Teil A geben die Tabellen 4.8, 4.9 und 4.10 an, bis zu welcher Verdünnungsstufe ein Nachweis der Mykobakterien gelang. In den Abbildungen 4.5 - 4.7 sind die Ergebnisse in Form von Balkendiagrammen dargestellt.

Im Gegensatz zur Arbeit mit Reinkulturen (Teil A) erbrachte bei Teil B nicht jede Verdünnungsreihe ein positives Ergebnis. Besonders auffällig war dabei die Kochmethode, sie lieferte nur in 11 von insgesamt 51 Ansätzen (= 21,6 %) in mindestens einer Verdünnungsstufe einen Mykobakterien-Nachweis. Bei der Chloroform/ Phenol-Methode waren drei Ansätze negativ, d.h. hier gelang die Wiederfindung der eingemischten Mykobakterien in 48 von 51 Fällen (= 94,1 %). Lediglich beim Einsatz des kommerziellen DNA-Kits waren alle 51 Ansätze positiv.

Ergebnisse

Tabelle 4.8 Hauptversuch (Teil B): Ergebnisse der PCR bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „Kochen“ unter Vorhandensein von Lymphknotenmatrix

Stamm	Ansatz	GKZ/ ml	Kochen										
			Mycob	Mav	Min	AV 6/7	IN 38/41	S + P	IS 901	IS 1245	Maap	IS 902	
<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	1	2,1·10 ⁸	kN	ng	kN	ng	kN	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	2	1,2·10 ⁹	kN	ng	kN	ng	kN	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	3	1,4·10 ⁹	kN	ng	kN	ng	kN	ng	ng	ng	ng	ng	ng
<i>M. a. avium</i> DSM 44156 ^T	1	6,9·10 ⁸	kN	kN	ng	kN	ng	kN	1	0	0	1	
	2	5,8·10 ⁸	kN	kN	ng	0	ng	kN	kN	kN	kN	0	
	3	4,8·10 ⁸	kN	kN	ng	kN	ng	kN	kN	kN	kN	kN	
<i>M. a. hominissuis</i> Feldstämme	1	5,6·10 ⁸	kN	kN	ng	0	ng	kN	ng	kN	kN	ng	
	2	3,6·10 ⁸	kN	kN	ng	1	ng	kN	ng	0	0	ng	
	3	4,7·10 ⁸	kN	kN	ng	1	ng	kN	ng	kN	kN	ng	

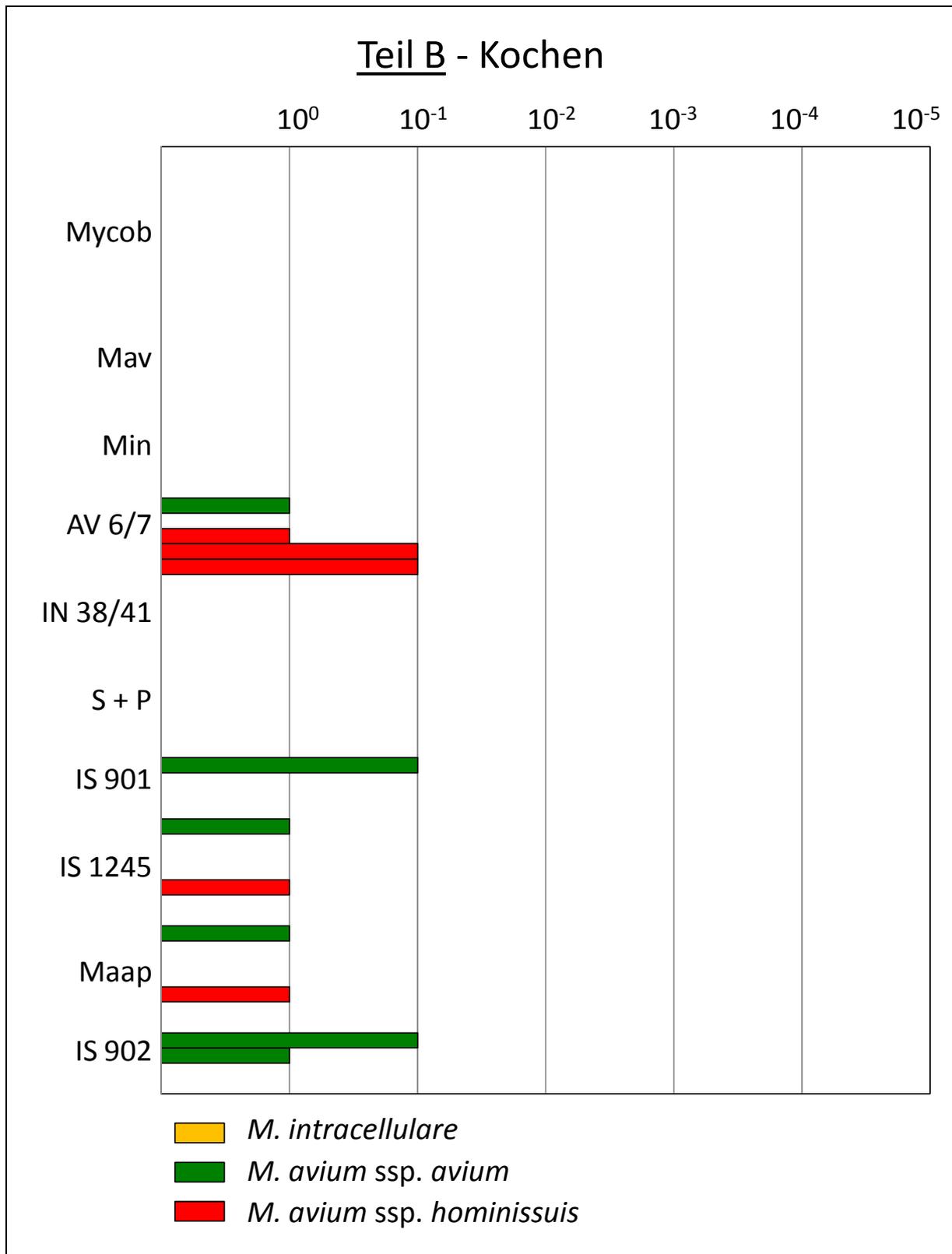
kN = kein Nachweis gelungen

0 = unverdünnte Bouillon (10⁰) positiv; 1 = 1. Verdünnungsstufe (10⁻¹) positiv; 2 = 2. Verdünnungsstufe (10⁻²) positiv usw.

ng = nicht getestet

Ergebnisse

Abbildung 4.5 Hauptversuch (Teil B): Ergebnisse der PCR bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „Kochen“ unter Vorhandensein von Lymphknotenmatrix



Ergebnisse

Tabelle 4.19 Hauptversuch (Teil B): Ergebnisse der PCR bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „Chloroform/ Phenol“ unter Vorhandensein von Lymphknotenmatrix

Stamm	Ansatz	GKZ/ ml	Chloroform/ Phenol										
			Mycob	Mav	Min	AV 6/7	IN 38/41	S + P	IS 901	IS 1245	Maap	IS 902	
<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	1	2,1·10 ⁸	kN	ng	kN	ng	0	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	2	1,2·10 ⁹	0	ng	0	ng	0	ng	ng	ng	ng	ng	ng
	3	1,4·10 ⁹	1	ng	0	ng	0	ng	ng	ng	ng	ng	ng
<i>M. a. avium</i> DSM 44156 ^T	1	6,9·10 ⁸	1	1	ng	3	ng	0	2	0	1	3	
	2	5,8·10 ⁸	kN	1	ng	2	ng	0	0	0	0	2	
	3	4,8·10 ⁸	0	0	ng	1	ng	0	0	0	1	1	
<i>M. a. hominissuis</i> Feldstämme	1	5,6·10 ⁸	1	1	ng	2	ng	0	ng	2	2	ng	
	2	3,6·10 ⁸	0	0	ng	2	ng	0	ng	1	1	ng	
	3	4,7·10 ⁸	2	1	ng	2	ng	2	ng	1	1	ng	

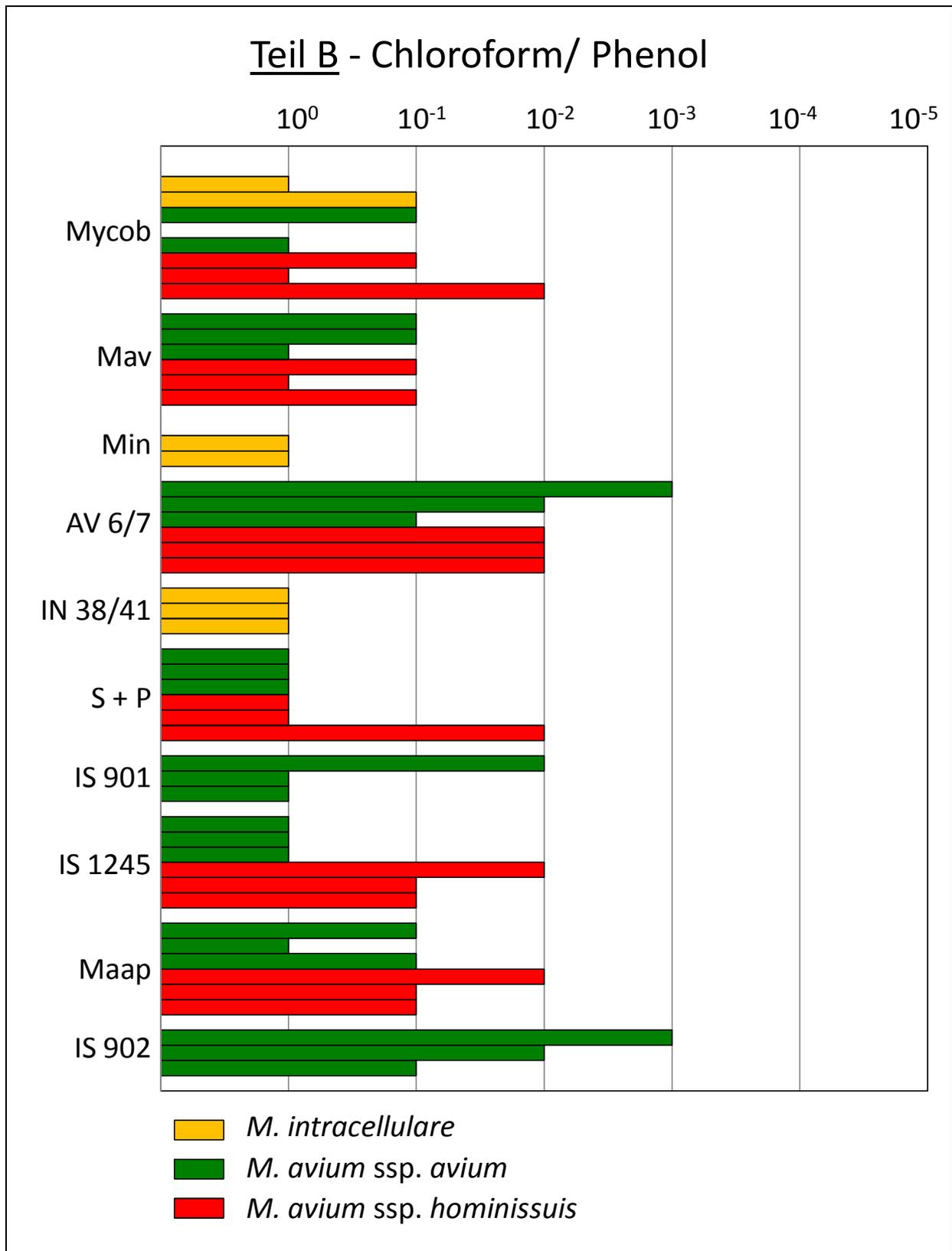
kN = kein Nachweis gelungen

0 = unverdünnte Bouillon (10⁰) positiv; 1 = 1. Verdünnungsstufe (10⁻¹) positiv; 2 = 2. Verdünnungsstufe (10⁻²) positiv usw.

ng = nicht getestet

Ergebnisse

Abbildung 4.6 Hauptversuch (Teil B): Ergebnisse der PCR bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „Chloroform/ Phenol“ unter Vorhandensein von Lymphknotenmatrix



Ergebnisse

Tabelle 4.10 Hauptversuch (Teil B): Ergebnisse der PCR bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „DNA-Extraktionskit“ unter Vorhandensein von Lymphknotenmatrix

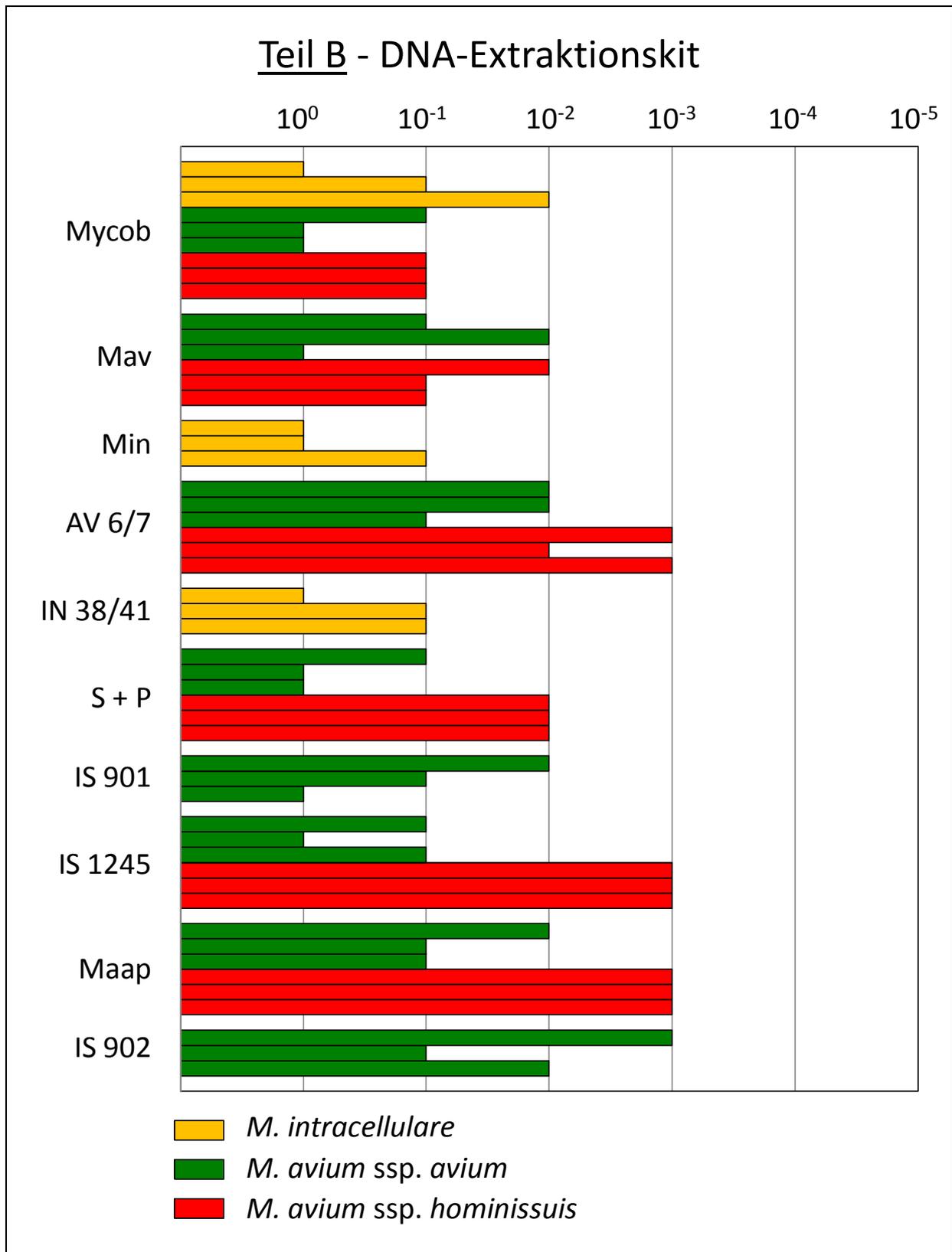
Stamm	Ansatz	GKZ/ ml	DNA-Extraktionskit									
			Mycob	Mav	Min	AV 6/7	IN 38/41	S + P	IS 901	IS 1245	Maap	IS 902
<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	1	2,1·10 ⁸	0	ng	0	ng	0	ng	ng	ng	ng	ng
	2	1,2·10 ⁹	1	ng	0	ng	1	ng	ng	ng	ng	ng
	3	1,4·10 ⁹	2	ng	1	ng	1	ng	ng	ng	ng	ng
<i>M. a. avium</i> DSM 44156 ^T	1	6,9·10 ⁸	1	1	ng	2	ng	1	2	1	2	3
	2	5,8·10 ⁸	0	2	ng	2	ng	0	1	0	1	1
	3	4,8·10 ⁸	0	0	ng	1	ng	0	0	1	1	2
<i>M. a. hominissuis</i> Feldstämme	1	5,6·10 ⁸	1	2	ng	3	ng	2	ng	3	3	ng
	2	3,6·10 ⁸	1	1	ng	2	ng	2	ng	3	3	ng
	3	4,7·10 ⁸	1	1	ng	3	ng	2	ng	3	3	ng

0 = unverdünnte Bouillon (10⁰) positiv; 1 = 1. Verdünnungsstufe (10⁻¹) positiv; 2 = 2. Verdünnungsstufe (10⁻²) positiv usw.

ng = nicht getestet

Ergebnisse

Abbildung 4.7 Hauptversuch (Teil B): Ergebnisse der PCR bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „DNA-Extraktionskit“ unter Vorhandensein von Lymphknotenmatrix



4.5 Berechnung der PCR-Nachweisgrenzen

Mit Hilfe der zu Versuchsbeginn berechneten Keimzahlen und der durch die im Hauptversuch (Teile A und B) erzielten Ergebnisse wurden die Nachweisgrenzen für die verschiedenen Zellaufschluss-/ Primerkombinationen ermittelt (Tabellen 4.12 und 4.13).

Die Werte stellen die auf dieser Grundlage ermittelte Anzahl an Mykobakterien pro ml dar, die für ein positives Ergebnis notwendig waren.

Vorgehen: Von den drei Ansätzen pro Stamm wurde jeweils die Keimzahl der höchsten bei der PCR positiven Verdünnungsstufe [log KbE/ ml] berechnet, wobei der Mittelwert dieser drei Werte die Nachweisgrenze ergab. In Tabelle 4.11 ist der Rechenweg am Beispiel der Kombination *M. intracellulare*, Kochen und Primer Mycob aus Teil A dargestellt. Bei diesem Beispiel waren demnach 5,85 log KbE/ ml notwendig, um ein positives PCR-Ergebnis zu erhalten.

Tabelle 4.11 Beispiel zur Berechnung der Nachweisgrenze (Teil A, *M. intracellulare*, Kochen, Primer Mycob)

	KbE/ ml	log KbE/ ml	Nachweis positiv bis	Entspricht log KbE/ ml	Nachweisgrenze (Ø log KbE/ ml)
1. Ansatz	$2,1 \times 10^8$	8,32	10^{-2}	6,32	} 5,85
2. Ansatz	$1,2 \times 10^9$	9,08	10^{-3}	6,08	
3. Ansatz	$1,4 \times 10^9$	9,15	10^{-4}	5,15	

Ergebnisse

Tabelle 4.12 Hauptversuch (Teil A): Errechnete PCR-Nachweisgrenzen (log₁₀ kbE) bei Verwendung von Reinkulturen

Versuchs- abschnitt	Zellauf- schluss	Stamm	Mycob	Mav	Min	AV 6 / 7	IN 38 / 41	S + P	IS 901	IS 1245	Maap	IS 902	Mittelwert
Teil A: Arbeit mit Reinkulturen	Kochen	<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	5,85	ng	6,18	ng	5,18	ng	ng	ng	ng	ng	
		<i>M. a. avium</i> DSM 44156 ^T	5,09	6,76	ng	6,09	ng	6,43	6,76	7,76	6,43	6,43	
		<i>M. a. hominissuis</i> Feldstämme	5,99	5,99	ng	5,66	ng	5,66	ng	4,99	5,32	ng	
		<i>M. a. silvaticum</i> DSM 44175 ^T	5,23	5,23	ng	ng	ng	6,57	5,57	6,90	5,57	4,90	
		<i>M. triviale</i> DSM 44153 ^T	5,53	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	
		<i>M. scrofulaceum</i> DSM 43992 ^T	5,61	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	5,91
	Chloroform/ Phenol	<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	8,18	ng	8,18	ng	7,85	ng	ng	ng	ng	ng	
		<i>M. a. avium</i> DSM 44156 ^T	8,09	8,09	ng	6,43	ng	8,43	7,76	8,09	7,76	6,09	
		<i>M. a. hominissuis</i> Feldstämme	7,66	7,66	ng	6,32	ng	6,99	ng	6,32	6,32	ng	
		<i>M. a. silvaticum</i> DSM 44175 ^T	6,23	6,57	ng	ng	ng	6,90	5,57	6,23	5,57	4,57	
		<i>M. triviale</i> DSM 44153 ^T	7,86	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	
		<i>M. scrofulaceum</i> DSM 43992 ^T	8,28	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	7,08
	Ultraschall + Kocken	<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	6,52	ng	6,18	ng	6,85	ng	ng	ng	ng	ng	
		<i>M. a. avium</i> DSM 44156 ^T	5,09	5,09	ng	6,76	ng	6,43	7,18	7,85	7,85	6,43	
		<i>M. a. hominissuis</i> Feldstämme	4,66	3,99	ng	5,66	ng	5,66	ng	5,66	5,66	ng	
		<i>M. a. silvaticum</i> DSM 44175 ^T	4,90	4,23	ng	ng	ng	4,90	6,23	6,57	5,90	4,23	
		<i>M. triviale</i> DSM 44153 ^T	6,53	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	
		<i>M. scrofulaceum</i> DSM 43992 ^T	6,28	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	5,90

ng = nicht getestet

Ergebnisse

Tabelle 4.13 Hauptversuch (Teil B): Errechnete PCR-Nachweisgrenzen (log₁₀ kbE) bei Vorhandensein von Lymphknotenmatrix in der Bouillon

Versuchsabschnitt	Zellaufschluss	Stamm	Mycob	Mav	Min	AV 6 / 7	IN 38 / 41	S + P	IS 901	IS 1245	Maap	IS 902	Mittelwert
Teil B: Arbeit mit Lymphknotenmatrix	Kochen	<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	-	ng	-	ng	-	ng	ng	ng	ng	ng	-
		<i>M. a. avium</i> DSM 44156 ^T	-	-	ng	-	ng	-	-	-	-	-	
		<i>M. a. hominissuis</i> Feldstämme	-	-	ng	-	ng	-	ng	-	-	ng	
	Chloroform/ Phenol	<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	8,62	ng	9,12	ng	8,85	ng	ng	ng	ng	ng	7,95
		<i>M. a. avium</i> DSM 44156 ^T	8,26	8,15	ng	6,76	ng	8,76	8,09	8,76	8,09	6,76	
		<i>M. a. hominissuis</i> Feldstämme	7,66	7,99	ng	6,66	ng	7,99	ng	7,32	7,32	ng	
	DNA-Kit	<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	7,85	ng	8,52	ng	8,18	ng	ng	ng	ng	ng	7,39
		<i>M. a. avium</i> DSM 44156 ^T	8,43	7,76	ng	7,43	ng	8,43	7,76	8,09	7,43	6,76	
		<i>M. a. hominissuis</i> Feldstämme	7,66	7,32	ng	5,99	ng	6,66	ng	5,66	5,66	ng	

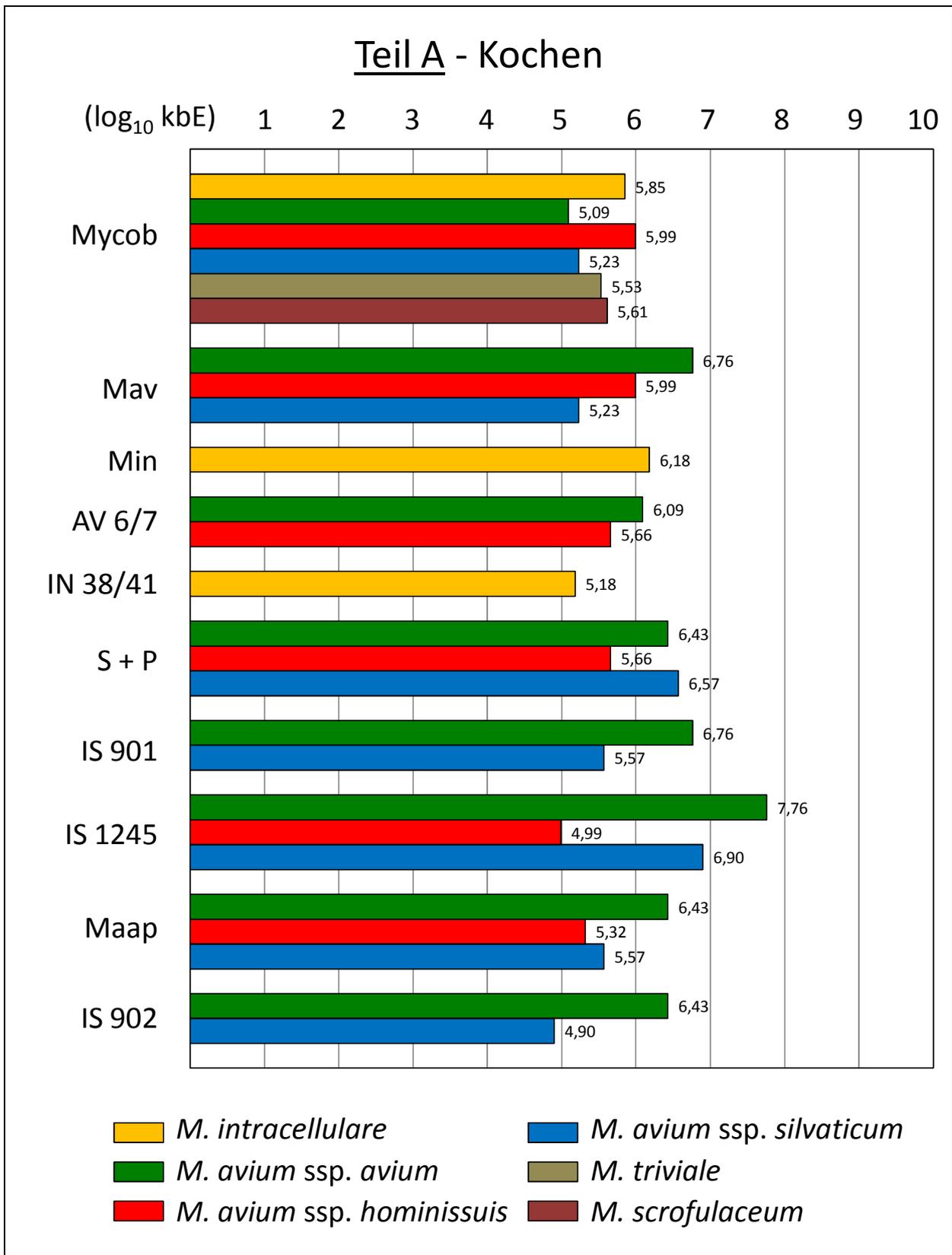
- = Errechnung der Nachweisgrenze nicht möglich

ng = nicht getestet

Die errechneten Nachweisgrenzen sind in den Abbildungen 4.8, 4.9 und 4.10 für Teil A sowie in den Abbildungen 4.11 und 4.12 in Form von Balkendiagrammen wiedergegeben.

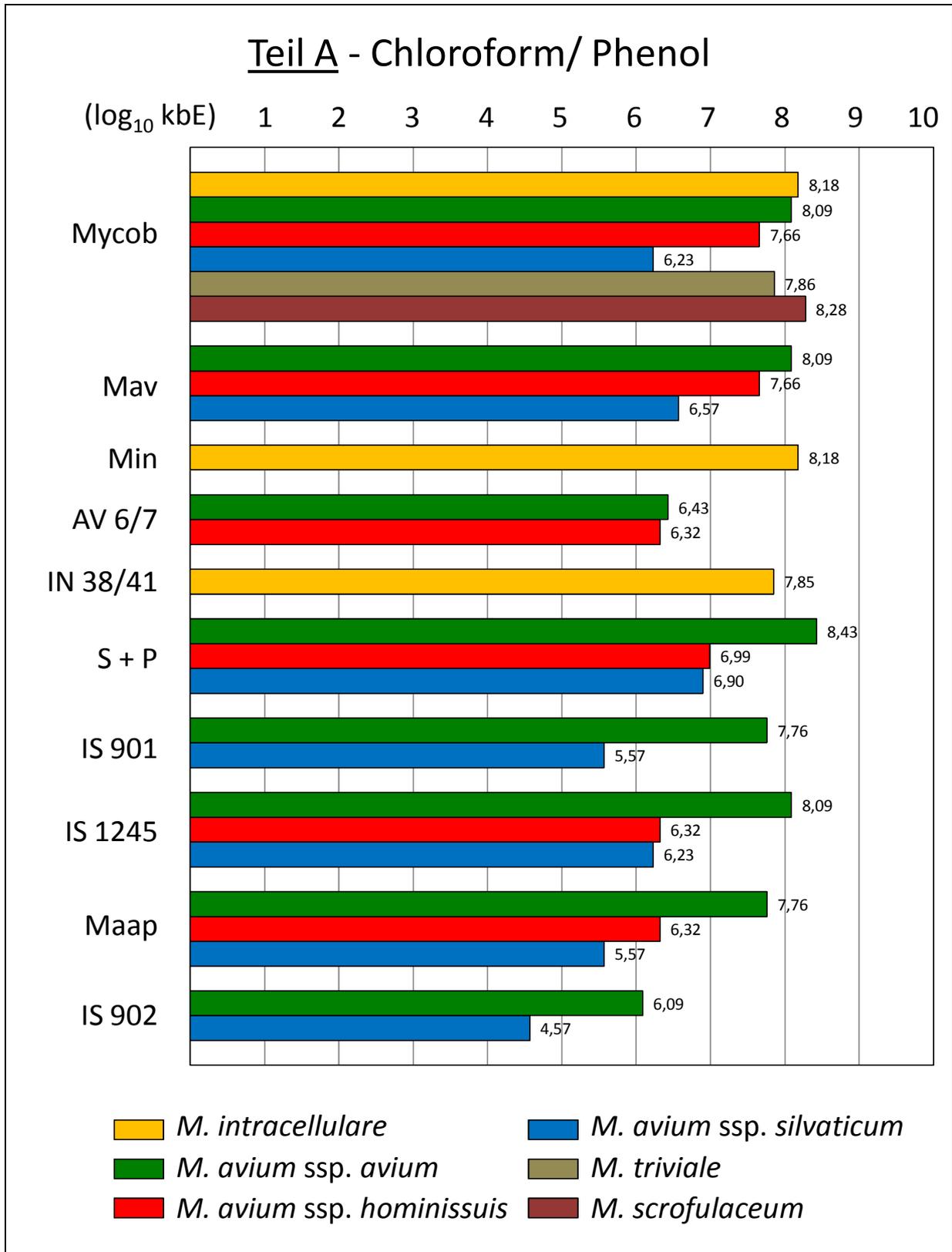
Ergebnisse

Abbildung 4.8 Hauptversuch (Teil A): PCR-Nachweisgrenzen (\log_{10} kbE) bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „Kochen“ unter Verwendung von Reinkulturen



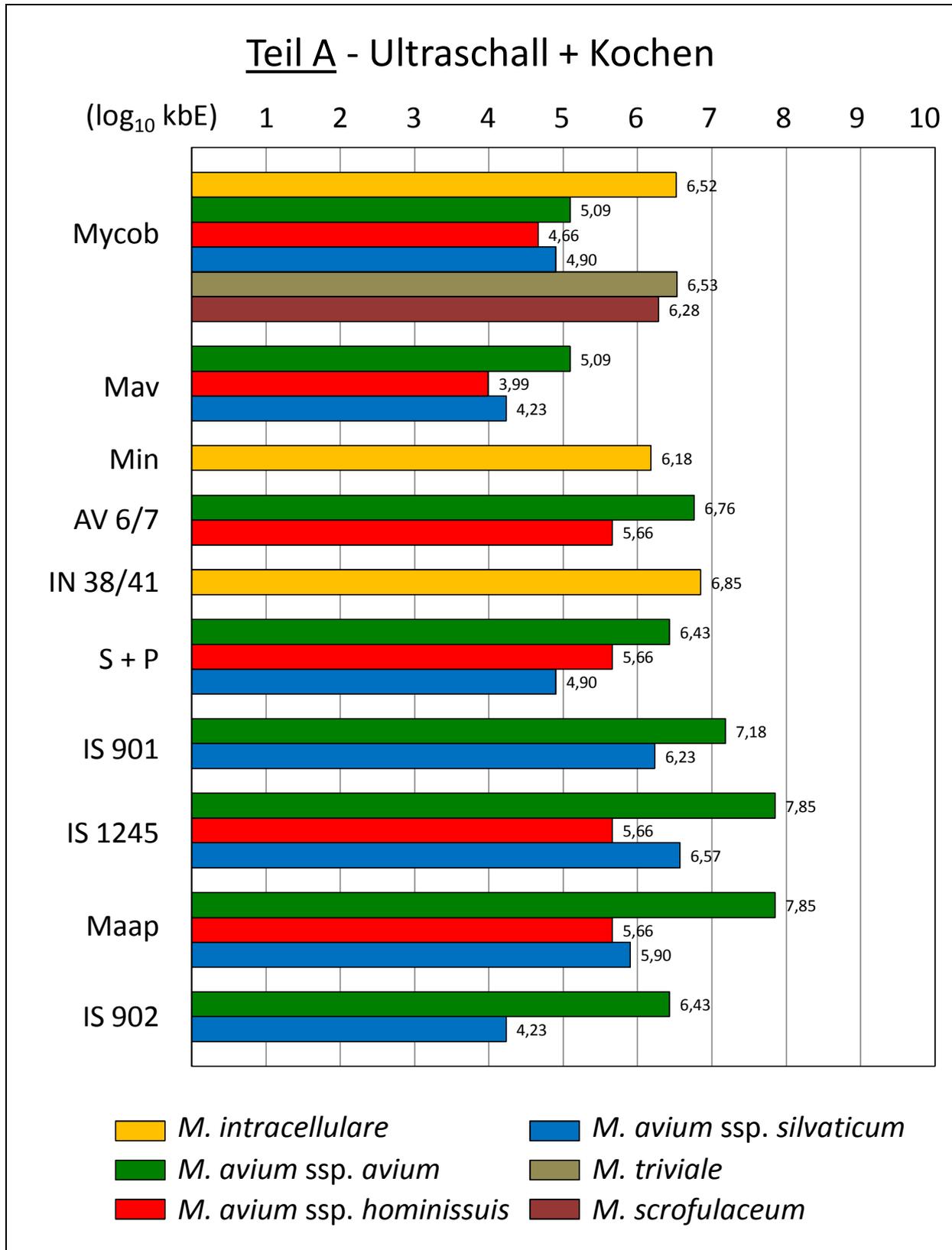
Ergebnisse

Abbildung 4.9 Hauptversuch (Teil A): PCR-Nachweisgrenzen (\log_{10} kbE) bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „Chloroform/ Phenol“ unter Verwendung von Reinkulturen



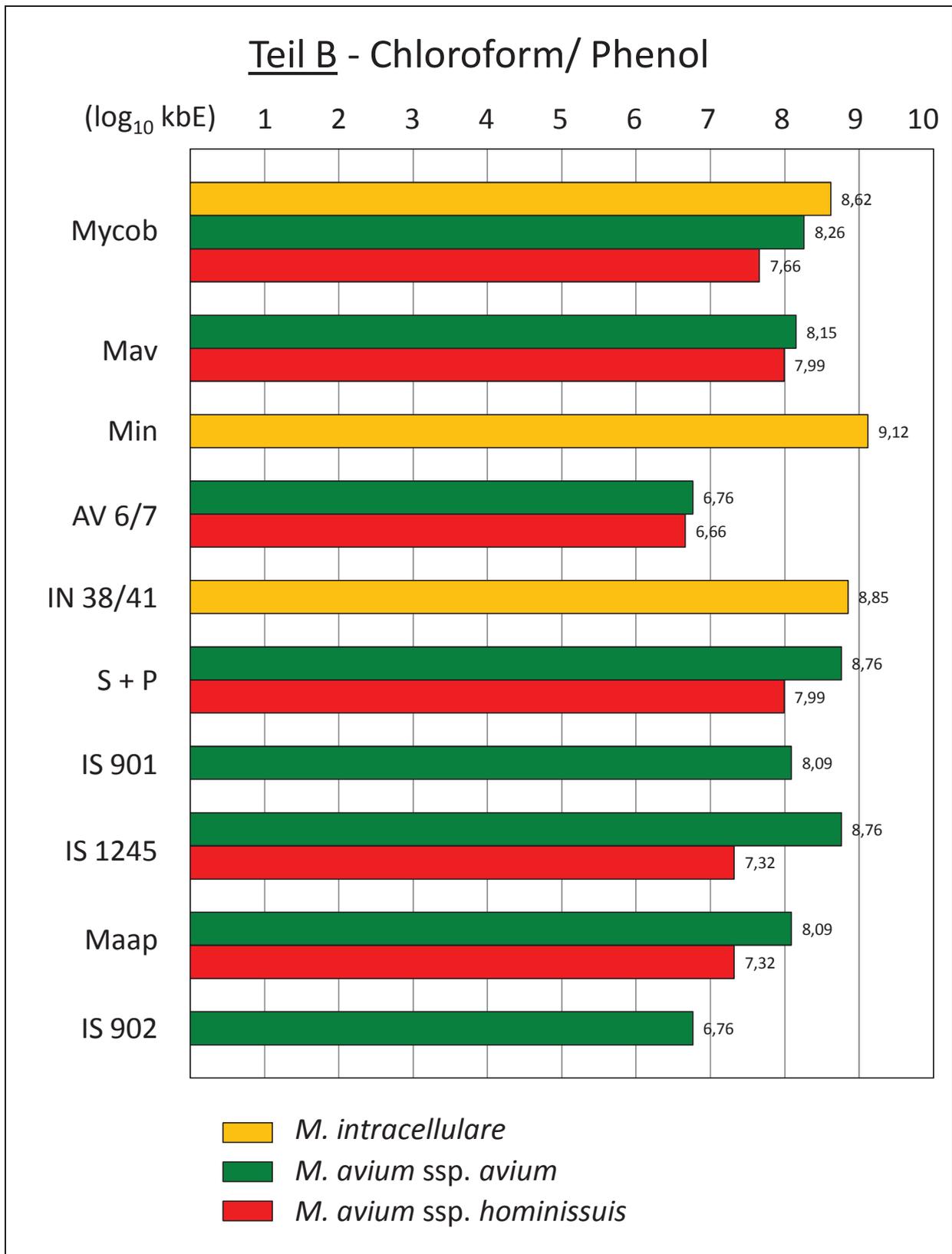
Ergebnisse

Abbildung 4.10 Hauptversuch (Teil A): PCR-Nachweisgrenzen (\log_{10} kbE) bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „Ultraschall mit anschl. Kochen“ unter Verwendung von Reinkulturen



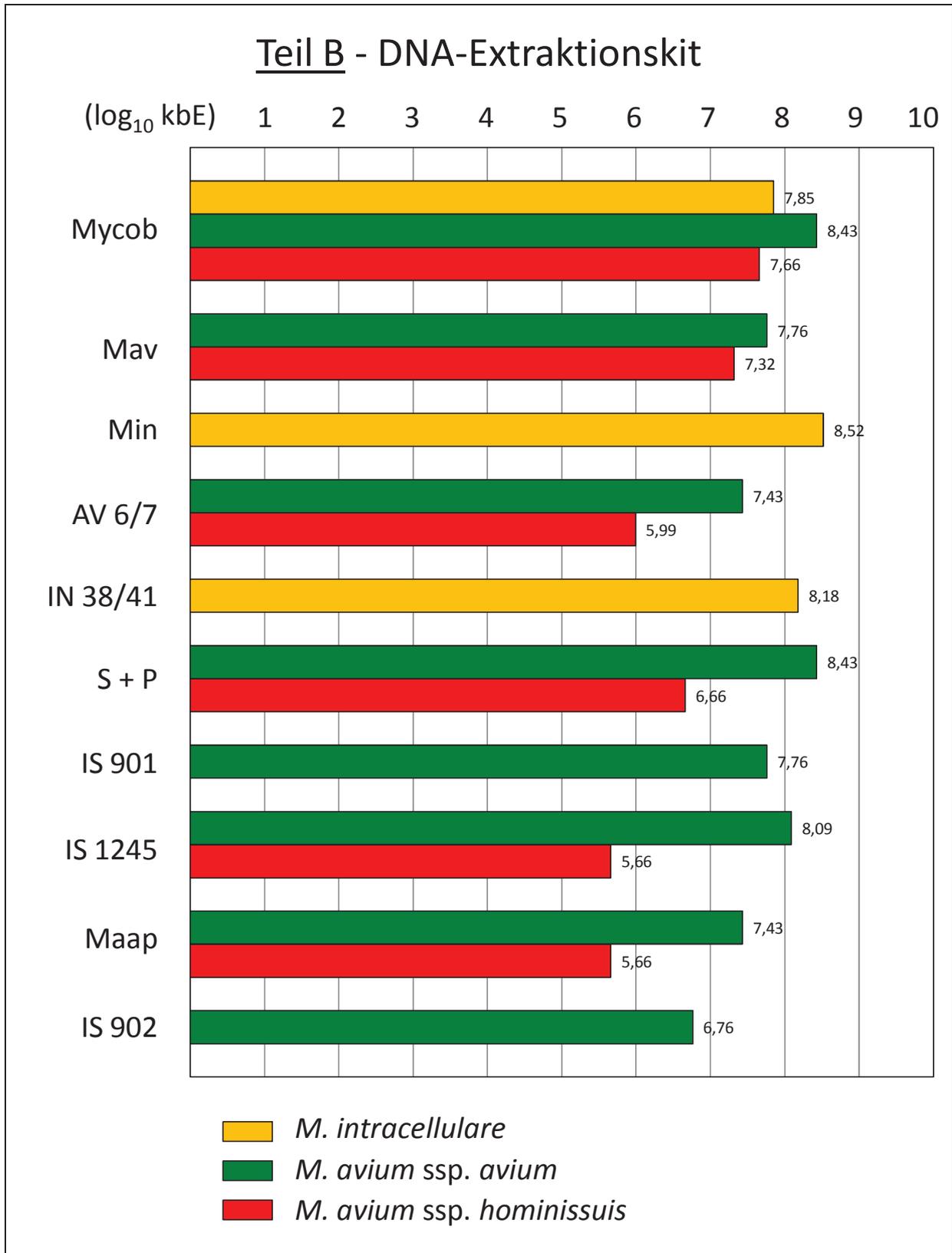
Ergebnisse

Abbildung 4.11 Hauptversuch (Teil B): PCR-Nachweisgrenzen (\log_{10} kbE) bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „Chloroform/ Phenol“ unter Vorhandensein von Lymphknotenmatrix



Ergebnisse

Abbildung 4.12 Hauptversuch (Teil B): PCR-Nachweisgrenzen (\log_{10} kbE) bei Einsatz der Zellaufschlussmethode „DNA-Extraktionskit“ unter Vorhandensein von Lymphknotenmatrix



Ergebnisse

Der Vergleich der Mittelwerte der einzelnen DNA-Extraktionsmethoden zeigt, dass für die Arbeit mit Reinkulturen (Teil A) die Ultraschallmethode mit anschließendem Kochen die niedrigste Nachweisgrenze besaß (5,90 log KbE/ ml, Tabelle 4.12).

Bei der Aufarbeitungsmethode Kochen (Teil A, Abbildung 4.8) erreichte der Primer IN 38/41 für *M. intracellulare* mit 5,18 log KbE/ ml die geringste Nachweisgrenze, für *M. avium* subsp. *avium* der Primer Mycob (5,09 log KbE/ ml) und für *M. avium* subsp. *hominissuis* der Primer IS 1245 (4,99 log KbE/ ml).

Auch bei der Chloroform/ Phenol-Methode (Teil A, Abbildung 4.9) war für *M. intracellulare* der Primer IN 38/41 am besten geeignet (7,85 log KbE/ ml). Im Gegensatz zum Kochen erbrachte bei Einsatz der Chloroform/ Phenol-Methode der Primer IS 902 für *M. avium* subsp. *avium* das beste Ergebnis (6,09 KbE/ ml). Für *M. avium* subsp. *hominissuis* erreichten mit AV 6/7, IS 1245 und Maap drei Primer eine identische Nachweisgrenze (6,32 log KbE/ ml).

Beim Zellaufschluss mit Hilfe von Ultraschall mit anschließendem Kochen (Teil A, Abbildung 4.10) waren Min für *M. intracellulare* (6,18 log KbE/ ml), Mycob und Mav für *M. avium* subsp. *avium* (5,09 log KbE/ ml) bzw. Mav für *M. avium* subsp. *hominissuis* die Primer mit der geringsten Nachweisgrenze.

Da sich *M. triviale* und *M. scrofulaceum* nur mit dem Primer Mycob detektieren ließen, war ein Primervergleich bei diesen beiden Spezies nicht möglich.

Bei Teil B erbrachten einige Ansätze kein Nachweisergebnis. Bei der Aufarbeitungsmethode Kochen blieben 40 von 51 PCR-Ansätze (= 78,4 %) ohne Nachweis, bei der Chloroform/ Phenol-Methode waren 3 von 51 Ansätze (= 5,9 %) negativ. Deshalb wurden für das Kochen keine Nachweisgrenzen errechnet, während die drei negativen Ergebnisse bei der Chloroform/ Phenol-Methode zur Berechnung der PCR-Nachweisgrenze nicht berücksichtigt wurden.

Bei Einmischung von Lymphknotenmaterial (Teil B) erbrachte das DNA-Extraktionskit mit einer durchschnittlichen Nachweisgrenze von 7,39 log KbE/ ml das beste Ergebnis (Tabelle 4.13). Bei diesem Zellaufschlussverfahren waren Mycob für *M. intracellulare* (7,85 log KbE/ ml), IS 902 für *M. avium* subsp. *avium* (6,76 log KbE/ ml) bzw. IS 1245 und Maap für *M. avium* subsp. *hominissuis* (5,66 log KbE/ ml) die Primer mit der niedrigsten Nachweisgrenze.

5 Diskussion

5.1 Fragestellung/ Versuchsziel

Grundlage dieser Arbeit ist das Problem, das die amtliche Überwachung bei der Erfassung von Mykobakterien-Infektionen hat. Auf der einen Seite wird das Erkennen einer Mykobakteriose beim Schlachtschwein bei der Fleischuntersuchung gefordert. Hierfür verfügt der amtliche Tierarzt momentan lediglich über die Möglichkeit, veränderte Lymphknoten (in erster Linie Kehlgangs- und Darmlymphknoten) makroskopisch zu bewerten. Die Veränderungen am angeschnittenen Lymphknoten sind allerdings nicht mit Sicherheit als Mykobakteriose anzusprechen. Ursache hierfür können auch andere Erreger sein, insbesondere *Rhodococcus equi* (DVORSKA et al. 1999; PAVLIK et al. 2003; KOMIJN et al. 2007). Andererseits wurden auch aus nicht veränderten Lymphknoten Vertreter des MAIC nachgewiesen (DVORSKA et al. 1999; OFFERMANN et al. 1999; SIRIMALAISUWAN 2004). Die tatsächliche Prävalenz des MAIC in Schweinebeständen lässt sich somit durch die Techniken der Fleischuntersuchung derzeit nicht belegen.

Für die Feststellung von MAIC sind deshalb Labortechniken notwendig. Bezüglich Mykobakterien aus dem MAIC wird auch bei Anwendung molekularbiologischer Techniken üblicherweise mit reinem Bakterienmaterial gearbeitet wird. Hierfür ist die kulturelle Anzucht erforderlich. Dieses Verfahren beinhaltet jedoch Nachteile:

1. Zum einen ist der Zeitaufwand aufgrund des langsamen Wachstums von Mykobakterien erheblich. Das Wachstum kann einige Wochen Zeit in Anspruch nehmen und ist deshalb z.B. nicht für Screening-Tests einsetzbar. Ein solches Screening wäre eine Möglichkeit, die Arbeit des amtlichen Tierarztes am Schlachtbetrieb zu erleichtern. Die Verordnung (EG) Nr. 854/2004 bietet in Art. 18 die Möglichkeit, auf Beschluss durch die zuständige Behörde alternative Verfahren sowie serologische oder andere Labortests bei der Fleischuntersuchung einzusetzen, wenn diese zumindest der traditionellen Fleischuntersuchung gleichwertige Garantien bieten. Letztendlich könnte der vorgeschriebene Anschnitt des Kehlgangslymphknotens unterbleiben, wenn Schweine aus einem Mykobakteriose-freien Bestand zur Schlachtung angeliefert werden.
2. Zum anderen besteht bei einer Kulturanzucht, v.a. wenn Anreicherungsmedien verwendet werden, die Möglichkeit, dass andere pathogene Mykobakterien angezüchtet werden, sofern sie in der Ausgangsprobe vorhanden waren. Insbesondere die Gefahr

für das Laborpersonal, die hierbei von den Tuberkuloseerregern ausgeht, muss berücksichtigt werden (CDC 1997). Vertreter des *M. tuberculosis*-Komplexes werden hauptsächlich über Aerosole übertragen. Die Infektionsdosis von *M. tuberculosis* ist mit 1-10 Keimen sehr gering (BALASUBRAMANIAN et al. 1994). Die Tuberkuloseinzidenz ist bei Laborpersonal, welches im Labor mit *M. tuberculosis* hantiert, 3-5 x höher als bei Laborpersonal ohne Umgang mit diesem Keim (CAPEWELL et al. 1988; GRIST u. EMSLIE 1994).

Diese Probleme ließen sich durch einen PCR-Direktnachweis aus Lymphknotenmaterial umgehen. Die vorliegende Arbeit sollte als erster Schritt für die Erarbeitung dieser Methodik dienen, indem ein Vergleich von in der Literatur beschriebenen Primern und DNA-Aufarbeitungstechniken untersucht wurde.

5.2 Versuchsaufbau

Die Arbeit besteht aus einem Vorversuch und einem zweistufigen Hauptversuch. Im Hauptversuch wurde zunächst die Effizienz von Primern und Zellaufschlussmethoden mit reinen Bakterienkulturen getestet (Teil A), danach wurde mit künstlich kontaminierten Schweine-lymphknoten als Matrix gearbeitet (Teil B).

Die PCR-Bedingungen wurden aus der Literatur für jedes Primerpaar übernommen und im Vorversuch an einer gut bewachsenen Bouillonkultur getestet. Auf diese Weise wurde zum einen die möglichen Kombinationen der 10 eingesetzten Primer an den sechs vorhandenen Mykobakterien-Spezies bzw. Subspezies überprüft, zum anderen nach eventuellen Verbesserungen im PCR-Protokoll gesucht. Da alle Primer im UV-Bild jedoch gut auswertbare Banden zeigten, wurden keine Änderungen im PCR-Protokoll vorgenommen.

Der erste Abschnitt im Hauptversuch (Teil A) sollte die Nachweisgrenzen bei der Testung mit reinem Bakterienmaterial aufzeigen. Zum Zellaufschluss wurden die gebräuchlichsten Aufarbeitungen Kochen, Chloroform-/ Phenol-Extraktion und eine Kombination aus Ultraschallbehandlung mit anschließendem Kochen eingesetzt. Mit Hilfe der sechs eingesetzten Mykobakterien-Spezies/ Subspezies in Kombination mit 10 Primerpaaren wurde anhand von Verdünnungsreihen die PCR-Nachweisgrenze auf Grundlage der drei Aufschlussmethoden ausgetestet.

Im zweiten Abschnitt des Hauptversuchs (Teil B) wurde der Bouillonkultur Lymphknotenmaterial vom Schwein zugemischt. Durch Einbringen dieses Fremdmaterials sollte ein realistisches Milieu im Aufarbeitungsansatz simuliert werden. Die genaue Konzentration an Mykobakterien in infizierten Lymphknoten lässt sich der Literatur allerdings nicht entnehmen. Es wurde die gleiche Menge an Mykobakterien-Bouillon wie in Teil A verwendet (1 ml), damit ein eventueller Anstieg der Nachweisgrenzen beurteilt werden konnte. Die Menge von 200 mg eingemischtem Lymphknotenmaterial entsprach dem Protokoll von SEITERT (2003), der in seiner Arbeit Lymphknoten von abgemagerten Kühen zum Nachweis von *M. avium* subsp. *paratuberculosis* mit Hilfe einer Real Time-PCR untersuchte.

5.3 Eingesetzte Stämme

Verwendet wurden hauptsächlich mit Mykobakterien-Typstämme. Einzige Ausnahme stellte *M. avium* subsp. *hominissuis* dar, der als Feldstamm freundlicherweise vom Friedrich-Löffler-Institut (Jena) zur Verfügung gestellt wurde. Folgende sechs Mykobakterien-Spezies/ Subspezies kamen in Teil A zum Einsatz:

- 1.) *M. intracellulare* (DSM 43223^T)
- 2.) *M. avium* subsp. *avium* (DSM 44156^T)
- 3.) *M. avium* subsp. *hominissuis* (3 Feldstämme, FLI Jena)
- 4.) *M. avium* subsp. *silvaticum* (DSM 44175^T)
- 5.) *M. triviale* (DSM 44153^T)
- 6.) *M. scrofulaceum* (DSM 43992^T)

Am wichtigsten ist beim Schwein *M. avium* subsp. *hominissuis*, da diese Subspezies derzeit ca. 90 % aller Mykobakterien beim Schwein ausmacht (FISCHER 1999; PAVLIK et al. 2003; MATLOVA et al. 2005). Sie wurde erstmals von MIJS et al. (2002) beschrieben und stellt damit eine relativ neue Subspezies innerhalb des MAIC dar. Zu Versuchsbeginn existierte noch kein kommerziell erhältlicher Typstamm, so dass hier auf Feldstämme zurück gegriffen wurde.

M. avium subsp. *avium* und *M. intracellulare* werden ebenfalls häufig bei Schweinen nachgewiesen, allerdings in weit geringerem Umfang als *M. avium* subsp. *hominissuis* (FISCHER 1999; PAVLIK et al. 2003; MATLOVA et al. 2005).

Diskussion

Im ersten Teil der Untersuchung wurden noch *M. avium* subsp. *silvaticum* als weiterer Vertreter des MAIC, der dem MAIC nahe stehende *M. scrofulaceum* und der nicht-MAIC-Stamm *M. triviale* eingesetzt.

Der ebenfalls zum MAIC gehörende Erreger *M. avium* subsp. *paratuberculosis* wurde in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt, da er zum einen auf das Rind und nicht das Schwein adaptiert ist (Erreger der Paratuberkulose), zum anderen, weil die Nachweistechiken für diese Subspezies im Gegensatz zu den anderen atypischen Mykobakterien weiter fortgeschritten sind. Bei diesen Techniken wird in erster Linie die Insertionssequenz IS900 genutzt (COUSINS et al. 1999; ELLINGSON et al. 2000; TASARA et al. 2005), die ausschließlich bei *M. avium* subsp. *paratuberculosis* vorkommt und deshalb bei den anderen atypischen Mykobakterien nicht von Interesse ist.

Da sich die sechs verwendeten Mykobakterien-Spezies/ Subspezies in ihrer genetischen Zusammensetzung unterscheiden, ergaben sich für die 10 eingesetzten Primer verschiedene Kombinationsmöglichkeiten. In Tabelle 5.1 ist dargestellt, welche Primer bei welchen Stämmen eingesetzt werden können.

Tabelle 5.1 Nachweismöglichkeiten verschiedener Mykobakterien-Stämme mit Hilfe der verwendeten Primer

Stämme \ Primer	Mycob	Mav	Min	AV 6/7	IN 38/41	S+P	IS 901	IS 1245	Maap	IS 902
<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> DSM 44156 ^T	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> Feldstämme	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> DSM 44175 ^T	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>M. triviale</i> DSM 44153 ^T	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. scrofulaceum</i> DSM 43992 ^T	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Da das Hauptaugenmerk dieser Untersuchung auf die hauptsächlich beim Schwein vorkommenden Vertreter *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *avium* und *M. intracellulare* gelegt wurde, kamen im 2. Versuchsabschnitt (Teil B) nur diese drei Spezies/ Subspezies zum Einsatz.

5.4 Eingesetzte Zellaufschlussverfahren

Die DNA-Extraktion ist bei Mykobakterien schwieriger als bei anderen Bakterien, da Mykobakterien aufgrund der auf ihrer Peptidoglykanschicht aufgelagerten wachsartigen Substanzen in ihrer Zellwand gegenüber einer Vielzahl von Lysepuffern resistent sind (WARDS et al. 1995; CORNEJO et al. 1998; MURRAY et al. 2002; HOSEK et al. 2006).

In dieser Untersuchung kamen insgesamt vier verschiedene Zellaufschlussverfahren zum Einsatz:

- Die „Kochmethode“ wurde als einfachste und allgemein gängige DNA-Aufarbeitungsmethode in beiden Teilen des Hauptversuchs angewendet. Ihr Prinzip besteht in der Zerstörung der Zellwand durch Kochen. Vorteil ist die einfache Durchführung, sie ist schnell, billig und wird vielfach bei der Arbeit mit Mykobakterien-Isolaten eingesetzt (TORTOLI et al. 2001; SVASTOVA et al. 2002). Der Nachteil liegt in dem Einbringen von PCR-Inhibitoren in den PCR-Ansatz, da keine Aufreinigung des gekochten Materials erfolgt. Abhängig vom Probenmaterial sind als mögliche Inhibitor-Quellen z.B. Blut (Häm, IgG, EDTA, Heparin), Urin (Harnsäure), Kot (Bilirubin, Gallensalze) oder Lebensmittel (Glycogen, Fette, Salz, Kohlenhydrate, Aminosäuren) zu nennen (KHAN et al. 1991; ROSSEN et al. 1992; LANTZ et al. 1997; WILSON 1997; AL-SOUD et al. 2000).
- Eine Modifizierung der Kochmethode ist die sog. „Ultraschallmethode“ (ROTH et al. 1998). Hier wurde zusätzlich zum Kocheffekt mit feinen Glaskügelchen eine mechanische Zerstörung der Zellen im Ultraschallbad bewirkt. Sie war damit etwas material- und arbeitsaufwendiger als die Kochmethode bei gleichen Nachteilen. Die Ultraschallmethode wurde nur im ersten Abschnitt des Hauptversuchs eingesetzt. Im Einsatz mit Lymphknotenmatrix (Teil B) wurde auf diese Technik verzichtet, da sie in Teil A keine wesentlich besseren Ergebnisse zeigte als die Kochmethode.
- Die Chloroform/ Phenol-Extraktion (MOORE 1990) war deutlich arbeits- und zeitaufwendiger als die beiden vorher genannten Methoden, diesen aber bei der DNA-Reinigungsleistung überlegen, da die DNA hier ausgefällt wird und störende Substanzen wie z.B. Proteine oder Salze durch Phasentrennung und Zentrifugation abgetrennt wer-

den. Bei dieser Methode erfolgt die Zellzerstörung durch den Einsatz des Enzyms Proteinase K. Nachteilig ist der Einsatz von toxischen Substanzen (Chloroform, Phenol), die das Arbeiten unter dem Abzug und eine spezielle Entsorgung erfordern. Diese Methode wurde in verschiedenen Variationen häufig bei Mykobakterien angewendet (MOORE 1990; PAVLIK et al. 1999; DVORSKA et al. 2003; SOMERVILLE et al. 2005).

- Der Einsatz eines kommerziell erhältlichen DNA-Extraktionskits (High Pure PCR Template Preparation Kit, Fa. Roche Applied Science, Mannheim) wurde in Teil B getestet. Dieses System ist zwar die teuerste Aufarbeitungsmethode, bietet aber ähnlich wie die Chloroform/ Phenol-Methode den Vorteil der Eliminierung von Inhibitoren aus dem PCR-Ansatz. Beim DNA-Kit werden spezielle Filtersysteme eingesetzt, die so konzipiert sind, dass in mehreren aufeinander folgenden Wasch- und Zentrifugationsschritten störende Substanzen entfernen werden. Auch hier wird Proteinase K zur initialen DNA-Freisetzung verwendet. Dieses System wurde ausschließlich im zweiten Abschnitt des Hauptversuchs (Teil B) eingesetzt, da nur hier Bedarf für diese aufwendige und kostspielige Technik bestand. Bei der Arbeit mit Reinkulturen, die von Natur aus weniger Störsubstanzen durch Fremdgewebe enthalten, ist ein DNA-Kit nicht notwendig und auch nicht sinnvoll. Um auch in Teil B drei Aufarbeitungsmethoden vergleichen zu können, wurde die „Ultraschallmethode“, die der „Kochmethode“ am ähnlichsten ist, fallen gelassen.

Bei der nachfolgenden Bewertung der Zellaufschlussverfahren muss unterschieden werden, ob Reinkulturen (Teil A) oder Gewebeproben (Teil B) untersucht werden:

5.4.1 Bewertung der Zellaufschlussverfahren bei der Verwendung von Reinkulturen (Teil A)

Bei der Verwendung von Reinkulturen (Teil A) wurden bei jeder der drei eingesetzten Aufarbeitungsmethoden (Kochen, Chloroform/ Phenol, Ultraschall mit anschließendem Kochen) 78 Verdünnungsreihen untersucht (26 Primer-/ Stammkombinationen x 3 Ansätze).

Alle PCR-Ansätze erbrachten ein positives Ergebnis. Im Durchschnitt erwies sich die Ultraschallmethode mit anschließendem Kochen mit einer Nachweisgrenze von $5,90 \log_{10}$ KbE/ml als am bestem geeignet für die Arbeit mit Reinkulturen (Tabelle 4.12). Die Aufarbeitung durch Kochen war jedoch mit $5,91 \log_{10}$ KbE/ml fast genauso effektiv, d.h. die zusätzliche Ultraschallbehandlung bei der erstgenannten Methode hatte nahezu keinen zusätzlichen

positiven Effekt. Die Chloroform/ Phenol-Methode konnte dagegen mit einer Nachweisgrenze von $7,08 \log_{10}$ KbE/ ml bei Teil A nicht überzeugen.

Bei der Arbeit mit Reinkulturen kann demnach das Kochen der Probe empfohlen werden, da diese Methode effizient, schnell und kostengünstig ist. Durch eine zusätzliche Ultraschallbehandlung der Bouillonkultur ist die Nachweisgrenze nur sehr geringfügig besser, was den höheren Arbeits- und Materialaufwand nicht rechtfertigt.

5.4.2 Bewertung der Zellaufschlussverfahren bei der Arbeit mit Lymphknotenmatrix (Teil B)

Bei Einmischung der Mykobakterien-Bouillonkulturen in Lymphknotengewebe ergab sich ein grundsätzlich anderes Bild als bei den Reinkulturen.

Hier traten die oben erwähnten Nachteile des Kochens deutlich zu Tage, denn die eingemischten Mykobakterien konnten mit Hilfe der Kochmethode nur in 11 von 51 Ansätzen (= 21,6 % positiv) wiedergefunden werden.

Auch bei der Chloroform-/ Phenol-Methode waren nicht alle Wiederfindungsversuche erfolgreich, lediglich in 48 von 51 Ansätzen (= 94,1 % positiv) wurden Mykobakterien nachgewiesen. Einzig beim Einsatz des kommerziellen DNA-Extraktionskits waren alle 51 Ansätze in mindestens einer Verdünnungsstufe positiv.

Die Nachweisgrenzen waren im Vergleich zur Arbeit mit Reinkulturen erkennbar schlechter (Tabell 4.13). Beim überlegenden DNA-Extraktionskit war sie mit durchschnittlich $7,39 \log$ KbE/ ml besser als bei der Chloroform-/ Phenol-Methode ($7,95 \log_{10}$ KbE/ ml). Eine Berechnung der Nachweisgrenze war für das Kochen aufgrund der hohen Anzahl negativer Ergebnisse nicht möglich.

Vergleicht man die jeweils besten Aufarbeitungsmethoden von Teil A und B, dann betrug die Differenz bei der Nachweisgrenze ca. 1,5 log-Stufen ($5,90 \log$ KbE/ ml bei Ultraschall mit Kochen in Teil A bzw. $7,39 \log$ KbE/ ml beim DNA-Extraktionskit in Teil B). Die Verschlechterung bei der Chloroform-/Phenol-Methode betrug ca. eine log-Stufe ($7,08 \log$ KbE/ ml in Teil A bzw. $7,95 \log_{10}$ KbE/ ml in Teil B).

Für die Aufarbeitung von Gewebeproben kann deshalb der Einsatz des kommerziellen DNA-Kits empfohlen werden.

Diese Ergebnisse betätigen die Aussage von HOSEK et al. (2006), dass die optimale Extraktionsmethode vom Probenmaterial abhängt und für jeden Probentyp unterschiedlich ist.

5.5 Bewertung der Primer

Für diese Arbeit wurden insbesondere die in der Literatur beschriebenen MAIC-spezifischen Primer getestet. Einziger Genus-spezifischer Primer war Mycob, der ebenfalls mit einbezogen wurde, da er von CHEN et al. (1996) neben den Spezies-spezifischen Primern Mav und Min beschrieben wurde.

Die Primer haben jeweils verschiedene Ansatzpunkte an der mykobakteriellen DNA, nämlich das 16S rRNA-Gen, die DT6/ DT1-Sequenz oder die Insertionssequenzen IS901, IS1245 oder IS902. Abhängig von der Ansatzstelle werden nur bestimmte Mykobakterien-Spezies/ Subspezies von den Primern erfasst.

Vor allem *M. intracellulare* unterscheidet sich in der DNA grundlegend von den *M. avium* Subspezies. Sollte der Nachweis von *M. intracellulare* neben *M. avium* subsp. gewünscht sein, muss zusätzlich noch ein anderes Primerpaar eingesetzt werden, sofern nicht der Genus-spezifische Primer Mycob verwendet wird. Dies wäre mit den Primern Min oder IN 38/ 41 möglich.

Bei der Bewertung der Primer kann zunächst festgestellt werden, dass alle Primer in Teil A (Reinkulturen) in der Lage waren, die verschiedenen Mykobakterien aus der Bouillon zu detektieren. Die Primer unterschieden sich in ihrer Nachweisgrenze voneinander. Tabelle 5.2 zeigt die Nachweisgrenzen der zehn eingesetzten Primer in Kombination mit den Spezies/ Subspezies bei der Arbeit mit Mykobakterien-Bouillonkulturen (Teil A) bzw. mit Lymphknotenmatrix (Teil B). Der Einfluss der DNA-Aufarbeitungsmethode wurde bei diesem Vergleich nicht berücksichtigt, alle drei Zellaufschlussmethoden flossen zu gleichen Teilen in die Berechnung ein (bei Teil B wurde die Kochmethode nicht berücksichtigt).

Die niedrigste Nachweisgrenze für den beim Schwein wichtigsten MAIC-Vertreter *M. avium* subsp. *hominissuis* wurde in Teil A mit dem Primer IS1245 erzielt (5,66 log₁₀ KbE/ ml), ge-

Diskussion

folgt von Maap (5,77 log₁₀ KbE/ ml) sowie Mav und AV 6/ 7 (je 5,88 log₁₀ KbE/ ml). In Teil B war für *M. avium* subsp. *hominissuis* der Primer AV 6/ 7 (6,33 log₁₀ KbE/ ml) vor IS1245 und Maap (6,49 log₁₀ KbE/ ml) am besten geeignet.

M. avium subsp. *avium* ließ sich in Teil A am besten mit den Primern Mycob (6,09 log₁₀ KbE/ ml) und IS902 (6,32 log₁₀ KbE/ ml) nachweisen, in Teil B durch IS902 (6,76 log₁₀ KbE/ ml). Für den Nachweis von *M. intracellulare* eignete sich in Teil A der Primer IN 38/ 41 (6,63 log₁₀ KbE/ ml), in Teil B der Primer Mycob (8,24 log₁₀ KbE/ ml).

Tabelle 5.2 Nachweisgrenzen der eingesetzten Primer bei den verschiedenen Mykobakterien-Spezies/ Subspezies unter Verwendung von Reinkulturen (Teil A) und Lymphknotenmatrix (Teil B)

	Teil A						Teil B		
	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	<i>M. triviale</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
Mycob	6,85	6,09	6,10	5,45	6,64	6,72	8,24	8,35	7,66
Mav	-	6,65	5,88	5,34	-	-	-	7,96	7,66
Min	6,85	-	-	-	-	-	8,82	-	-
AV 6/ 7	-	6,43	5,88	-	-	-	-	7,10	6,33
IN 38/ 41	6,63	-	-	-	-	-	8,52	-	-
S + P	-	7,10	6,10	6,12	-	-	-	8,60	7,33
IS901	-	7,23	-	5,79	-	-	-	7,93	-
IS1245	-	7,90	5,66	6,57	-	-	-	8,43	6,49
Maap	-	7,35	5,77	5,68	-	-	-	7,76	6,49
IS902	-	6,32	-	4,57	-	-	-	6,76	-

- = kein Nachweis möglich

Bei der Arbeit mit Reinkulturen (Teil A) eigneten sich grundsätzlich alle Primer, da alle bei einer gut bewachsenen Bouillonkultur zu einem positiven Ergebnis führten. Durch Einmischung von Lymphknotenmatrix (Teil B) sank die Nachweisgrenze bei allen Primern jeweils um etwa eine halbe bis zwei Zehnerpotenzen.

Diskussion

Bei der Wahl eines geeigneten Primers zum angedachten Direktnachweis von Mykobakterien des MAIC aus Schweinelymphknoten muss die Prävalenz der verschiedenen Spezies/ Subspezies berücksichtigt werden. Ca. 90 % aller MAIC-Infektionen beim Schwein werden durch *M. avium* subsp. *hominissuis* verursacht (FISCHER 1999; PAVLIK et al. 2003; MATLOVA et al. 2005). Bei Anwendung des kommerziellen DNA-Extraktionskits waren die Primer IS1245 und Maap mit einer Nachweisgrenze von je 5,66 log₁₀ KbE/ ml in Teil B am besten für diese Subspezies geeignet (Tab. 4.13). Auch die anderen *M. avium*-Subspezies lassen sich durch diese Primer nachweisen, allerdings nicht *M. intracellulare*.

Um alle Vertreter des MAIC zu erfassen bietet sich eine Multiplex-PCR (zwei oder mehr Primerpaare im gleichen Amplifikationsansatz) an. Durch die gleichzeitige Anwendung der Primerpaare AV 6/ 7 und IN 38/ 41 können sowohl *M. intracellulare* als auch *M. avium* subsp. *avium* und *M. avium* subsp. *hominissuis* nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenzen dieser Primerkombination waren besser als die der Kombination der Primer Mav und Min, die ebenfalls die genannten Vertreter des MAIC nachweisen können (Tab. 5.3).

Tabelle 5.3 Nachweisgrenzen bei den Primern Mav/ Min unter Verwendung von Lymphknotenmatrix (Teil B)

Stamm	Mav	Min	AV 6/ 7	IN 38/ 41
<i>M. intracellulare</i> DSM 43223 ^T	ng	8,52	ng	8,18
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> DSM 44156 ^T	7,76	ng	7,43	ng
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> Feldstämme	7,32	ng	5,99	ng

ng = nicht getestet

Deshalb wird der Einsatz von AV 6/ 7 in Kombination mit IN 38/ 41 für den Routineeinsatz an Gewebeproben empfohlen.

5.6 Bewertung der erzielten Nachweisraten

Für einen Nachweis durch die PCR waren durchschnittlich 10^5 - 10^7 Keime/ ml notwendig. Damit liegt die hier angewendete Methode unterhalb der Nachweisgrenzen für Kultur (10^1 - 10^2 KbE/ ml) und den mikroskopischen Nachweis (10^3 - 10^4 KbE/ ml). Auch im Vergleich mit anderen PCR-Nachweistechiken (allgemein 10^2 - 10^3 KbE/ ml, bei einigen Spezies auch deutlich darunter) schneidet die hier untersuchte Technik schlechter ab. In Tabelle 5.3 sind einige in der Literatur beschriebenen PCR-Nachweisgrenzen aufgeführt.

Tabelle 5.3 Auswahl von in der Literatur beschriebenen PCR-Nachweisgrenzen

Nachweisgrenze (KbE / ml)	Zielkeim	Matrix/ Testsystem	Literaturquelle
$1,2 \times 10^2$	<i>Salmonella</i>	TSB-Kultur	KIMURA et al. (1999)
$1,4 \times 10^2$	<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeria test-PCR	BESSER (2000)
$1,0 \times 10^3$	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Sputum	HERMANS et al. (1990)
$1,0 \times 10^3$	Campylobacter sp.	Geflügelfleisch und -innereien, Geflügelkot	WERTH (2006)
$1,0 \times 10^3$	<i>Staphylococcus aureus</i>	Blut	BRAKSTAD et al. (1992)
$2,0 \times 10^3$	<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	IMS-PCR (IS 900)	GRANT et al. (2000)
$5,0 \times 10^3$	<i>Staphylococcus aureus</i>	Milch	RIFFON et al. (2001)
$3,5 \times 10^3$ $2,6 \times 10^4$	<i>E. coli</i> O157:H7 <i>E. coli</i> O157:H7	Kultur Umweltproben	IBEKWE u. GRIEVE (2003)
$1,6 \times 10^6$	<i>Listeria monocytogenes</i>	BAXTM-PCR	BESSER (2000)

Der Umstand der geringeren Nachweisrate lässt sich zum einen damit erklären, dass Mykobakterien aufgrund ihrer besonderen Zellwandstruktur schwerer zu zerstören sind als andere Bakterienzellen (MURRAY et al. 2002; HOSEK et al. 2006). Außerdem wurden die Angaben bezüglich der durchgeführten Techniken ohne Veränderungen aus der Literatur übernommen, d.h. es wurden keine Optimierungsversuche vorgenommen. Die Primer stammen alle aus Literaturquellen, bei denen mit Kulturmaterial gearbeitet wurde. Die PCR-Protokolle waren für die Anwendung an Reinkulturen ausreichend, was auch in dieser Arbeit belegt werden konnte: Alle Verdünnungsansätze in Teil A waren positiv.

5.7 Folgerungen/ Konsequenzen

Die Beobachtung niedrigerer Nachweisraten bei Beteiligung von Lymphknotenmaterial legt eine Überprüfung der Aufarbeitungsmethode und/ oder der PCR nahe. Bei dem Material, das zur DNA-Extraktion vorlag, handelte es sich um eine Mischung aus Mykobakterienbewachsener Bouillon bekannter Konzentration und 200 mg Lymphknotengewebe.

Eine denkbare Möglichkeit für die geringere Nachweisrate in Teil B ist eine Überlagerung der Ziel-DNA mit großen Mengen an unspezifischer Hintergrund-DNA, die sowohl aus kompetitiver Mikroflora als auch aus dem Gewebe der Probe selbst stammen kann.

Inhibitoren, die bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode mitgeführt werden können, sind neben einer großen Menge DNA und Zellbestandteilen vor allem die Faktoren aus dem Blut (Häm, IgG, EDTA, Heparin, hohe Konzentration leukotriener DNA), aber auch Glycogen, Fette oder Ca^{2+} .

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass mit steigender Zahl von Substanzen in einem Medium die Formulierung des Protokolls eine zentrale Rolle einnimmt. Die zu verwendende Methode muss weitgehend auf das Probenmaterial und den Erreger abgestimmt werden. Generell gilt der Grundsatz, dass unterschiedliche Aufarbeitungsmethoden für unterschiedliche Probenarten und unterschiedliche Keime verwendet werden müssen (WILSON 1997).

Eine Modifizierung der einzelnen Arbeitsschritte könnte zu einer Erhöhung der Effizienz führen. Verbesserungsmöglichkeiten bieten sich in allen Arbeitsschritten an:

1. Aufarbeitung der Lymphknoten
 - a. Lokalisation der Materialgewinnung (Lymphknotenmark, -rinde)
 - b. Menge an Lymphknotenmaterial
 - c. Homogenisierungszeiten erhöhen, andere Homogenisierungsarten
 - d. Variation in der Zentrifugation
 - e. Einsatz von Mykobakterienzellwandzerstörenden Substanzen (z.B. Lysozym)
2. DNA-Extraktion
 - a. Einsatz anderer kommerzieller Kits (andere Hersteller)
3. Durchführung der PCR
 - a. Variationen im Temperaturprogramm (Annealingtemperatur)
 - b. Erhöhung der Zyklenzahl
 - c. Erhöhung der DNA-Ausgangsmenge
 - d. Einsatz spezifischerer Polymerasen

6 Zusammenfassung

Eignung unterschiedlicher Primer und DNA-Extraktionsmethoden zum PCR-Nachweis von Vertretern des Mycobacterium avium-intracellulare-Komplexes (MAIC)

Für eine effektive Überwachung und Bekämpfung der Mykobakteriose ist eine schnelle Detektion und spezifische Identifikation des Erregers erforderlich. Aufgrund des langsamen Wachstums von Mykobakterien kann dies aus der Kultur, die als „Goldstandard“ betrachtet wird, je nach Spezies mehrere Wochen dauern. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht eine Amplifikation von DNA in wenigen Stunden und verkürzt somit die Dauer der Diagnostik beträchtlich.

Ziel dieser Arbeit war die Erarbeitung eines PCR-Modells als Grundlage für Reihenuntersuchungen von Schweinebeständen auf Vertreter des *Mycobacterium avium-intracellulare*-Komplexes (MAIC). In einem zweiteiligen Versuchsaufbau wurden in der Literatur beschriebene Primer und Zellaufschlussverfahren unter Verwendung von Mykobakterien-Stämmen vergleichend untersucht. Die Testung erfolgte zum einen an Verdünnungen von Reinkulturen bekannter Konzentration (Teil A), zum anderen an gespikten Lymphknotenproben (Teil B). Zum Einsatz kamen sechs Mykobakterien-Spezies/ Subspezies (*M. intracellulare*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. triviale*, *M. scrofulaceum*), 10 Primerpaare und vier Zellaufschlussverfahren (Kochen, Chloroform/Phenol-Methode, Ultraschall mit anschließendem Kochen, kommerzielles DNA-Extraktionskit).

Mit den verwendeten Techniken war es möglich, Vertreter des MAIC nachzuweisen, wobei sich bei den Reinkulturen bessere Nachweisraten erzielen ließen als bei Vorhandensein von Lymphknotenmaterial.

Bei Reinkulturen (Teil A) erwies sich das alleinige Kochen der Probe als fast genauso effektiv wie die Ultraschallmethode mit anschließendem Kochen. Beim Routineeinsatz mit Mykobakterien-Kulturen kann deshalb die erstgenannte Methode empfohlen werden, da diese schneller durchzuführen, materialsparender und etwas kostengünstiger ist. Die Chloroform/Phenol-Methode schnitt in Teil A schlechter ab als die beiden anderen Aufarbeitungsmetho-

Zusammenfassung

den. Die durchschnittliche Nachweisgrenze betrug bei der Ultraschallmethode mit anschließendem Kochen 5,90 log₁₀ KbE/ ml, beim Kochen 5,91 log₁₀ KbE/ ml und bei der Chloroform/ Phenol-Methode 7,08 log₁₀ KbE/ ml.

Alle Primer waren bei Teil A in der Lage, die Mykobakterien, für die sie vorgesehen sind, aus der Bouillon zu detektieren.

Bei Vorhandensein von Lymphknotengewebe (Teil B) erwies sich die Kochmethode zur DNA-Extraktion als ungeeignet. Hier konnten die eingemischten Mykobakterien nur in 11 von 51 Verdünnungsreihen wiedergefunden werden (= 21,6 % positiv). Der Einsatz eines kommerziellen DNA-Kits (alle 51 Ansätze positiv) oder mit Abstrichen die Chloroform/ Phenol-Methode (48 von 51 Ansätze = 94,1 % positiv) erbrachte deutlich bessere Ergebnisse. Die Nachweisgrenze war beim DNA-Extraktionskit mit durchschnittlich 7,39 log₁₀ KbE/ ml besser als bei der Chloroform-/ Phenol-Methode (7,95 log₁₀ KbE/ ml), für das Kochen war eine Berechnung der Nachweisgrenze aufgrund der hohen Anzahl negativer Ergebnisse nicht möglich.

Als Primer zum Direktnachweis aus Lymphknotengewebe sollte die Kombination von AV 6/ 7 und IN 38/ 41 in Erwägung gezogen werden (Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis von *M. avium* subsp. und *M. intracellulare*). Die Nachweisgrenze für den wichtigsten Vertreter *M. avium* subsp. *hominissuis*, der ca. 90 % aller Mykobakterien-Infektionen beim Schwein ausmacht, betrug mit dem Primer AV 6/ 7 in Kombination mit dem DNA-Kit 5,99 log₁₀ KbE/ ml.

Die erzielten Nachweisraten waren im Vergleich zu den allgemein in der Literatur beschriebenen PCR-Nachweisraten unbefriedigend. Vor einem Einsatz im Feldversuch sollte deshalb durch Variation verschiedener Parameter eine Verbesserung der Nachweisrate angestrebt werden. Probenaufarbeitung, DNA-Extraktion und Durchführung der PCR sind gleichermaßen der Variation zu unterziehen.

7 Summary

Testing different primers and DNA extraction methods to detect members of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAIC) by using PCR.

For effective monitoring and control of mycobacteriosis rapid detection and specific identification of the pathogen is required. Due to the slow growth of mycobacteria in culture, which is considered as "gold standard", it takes several weeks, depending on the species. The polymerase chain reaction (PCR) allows amplification of DNA in a few hours, and thus considerably shortens the time for diagnosis.

The aim was to develop a PCR model as a basis for screening pigs to the *Mycobacterium-avium-intracellulare* complex (MAIC). In a two-part test set-up, primers and cell disruption procedures were compared by using different strains of mycobacteria. The testing was carried out with dilutions of pure cultures of known concentrations (part A), and with spiked swine lymph node samples (part B). The test included six mycobacterial species/ subspecies (*M. intracellulare*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. triviale*, *M. scrofulaceum*), 10 primer pairs and four cell disruption methods (boiling, chloroform/ phenol method, ultrasound followed by boiling, commercial DNA extraction kit).

With the used methods, it was possible to detect the members of the MAIC, with higher detection rates from the culture broth as directly from lymph node material.

For pure cultures (part A), boiling of the sample was almost as effective as the ultrasound method followed by boiling. For routine work with mycobacterial cultures therefore the first method is recommended, as it is faster, material-saving and slightly cheaper. The chloroform/ phenol method in part A was worse than the other two extraction methods. The average detection limit in the ultrasound method with boiling was 5.90 log₁₀ cfu/ ml, followed by boiling with 5.91 log₁₀ cfu/ ml and chloroform/ phenol method with 7.08 log₁₀ cfu/ ml. In part A, all primers were able to detect the respective mycobacteria from culture broth.

With lymph node tissue (part B), boiling was inappropriate as DNA extraction method, because the added mycobacteria was only found in 11 of 51 dilution series (= 21.6 %

Summary

positive). The use of a commercial DNA kit (all 51 approaches) or, to a lesser extent, the chloroform/ phenol method (48 of 51 approaches = 94.1% positive) yielded better results. The average detection limit in the DNA extraction kit was 7.39 log₁₀ cfu/ ml, better than the chloroform/ phenol method with 7.95 log₁₀ cfu/ ml. Calculation of the detection limit for boiling was not possible due to the high number of negative results.

The combination of AV 6/ 7 and IN 38/ 41 should be considered for direct detection of atypical mycobacteria in lymph node tissue (multiplex PCR for simultaneous detection of *M. intracellulare* and *M. avium* subsp.). The detection limit for *M. avium* subsp. *hominissuis*, which accounts for approximately 90% of mycobacterial infections in pigs, was 5.99 log₁₀ cfu/ ml with the primer AV 6/ 7 in combination with the DNA extraction kit.

Compared to the PCR detection rates generally described in the literature, the results of the techniques in this study were unsatisfactory. Prior to any use in a field trial, it should be attempted to improve the detection rate by varying different parameters. Sample preparation, DNA extraction and PCR procedure could be varied.

8 Literaturverzeichnis

ACKERMANN, B. (2001):

Molekulargenetische Untersuchungen zum Nitratstoffwechsel und diagnostischen Nachweis von Mykobakterien.

Vet. Med. Diss., Hannover

AHMED, N., J.R. KHAN, and N.A. GANAI (1999):

DNA amplification assay for rapid detection of bovine tubercle bacilli in semen.

Anim. Reprod. Sci. 57, 15-21

AKANE, A., K. MATSUBARA, H. NAKAMURA, S. TAKAHASHI, and K. KIMURA (1994):

Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification.

J. Forensic Sci. 39, 362-372

ALFREDSON, S., and E. SKJERVE (1993):

An abattoir-based case-control study of risk factors for mycobacteriosis in Norwegian swine.

Prev. Vet. Med. 15, 253-259

AL-SOUD, W.A., and P. RÅDSTRÖM (1998):

Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples.

Appl. Environ. Microbiol. 64, 3748-3753

AL-SOUD, W.A., and P. RÅDSTRÖM (2000):

Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat.

J. Clin. Microbiol. 38, 4463-4470

AL-SOUD, W.A., L.J. JÖNSSON, and P. RÅDSTRÖM (2000):

Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR.

J. Clin. Microbiol. 38, 345-350

ALVAREZ, A.J., M.P. BUTTNER, and L.D. STETZENBACH (1995):

PCR for bioaerosol monitoring: sensitivity and environmental interference.

Appl. Environ. Microbiol. 61, 3639-3644

ANTOGNOLI, M.C., M.D. SALMAN, J. TRIANTIS, J. HERNANDEZ, and T. KEEFE (2001):

A one-tube nested polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium bovis* in spiked milk samples: An evaluation of concentration and lytic techniques.

J. Vet. Diagn. Invest. 13, 111-113

ARANAZ, A., E. LIÉBANA, E. GÓMEZ-MAMPASO, J.C. GALÁN, D. COUSINS, A. ORTEGA, J. BLÁZQUEZ, F. BAQUERO, A. MATEOS, G. SÚAREZ, and L. DOMÍNGUEZ (1999):

Mycobacterium tuberculosis subsp. *caprae* subsp. nov.: A taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain.

Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 1263-1273

ARANAZ, A., D. COUSINS, A. MATEOS, and L. DOMÍNGUEZ (2003):

Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1785-1789

Literaturverzeichnis

AVID IX (1997):

Mykobakterien.

Richtlinien für die optimale Anzüchtung von Mykobakterien, erarbeitet vom Arbeitskreis für Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID) im Arbeitsgebiet „Mikrobiologie, Parasitologie und Hygiene“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG)

www.dvg.net/avid/methoden/mycobakterien-ix-1997.pdf

BALASUBRAMANIAN, V., E.H. WIEGESHAUS, B.T. TAYLOR, and D.W. SMITH (1994):

Pathogenesis of tuberculosis: Pathway to apical localization.

Tuber. Lung Dis. 75, 168-178

BARTOS, M., P. HLOZEK, P. SVASTOVA, L. DVORSKA, T. BULL, L. MATLOVA, I. PARMOVA, I. KUHN, J. STUBBS, M. MORAVKOVA, J. KINTR, V. BERAN, I. MELICHAREK, M. OCEPEK, and I. PAVLIK (2006):

Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards.

J. Microbiol. Methods 64, 333-345

BASSAM, B.J., and G. CAETANO-ANOLLES (1993):

Automated “hot start” PCR using mineral oil and paraffin wax.

BioTechniques 14, 30-34

BAUER, J., and Å.B. ANDERSEN (1999):

Stability of insertion sequence IS1245, a marker for differentiation of *Mycobacterium avium* strains.

J. Clin. Microbiol. 37, 442-444

BAUER, J., A.B. ANDERSEN, D. ASKGAARD, S.B. GIESE, and B. LARSEN (1999):

Typing of clinical *Mycobacterium avium* complex strains cultured during a 2-year period in Denmark by using IS1245.

J. Clin. Microbiol. 37, 600-605

BAUERFEIND, R., S. BENAZZI, R. WEISS, T. SCHLIESSER, H. WILLEMS, and G. BALJER (1996):

Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats, and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element IS900.

J. Clin. Microbiol. 34, 1617-1621

BECKER, K. (1963):

Typendifferenzierung bei tuberkulösen Schlachtschweinen.

Vet. Med. Diss., München

BECTON DICKINSON (1999):

BBL MGIT-Indikatorröhrchen für Mykobakterien-Wachstum.

BECTON DICKINSON, USA

BEERWERTH, W. und K. POPP (1971):

Zur epizootologischen Bedeutung der Sägemehleinstreu für das Auftreten der Schweinetuberkulose.

Zbl. Vet. Med. B 18, 634-645

BEERWERTH, W. und U. KESSEL (1976):

Mykobakterien in der Umwelt von Mensch und Tier.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. A 235, 177-183

BEGGS, M.L., R. STEVANOVA, and K.D. EISENACH (2000):

Species identification of *Mycobacterium avium* complex isolates by a variety of molecular techniques.

J. Clin. Microbiol. 38, 508-512

- BEJ, A.K., M.H. MAHBUBANI, J.L. DICESARE, and R.M. ATLAS (1991):
Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples.
Appl. Environ. Microbiol. 57, 3529-3534
- BENSON, C.A. (1994):
Disease due to *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS: Epidemiology and clinical syndrome.
Clin. Infect. Dis. 18, S218-S222
- BERGMANN, R., and O. HOLMBERG (1979):
Occurrence and characterization of "avium-like" mycobacteria isolated from animals in Sweden.
Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B 87, 363-369
- BESSER, I.D. (2000):
Untersuchungen zur Optimierung und Prüfung spezifischer PCR-Nachweisverfahren für *Listeria monocytogenes* in Milchprodukten.
Vet. Med. Diss., München
- BfR (1998):
Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 1998.
BgVV-Hefte, ISBN 3-931675-49-1, S. 23
- BILLE, N., and L. LARSEN (1973):
Porcine congenital infection due to *Mycobacterium tuberculosis* typus *avium*.
Nord. Mes.-Vet. 25, 139-143
- BISPING, W. (1998):
Zur Geschichte der Bekämpfung der Rindertuberkulose.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 111, 362-367
- BISPING, W. und G. AMTSBERG (1988):
Mykobakterien.
In: BISPING, W. und G. AMTSBERG (Hrsg.): Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere.
Verlag Paul Parey, Berlin, S. 108-120
- BÖDDINGHAUS, B., T. ROGALL, T. FLOHR, H. BLOCKER, and E.C. BÖTTGER (1990):
Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA.
J. Clin. Microbiol. 28, 1751-1759
- BÖHM, O., J. PREVORCNIK, L. SENK, S. KOSOROK, and G. BAJT (1988):
Mycobacterium intracellulare Serovar 4 infection on a large-scale pig farm in Slovenia, Yugoslavia.
In: Proc. 10th Congr. Intern. Pig Vet. Soc., Rio de Janeiro, Brasilien, 14.-17. August 1988
- BÖTTGER, C. (1991):
Systematik, Differenzierung und Nachweis von bakteriellen Infektionserregern – Die Familie Mycobacteriaceae.
Immun. Infekt. 19, 143-152
- BOHRBEN, A. (2003):
Diagnostik von Mykobakterien mittels Polymerase-Kettenreaktion: Nachweis aus Patientenmaterial und Erweiterung der Speziesdiagnostik.
Vet. Med. Diss., Hannover

Literaturverzeichnis

- BONO, M., T. JEMMI, C. BERNASCONI, D. BURKI, A. TELENTI, and T. BODMER (1995):
Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains.
Appl. Environ. Microbiol. 61, 371-373
- BOOKSTEIN, R., C.C. LAI, H. TO, and W.H. LEE (1990):
PCR-based detection of a polymorphic BamHI site in intron 1 of the human retinoblastoma (RB) gene.
Nucleic Acids Res. 18, 1666
- BOSSHARD, C., R. STEPHAN, and T. TASARA (2006):
Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows.
J. Food Prot. 69, 1662-1667
- BRAKSTAD, O.G., K. AASBAKK, and J.A. MAELAND (1992):
Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene.
J. Clin. Microbiol. 30, 1654-1660
- BRENNAN, P. (1981):
Structure of the typing antigens of atypical mycobacteria: a brief review of present knowledge.
Rev. Infect. Dis. 3, 905-913
- BROSCH, R., S.V. GORDON, M. MARMIESSE, P. BRODIN, C. BUCHRIESER, K. EIGLMEIER, T. GARNIER, C. GUTIERREZ, G. HEWINSON, K. KREMER, L.M. PARSONS, A.S. PYM, S. SAMPER, D. VAN SOOLINGEN, and S.T. COLE (2002):
A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 3684-3689
- BUHLER, V.B., and A. POLLAK (1953):
Human infection with atypical acid-fast organisms – Report of two cases with pathologic findings.
Am. J. Clin. Pathol. 23, 363-374
- BULL, T.J., J.M. SHERIDAN, H. MARTIN, N. SUMAR, M. TIZARD, and J. HERMON-TAYLOR (2000):
Further studies on the GS element. A novel mycobacterial insertion sequence (IS1612), inserted into an acetylase gene (*mpa*) in *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* but not in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.
Vet. Microbiol. 77, 453-463
- BULL, T.J., E.J. MCMINN, K. SIDI-BOUMEDINE, A. SKULL, D. DURKIN, P. NEILD, G. RHODES, R. PICKUP, and J. HERMON-TAYLOR (2003a):
Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease.
J. Clin. Microbiol. 41, 2915-2923
- BULL, T.J., K. SIDI-BOUMEDINE, E.J. MCMINN, K. STEVENSON, R. PICKUP, and J. HERMON-TAYLOR (2003b):
Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium* complex.
- CAPEWELL, S., A.R. LEAKER, and A.G. LEITCH (1988):
Pulmonary tuberculosis in health service staff - Is it still a problem?
Tubercle 69, 113-118
- CDC (1997):
<http://www.cdc.gov/od/ohs/tb/tbdoc2.htm>

Literaturverzeichnis

- CHEN, Z.-H., W.R. BUTLER, B.R. BAUMSTARK, and D.G. AHEARN (1996):
Identification and differentiation of *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* by PCR.
J. Clin. Microbiol. 34, 1267-1269
- CHERNESKY, M.A., D. JANG, J. SELLORS, K. LUINSTRAS, S. CHONG, S. CASTRICIANO, and J.B. MAHONY (1997):
Urinary inhibitors of polymerase chain reaction and ligase chain reaction and testing of multiple specimens may contribute to lower assay sensitivities for diagnosing *Chlamydia trachomatis* infected women.
Mol. Cell. Probes 11, 243-249
- CHIODINI, J.R. (1989):
Crohn's disease and the mycobacterioses: A review and comparison of two disease entities.
Clin. Microbiol. Rev. 2, 90-117
- CIMINO, G.D., K. METCHETTE, S.T. ISAACS, and Y.S. ZHU (1990):
More false-positive problems.
Nature 345, 773-774
- CLINE, J.M., D.W. SCHLAFER, D.R. CALLIHAN, D. VANDERWALL, and F.J. DRAZEK (1991):
Abortion and granulomatous colitis due to *Mycobacterium avium* complex infection in a horse.
Vet. Pathol. 28, 89-91
- COETSIER, C., P. VANNUFFEL, N. BLONDEEL, J.F. DENEFF, C. COCITO, and J.L. GALA (2000):
Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle.
J. Clin. Microbiol. 38, 3048-3054
- COLE, J., C. THOEN, and F. MITCHELL (1975):
Mycobacterium avium infection in Georgia swine.
In: Proc. 79th Ann. Meet. U.S. Anim. Health Assoc., S. 294-297
- COLE, J., L. SANGSTER, D. HERNON, A. PURSELL (1980):
Swine mycobacterial infection: Epidemiology, pathogenesis and prevention.
In: Proc. 6th Congr. IPVS, Kopenhagen, Dänemark, 30. Juni - 3. Juli 1980, S. 198
- COLLINS, D.M., D.M. GABRIC, and G.W. DE LISLE (1989):
Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*.
FEMS Microbiol. Lett. 51, 175-178
- COLLINS, D.M., D.M. GABRIC, and G.W. DE LISLE (1990):
Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization.
J. Clin. Microbiol. 28, 1591-1596
- COLLINS, D.M., S. CAVAINAC, and G.W. DE LISLE (1997):
Use of four DNA insertion sequences to characterize strains of *Mycobacterium avium* complex isolated from animals.
Mol. Cell. Probes 11, 373-380
- COLLINS, D.M., M. DE ZOETE, and S.M. CAVAINAC (2002):
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference.
J. Clin. Microbiol. 40, 4760-4762
- COMEY, C.T., J.M. JUNG, and B. BUDOWLE (1991):
Use of formamide to improve amplification of HLA-DQ alpha sequences.
BioTechniques 10, 60-61a

Literaturverzeichnis

- CORNEJO, B.J., A. SAHAGÚN-RUIZ, F. SUÁREZ-GÜEMES, C.G. THORNTON, T.A. FICHT, and L.G. ADAMS (1998):
Comparison of C18-carboxypropylbetaine and glass bead DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium bovis* in bovine milk samples and analysis of samples by PCR.
Appl. Environ. Microbiol. 64, 3099-4101.
- CORNER, L.A., R.H. BARRETT, A.W.D. LEPPER, V. LEWIS, and C.W. PEARSON (1981):
A survey of mycobacteriosis of feral pigs in the Northern Territory.
Austr. Vet. J. 57, 537-542
- COUSINS, D., B. FRANCIS, and D. DAWSON (1996):
Multiplex PCR provides a low-cost alternative to DNA probe methods for rapid identification of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*.
J. Clin. Microbiol. 34, 2331-2333
- COUSINS, D.V., R. WHITTINGTON, I. MARSH, A. MASTERS, R.J. EVANS, and P. KLUVER (1999):
Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction: Implications for diagnosis.
Mol. Cell. Probes 13, 431-442
- COUSINS, D.V., S.N. WILLIAMS, A. HOPE, and G.J. EAMENS (2000):
DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using IS900 RFLP.
Aust. Vet. J. 78, 184-190
- CRAWFORD, J.T., J.K. FITZHUGH, and J.H. BATES (1981a):
Phage typing of the *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum*-complex.
Am. Rev. Resp. Dis. 124, 559-562
- CRAWFORD, J.T., M.D. CAVE, and J.H. BATES (1981b):
Characterization of plasmids from strains of *Mycobacterium avium-intracellulare*.
Rev. Infect. Dis. 3, 949-952
- CRAWFORD, J.T., and J.H. BATES (1986):
Analysis of plasmids in *Mycobacterium avium-intracellulare* isolates from persons with acquired immunodeficiency syndrome.
Am. Rev. Respir. Dis. 134, 659-661
- CVETNIĆ, Ž., H. KOVAČIĆ und M. OCEPEK (1998):
Mykobakterien in der Umwelt und im Futter von Schweinen in Kroatien.
Wien. Tierärztl. Monatschrift 85, 18-21
- DALCHOW, W. (1988):
Mykobakteriose beim Schwein durch Verfütterung von Teigabfällen.
Tierärztl. Umschau 43, 62-74
- DALCHOW, W. und J. NASSAL (1979):
Mykobakteriose beim Schwein durch Sägemehleinstreu.
Tierärztl. Umschau 34, 253-261
- DAWSON, D.J. (1990):
Infection with *Mycobacterium avium* complex in Australian patients with AIDS.
Med. J. Aust. 13, 466-468

DEDIÉ, K. (1993):

Tuberkulosen und Mykobakteriosen als Zoonosen.

In: DEDIÉ, K., J. BOCKEMÜHL, H. KÜHN, K.-J. VOLKMER und T. WEINKE (Hrsg.): Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch.

Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart, 335-362

DE FRANCHIS, R., N.C.P. CROSS, N.S. FOULKES, and T.M. COX (1988):

A potent inhibitor of *Taq* polymerase copurifies with human genomic DNA.

Nucleic Acids Res. 16, 10355

DE LISLE, G.W., D.M. COLLINS, and H.F. HUCHZERMEYER (1992):

Characterization of ovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization.

Onderstepoort J. Vet. Res. 59, 163-165

DE LISLE, G.W., B.J. WARDS, B.M. BUDDLE, and D.M. COLLINS (2005):

The efficacy of live tuberculosis vaccines after presensitization with *Mycobacterium avium*.

Tuberculosis 85, 73-79

DE LISLE, G.W., M.C. CANNON, G.F. YATES, and D.M. COLLINS (2006):

Use of a polymerase chain reaction to subtype *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, an increasingly important pathogen from farmed deer in New Zealand.

N. Z. Vet. J. 54, 195-197

DE LOMAS, J.G., F.J. SUNZERI, and M.P. BUSCH (1992):

False-negative results by polymerase chain reaction due to contamination by glove powder.

Transfusion 32, 83-85

DEUTZ, A. und J. KÖFER (1999):

Schwein und Wildschwein als Träger von Zoonosen.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 12, 305-310

DEVALLOIS, A., M. PICARDEAU, K.S. GOH, C. SOLA, V. VINCENT, and N. RASTOGI (1996):

Comparative evaluation of PCR and commercial DNA probes for detection and identification to species level of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*.

J. Clin. Microbiol. 34, 2756-2759

DEVALLOIS, A., and N. RASTOGI (1997):

Computer-assisted analysis of *Mycobacterium avium* fingerprints using insertion elements IS1245 and IS1311 in a Caribbean setting.

Res. Microbiol. 148, 703-713

DEVALLOIS, A., M. PICARDEAU, C.N. PARAMASIVAN, V. VINCENT, and N. RASTOGI (1997):

Molecular characterization of *Mycobacterium avium* complex isolates giving discordant results in AccuProbe tests by PCR-restriction enzyme analysis, 16S rRNA gene sequencing, and DT1-DT6 PCR.

J. Clin. Microbiol. 35, 2767-2772

DICKINSON, J.H., R.G. KROLL, and K.A. GRANT (1995):

The direct application of the polymerase chain reaction to DNA extracted from foods.

Lett. Appl. Microbiol. 20, 212-216

DIN 58943-3:

Medizinische Mikrobiologie – Tuberkulosedagnostik. Teil 3: Kulturelle Methoden zum Nachweis von Mykobakterien.

Deutsches Institut für Normung (DIN) e.V. (1996)

Beuth Verlag, Berlin

DIN 58959-7:

Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie – Teil 7: Allgemeine Anforderungen an das Mitführen von Kontrollstämmen.

Deutsches Institut für Normung (DIN) e.V. (1997)

Beuth Verlag, Berlin

DÜZGÜNES, N., D. FLASHER, M.V. REDDY, J. LUNA-HERRERA, and P.R. GANGADHARAM (1996):

Treatment of intracellular *Mycobacterium avium* complex infection by free and liposome-encapsulated sparfloxacin.

Antimicrob. Agents Chemother. 40, 2618-2621

DVORSKA, L., I. PARMOVA, M. LAVICKOVA, J. BARTL, V. VRBAS, and I. PAVLIK (1999):

Isolation of *Rhodococcus equi* and atypical mycobacteria from lymph nodes of pigs and cattle in herds with the occurrence of tuberculoid gross changes in the Czech Republic over the period of 1996-1998.

Vet. Med. Czech 44, 321-330

DVORSKÁ, L., M. BARTOŠ, G. MARTIN, W. ERLER, and I. PAVLÍK (2001):

Strategies for differentiation, identification and typing of medically species of mycobacteria by molecular methods.

Vet. Med-Czech 46, 309-328

DVORSKA, L., M. BARTOS, O. OSTADAL, J. KAUSTOVA, L. MATLOVA, and I. PAVLIK (2002):

IS1311 and IS1245 restriction fragment length polymorphism analyses, serotypes, and drug susceptibilities of *Mycobacterium avium* complex isolates obtained from a human immunodeficiency virus-negative patient.

J. Clin. Microbiol. 40, 3712-3719

DVORSKA, L., T.J. BULL, M. BARTOS, L. MATLOVA, P. SVASTOVA, R.T. WESTON, R.J. KLINT, I. PARMOVA, D. VAN SOOLINGEN, and I. PAVLIK (2003):

A standardised restriction length fragment polymorphism (RFLP) method for typing *Mycobacterium avium* isolates links IS901 with virulence for birds.

J. Microbiol. Methods 55, 11-27

ECKSTEIN, T.M., J.M. INAMINE, M.L. LAMBERT, and J.T. BELISLE (2000):

A genetic mechanism for deletion of the *ser2* gene cluster and formation of rough morphological variants of *Mycobacterium avium*.

J. Bacteriol. 182, 6177-6182

ECKSTEIN, T.M., J.T. BELISLE, and J.M. INAMINE (2003):

Proposed pathway for the biosynthesis of serovar-specific glycopeptidolipids in *Mycobacterium avium* serovar 2.

Microbiology 149, 2797-2807

ELLINGSON, J.L., C.A. BOLIN, and J.R. STABEL (1998):

Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis.

Mol. Cell. Probes 12, 133-142

ELLINGSON, J.L.E., J.R. STABEL, W.R. BISHAI, R. FROTHINGHAM, and J.M. MILLER (2000):

Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies.

Mol. Cell. Probes 14, 153-161

ELLSWORTH, S., C. KIRKBRIDGE, and D. JOHNSON (1980):

Excretion of *Mycobacterium avium* from lesions in the intestine and tonsils of infected swine.

Am. J. Vet. Res. 41, 1526-1530

ENGEL, W., D. GROOTHUIS, W. WOUDA, C. KÖNIG, and L. LENDERS (1978):

“Pig-compost” as a source of *Mycobacterium avium* infection in swine.

Zbl. Vet. Med. B 25, 373-382

ENGLUND, S., G. BOLSKÉ, A. BALLAGI-PORDANY, and K.E. JOHANSSON (2001):

Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples by single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene.

Vet. Microbiol. 81, 257-271

EUZÉBY, J.P. (2009):

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.

<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>

EYSING, B. (1977):

Mykobakterien in Arthropoden – Ein Beitrag zur Ökologie.

Vet. Med. Diss., Gießen

FALKINGHAM, J.O., C. NORTON, and M. LECHEVALLIER (2001):

Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems.

Appl. Environ. Microbiol. 67, 1225-1231

FANG, Y., W.H. WU, J.L. PEPPER, J.L. LARSEN, S.A. MARRAS, E.A. NELSON, W.B. EPPERSON, and J. CHRISTOPHER-HENNINGS (2002):

Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples.

J. Clin. Microbiol. 40, 287-291

FISCHER, S. (1999):

Epidemiologische Untersuchungen zur Bedeutung von Mykobakterieninfektionen bei Schlachtschweinen unter besonderer Berücksichtigung des *Mycobacterium avium-intracellulare*-Komplexes.

Vet. Med. Diss., Leipzig

FLEISCHMAN, R.W., G.C. DU MOULIN, H.J. ESBER, V. ILIEVSKI, and A.E. BOGDEN (1982):

Nontuberculous mycobacterial infection attributable to *Mycobacterium intracellulare* serotype 10 in two rhesus monkeys.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 181, 1358-1362

FLORES, J.M., J. SANCHEZ, and M. CASTANO (1991):

Avian tuberculosis dermatitis in a young horse.

Vet. Rec. 128, 407-408

FLUIT, A.C., R. TORENSMA, M.J.C. VISSER, C.J.M. AARSMAN, M.J.J.G. POPPELIER, B.H.I. KELLER, P. KLAPWIJK, and J. VERHOEF (1993):

Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay.

Appl. Environ. Microbiol. 59, 1289-1293

FUKUSHIMA, M., K. KAKINUMA, H. HAYASHI, H. NAGAI, K. ITO, and R. KAWAGUCHI (2003):

Detection and identification of *Mycobacterium* species isolates by DNA microarray.

J. Clin. Microbiol. 41, 2605-2615

GARRIDO, J.M., N. CORTABARRIA, J.A. OGUIZA, G. ADURIZ, and R.A. JUSTE (2000):

Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis.

Vet. Microbiol. 77, 379-386

Literaturverzeichnis

GARRIGA, X., P. CORTES, F. MARCH, P. RODRIGUEZ, M. GARRIGO, C. MORENO, E. GARCIA, P. COLL, and P. PRATS (1999):
Characterization to species level of clinical isolates of the *Mycobacterium avium* complex by DNA probes, DT1-DT6 PCR and PCR-restriction enzyme analysis.
Clin. Microbiol. Infect. 5, 379-382

GODFROID, J., C. DELCORPS, L.M. IRENGE, K. WALRAVENS, S. MARCHE, and J.L. GALA (2005):
Definitive differentiation between single and mixed mycobacterial infections in red deer (*Cervus elaphus*) by a combination of duplex amplification of p34 and f57 sequences and Hpy188I enzymatic restriction of duplex amplicons.
J. Clin. Microbiol. 43, 4640-4648

GOODWIN, B.T., C. JEROME, and B. BULLOCK (1988):
Unusual lesion morphology and skin test reaction for *Mycobacterium avium* complex in macaques.
Lab. Anim. Sci. 38, 20-24

GRANGE, J.M. (1996):
Mycobacteria and human disease.
Verlag Arnold, London, S. 11-28

GRANT, I.R., C.M. POPE, L.M. O'RIORDAN, H.J. BALL, and M.T. ROWE (2000):
Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR.
Vet Microbiol. 77, 369-378

GREEN, E.P., M.L.V. TIZARD, M.T. MOSS, J. THOMPSON, D.J. WINTERBOURNE, J.J. MCFADDEN, and J. HERMON-TAYLOR (1989):
Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*.
Nucleic Acids Res. 17, 9063-9073

GRIST, N.R., and J.A.N. EMSLIE (1994):
Association of clinical pathologists' surveys of infection in British clinical laboratories, 1970-1989.
J. Clin. Pathol. 47, 391-394

GÜNTHER, H. (1987):
Mykobakterien-Infektionen.
In: NEUNDORF, R. und H. SEIDEL (Hrsg.): Schweinekrankheiten.
Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart, S. 448-452

GUERRERO, C., C. BERNASCONI, D. BURKI, T. BODMER, and A. TELENTI (1995):
A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS 1245, is a specific target for analysis of strain relatedness.
J. Clin. Microbiol. 33, 304-307

GUNNES, G., K. NORD, S. VANT, and F. SAXEGAARD (1995):
A case of generalised avian tuberculosis in a horse.
Vet. Rec. 136, 565-566

GYLSTORFF, I. (1987):
Bakterielle Infektionen.
In: GYLSTORFF, I. und F. GRIMM (Hrsg.): Vogelkrankheiten.
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, S. 289-322

HAHN, H., S. FALKE, H. KAUFMANN und K. ULLMANN (2001):
Mykobakterien.
In: HAHN, H. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.
Springer Verlag, Berlin, S. 377-391

Literaturverzeichnis

- HALLDORSOTTIR, S., S. ENGLUND, S.F. NILSEN, and I. OLSAKER (2002):
Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by buoyant density centrifugation, sequence capture PCR and dot blot hybridization.
Vet. Microbiol. 87, 327-340
- HAMPSON, S.J., F. PORTAELS, J. THOMPSON, E.P. GREEN, M.T. MOSS, J. HERMON-TAYLOR, and J.J. MCFADDEN (1991):
DNA probes demonstrate a single highly conserved strain of *Mycobacterium avium* infecting AIDS patients.
Lancet 1, 65-68
- HAUTMANN, G., and T. LOTTI (1995):
Diseases caused by *Mycobacterium scrofulaceum*.
Clinics in Dermatology 13, 277-280
- HAWKINS, J.E. (1977):
Scotochromogenic Mycobacteria which appear intermediate between *Mycobacterium avium-intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum*.
Am. Rev. Resp. Dis. 116, 963-964
- HEINRICH, M. (1991):
PCR carry-over.
BFE 8, 594-597
- HELIE, P., and R. HIGGINS (1996):
Mycobacterium avium complex abortion in a mare.
J. Vet. Diagn. Invest. 8, 257-258
- HERMANS, P.W., A.R. SCHUITEMA, D. VAN SOOLINGEN, C.P. VERSTYNNEN, E.M. BIK, J.E. THOLE, A.H. KOLK, and J.D. VAN EMBDEN (1990):
Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction.
J. Clin. Microbiol. 28, 1204-1213
- HERNANDEZ PEREZ, M., N.G. FOMUKONG, T. HELLYER, I.N. BROWN, and J.W. DALE (1994):
Characterization of IS1110, a highly mobile genetic element from *Mycobacterium avium*.
Mol. Microbiol. 12, 717-724
- HERNANDEZ PEREZ, M., Z.M. KUNZE, S. BROWN, M.A. YAKRUS, J.J. MCFADDEN, and J.W. DALE (1997):
Strain variation in *Mycobacterium avium*: Polymorphism of IS1110-related sequences.
Int. J. Infect. Dis. 1, 192-198
- HILL, E.B., L.G. WAYNE, and W.M. GROSS (1972):
Purification of mycobacterial deoxyribonucleic acid.
J. Bact. 112, 1033-1039
- HINES, M.E., K.S. FRAZIER, C.A. BALDWIN, J.R. COLE, and L.T. SANGSTER (1998):
Efficacy of vaccination for *Mycobacterium avium* with whole cell and subunit vaccines in experimentally infected swine.
Vet. Microbiol. 63, 49-59
- HOLSBOER-BUOGO, C., L. BACCIARINI, N. ROBERT, T. BODMER, and J. NICOLET (1997):
Occurrence of *Mycobacterium genavense* in birds.
Schweiz. Arch. Tierheilk. 139, 397-402
- HOOP, R., E. BÖTTGER, and G. PFEIFFER (1996):
Etiological agents of mycobacteriosis in pet birds between 1986 and 1995.
J. Clin. Microbiol. 34, 991-992

Literaturverzeichnis

- HORSBURGH, C.R. (1997):
Epidemiology of *Mycobacterium avium* complex disease.
Am. J. Med. 102, 11-15
- HOSEK, J., P. SVASTOVA, M. MORAVKOVA, I. PAVLIK, and M. BARTOS (2006):
Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: A review.
Veterinarni Medicina 51, 180-192
- HUGHES, M.S., R.A. SKUCE, L.-A. BECK, and S.D. NEILL (1993):
Identification of mycobacteria from animals by restriction enzyme analysis and direct DNA cycle sequencing of polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene sequences.
J. Clin. Microbiol. 31, 3216-3222
- HUNG, T., K. MAK, and K. FONG (1990):
A specificity enhancer for polymerase chain reaction.
Nucleic Acids Res. 18, 4953
- IBEKWE, A.M., and C.M. GRIEVE (2003):
Detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental samples by real-time PCR.
J. Appl. Microbiol. 94, 421-431
- INNIS, M., K.B. MYAMBO, D.H. GELFAND, and M.A.D. BROWN (1988):
DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9436-9440
- IZRAELI, S., C. PFLEIDERER, and T. LION (1991):
Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood.
Nucleic Acids Res. 19, 6051
- JANETSCHKE, P. (1964):
Über die Tuberkulose beim Schwein.
Mh. Vet. Med. 18, 860-864
- JEFFREYS, A.J., V. WILSON, R. NEUMANN, and J. KEYTE (1988):
Amplification of human minisatellites by polymerase chain reaction: Toward DNA fingerprinting of single cells.
Nucleic Acids Res. 16, 10953-10971
- JOHANSEN, T.B., B. DJONNE, M.R. JENSEN, and I. OLSEN (2005):
Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited.
J. Clin. Microbiol. 43, 2500-2502
- JØRGENSEN, J.B., K. HAARBO, A. DAM, and H.C. ENGBÆK (1972a):
An enzootic of pulmonary tuberculosis in pigs caused by *M. avium* – 1. Epidemiological and pathological studies.
Acta Vet. Scand. 13, 56-67
- JØRGENSEN, J.B., H.C. ENGBÆK, and A. DAM (1972b):
An enzootic of pulmonary tuberculosis in pigs caused by *M. avium* – 2. Bacteriological studies.
Acta Vet. Scand. 13, 68-86
- JØRGENSEN, J.B. (1978a):
Experimental infection with *Mycobacterium avium*, serotype 2, in pigs.
Acta Vet. Scand. 19, 49-72

Literaturverzeichnis

JØRGENSEN, J.B. (1978b):

Serological investigation of strains of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* isolated from animal and non-animal sources.

Nord. Med.-Vet. 30, 155-162

KAPUR, V., L.L. LI, M.R. HAMRICK, B.B. PLIKAYTIS, T.M. SHINNICK, A. TELENTI, W.R. JACOBS, A. BANERJEE, S. COLE, and K.Y. YUEN (1995):

Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing.

Arch. Pathol. Lab. Med. 119, 131-138

KATCHER, H.L., and I. SCHWARTZ (1994):

A distinctive property of *Tth* DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol.

BioTechniques 16, 84-92

KAUKER, E. und W. RHEINWALD (1972):

Untersuchungen über das Vorkommen atypischer Mykobakterien der Gruppe III nach Runyon in Einstreu (Sägemehl) und Futter von Schweinen in Nordhessen.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 20, 384-387

KAZDA, J. (2000):

The ecology of Mycobacteria.

1st ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 72-82

KELLER, A.P., M.K. BEGGS, B. AMTHOR, F. BRUNS, P. MEISSNER, and W.H. HAAS (2002):

Evidence of the presence of IS1245 and IS1311 or closely related insertion elements in non-tuberculous mycobacteria outside of the *Mycobacterium avium* complex.

J. Clin. Microbiol. 40, 1869-1872

KHAN, G., H.O. KANGRO, P.J. COATES, and R.B. HEATH (1991):

Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA.

J. Clin. Pathol. 44, 360-365

KIMURA, B., S. KAWASAKI, T. FUJII, J. KUSUNOKI, T. ITOH, S.J.A. FLOOD (1999):

Evaluation of TaqMan PCR Assay for detecting *Salmonella* in raw meat and shrimp.

J. Food Prot. 62, 329-335

KLEIN, A., R. BARSUK, S. DAGAN, O. NUSBAUM, D. SHOUVAL, and E. GALUN (1997):

Comparison of methods for extraction of nucleic acid from hemolytic serum for PCR amplification of Hepatitis B virus DNA sequences.

J. Clin. Microbiol. 35, 1897-1899

KOMIJJN, R.E., P.E.W. DE HAAS, M.M.E. SCHNEIDER, T. EGER, J.E.W. NIEUWENHUIJS, R.J. VAN DEN HOEK, D. BAKKER, F.D. VAN ZIJDERVELD, and D. VAN SOOLINGEN (1999):

Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs in The Netherlands and comparison of IS1245 restriction fragment length polymorphism patterns of porcine and human isolates.

J. Clin. Microbiol. 37, 1254-1259

KOMIJJN, R.E., H.J. WISSELINK, V.M.C. RIJSMAN, N. STOCKHOFE-ZURWIEDEN, D. BAKKER, F.G. VAN ZIJDERVELD, T. EGER, J.A. WAGENAAR, F.F. PUTIRULAN, and B.A.P. URLINGS (2007):

Granulomatous lesions in lymph nodes of slaughter pigs bacteriologically negative for *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and positive for *Rhodococcus equi*.

Vet. Microbiol. 120, 352-357

KULSKI, J.K., and T. PRYCE (1996):

Preparation of mycobacterial DNA from blood culture fluids by simple alkali wash and heat lysis method for PCR detection.

J. Clin. Microbiol. 34, 1985-1991

Literaturverzeichnis

KUBICA, G.P., and L.G. WAYNE (1984):

In: KUBICA, G.P., and L.G. WAYNE (Hrsg.): *The Mycobacteria: A Sourcebook Part A and B*.
Verlag Marcel Dekker Inc., New York

KUNZE, Z.M., S. WALL, R. APPELBERG, M.T. SILVA, F. PORTAELS, and J.J. MCFADDEN (1991):
IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with
pathogenicity in *Mycobacterium avium*.

Mol. Microbiol. 5, 2265-2272

KWOK, S., and R. HIGUCHI (1989):

Avoiding false positives with PCR.

Nature 339, 237-238

LANTZ, P.-G., F. TJERNELD, E. BORCH, B. HAHN-HÄGERDAL, and P. RÅDSTRÖM (1994):

Enhanced sensitivity in PCR detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese through use of an
aqueous two-phase system as a sample preparation method.

Appl. Environ. Microbiol. 60, 3416-3418

LANTZ, P.-G., M. MATSSON, T. WADSTRÖM, and P. RÅDSTRÖM (1997):

Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two- phase
system for sample preparation prior to PCR.

J. Microbiol. Meth. 28, 159-167

LAURENT, J.P., S. FASKE, and G.A. CANGELOSI (2002):

Characterization of IS999, an unstable genetic element in *Mycobacterium avium*.

Gene 294, 249-257

LEBRUN, L., F.X. WEILL, L. LAFENDI, F. HOURIEZ, F. CASANOVA, M.C. GUTIERREZ,
D. INGRAND, P. LAGRANGE, V. VINCENT, and J.L. HERMANN (2005):

Use of the INNO-LiPA-MYCOBACTERIA assay (version 2) for identification of *Mycobacterium avium*-
Mycobacterium intracellulare-*Mycobacterium scrofulaceum* complex isolates.

J. Clin. Microbiol. 43, 2567-2574

LEINEMANN, H., H. BERNER, H. GERLACH, H. KALAU und J. KÖSTERS (1993):

Mykobakteriose bei Schweinen durch *Mycobacterium avium-intracellulare*.

Tierärztl. Umschau 48, 713-718

LESSLIE, I.W., K.J. BIRN, P. STUART, P.F. O'NEILL, and J. SMITH (1968):

Tuberculosis in the pig and the tuberculin test.

Vet. Rec. 83, 647-651

LÉVY-FRÉBAULT, V.V., and F. PORTAELS (1992):

Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing
Mycobacterium species.

Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 315-323

LIENERT, K., and J.C.S. FOWLER (1992):

Analysis of mixed human/microbial DNA samples: A validation study of two PCR AMP-FLP typing
methods.

BioTechniques 13, 276-281

LINDQVIST, R., B. NORLING, and S.T. LAMBERTZ (1997):

A rapid sample preparation method for PCR detection of food pathogens based on buoyant density
centrifugation.

Lett. Appl. Microbiol. 24, 306-310

- LÜCKER, E., S. THORIUS-EHRLER, M. ZSCHÖCK und M. BÜLTE (1997):
Zur Frage der fleischhygienerechtlichen Beurteilung tuberkulöser Veränderungen.
In: Proc. DVG, 38. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene", Garmisch-Partenkirchen. S. 502-508
- MAGNUSSON, M. (1984):
Immunological classification using sensitins.
In: KUBICA, G.P., and L.G. WAYNE (Hrsg.): The mycobacteria – A sourcebook, Part A.
Verlag Dekker, Inc., New York, S. 83-104
- MARCHETTI, G., A. GORI, L. CATOZZI, L. VAGO, M. NEBULONI, M.C. ROSSI, A.D. ESPOSTI, A. BANDERA, and F. FRANZETTI (1998):
Evaluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: Comparison of four amplification assays.
J. Clin. Microbiol. 36, 1512-1517
- MARSH, I., R. WHITTINGTON, and D. COUSINS (1999):
PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311.
Mol. Cell. Probes 13, 115-126
- MARSH, I., R. WHITTINGTON, and D. MILLAR (2000):
Quality control and optimized procedure of hybridization capture-PCR for the identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces.
Mol. Cell. Probes 14, 219-232
- MARSH, I.B., and R.J. WHITTINGTON (2001):
Progress towards a rapid polymerase chain reaction diagnostic test for the identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces.
Mol. Cell. Probes 15, 105-118
- MARTIN, G. und D. SCHIMMEL (2000):
Die *Mycobacterium avium*-Infektion des Geflügels – (k)eine Gefahr für die menschliche Gesundheit?
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 107, 53-58
- MARTIN, G. und J. BRÄUNIG (2002):
Mögliche Zusammenhänge zwischen Paratuberkulose und Morbus Crohn.
Fortbildungsveranstaltung für den öffentlichen Gesundheitsdienst, BfR, Berlin, März 2002
- MATLOVA, L., L. DVORSKA, M. BARTOS, J. BARTL, W. AYELE, M. ALEXA, and I. PAVLIK (2003):
Mycobacteria isolated from the environment of pig farms in the Czech Republic during the years 1996 to 2002.
Vet. Med. Czech. 48, 343-357
- MATLOVA, L., L. DVORSKA, K. PALACEK, L. MAURENC, M. BARTOS, and I. PAVLIK (2004):
Impact of sawdust and wood shavings in bedding on pig tuberculous lesions in lymph nodes, and IS1245 RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* of serotypes 6 and 8 isolated from pigs and environment.
Vet. Microbiol. 102, 227-236
- MATLOVA, L., L. DVORSKA, W. AYELE, M. BARTOS, T. ANEMORI, and I. PAVLIK (2005):
Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteriosis as a supplement.
J. Clin. Microbiol. 43, 1261-1268
- MATTHIAS, D. (1980):
Tuberkulose des Rindes (*Mycobacterium bovis*- Infektionen).
In: BEER, J. (Hrsg.): Infektionskrankheiten der Haustiere.
Verlag Gustav Fischer, Jena, S. 626-638

MAYER, J., U. REISCHL und W. JILG (1994):

Klinische Bedeutung der Polymerase-Kettenreaktion in der Infektiologie.

Dtsch. Med. Wschr. 119, 1625-1629

MEISSNER, G., K.H. SCHRÖDER, G.E. AMADIO, W. ANZ, S. CHAPARAS, H.W.B. ENGEL, P.A. JENKINS, W. KÄPPLER, K.H. KLEEBERG, E. KUBALA, M. KUBIN, D. LAUTERBACH, A. LIND, M. MAGNUSSON, Z. MIKOVA, S.R. PATTYN, W.B. SCHAEFER, J.L. STANFORD, T. TSUKAMURA, L.G. WAYNE, I. WILLERS, and E. WOLYNSKY (1974):

Co-operative numerical analysis of nonscoto- and nonphotochromogenic slowly growing mycobacteria.

J. Gen. Microbiol. 83, 827-830

MCADAM, R.A., C. GUILHOT, and B. GICQUEL (1994):

Transposition of Mycobacteria.

In: BLOOM, R.A. (Hrsg.): Tuberculosis: Pathogenesis, protection, and control.

American Society for Microbiology, Washington D.C., S. 199-216

MEISSNER, P.S., and J.O. FALKINHAM III. (1986):

Plasmid DNA profiles as epidemiological markers for clinical and environmental isolates of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum*.

J. Infect. Dis. 153, 325-331

MENDENHALL, M.K., S.L. FORD, C.L. EMERSON, R.A. WELLS, L.G. GINES, and I.S. ERIKS (2000):
Detection and differentiation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium genavense* by polymerase chain reaction and restriction enzyme digestion analysis.

J. Vet. Diagn. Invest. 12, 57-60

MENENDEZ, M.C., E. PALENQUE, M.C. NAVARRO, M.C. NUÑEZ, and M.J. GARCIA (2001):

Characterization of a *Mycobacterium intracellulare* variant strain by molecular techniques.

J. Clin. Microbiol. 39, 4241-4246

MERKAL, R., and J. CRAWFORD (1979):

Heat inactivation of *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex organisms in aqueous suspension.

Appl. Environ. Microbiol. 38, 827-830

METCHOCK, B.G., F.S. NOLTE, and R.J. WALLACE (1999):

Mycobacterium.

In: MURRAY, P.R., E.J. BARON, M.A. PFALLER, F.C. TENOVER, and R.H. YOLKEN (Hrsg.): Manual of Clinical Microbiology.

Verlag ASM Press, Washington D.C., S. 399-437

MEYER, M., P.W. VON GRÜNBERG, T. KNOOP, P. HARTMANN, and G. PLUM (1998):

The macrophage-induced gene mig as a marker for clinical pathogenicity and in vitro virulence of *Mycobacterium avium* complex strains.

Infect. Immun. 66, 4549-4552

MIJS, W., P. DE HAAS, R. ROSSAU, T. VAN DER LAAN, L. RIGOUTS, F. PORTAELS, and D. VAN SOOLINGEN (2002):

Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and *M. avium* subsp. *hominissuis* for the human/porcine type of *M. avium*.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1505-1518

MILLAR, D.S., S.J. WITHEY, M.L. TIZARD, J.G. FORD, and T.J. HERMON (1995):

Solid-phase hybridization capture of low-abundance target DNA sequences: Application to the polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*.

Anal. Biochem. 226, 325-330

Literaturverzeichnis

- MÖBIUS, P., P. LENTZSCH, I. MOSER, L. NAUMANN, G. MARTIN, and H. KOHLER (2006): Comparative macrorestriction and RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from man, pig, and cattle. *Vet. Microbiol.* 117, 284-291
- MONTEIRO, L., D. BONNEMAISON, A. VEKRIS, K.G. PETRY, J. BONNET, R. VIDAL, J. CABRITA, and F. MEGRAUD (1997): Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.* 35, 995-998
- MOORE, D.D. (1990): Preparation and analysis of DNA. In: AUSUBEL, F.M., R. BRENT, R.E. KINGSTON, D.D. MOORE, J.G. SEIDMAN, J. A. SMITH, and K. STRUHL (Hrsg.): Short protocols in molecular biology. Verlag John Wiley & Sons, Inc., New York, S. 2-1 – 2-49
- MORRISSEY, A.B., T.O. AISU, J.O. FALKINHAM III., P.P. ERIKI, J.J. ELLNER, T.M. DANIEL (1992): Absence of *Mycobacterium avium* complex disease in patients with AIDS in Uganda. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 5, 477-478
- MOSS, M.T., J.D. SANDERSON, M.L.V. TIZARD, J. HERMON-TAYLOR, F.A.K. EL-ZAATARI, D.C. MARKESICH, D.Y. GRAHAM (1992): Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* in long term cultures from Crohn's disease and control tissues. *Gut* 33, 1209-1213
- MÜLLER, T. und E. SCHARNER (1998): Fleischhygienische Aspekte der Mykobakteriose von Schlachtschweinen. *Rdsch. Fleischhyg. Lebensmittelüberw.* 50, 51-53
- MURRAY, P.R., K.S. ROSENTHAL, G.S. KOBAYASHI, and M.A. PFALLER (2002): *Mycobacterium*. In: MURRAY, P.R., K.S. ROSENTHAL, G.S. KOBAYASHI, and M.A. PFALLER (Hrsg.): Medical Microbiology. Verlag Mosby Inc., St. Louis, S. 366-368
- NASER, S.A., G. GHOBRIAL, C. ROMERO, and J.F. VALENTINE (2004): Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* 364, 1039-1044
- NASSOS, P.S., D.M. YAIKO, C.A. SANDERS, W.K. HADLEY (1991): Prevalence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex in respiratory specimens from AIDS and non-AIDS patients in a San Francisco hospital. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143, 66-68
- NEL, E. (1981): *Mycobacterium avium-intracellulare* complex serovars isolated in South Africa from humans, swine, and the environment. *Rev. Inf. Dis.* 3, 1013-1020
- NETO, F., J. CÔRTEZ, I. SINHORINI, S. VASCONCELLOS, F. ITO, and E. SIVA (1988): Macroscopic tuberculous lesion as a diagnostic criterium of mycobacterial infection in slaughtered swine carcasses. In: Proc. 10th Congr. Internat. Pig Vet. Soc., Rio de Janeiro, Brasilien, 14.-17. August 1988, S. 154

NIEMANN, S., S. RÜSCH-GERDES, M.L. JOLOBA, C.C. WHALEN, D. GUWATUDDE, J.J. ELLNER, K. EISENACH, N. FUMOKONG, J.L. JOHNSON, T. AISU, R.D. MUGERWA, A. OKWERA, and S.K. SCHWANDER (2002):

Mycobacterium africanum subtype II is associated with two distinct genotypes and is a major cause of human tuberculosis in Kampala, Uganda.

J. Clin. Microbiol. 40, 3398-3405

NIEMANN, S., E. RICHTER, and S. RÜSCH-GERDES (2002):

Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 433-436

NIGHTINGALE, S.D., L.T. BYRD, P.M. SOUTHERN, J. JOCKUSCH, S.X. CAL, and B.A. WAYNE (1992):

Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients.

J. Infect. Dis. 165, 1082-1085

NISHIMORI, K., M. EGUCHI, Y. NAKAOKA, Y. ONODERA, T. ITO, and K. TANAKA (1995):

Distribution of IS901 in strains of *Mycobacterium avium* complex from swine by using IS901-detecting primers that discriminate between *M. avium* and *Mycobacterium intracellulare*.

J. Clin. Microbiol. 33, 2102-2106

O'BRIEN, R.J., W. GEITER, and D.E. SNIDER (1987):

The epidemiology of nontuberculous mycobacterial disease in the United States: Results from a national survey.

Am. Rev. Respir. Dis. 135, 1007-1014

OFFERMANN, U., T. BODMER, L. AUDIGE, and T. JEMMI (1999):

The prevalence of *Salmonella*, *Yersinia* and mycobacteria in slaughtered pigs in Switzerland.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 141, 509-515

O'GRADY, D., O. FLYNN, E. COSTELLO, F. QUIGLEY, A. GOGARTY, J. MCGUIRK, J. O'ROURKE, and N. GIBBONS (2000):

Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium avium* isolates from animal and human sources.

Int. J. Tuberc. Lung Dis. 4, 278-281

OLCEN, P., P.G. LANTZ, A. BACKMAN, and P. RÅDSTRÖM (1995):

Rapid diagnosis of bacterial meningitis by a seminested PCR strategy.

Scand. J. Infect. Dis. 27, 537-539

OLIVEIRA, R.S., M.P. SIRCILI, E.M. OLIVEIRA, S.C. BALIAN, J.S. FERREIRA-NETO, and S.C. LEÃO (2003):

Identification of *Mycobacterium avium* genotypes with distinctive traits by combination of IS1245-based restriction fragment length polymorphism and restriction analysis of *hsp65*.

J. Clin. Microbiol. 41, 44-49

OLSEN, I., T.B. JOHANSEN, H. BILLMAN-JACOBSE, S.F. NILSEN, and B. DJONNE (2004):

A novel IS element, IS*Mpa1*, in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Vet. Microbiol. 98, 297-306

PAGNOUT, C., J.F. FERARD, and P. POUPIN (2006):

Characterization of IS1110-like sequences found in *Mycobacterium* species other than *Mycobacterium avium*.

Res. Microbiol. 157, 650-658

- PANACCIO, M., and A. LEW (1991):
PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood.
Nucleic Acids Res. 19, 1151
- PATE, M., and M. OCEPEK (2003):
Methods for typing the *Mycobacterium avium* complex with an emphasis on RFLP analysis.
Slov. Vet. Res. 40, 17-26
- PATEL, S., M. YATES, and N.A. SAUNDERS (1997):
PCR-enzyme-linked immunosorbent assay and partial rRNA gene sequencing: a rational approach to identifying mycobacteria.
J. Clin. Microbiol. 35, 2375-2380
- PAULS, R.J., C.Y. TURENNE, J.N. WOLFE, and A. KABANI (2003):
A high proportion of novel mycobacteria species identified by 16S rDNA analysis among slowly growing AccuProbe-negative strains in a clinical setting.
Am. J. Clin. Pathol. 120, 560-566
- PAVLIK, I., A. HORVATHOVA, L. DVORSKA, J. BARTL, P. SVASTOVA, R. DU MAINE, and I. RYCHLIK (1999):
Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.
J. Microbiol. Methods 38, 155-167
- PAVLIK, I., P. SVASTOVA, J. BARTL, L. DVORSKA, and I. RYCHLIK (2000):
Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans and the environment and virulence for poultry.
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7, 212-217
- PAVLIK, I., L. DVORSKA, L. MATLOVA, P. SVASTOVA, I. PARMOVA, J. BAZANT, and J. VELEBA (2002):
Mycobacterial infections in cattle in the Czech Republic during 1990-1999.
Vet. Med. Czech 47, 241-250
- PAVLIK, I., L. MATLOVA, L. DVORSKA, J. BARTL, L. OCTABCOVA, J. DOCEKAL, and I. PARMOVA (2003):
Tuberculosis lesions in the Czech Republic during 1990-1999: Occurrence, causal factors and economic losses.
Vet. Med. Czech 48, 113-125
- PESTEL-CARON, M., and R.D. ARBEIT (1998):
Characterization of IS1245 for strain typing of *Mycobacterium avium*.
J. Clin. Microbiol. 36, 1859-1863
- PICARDEAU, M., and V. VINCENT (1996):
Typing of *Mycobacterium avium* isolates by PCR.
J. Clin. Microbiol. 34, 389-392
- PICARDEAU, M., A. VARNEROT, T. LECOMPTE, F. BREL, T. MAY, and V. VINCENT (1997):
Use of different molecular typing techniques for bacteriological follow-up in a clinical trial with AIDS patients with *Mycobacterium avium* bacteremia.
J. Clin. Microbiol. 35, 2503-2510
- PIENING, C., W. ANZ und G. MEISSNER (1972):
Serotyp-Bestimmungen und ihre Bedeutung für epidemiologische Untersuchungen bei der Schweine-tuberkulose in Schleswig-Holstein.
Dt. Tierärztl. Wschr. 79, 313-336

Literaturverzeichnis

PIERRE, C., D. LECOSSIER, Y. BOUSSOUGANT, D. BOCART, V. JOLY, P. YENI, and A.J. HANCE (1991):

Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA.

J. Clin. Microbiol. 29, 712-717

PIKAART, M.J., and B. VILLEPONTEAU (1993):

Suppression of PCR amplification by high levels of RNA.

BioTechniques 14, 24-25

PLONAIT, H. und K. BICKHARDT (1988):

Tuberkulose.

In: PLONAIT, H. und K. BICKHARDT (Hrsg.): Lehrbuch der Schweinekrankheiten.

Verlag Paul Parey, Berlin, S. 357-358

PONCE, M.R., and J.L. MICOL (1991):

PCR amplification of long DNA fragments.

Nucleic Acids Res. 20, 623

POUPART, P., M. COENE, H. VAN HEUVERSWYN, and C. COCITO (1993):

Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease.

J. Clin. Microbiol. 31, 1601-1605

POWELL, H.A., C.M. GOODING, S.D. GARRETT, B.M. LUND, and R.A. MCKEE (1994):

Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction.

Let. Appl. Microbiol. 18, 59-61

POZNIAK, A.L., A.H.C. UTTLEY, R.J. KENT (1996):

Mycobacterium avium complex in AIDS: Who, when, where, why and how?

J. Appl. Bacteriol. 81, 40S-46S

PUYANG, X., K. LEE, C. PAWLICHUK, and D.Y. KUNIMOTO (1999):

IS 1626, a new IS900-related *Mycobacterium avium* insertion sequence.

Microbiology 145, 3163-3168

RAJEEV, S., Y. ZHANG, S. SREEVATSAN, A.S. MOTIWALA, and B. BYRUM (2005):

Evaluation of multiple genomic targets for identification and confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates using real-time PCR.

Vet. Microbiol. 105, 215-221

REISCHL, U. und L. NAUMANN (1996):

Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Mykobakterien – Verbesserte und neuentwickelte Testsysteme zur Mykobakteriendiagnostik.

Fortschr. Med. 114, 237-241

RENAULT, L. (1989):

Tuberkulose.

In: MORNET, P., J. TOURNUT und B. TOMA (Hrsg.): Das Schwein und seine Krankheiten.

Verlag Schober, Hengersberg

RICHTER, W. (1967):

Über das Vorkommen von *M. avium* bei anderen Haustieren als dem Geflügel, insbesondere beim Rind und Schwein.

Zeit. für Tub. 127, 109-110

Literaturverzeichnis

- RIFFON, R., K. SAYASITH, H. KHALIL, P. DUBREUIL, M. DROLET, and J. LAGACE (2001):
Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR.
J. Clin. Microbiol. 39, 2584-2589
- RINGUET, H., C. AKOUA-KOFFI, S. HONORE, A. VARNEROT, V. VINCENT, P. BERCHE, J.L. GAILLARD, and C. PIERRE-AUDIGIER (1999):
Hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria.
J. Clin. Microbiol. 37, 852-857
- RITACCO, V., K. KREMER, T. VAN DER LAAN, J.E.M. PIJNENBURG, P.E.W. DE HAAS, and D. VAN SOOLINGEN (1998):
Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates.
Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2, 242-251
- RKI (2003-2009):
Berichte zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2003-2009.
Robert-Koch-Institut, Berlin
- ROIZ, M.P., E. PALENQUE, C. GUERRERO, and M.J. GARCIA (1995):
Use of restriction fragment length polymorphism as a genetic marker for typing *Mycobacterium avium* strains.
J. Clin. Microbiol. 33, 1389-1391
- ROLLE, M. und A. MAYR (1984):
Mycobacterium.
In: ROLLE, M. und A. MAYR (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.
Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart, S. 776-792
- ROSSEN, L., P. NORSKOV, K. HOLMSTROM, and O. F. RASMUSSEN (1992):
Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays, and DNA-extraction solutions.
Int. J. Food Microbiol. 17, 37-45
- ROTH, A., M. FISCHER, M.E. HAMID, S. MICHALKE, W. LUDWIG, and H. MAUCH (1998):
Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences.
J. Clin. Microbiol. 36, 139-147
- ROTH, A., U. REISCHL, A. STREUBEL, L. NAUMANN, R.M. KROPPESTEDT, M. HABICHT, M. FISCHER, and H. MAUCH (2000):
Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases.
J. Clin. Microbiol. 38, 1094-1104
- RUNYON, E.H. (1974):
Ten mycobacterial pathogens.
Tuberc. 55, 235-240
- RUNYON, E.H. (1981):
Mycobacteria: An overview.
Rev. Infect. Dis. 3, 819-21
- RYAN, P., M.W. BENNETT, S. AARONS, G. LEE, J.K. COLLINS, G.C. O'SULLIVAN, J. O'CONNELL, and F. SHANAHAN (2002):
PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection.
Gut 51, 665-670

SAIKI, R.K. (1989):

The design and optimization of the PCR.

In: EHRLICH, H.A. (Hrsg.): PCR technology, principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, New York, S. 7-16

SAITO, H., H. TOMIOKA, K. SATO, H. TASAKA, M. TSUKAMURA, F. KUZE, and K. ASANO (1989): Identification and partial characterization of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* by using DNA probes.

J. Clin. Microbiol. 27, 994-997

SALFINGER, M. und F.M. KAFADER (1992):

Mycobacteriaceae.

In: BURKHARDT, F. (Hrsg.): Mikrobiologische Diagnostik.

Thieme-Verlag, Stuttgart, S. 269-290

SANDERSON, J.D., M. T. MOSS, M.L.V. TIZARD, and J. HERMON-TAYLOR (1992):

Mycobacterium paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissue.

Gut 33, 890-896

SANGARI, F.J., M. BACHLI, L.E. BERMUDEZ, and T. BODMER (2000):

Characterization of IS666, a newly described insertion element of *Mycobacterium avium*.

Microb. Comp. Genomics 5, 181-188

SANNA, E., C.J. WOODALL, N.J. WATT, C.J. CLARKE, M. PITTAU, A. LEONI, and A.M. NIEDDU (2000):

In situ-PCR for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in paraffin-embedded tissues.

Eur. J. Histochem. 44, 179-184

SARKAR, G., and S.S. SOMMER (1990):

Shedding light on PCR contamination.

Nature 343, 27

SAVIC, B., U. SJOBRING, S. ALUGUPALLI, L. LARSSON, and H. MIORNER (1992):

Evaluation of polymerase chain reaction, tuberculostearic acid analysis, and direct microscopy for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum.

J. Infect. Dis. 166, 1177-1180

SAXEGAARD, F. (1981):

Serotypical investigations of *Mycobacterium avium* and *M. avium*-like bacteria isolated from domestic and wild animals.

Acta Vet. Scand. 22, 153-161

SAXER, E. und H. VONARBURG (1951):

Untersuchungen über die Lebensfähigkeit von Tuberkelbazillen.

Schweiz. Z. Allg. Pathol. Bakteriolog. 14, 532-536

SCHIEFERSTEIN, C. (2006):

Atypische Mykobakterien.

In: CASPARY, W.F., M. KIST und J. STEIN (Hrsg.): Infektiologie des Gastrointestinaltraktes.

Verlag Springer, Berlin, S. 261-264

SCHLIESSER, T. (1967):

Die Tuberkulose der Schweine und ihre gegenwärtige Bedeutung.

Tierärztl. Umsch. 22, 17-20

SCHLIESSER, T. (1976):

Vorkommen und Bedeutung von Mykobakterien bei Tieren.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. A 235, 184-194

Literaturverzeichnis

- SCHLIESSER, T. (1978):
Aktuelle Probleme der Mykobakteriosen (einschließlich Tuberkulose) bei Tieren.
Wien. Tierärztl. Mschr. 65, 77-83
- SCHLIESSER, T (1985):
Mykobakterien.
In: BLOBEL, H. und T. SCHLIESSER (Hrsg.): Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Bd. V.
Verlag Gustav Fischer, Jena, S. 155-313
- SCHLIESSER, T. und A. WEBER (1973):
Untersuchungen über die Tenazität von Mykobakterien der Gruppe III nach Runyon in Sägemehlein-
streu.
Zbl. Vet. Med. B 20, 710-714
- SCHÜTT-GEROWITT, H. (1996):
Erkrankungen durch ubiquitäre Mykobakterien – Klinische, therapeutische und mikrobiologische
Aspekte.
Fortschr. Med. 114, 233-236
- SCHULZ, W. (1987):
Mykobakterien-Infektionen.
In: BEER, J. (Hrsg.): Infektionskrankheiten der Haustiere.
Verlag Gustav Fischer, Jena, S. 745-768
- SCHULZ, L.-C. und G. TRAUTWEIN (1990):
Besondere Entzündungsformen.
In: SCHULZ, L.-C. (Hrsg.): Lehrbuch der allgemeinen Pathologie.
Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart, S. 312-328
- SECHI, L.A., I. DUPRE, M. SANGUINETTI, G. FADDA, and S. ZANETTI (1999):
Simple and rapid identification of different species of mycobacteria by PCR.
Mol. Cell. Probes 13, 141-146
- SECHI, L.A., A.M. SCANU, P. MOLICOTTI, S. CANNAS, M. MURA, G. DETTORI, G. FADDA, and
S. ZANETTI (2005):
Detection and isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from intestinal mucosal
biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia.
Am. J. Gastroenterol. 100, 1529-1536
- SEEGER, J. und G. SCHACK-STEFFENHAGEN (1967):
Ursache und Bedeutung der Schweinetuberkulose für die Gesundheit von Mensch und Tier.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 12, 226-229
- SEITERT, G.A. (2003):
Entwicklung und Validierung molekularer Methoden für den Nachweis von *Mycobacterium avium*
subsp. *paratuberculosis* in Gewebe von geschlachteten abgemagerten Schweizer Kühen.
Vet. Med. Diss., Bern
- SELBITZ, H.-J. (1992):
Mycobacteriaceae.
In: SELBITZ, H.J. (Hrsg.): Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie.
Verlag Gustav Fischer, Jena, S. 215-230
- SHIN, S.J., Y.F. CHANG, C. HUANG, J. ZHU, L. HUANG, H.S. YOO, K.S. SHIN, S. STEHMAN,
S.J. SHIN, and A. TORRES (2004):
Development of a polymerase chain reaction test to confirm *Mycobacterium avium* subsp. *paratuber-
culosis* in culture.
J. Vet. Diagn. Investig. 16, 116-120

Literaturverzeichnis

- SIGUIER, P., J. PEROCHON, L. LESTRADE, J. MAHILLON, and M. CHANDLER (2006):
ISfinder: The reference centre for bacterial insertion sequences.
Nucl. Acids Res. 34, D32-D36
- SIMON, P. (1976):
Mycobacterium intracellulare infection in pigs.
Can. Vet. J. 17, 29
- SIRIMALAISUWAN, A. (2004):
Molecular studies on *Mycobacterium avium-intracellulare*-complex isolated from slaughtered pigs and wild-life animals in Germany.
Vet. Med. Diss., Berlin
- SIVAKUMAR, P., B.N. TRIPATHI, and N. SINGH (2005):
Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture.
Vet. Microbiol. 108, 263-270
- SMITH, K.T., C.M. LONG, B. BOWMANN, and M.M. MANOS (1990):
Using cosolvents to enhance PCR amplification.
Amplifications 5, 16
- SOINI, H., E.C. BÖTTGER, and M.K. VILJANEN (1994):
Identification of mycobacteria by PCR-based sequence determination of the 32-kilodalton protein gene.
J. Clin. Microbiol. 32, 2944-2947
- SOINI, H., and J.M. MUSSER (2001):
Molecular diagnosis of mycobacteria.
Clin. Chem. 47, 809-814
- SOLA, C., A. DEVALLOIS, K.S. GOH, E. LEGRAND, and N. RASTOGI (1996):
Molecular characterization of *Mycobacterium avium* complex isolates from Caribbean patients by DT1/DT6-PCR, nonradioactive Southern hybridization, and the Accuprobe system.
Curr. Microbiol. 33, 352-358
- SOMERVILLE, W., L. THIBERT, K. SCHWARTZMAN, and M.A. BEHR (2005):
Extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA: A question of containment.
J. Clin. Microbiol. 43, 2996-2997
- STATISTISCHES BUNDESAMT (2000-2007):
Fleischuntersuchung 1999-2006.
In: STATISTISCHES BUNDESAMT, WIESBADEN (Hrsg.): Fachserie 3, Reihe 4.3 – Land- und Forstwirtschaft, Fischerei.
Verlag Metzler-Poeschel, Stuttgart
- STEFFAN, R.J., and R.M. ATLAS (1988):
DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples.
Appl. Environ. Microbiol. 54, 2185-2191
- STRATMANN, J., B. STROMMENGER, R. GOETHE, K. DOHMANN, G.F. GERLACH, K. STEVENSON, L.L. LI, Q. ZHANG, V. KAPUR, and T.J. BULL (2004):
A 38-kilobase pathogenicity island specific for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* encodes cell surface proteins expressed in the host.
Infect. Immun. 72, 1265-1274

Literaturverzeichnis

- STROMMINGER, B., K. STEVENSON, and G.F. GERLACH (2001):
Isolation and diagnostic potential of IS*Mav2*, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.
FEMS Microbiol. Lett. 196, 31-37
- SUGGS, S.V., T. HIROSE, T. MIYAKE, E.H. KAWASHIMA, M.J. JOHNSON, K. ITAKURA, and R.B. WALLACE (1981):
Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of cloned DNA sequences.
In: BROWN, D.D., and C.F. FOX (Hrsg.): Developmental biology using purified genes.
Academic Press, New York, S. 683-697
- SUPPLY, P., J. MAGDALENA, S. HIMPENS, and C. LOCHT (1997):
Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component operon.
Mol. Microbiol. 26, 991-1003
- SUPPLY, P., E. MAZARS, S. LESJEAN, V. VINCENT, B. GICQUEL, and C. LOCHT (2000):
Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome.
Mol. Microbiol. 36, 762-771
- SVASTOVA, P., I. PAVLIK, and M. BARTOS (2002):
Rapid differentiation of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by amplification of insertion element IS*901*.
Veterinarni Medicina 47, 117-121
- SZABO, I., S. TUBOLY, and A. SZEKY (1974):
Mycobacterial lymphadenitis of swine in large scale farms.
In: Proc. 3rd Congr. Intern. Pig Vet. Soc., Lyon, Frankreich, 12.-14. Juni 1974
- SZEWZYK, U., R. SZEWZYK, W. MANZ, and K. SCHLEIFER (2000):
Microbiological safety of drinking water.
Annu. Rev. Microbiol. 54, 81-127
- TAMMEMAGI, L., and G. SIMMONS (1968):
Batty-type mycobacterial infections of pigs.
Austr. Vet. J. 44, 121
- TAMMEMAGI, L., and G. SIMMONS (1969):
Further observations on Batty-type mycobacterial infections of pigs.
Austr. Vet. J. 45, 38-39
- TANAKA, E., R. AMITANI, A. NIIMI, K. SUZUKI, T. MURAYAMA, and F. KUZE (1997):
Yield of computed tomography and bronchoscopy for the diagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 155, 2041-2046
- TASARA, T., and R. STEPHAN (2005):
Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk.
Appl. Environ. Microbiol. 71, 5957-5968
- TASARA, T., L.E. HOELZLE, and R. STEPHAN (2005):
Development and evaluation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) specific multiplex PCR assay.
Int. J. Food Microbiol. 104, 279-287
- TAYLOR, M.J., M.S. HUGHES, R.A. SKUCE, and S.D. NEILL (2001):
Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical specimens using real-time fluorescence and fluorescence resonance energy transfer probe rapid-cycle PCR.
J. Clin. Microbiol. 39, 1272-1278

- TEBBE, C.C., and W. VAHJEN (1993):
Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast.
Appl. Environ. Microbiol. 59, 2657-2665
- TELENTI, A., F. MARCHESI, M. BALZ, F. BALLY, E.C. BÖTTGER, and T. BODMER (1993):
Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis.
J. Clin. Microbiol. 31, 175-178
- THEGERSTRÖM, J., B.I. MARKLUND, S. HOFFNER, D. AXELSSON-OLSSON, J. KAUPPINEN, and B. OLSEN (2005):
Mycobacterium avium with the bird type IS1245 RFLP profile is commonly found in wild and domestic animals, but rarely humans.
Scand. J. Infect. Dis. 37, 15-20
- THIERRY, D., V. VINCENT, F. CLÉMENT, and J.-L. GUESDON (1993):
Isolation of specific DNA fragments of *Mycobacterium avium* and their possible use in diagnosis.
J. Clin. Microbiol. 31, 1048-1054
- THOEN, C., D. JOHNSON, M. HIMES, S. MENKE, and C. MUSCOPLAT (1976a):
Experimental induced *Mycobacterium avium* serotype 8 infection in swine.
Am. J. Vet. Res. 37, 177-181
- THOEN, C., E. ELMER, D. WEAVER, and G. SPANGLER (1976b):
Tuberculosis in brood sows and pigs slaughtered in Iowa.
Am. J. Vet. Res. 37, 775-778
- THOEN, C., E. HIMES, and R. BARRETT (1977):
Mycobacterium avium serotype 1 infection in a sandhill crane.
J. Wildlife Dis. 13, 40-42
- THOEN, C., W. OWEN, and E. HIMES (1979):
Mycobacterium avium serotype 4 infection in swine.
In: Proc. 83th Ann. Meet. U.S. Anim. Health Assoc., S. 468-479
- THOEN, C., A.G. KARLSON, and E.M. HINES (1981):
Mycobacterial infections in animals.
Rev. Inf. Dis. 3, 960-996
- THOEN, C., and A.G. KARLSON (1986):
Tuberculosis.
In: LEMAN, A.D. et al. (Hrsg.): Diseases of swine.
Verlag Iowa State University Press, S. 484-493
- THOREL, M.-F., M. KRICHEVSKY, and V.V. LÉVY-FRÉBAULT (1990):
Numerical taxonomy of mycobactin-dependent *Mycobacteria*, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov.
Int. J. Syst. Bact. 40, 254-260
- THOREL, M., H. HUCHZERMEYER, R. WEISS, and J. FONTAINE (1997):
Mycobacterium avium infection in animals – Literature review.
Vet. Res. 28, 439-447
- THOREL, M., H. HUCHZERMEYER, and A. MICHEL (2001):
Mycobacterium avium and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals.
Rev. Sci. Tech. Int. Epiz. 20, 204-218

Literaturverzeichnis

TORTOLI, E., A. NANETTI, C. PIERSIMONI, P. CICHERO, C. FARINA, G. MUCIGNAT, C. SCARPARO, L. BARTOLINI, R. VALENTINI, D. NISTA, G. GESU, C.P. TOSI, M. CROVATTO, and G. BRUSAROSCO (2001):

Performance assessment of new multiplex probe assay for identification of mycobacteria.

J. Clin. Microbiol. 39, 1079-1084

TORTOLI, E., A. MARIOTTINI, and G. MAZZARELLI (2003):

Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: Improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification.

J. Clin. Microbiol. 41, 4418-4420

TRCKOVA, M., Z. ZRALY, L. MATLOVA, V. BERAN, M. MORAVKOVA, J. SVOBODOVA, and I. PAVLIK (2006):

Effects of peat feeding on the performance and health status of fattening pigs and environmentally derived mycobacteria.

Veterinaria Medicina 51, 533-543

TROESCH, A., H. NGUYEN, C.G. MIYADA, S. DESVARENNE, T.R. GINGERAS, P.M. KAPLAN, P. CROS, and C. MABILAT (1999):

Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays.

J. Clin. Microbiol. 37, 49-55

TSAI, Y.-L., and B.H. OLSEN (1992):

Detection of low numbers of bacterial cells in soil and sediments by polymerase chain reaction.

Appl. Environ. Microbiol. 58, 754-757

TSANG, A.Y., J.C. DENNER, P.J. BRENNAN, and J.K. MCCLATCHY (1992):

Clinical and epidemiological importance of typing of *Mycobacterium avium* complex isolates.

J. Clin. Microbiol. 30, 479-484

TSUKAMURA, M., and H. NEMOTO (1973):

A taxonomic study of *Mycobacterium intracellulare* isolated from swine.

Jap. J. Microbiol. 17, 91-98

TURENNE, C.Y., M. SEMRET, D.V. COUSINS, D.M. COLLINS, and M.A. BEHR (2006):

Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex.

J. Clin. Microbiol. 44, 433-440

TURENNE, C.Y., R. WALLACE, and M.A. BEHR (2007):

Mycobacterium avium in the postgenomic era.

Clin. Microbiol. Rev. 20, 205-229

TYLER, K.D., G. WANG, S.D. TYLER, and W.M. JOHNSON (1997):

Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens.

J. Clin. Microbiol. 35, 339-346

VAN DER GIESSEN, J.W.B., A. EGER, J. HAAGSMA, and B.A.M. VAN DER ZEIJST (1993):

Rapid detection and identification of *Mycobacterium avium* by amplification of 16S rRNA sequences.

J. Clin. Microbiol. 31, 2509-2512

VAN SOOLINGEN, D. (2001):

Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: Main methodologies and achievements.

J. Intern. Med. 249, 1-26

Literaturverzeichnis

- VAN SOOLINGEN, D., J. BAUER, V. RITACCO, S. CARDOSO LEÃO, I. PAVLIK, V. VINCENT, N. RASTOGI, A. GORI, T. BODMER, C. GARZELLI, and M.J. GARCIA (1998):
IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: Proposal for standardization.
J. Clin. Microbiol. 36, 3051-3054
- VARY, P.H., P.R. ANDERSEN, E. GREEN, J. HERMON-TAYLOR, and J.J. MCFADDEN (1990):
Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease.
J. Clin. Microbiol. 28, 933-937
- VON REYN, C.F., R.D. WADDELL, T. EATON, R.D. ARBEIT, J.N. MASLOE, T.W. BARBER, R.J. BRINDLE, C.F. GILKS, J. LUMIO, J. LÄHDEVIRTA, A. RANKI, D. DAWSON, and J.O. FALKINHAM III. (1993):
Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya.
J. Clin. Microbiol. 31, 3227-3230
- WARDS, B. J., D.M. COLLINS, and G.W. DE LISLE (1995):
Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction.
Vet. Microbiol. 43, 227-240
- WAYNE, L.G., and G.P. KUBICA (1986):
Section 16: The mycobacteria.
In: SNEATH, P.H.A., N.S. MAIR, M.E. SHARPE, and J.G. HOLT (Hrsg.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2: The Pro bacteria.
Verlag Williams & Wilkins, Baltimore, S. 1435-1457
- WEBER, A. und T. SCHLIESSER (1974):
Zum Nachweis von sogenannten atypischen Mykobakterien in Kopf- und Darmlymphknoten nicht tuberkulöser Schlachtschweine.
Zbl. Vet. Med. 21, 799-806
- WEISS, E. und R. RUDOLPH (1988):
Atmungsorgane, Verdauungsorgane.
In: DAHME, E. und E. WEISS (Hrsg.): Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere.
Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart, S. 85-127
- WENTZ, H., M.D. WENTZ, C.A. MALLMANN, E.L. MAFESSONI, and J. BARLETTO (1990):
Mycobacterium intracellulare lymphadenitis: Identification, evolution and outbreak control.
In: Proc. 11th Congr. Internat. Pig Vet. Soc., Lausanne, Schweiz, 1.-5. Juli 1990, S. 195
- WERTH, B.-M. (2006):
Vergleichende Untersuchungen zu Schnellmethoden für den Nachweis thermophiler *Campylobacter* spp. in natürlich und artifiziell kontaminiertem Geflügelfleisch und -innereien sowie in Geflügelkot
Vet. Med. Diss., Berlin
- WEYANT, R.S., P. EDMUNDS, and B. SWAMINATHAN (1990):
Effect of ionic and non-ionic detergents on the *Taq* polymerase.
BioTechniques 9, 308-309
- WHITTINGTON, R., I. MARSH, E. CHOY, and D. COUSINS (1998):
Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species.
Mol. Cell. Probes 12, 349-358

Literaturverzeichnis

- WHITTINGTON, R.J., L. REDDAKLIFF, I. MARSH, and V. SAUNDERS (1999):
Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by IS900 polymerase chain reaction.
Aust. Vet. J. 77, 392-397
- WHITTINGTON, R.J., A.F. HOPE, D.J. MARSHALL, C.A. TARAGEL, and I. MARSH (2000):
Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and human in Australia.
J. Clin. Microbiol. 38, 3240-3248
- WIDJOJOATMODJO, M.N., A.C. FLUIT, R. TORENSMA, B.H.I. KELLER, and J. VERHOEF (1991):
Evaluation of the magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella*.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10, 935-938
- WIDJOJOATMODJO, M.N., A.C. FLUIT, R. TORENSMA, G.P.H.T. VERDONK, and J. VERHOEF (1992):
The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of *Salmonellae* in fecal samples.
J. Clin. Microbiol. 30, 3195-3199
- WILLIAMS, J.F. (1989):
Optimization strategies for the polymerase chain reaction.
BioTechniques 7, 762-767
- WILSON, I.G., J.E. COOPER, and A. GILMOUR (1994):
Some factors inhibiting amplification of the *Staphylococcus aureus* enterotoxin C1 (sec1) by PCR.
Int. J. Food Microbiol. 22, 55-62
- WILSON, I.G. (1997):
Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification.
Appl. Environ. Microbiol. 63, 3741-3751
- WINDSOR, R.S., D.S. DURRANT, and K.J. BURN (1984):
Avian tuberculosis in pigs: *Mycobacterium intracellulare* infection in a breeding herd.
Vet. Rec. 114, 497-500
- WINSHIP, P.R. (1989):
An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide.
Nucleic Acids Res. 17, 1266
- WOESE, C.R. (2003):
Bacterial evolution.
Microbiol. Rev. 51, 221-271
- WOLINSKY, E., and W. B. SCHAEFER (1973):
Proposed numbering scheme for mycobacterial serotypes by agglutination.
Int. J. Syst. Bacteriol. 23, 182-183
- WOLINSKY, E. (1979):
Nontuberculous mycobacteria and associated diseases.
Am. Rev. Respir. Dis. 119, 107-159
- WRBA, F., H. DOLZNIG und C. MANNHALTER (2007):
Untersuchung von RNA.
In: WRBA, F., H. DOLZNIG und C. MANNHALTER (Hrsg.): Genetik verstehen – Grundlagen der molekularen Biologie.
Verlag Facultas, Wien, S. 156-166

YACHIDA, S., and K. SHIMIZU (1973):

Studies on atypical Mycobacteria isolated from tuberculous lesions of the mesenteric lymphnodes of slaughtered pigs.

Jap. J. Vet. Sci. 35, 459-471

YAKRUS, M.A., S.M. HERNANDEZ, M.M. FLOYD, D. SIKES, W.R. BUTLER, and B. METCHOCK (2001):

Comparison of methods for identification of *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae* isolates.

J. Clin. Microbiol. 39, 4103-4110

YATES, M., J.M. GRANGE, and A.I. POZNIAK (1993):

Isolation of mycobacteria from patients seropositive for the human immunodeficiency virus (HIV) in south east England 1984-1992.

Thorax 48, 990-995

Zitierte Rechtsvorschriften:

Ausführungsbestimmungen A

über die Untersuchung und gesundheitspolizeiliche Behandlung der Schlachttiere und des Fleisches bei Schlachttieren im Inland vom 1. November 1940 (Reichsministerialbl. S. 289)

Entscheidung 97/76 EG

der Kommission vom 17. Dezember 1996 über Kontrollmethoden zur Aufrechterhaltung des amtlich anerkannt tuberkulosefreien Status von Rinderbeständen in bestimmten Mitgliedstaaten und Regionen der Mitgliedstaaten (Amtsblatt Nr. L 019, S. 34-36)

Fleischbeschaugesetz

Bekanntmachung der neuen Fassung des Fleischbeschaugesetzes vom 29. Oktober 1940 (Reichsgesetzbl. I 1940, S. 1463-1467)

Fleischhygienegesetz (FIHG)

in der Fassung der Bekanntmachung vom 8. Juli 1993 (BGBl. I S. 1190-1201), aufgehoben durch Artikel 7 Nr. 7 des Gesetzes zur Neuordnung des Lebensmittel- und des Futtermittelrechts vom 1. September 2005 (BGBl. I S. 2618-2669)

Fleischhygiene-Verordnung (FIHV)

Verordnung über die hygienischen Anforderungen und amtlichen Untersuchungen beim Verkehr mit Fleisch, in der Fassung der Bekanntmachung vom 29. Juni 2001 (BGBl. I S. 1366), zuletzt geändert durch Artikel 16 der Verordnung vom 8. August 2007 (BGBl. I S. 1816)

Reichsgesetz, betreffend die Schlachtvieh- und Fleischschau

vom 3. Juni 1900 (Reichsgesetzbl. S. 547)

Verordnung (EG) Nr. 854/2004

des europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs

Amtsblatt der Europäischen Union L 139 vom 30. April 2004, S. 206-320

Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen

in der Fassung der Bekanntmachung vom 3. November 2004 (BGBl. I S. 2764), zuletzt geändert durch Artikel 15 der Verordnung vom 20. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3499)

Verordnung über die meldepflichtigen Tierseuchen

in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. April 2001 (BGBl. I S. 540), zuletzt geändert durch Artikel 362 der Verordnung vom 29. Oktober 2001 (BGBl. I S. 2785)

9 Anhang

9.1 Nährmedien für Mykobakterien

9.1.1 Middlebrook 7H9-Bouillon

Ammoniumsulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	1,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_3	2,5 g
Trinatriumcitrat, $\text{C}_3\text{H}_4\text{OH}(\text{COO})_3\text{Na}_3$	0,1 g
L-Glutaminsäure, $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_4\text{N}$	0,5 g

	Stammlösung		
Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	25,0 mg/ml	50,0 mg	(2 ml)
Calciumchlorid, CaCl_2	0,5 mg/ml	0,5 mg	(1 ml)
Zinksulfat, $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,0 mg/ml	1,0 mg	(1 ml)
Kupfersulfat, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	1,0 mg/ml	1,0 mg	(1 ml)
Eisen-(III)-Ammoniumcitrat	40,0 mg/ml	40,0 mg	(1 ml)
Pyridoxine HCl	1,0 mg/ml	1,0 mg	(1 ml)
D-Biotin, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}$	0,5 mg/ml	1,0 mg	(2 ml)

Lösen in 900 ml A. dest.

Autoklavieren in Aliquots (180 ml in 500 ml-Kolben): 10 min. bei 121°C

OADC-Zugabe:	Oleinsäure	0,05 g
	bovines Albumin, Fraktion V	5,0 g
	Glucose (Dextrose)	2,0 g
	NaCl	0,85 g

Lösen in 100 ml A. dest., steril

Sterile Zugabe von je 20 ml OADC zu je 180 ml 7H9-Basisbouillon.

Ggf. steriles Pipettieren der Bouillon in sterile Gefäße.

9.1.2 Middlebrook 7H10-Agar

Ammoniumsulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	1,5 g
Dikaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_3	1,5 g
Trinatriumcitrat, $\text{C}_3\text{H}_4\text{OH}(\text{COO})_3\text{Na}_3$	0,4 g
L-Glutaminsäure, $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_4\text{N}$	0,5 g

Stammlösung

Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	25,0 mg/ml	25,0 mg	(1 ml)
Calciumchlorid, CaCl_2	0,5 mg/ml	0,5 mg	(1 ml)
Zinksulfat, $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	1,0 mg/ml	1,0 mg	(1 ml)
Kupfersulfat, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	1,0 mg/ml	1,0 mg	(1 ml)
Eisen-(III)-Ammoniumcitrat	40,0 mg/ml	40,0 mg	(1 ml)
Pyridoxine HCl	1,0 mg/ml	1,0 mg	(1 ml)
D-Biotin, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}$	0,5 mg/ml	0,5 mg	(1 ml)
Malachitgrün	0,25 mg/ml	0,25 mg	(1 ml)
Agar		15 g	

Lösen in 900 ml A. dest. (Dampftopf)

Autoklavieren: 10 min bei 121°C

OADC-Zugabe: Oleinsäure	0,05 g
bovines Albumin, Fraktion V	5,0 g
Glucose (Dextrose)	2,0 g
NaCl	0,85 g

Lösen in 100 ml A. dest., steril

Steril zugeben und in sterile Röhrchen pipettieren (Schrägagar)

9.2 Ziehl-Neelsen-Färbung

Dient der Darstellung säurefester Mykobakterien, Technik:

- Hitzefixierten Ausstrich mit Karbolfuchsin bedecken, bis zur Blasenbildung erhitzen
- Farbstoff 2-3 min. einwirken lassen
- Farbstoff abgießen (ohne Wasserspülung), in 3%igem salzsauren Alkohol entfärben bis der Ausstrich farblos erscheint
- Abspülen mit Wasser
- 15 sec. mit Methylenblau gegenfärben
- Mit Wasser abspülen und im Fließpapierblock abtrocknen lassen

Mykobakterien erscheinen (unter dem Mikroskop) leuchtend rot.

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Reinhard Fries bedanken, der durch Überlassen des Themas nicht nur die Voraussetzung für diese Arbeit geschaffen hat, sondern durch seine intensive und gute Betreuung mit vielen Anregungen und Ratschlägen das Gelingen dieser Dissertation ermöglicht hat.

Ein besonderer Dank geht an PD Dr. Irmgard Moser vom Friedrich-Löffler-Institut in Jena für die Bereitstellung der *M. avium* subsp. *hominissuis*-Feldstämme sowie für einige förderliche Diskussionen.

Ein herzlicher Dank geht an Lilo Bräutigam für ihre fachliche Unterstützung und ihre Hilfestellung bei der praktischen Arbeit im Labor.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Fleischhygiene und -technologie bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit während meiner Zeit am Institut.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, besonders meiner Mutter und meinem Vater, die mich während des Studiums jahrelang unterstützt und zu der Doktorarbeit ermuntert haben, sowie meinen Freunden, die durch gelegentlich nötige Aufmunterungen und Ablenkung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Eignung unterschiedlicher Primer und DNA-Extraktionsmethoden zum PCR-Nachweis von Vertretern des Mycobacterium avium-intracellulare-Komplexes (MAIC)“ selbständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Ludwigsburg, den 07.03.2010

Robin Großpietsch