

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. R. Korbel

**Entwicklung einer Realtime-PCR zum Nachweis von  
*Mycobacterium avium ssp. avium* und  
*Mycobacterium avium ssp. silvaticum* beim Vogel**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Katrín Stein  
aus  
Groß-Gerau

München 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Korbel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Sutter

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

*Gewidmet meiner Familie*

*In Gedenken an Opa Hellmuth und Opa Erich*

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Taxonomie und Vorkommen von Mykobakterien</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Aviäre Mykobakteriosen</b>	<b>15</b>
2.2.1 Erkrankungen durch Mykobakterien beim Vogel	15
2.2.2 Mykobakterien des Tuberkulosekomplexes beim Vogel	17
2.2.3 Atypische Mykobakterien beim Vogel	18
2.2.4 Zoonosepotential aviärer Mykobakteriosen	19
<b>2.3 Methoden zum Nachweis von Mykobakteriosen</b>	<b>20</b>
2.3.1 Mikroskopie und Färbungen	20
2.3.2 Anzucht	22
2.3.3 Nachweis der Immunreaktion	22
<b>2.4 Nachweis der DNA</b>	<b>23</b>
2.4.1 DNA-Extraktion bei Mykobakterien	23
2.4.2 PCR-basierte Nachweismethoden	24
2.4.3 Pulsfeldgelelektrophorese	27
<b>2.5 Weitere Nachweismethoden</b>	<b>27</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Material</b>	<b>29</b>
3.1.1 Mykobakterien-Referenzstämme	29
3.1.2 Kot von SPF-Tauben	29
3.1.3 Patientenproben	31
<b>3.2 Methoden</b>	<b>31</b>
3.2.1 Mykobakterienanzucht	31
3.2.2 Spicken von Kotproben	32
3.2.3 Mikroskopische Untersuchung auf säurefeste Stäbchen	33
3.2.4 DNA-Extraktion	33
3.2.5 Entwicklung und Durchführung der Realtime-PCR	34

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
4.1	Auswahl des Zielgens	41
4.2	Interne Kontrolle	41
4.3	PCR-Optimierung	42
4.4	Ergebnisse der Untersuchung von Referenzstämme	45
4.5	Ergebnisse der Untersuchung von gespickten Kotproben	46
4.6	Ergebnisse der Untersuchungen von Patientenproben	48
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>59</b>
5.1	DNA-Extraktion	60
5.2	Einsatz einer internen Kontrolle	61
5.3	Auswahl des IS901 als Zielgen für die Realtime-PCR	63
5.4	Spezifität und Sensitivität	64
5.5	Schlussfolgerungen und Ausblick	67
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>81</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis	81
9.2	Tabellenverzeichnis	82
9.3	Zusammensetzung der Fertignährböden	84
9.4	Färbeanleitungen	85
9.4.1	GRAM-Färbung	85
9.4.2	Ziehl-Neelsen-Färbung	85
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>86</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>87</b>



## Abkürzungsverzeichnis

AIDS	= acquired immunodeficiency syndrome
BCG	= Bacillus Calmette-Guérin; Mykobakterienimpfstamm
°C	= Grad Celsius
DNA	= DNS, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	= desoxy-Nucleotid-Triphosphat
DSM	= Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
et al.	= et alli
FLI	= Friedrich-Loeffler-Institut
HIV	= humanes Immundefizienzvirus
hsp	= Hitzeschockprotein
LMU	= Ludwig-Maximilians-Universität
k.W.	= kein ct-Wert in der PCR vorgefunden
M.	= <i>Mycobacterium</i>
M.a.a.	= <i>Mycobacterium avium subspecies avium</i>
MAA/S-PCR	= PCR zum Nachweis von <i>Mycobacterium avium subspecies avium</i> und <i>Mycobacterium avium subspecies silvaticum</i>
MAC	= Mycobacterium-avium-intracellulare-Komplex
M.a.h.	= <i>Mycobacterium avium subspecies hominissuis</i>
MALDI TOF MS	= Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization-Time-of Flight Mass Spectrometry
M.a.p.	= <i>Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i>
M.a.s.	= <i>Mycobacterium avium subspecies silvaticum</i>
MOTT	= atypische Mykobakterien („mycobacteria other than tuberculosis“)
OSA	= Objektträgerschnellagglutination
PCR	= Polymerase-Ketten-Reaktion
PGFE	= Puls-Gel-Feld-Elektrophorese
RFLP	= Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusanalyse
RKI	= Robert-Koch-Institut
RNA	= RNS, Ribonukleinsäure
SLA	= Serumlangsamagglutination

---

Spez.	= Spezies
<i>sp./ spp.</i>	= species/ species pluralis
<i>ssp.</i>	= subspecies
Tbc	= Tuberkulose
unverd.	= unverdünnt
verd.	= verdünnt
WHO	= Weltgesundheitsorganisation
ZN	= Ziehl-Neelsen-Färbung

## 1 Einleitung

Infektionen mit Mykobakterien werden in der tierärztlichen Praxis bei vielen Vogelarten regelmäßig festgestellt. Dabei sind Zoo- und Wildvögel und häufig auch Ziervögel sowie alle Arten des Nutzgeflügels betroffen. In Beständen können diese Infektionen unter Umständen erhebliches Ausmaß annehmen. So waren im Zeitraum von 1994 bis 2004 in einem Tierpark in Deutschland 10 % von 597 untersuchten Vögeln an einer Mykobakteriose erkrankt. Betroffen waren Ciconiiformes (Schreitvögel), Phasianiformes (Hühnervögel), Anatiformes (Entenvögel), Passeriformes (Sperlingsvögel) sowie einzelne Tiere der Gruiformes (Kraniche) und Psophiiformes (Rallenkraniche) (MÜNCH, 2006).

Als Erreger der aviären Mykobakteriose besitzen vor allem *Mycobacterium avium* ssp. *avium* und *Mycobacterium avium* ssp. *silvaticum* Bedeutung, die dem *Mycobacterium avium* - Komplex zugeordnet werden (MÖBIUS et al., 2006). Diese Bakterien führen beim Vogelpatienten zu schwerwiegenden, chronischen Infektionserkrankungen, die außer einer fortschreitenden Abmagerung kaum typische Symptome hervorbringen und meist letal verlaufen. In wenigen Fällen kann man äußerlich eine Granulombildung im Bereich der Augen, Gelenke oder Haut erkennen. Meist sind Einzeltiere von der Erkrankung betroffen, jedoch kann sich eine aviäre Mykobakteriose auch zum Bestandsproblem entwickeln. Darüber hinaus werden diese Mykobakterien der Vögel als potentielle Zoonoseerreger angesehen (ÁLVAREZ et al., 2008).

Der Diagnostik kommt im Rahmen der Bekämpfung der aviären Mykobakteriose eine große Bedeutung zu. Da die klinischen Symptome wenig charakteristisch sind, ist dabei der Erregernachweis sowohl in Organproben als auch am lebenden Vogel entscheidend. Bisherige diagnostische Verfahren sind allerdings entweder besonders zeitintensiv oder in der Durchführung sehr aufwendig. Ziel dieser Arbeit war es daher, einen diagnostischen Test in Form einer Realtime-PCR zu entwickeln, der einen schnellen, einfachen und dabei sicheren Nachweis von vogelpathogenen Mykobakterien aus unterschiedlichen klinischen Untersuchungsmaterialien erlaubt.

---

Bei der Entwicklung einer solchen Realtime-PCR stand im Vordergrund, dass sie a) pathogene Mykobakterien sicher ausschließen sollte und die vogelpathogenen Arten *M. avium ssp. avium* und *M. avium ssp. silvaticum* mit hoher Sensitivität erkennen sollte, so dass man im Rahmen der Diagnostik nicht mehr auf eine langwierige Erregeranzucht angewiesen ist. Als Untersuchungsmaterial sollten sich Organmaterialien und vor allem auch Kotproben eignen.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher zum Nachweis von *M. avium ssp. avium* und *M. avium ssp. silvaticum* eine Realtime-PCR auf der Basis einer Gensequenz des Insertionselementes IS901 entwickelt werden, die bei beiden Subspezies vorgefunden wird und für diese spezifisch ist. Da die DNA-Extraktion aus Kotproben wegen des Vorkommens von PCR-Inhibitoren häufig problematisch ist, sollte in das Protokoll zusätzlich eine interne Kontrolle in Form einer Duplex-PCR integriert werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Taxonomie und Vorkommen von Mykobakterien

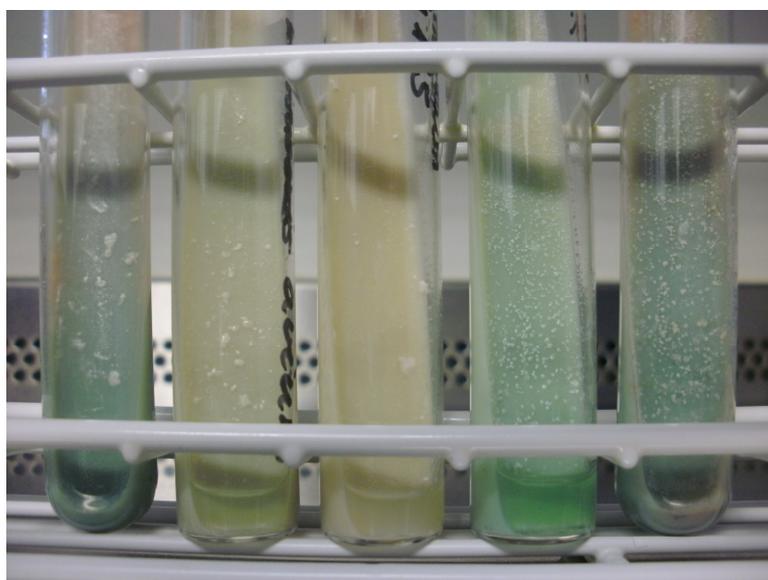
Die taxonomische Zuordnung wichtiger Mykobakterienspezies ist in der Tabelle 1 dargestellt. Zur Gattung *Mycobacterium* werden derzeit mehr als 150 Arten gezählt. Es besteht eine enge Verwandtschaft zu den Gattungen *Corynebacterium*, *Nocardia* und *Rhodococcus*. Alle Gattungen sind in der GRAM-Färbung GRAM-positiv und weisen einen hohen G+C-Gehalt von über 50 mol% auf (SELBITZ, 2002).

**Tabelle 1: Taxonomie der Mykobakterien (ROLLE & MAYR, 2002)**

<b>Klasse</b>	Actinobacteria
<b>Ordnung</b>	Actinomycetales
<b>Familie</b>	Mykobacteriaceae
<b>Gattung</b>	<i>Mycobacterium</i>
<b>Spezies</b>	<i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplex <i>Mycobacterium-avium</i> -Komplex <i>Mycobacterium genavense</i>

Durch einen besonderen Aufbau der Zellwand unterscheiden sich Mykobakterien wesentlich von den meisten anderen Bakterien. In die Zellwand von Mykobakterien sind Mycolsäuren mit 60-80 Kohlenstoffatomen eingelagert. Diese führen zu der diagnostisch genutzten Säure- und Alkoholfestigkeit sowie zu einer hohen Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln. Mykobakterien zeichnen sich des Weiteren durch einen Guanosin- und Cytidingehalt von 61-71-mol% aus. Die geraden oder leicht gebogenen Stäbchen von 0,2-0,7 x 1,0-10,0 µm Größe färben sich in der Regel grampositiv an. Sie sind unbeweglich und bilden keine Sporen aus. Wachstum erfolgt unter aeroben oder mikroaeroben Bedingungen (HOLT et al., 1994). Bis zur Ausbildung sichtbarer Kolonien können je nach Spezies eine Dauer von drei bis fünf Tagen (schnell wachsend) über vier bis sechs Wochen (langsam wachsend) vergehen. Bei *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* können Kolonien nach drei Monaten oder noch später sichtbar werden. Beispiele von Kolonien

verschiedener Mykobakterien sind in Abbildung 1 dargestellt. Die Einteilung von Mykobakterien in verschiedenen Gruppen erfolgt je nach Wachstumsgeschwindigkeit und nach der Fähigkeit zur Pigmentbildung unter Lichteinfluss oder bei Dunkelheit. Der MAC und *M. genavense* gehören zu den langsam wachsenden und nicht chromogenen Mykobakterien. Biochemische Eigenschaften können zur Differenzierung herangezogen werden, sind allerdings aufgrund des teilweise sehr langsamen Wachstums von untergeordneter Rolle. Es werden immer mehr moderne Labormethoden zur Differenzierung verwendet, was zu einer Neusortierung und Entdeckung weiterer Spezies in den letzten Jahren führte (TORTOLI et al., 2003).



**Abbildung 1: verschiedene Mykobakterienkulturen. Von links nach rechts: M.a.a. Av 56, M.a.a. FLI, M.a.s., M. fortuitum, M. avium (Patientenprobe)**

Grundsätzlich werden Mykobakterien in zwei große Gruppen aufgeteilt. Dabei handelt es sich zum einen um Mykobakterien des Tuberkulosekomplexes und zum anderen um Mykobakterien, die als atypische Mykobakterien oder so genannte mycobacteria other than tuberculosis (MOTT) bezeichnet werden (FALKINGHAM, 1996).

Zum Tuberkulosekomplex gehören: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. canetti* und *M. caprae*. Untersuchungen der 16SrRNA zeigen, dass alle Vertreter zu der Spezies *Mycobacterium tuberculosis* gehören und somit eigentlich als Subspezies zu bezeichnen sind. Dennoch wurden die ursprünglichen

Bezeichnungen beibehalten, da diese allgemein gebräuchlich ist (RKI, 2010a). Häufig sind diese Erreger mit Erkrankungen des Menschen ebenso wie bei Tieren assoziiert. In der Umwelt sind sie in der Regel nicht zu finden. Die Tuberkulose des Menschen wird auch heute noch regelmäßig in Deutschland diagnostiziert und stellt ein bestehendes Gesundheitsproblem dar. So starben 155 Menschen in Deutschland im Jahr 2008 an Tuberkulose (RKI, 2010b). Wichtigster Eintrag und Ansteckungsquelle sind Reisende aus osteuropäischen Ländern (RKI, 2010b). Die Anzahl der Neuerkrankungen an Tuberkulose ist auf Basis der Berichte des Robert-Koch-Instituts (RKI) zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland (RKI, 2010b) in nachfolgender Tabelle 2 zusammengefasst. Dabei wurden entsprechend der RKI-Definition außer *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) alle zum *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex gehörigen Spezies ohne die atypischen Mykobakterien einbezogen. Hinsichtlich der Therapie der Tuberkulose des Menschen stellen Antibiotikaresistenzen ein großes Problem dar. Der Anteil multiresistenter Stämme, die sich durch das Vorliegen einer Resistenz sowohl gegen Isoniazid als auch gegen Rifampicin sowie gegebenenfalls gegen weitere Antibiotika auszeichnen, ging von 2,0% im Jahr 2007 allerdings auf 1,5% im Jahr 2008 zurück.

Im Gegensatz zur Situation beim Menschen gelten Deutschlands Rinderbestände als frei von Tuberkulose. Dies bedeutet, dass 99,8% der Rinderbestände, die mindestens 99,9% der Rinder halten, frei sind von Tuberkulose, also von Erkrankungen durch Mykobakterien des Tuberkulosekomplexes (RKI, 2010c). Es treten zwar auch in Deutschland immer wieder einzeln Fälle bei Rindern auf, die Zahlen liegen dabei aber weit unter der Toleranzgrenze (RKI, 2010c).

Der Name „atypische Mykobakterien“ beruht auf der frühen Annahme, dass es sich bei diesen Mykobakterien um außergewöhnliche Mykobakterien des Tuberkulosekomplexes handelte (FALKINHAM, 1996). Der englischsprachige Begriff „mycobacteria other than tuberculosis“ beschreibt die Vertreter wesentlich besser, da in dieser Gruppe alle Mykobakterien außerhalb des Tuberkulosekomplexes zusammengefasst werden. Bedeutende Erreger sind unter anderem der *Mycobacterium-avium-intracellulare*-Komplex (MAC), *Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium fortuitum* oder *Mycobacterium simiae*. Isoliert wurden MOTT unter anderem aus Trinkwasser, Wasserleitungen und dem Erdreich (COVERT et al.,

1999; DAILLOUX et al., 1999). Viele Spezies sind saprophytär verbreitet und gelten als apathogen für Mensch und Tier. Durch diese Erreger ausgelöste Erkrankungen werden als Mykobakteriosen bezeichnet.

**Tabelle 2: Übersicht über die Anzahl an Tbc-Neuerkrankungen von Menschen in Deutschland**

Jahr	Anzahl der Neuerkrankungen	Inzidenz pro 100.000 Einwohnern in Prozent
2001	7539	9,1
2002	7684	9,3
2003	7184	8,7
2004	6583	8,0
2005	6045	7,3
2006	5402	6,6
2007	5020	6,1
2008	4543	5,5

Die Taxonomie der Mitglieder des *Mycobacterium-avium-intracellulare-Komplexes* wurden in den letzten Jahren immer wieder revidiert. Derzeit gehören zum MAC *M. avium ssp. avium*, *M. avium ssp. hominissuis*, *M. avium ssp. silvaticum*, *M. avium ssp. paratuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. chimaera* und *M. Species X* (MÖBIUS et al., 2006). Eine weitere Gruppierung der Erreger in diesem Komplex beruht auf der Bestimmung von Serovaren. Es sind 28 Serovare sowie zwei nicht weiter klassifizierte Serovare Ultra28a und Ultra28b bekannt. Die Zuordnung der Serovare zu den einzelnen Vertretern unterscheidet sich je nach Autor und Untersuchungsmethode. Nach MÖBIUS et al. (2006) werden die Serovare 1-6, 8-11 und 21 *M. avium* und die Serovare 7, 12-20 und 25 der Art *M. intracellulare* zugeordnet. Die Serovare 1-3 werden dabei *M. avium ssp. avium* zugeteilt. Serovar 1 kommt häufiger in den USA vor und die Serovare 2 und 3 sind in Europa verbreitet

(SCHLIESSER, 1985). THOREL et al. (1997) sieht in *M. avium ssp. avium* den Erreger der aviären Tuberkulose. Welche Erreger des MAC-Komplexes für Menschen pathogen sind, ist umstritten. Krankheitsbilder sind vor allem Lungeninfektionen bei Erwachsenen und Lymphadenitis bei Kindern. Bei AIDS-Patienten führt diese Subspezies zu einer disseminierten Infektion (CAMPELL, 2004).

Im Gegensatz zu *M. avium ssp. avium* wächst *M. avium ssp. silvaticum* nicht auf eihaltigen Nährböden. Eine Wachstumsstimulation erfolgt bei pH 5,5. Diese Subspezies gilt als obligat tierpathogen, sie verursacht beim Vogel aviäre Tuberkulose sowie bei Säugetieren eine so genannte Paratuberkulose (LEHTOLA et al., 2006). *M. avium sp. silvaticum* konnte bislang nicht aus der Umwelt isoliert werden (THOREL et al., 1997; LEHTOLA et al., 2006).

Die Insertionselemente IS1245 und IS1311 sind charakteristisch für *M. avium*. Sie zeigen eine hoch konservierte Gensequenz. Allerdings erlauben sie keine Differenzierung zwischen den einzelnen Subspezies (GUERRERO et al., 1995; ROIZ et al., 1995; BAUER & ANDERSEN, 1999). Zusätzlich besitzen nur *M. avium ssp. avium* und *M. avium ssp. silvaticum* das Insertionselement IS901. Teilweise wurde dieses Insertionselement bei *M. avium ssp. silvaticum* als IS902 bezeichnet (AHRENS et al., 1995), eigene Untersuchungen zeigten allerdings, dass Sequenzen von IS901 und IS902 identisch sind. In Versuchen wurde nachgewiesen, dass Mykobakterien des MAC, die das IS901 besitzen, hochpathogen für Vögel (BONO et al., 1995; PAVLIK et al., 2000; DVORSKA et al., 2003), wahrscheinlich aber nicht für Säugetiere und den Menschen sind. So konnte dieses Insertionselement bei Mykobakterien aus Säugetieren und Menschen nicht nachgewiesen werden (BONO et al. 1995; MÖBIUS et al., 2006). Zudem konnte IS901 bisher noch bei keinen Mykobakterien außerhalb des MAC oder anderen Bakterien nachgewiesen werden.

## 2.2 Aviäre Mykobakteriosen

### 2.2.1 Erkrankungen durch Mykobakterien beim Vogel

Das Krankheitsbild der aviären Mykobakteriose ist meist unspezifisch. In der Regel handelt es sich beim Vogel um eine chronisch auszehrende Erkrankung. Hinweise auf eine Mykobakteriose sind häufig nur Symptome wie ein deutlich reduzierter Ernährungszustand bei erhaltener oder verminderter Futteraufnahme sowie ein reduziertes Allgemeinbefinden (WEDEL 1999, FOLDENAUER et al., 2007). Eine hochgradige Leukozytose wird bei erkrankten Vögeln häufig festgestellt (TELL et al., 2003b). Weitere Symptome und deren Ausprägung sind abhängig von Art und Lokalisation der betroffenen Organe sowie vom Grad der Veränderungen. Unter anderem kann es zu Durchfall, Dyspnoe, Leber- oder Nierenversagen kommen. Auch bei Umfangsvermehrungen in der Haut oder an anderer Lokalisation ist immer an eine Infektion mit Mykobakterien als Differentialdiagnose zu denken. Infizierte Vögel können über Jahre klinisch unauffällig bleiben und die Mykobakteriose wird als Zufallsbefund festgestellt. Betroffen sind in der Regel ältere Tiere (POLLOCK, 2006). In zoologischen Gärten werden oft klinisch gesunde Tiere bei routinemäßigen Untersuchungen serologisch positiv getestet (MÜNCH, 2006). Als wichtigster Infektionsweg gilt die orale Aufnahme der Erreger (POLLOCK, 2006). Die Mykobakterien befinden sich dabei in Futter, Wasser, Erdreich, Einstreu oder in aufgenommenen Arthropoden (MÜLLER-BEISSER, 1994). Stress scheint einen Ausbruch zu begünstigen (DVORSKA et al., 2007). Grundsätzlich werden verschiedene Verlaufsformen beim Vogel unterschieden, die allerdings fließend ineinander übergehen oder parallel zueinander vorkommen können. Generell ist bei erkrankten Vögeln von einer offenen Tuberkulose auszugehen, bei der es also zu einer Erregerausscheidung kommt (HOOP & GLÜNDER, 2005). Betroffene Vögel scheiden Mykobakterien intermittierend mit dem Kot aus (MÜLLER-BEISSER, 1994).

Bei der so genannten klassischen oder granulomatösen Verlaufsform entstehen typische Granulome in verschiedenen Organen. Histologisch zeigt sich im fortgeschrittenen Stadium eine zentrale Nekrose umgeben von Epitheloidzellen. Am häufigsten sind die Granulome, begünstigt durch den oralen Infektionsweg, in der Leber, Milz oder im Magen-Darm-Trakt zu finden (DVORSKA et al., 2007).

Granulome in anderen Organen sind wesentlich seltener. Dennoch können auch Lunge, Herz und Perikard, zentrales Nervensystem, Knochen oder jedes andere Organsystem betroffen sein (THOREL et al., 1997). Granulome am Darm haben dabei eine offene Verbindung zum Darmlumen (HOOP & GLÜNDER, 2005). Beschrieben ist diese Verlaufsform sowohl bei Gänsen (ÖZCAN et al., 2001) als auch bei Vertretern der Familie Ardeideae und Threskiornithidae (DVORSKA, 2007) aus einem Zoo. Bei einer Legehennenherde konnten Granulome in Milz, Leber, am Darm und vereinzelt im Mesenterium, Perikard, Knochen sowie Knochenmark und Niere gefunden werden. Zusätzlich konnten säurefeste Stäbchen in Lunge und Infraorbitalsinus nachgewiesen werden (GONZÁLEZ et al., 2002). Eine besondere Form der granulomatösen Mykobakteriose stellt die Hautform dar. Dabei kann es auch zu Zubildungen an den Augen betroffener Tiere kommen (KORBEL et al., 1997). Über eine Beteiligung von Mykobakterien an den Sohlenballengeschwüren bei Greifvögeln wurde ebenfalls berichtet (SMIT et al., 1987). Auch einzelne knotige Veränderungen an der Haut können Zeichen einer Mykobakteriose darstellen (FERRER et al., 1997).

Die so genannte paratuberkulöse Verlaufsform ähnelt der Paratuberkulose bei Säugetieren, die hier allerdings von *M. avium ssp. paratuberculosis* verursacht wird. Diese Verlaufsform ist durch eine Verdickung der Darmschleimhaut und eine Zottenhypertrophie gekennzeichnet. Klinisch zeigt sich häufig eine schlechte Verdauung von Futter und in der Folge Diarrhoe zusammen mit einem reduzierten Ernährungszustand. Pathologisch-anatomisch präsentiert sich die Darmwand verdickt und mit kolbenartig aufgetriebenen und verdickten Darmzotten. Diese Verlaufsform kommt bei Psittaziden häufig vor (WEDEL, 1999).

Die so genannte atypische Verlaufsform ist durch eine mehr oder weniger starke Schwellung diverser Organe gekennzeichnet. Betroffen sind in erster Linie Leber und Milz. Typische Granulome fehlen vollständig. Häufig ist diese Form bei Finkenartigen und Wassergeflügel sowie bei Tauben zu sehen (BOUGIOUKLIS et al., 2005; POLLOCK, 2006). Durch das unspezifische klinische und pathologische Bild kann die Mykobakteriose in dieser Form leicht übersehen oder mit anderen Erkrankungen, die mit Organschwellungen einhergehen, verwechselt werden (WEDEL, 1999).

Die unterschiedlichen Verlaufsformen können bei verschiedenen Vogelspezies unterschiedlich gehäuft auftreten. Auch akute Todesfälle durch eine Infektion mit Mykobakterien kommen vor. Dabei kommt es in der Regel nicht zur Ausbildung von Granulomen (KOPPERS, 1989).

### **2.2.2 Mykobakterien des Tuberkulosekomplexes beim Vogel**

Mykobakterien des Tuberkulose-Komplexes kommen bei Vögeln nur selten vor. Dabei handelt es sich in erster Linie um Erkrankungen mit *M. tuberculosis*. Meist sind davon Vögel betroffen, bei denen ein enger Kontakt zwischen Vogel und Besitzer besteht. Das klinische Bild ist bei Vögeln von granulomatösen Zubildungen am Kopf, im Sinus und in der Schnabelhöhle geprägt (WASHKO et al., 1998). HOOP (2002) berichtet von je einem Fall bei einer Blaustirnamazone und einem Kanarienvogel. Die Amazone zeigte Veränderungen am linken Ständer und am Brustmuskel. Säurefeste Stäbchen konnten sowohl in der Muskulatur als auch aus dem Tibiotarsus und in einer Masse in der Subkutis des linken Ständers nachgewiesen werden. Der Kanarienvogel zeigte eine Umfangsvermehrung in der Lunge (HOOP, 2002). Die Übertragungswege sind letztendlich noch nicht vollständig geklärt. Allerdings lässt sich zumindest teilweise eine Übertragung vom Menschen auf den Vogel vermuten. Dies beschreibt STEINMETZ et al. (2006) bei dem Fall einer Tuberkulose bei einem dunkelroten Ara (*Ara chloroptera*). Der Ara zeigte eine Schwellung am rechten Bein sowie eine vergrößerte und gestaute Leber mit hellen Arealen auf der Oberfläche. Anamnestisch war bei dem Besitzer zuvor eine offene Tuberkulose festgestellt worden. Zudem lag ein enger Kontakt zwischen Besitzer und Ara mit Mund-zu-Schnabel-Fütterung vor (STEINMETZ et al., 2006).

Experimentelle Infektionen mit *M. bovis* wurden bei verschiedenen Vogelarten durchgeführt. Bei Staren und Krähen zeigte sich, dass lediglich bei einer Krähe von acht Krähen nach intraperitonealer Infektion säurefeste Stäbchen histologisch nachgewiesen werden konnten. Bei fünf von acht Tieren konnte *M. bovis* nach intraperitonealer Infektion rekultiviert werden (BUTLER et al., 2001). Bei Tauben zeigte sich nach oraler oder intratrachealer Infektion innerhalb von 90 Tagen post infectionem keine klinische Symptomatik. Ein Tier zeigte nach intratrachealer Infektion Granulome in der Lunge und ein weiteres Tier Granulome in der Leber. Bei

einem Tier konnte nach oraler Infektion *M. bovis* aus dem Darmtrakt angezüchtet werden, ohne dass bei der pathologischen Untersuchung makroskopisch Veränderungen an den Organen auffielen. Zwei Tiere schieden *M. bovis* mit dem Kot an Tag 1 nach der Infektion und ein weiteres Tier an Tag 60 mit dem Kot aus (FITZGERALD et al., 2003). Bei Stockenten konnte lediglich bei einem von 6 Tieren *M. bovis* nach intratrachealer Infektion, und zwar nach 30 Tagen post infectionem isoliert werden. Kotproben waren zu jedem Zeitpunkt negativ. Kein Tier zeigte in der pathologischen und histologischen Untersuchung Veränderungen (FITZGERALD et al., 2005).

### 2.2.3 Atypische Mykobakterien beim Vogel

Beim Vogelpatient werden am häufigsten atypische Mykobakterien als Erreger von Mykobakteriosen nachgewiesen. Zum einen handelt es sich dabei um Mykobakterien des MAC, und hier vor allem *M. avium* ssp. *avium* und *M. avium* ssp. *silvaticum* sowie in Einzelfällen um *M. intracellulare*. Zum anderen ist *M. genavense* regional sehr stark am Krankheitsgeschehen beteiligt. Testet man die MAC-Isolate auf ihre Serovanzugehörigkeit, überwiegen die Serovar 1 bis 3. Seltener findet man die Serovare 4, 6 oder 8. Die anderen Serovare treten, wenn überhaupt, nur in Einzelfällen auf (HOOP et al., 1993; FERRER et al., 1997). Bei einem wildlebenden Weißkopfseeadler (*Haliaeetus leucocephalus*) konnte eine generalisierte Infektion mit *M. avium* ssp. *avium* nachgewiesen werden. Das Tier zeigte eine Umfangsvermehrung am rechten Ellenbogengelenk und Granulome im Bereich von Lunge, Mesenterium, Pharynx, Pleura und Leber (HOENERHOFF et al., 2004). HSIEH et al. (2009) beschreiben bei zwei Fasänen (*Lophura swinhoii*) granulomatöse Veränderungen in Cerebrum und Cerebellum, Herz- und Intercostalmuskulatur, Luftsack, Lunge, Leber, Milz und Niere. Mittels PCR und anschließender Sequenzierung konnte *M. avium* ssp. *avium* als Auslöser festgestellt werden.

*M. genavense* wird häufig bei Psittaziden beschrieben. HOOP et al. (1993) diagnostizierte *M. genavense* bei drei Wellensittichen (*Melopsittacus undulatus*), einer Amazone (*Amazona amazonica*), einem Japanschnäpper (*Cyanoptila cyanomelana*) und einem Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*). Dabei fielen vor allem eine Leberschwellung, Verdickung der Dickdarmwand sowie eine Muskelatrophie auf.

Lediglich jeweils in einem Fall konnten granulomatöse Veränderungen in der Lunge und in der Subcutis festgestellt werden. KIEHN et al. (1996) beschreibt einen Fall bei einer Amazone (*Amazona ochracephala*) mit respiratorischen Symptomen. In der Untersuchung zeigte sich eine Umfangsvermehrung an der Glottis mit vielen säurefesten Stäbchen sowie eine granulomatöse Hepatitis, Enteritis und Pneumonie. Bei diesen Organen konnten keine säurefesten Stäbchen nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde eine granulomatöse Dermatitis in Folge einer Infektion mit *M. genavense* bei einem Lori (*Trichoglossus haematodus*) und einer Amazone (*Amazona albifrons*) beschrieben (FERRER et al., 1997). Kanarienvögel zeigten klinisch nur eine unspezifische Symptomatik und Splenomegalie (RAMIS et al., 1996, HOLLSBOER BUOGO et al., 1997).

Andere atypische Mykobakterien wurden bislang nur in wenigen Fällen im Zusammenhang mit einem Erkrankungsgeschehen beim Vogel vorgefunden. *M. simiae* (TRAVIS et al., 2007) wurde bei vier Zimtkopflisten (*Halcyon cinnamomina cinnamomina*) nachgewiesen. Die Tiere zeigten klinisch Dyspnoe und Gewichtsverlust. Des Weiteren konnte nur eine Vergrößerung der Leber festgestellt werden. Lediglich in Kulturen aus der Leber konnte *M. simiae* isoliert werden (TRAVIS et al., 2007). Infektionen mit *M. fortuitum* und *M. terrae* führten bei drei Bussarden (*Buteo buteo*) zu lokalen Entzündungen an den Krallen. Eine Dohle (*Corvus manedula*) besaß Pockenläsionen ähnliche Veränderungen an Schnabel und Füßen, die auf eine Infektion mit *M. fortuitum* zurückzuführen waren. Eine Möwe (*Larus canus*) wies einzelne Granulome am Darm auf. Bei diesem Tier konnte *M. nonchromogenicum* isoliert werden. Nekrosen an Leber und Milz zeigte ein Fasan (*Phasianus colchicus*), bei dem *M. flavescens* und *Mycobacterium sp.* isoliert werden konnte (SMIT et al., 1987). *M. avium ssp. paratuberculosis* konnte bei einem Haussperling (*Passer domesticus*) und drei Staren (*Sturnus vulgaris*) nachgewiesen werden (CORN et al., 2005). Dabei lagen keine Informationen vor, ob bei diesen Tieren eine klinische Symptomatik vorhanden war.

#### **2.2.4 Zoonosepotential aviärer Mykobakteriosen**

MOTT werden als für den Menschen apathogen, z.B. *M. brumae* u.a., oder fakultativ pathogen, z.B. Mykobakterien des MAC, *M. genavense* u.a., angesehen. Mit

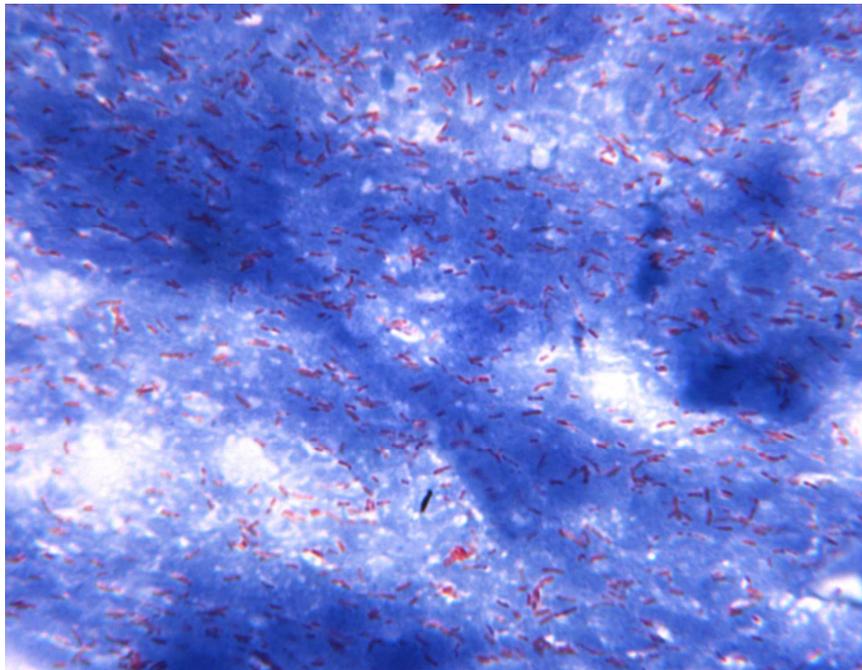
Lungenerkrankungen sind häufig *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. malmoense* und Mykoabakterien des MAC assoziiert. Von Mykobakterien des MAC sind in erster Linie immunsupprimierte Personen wie Kleinkinder, chronisch Kranke, HIV-Patienten oder sehr alte Menschen betroffen (CAMPELL, 2004). Dabei unterscheidet sich das klinische Bild deutlich von dem der durch Mykobakterien des Tuberkulose-Komplexes ausgelösten Erkrankungen. *M. avium* führt bei erwachsenen Menschen mit AIDS zu einer disseminierten Infektion. Kleinkinder zeigen oft eine Lymphadenitis (THOREL et al., 1997). Die Heilung einer Mykobakteriose beim Menschen gilt als schwierig (ALAGARSWAMY et al., 2007). *M. avium ssp. hominissuis* ist dabei der am weitesten verbreitete Erreger des MAC beim Menschen. Nach MÖBIUS et al. (2006) gibt es bisher noch keinen Nachweis von *M. avium ssp. avium* beim Menschen in der Bundesrepublik Deutschland. Somit muss in Zukunft noch weiter geklärt werden, wie hoch das zoonotische Potential wirklich ist.

## 2.3 Methoden zum Nachweis von Mykobakteriosen

### 2.3.1 Mikroskopie und Färbungen

Die Säure-Alkoholfestigkeit der Mykobakterien erlaubt eine charakteristische Färbung und damit eine mikroskopische Identifizierung dieser Keime im Untersuchungsmaterial. Ein einmal in die Mykobakterien aufgenommenen Farbstoff wird unter Einwirkung von Salzsäurealkohol nicht mehr abgegeben. Corynebakterien, *Nocardia sp.* und *Rhodococcus sp.* können allerdings auch eine gewisse Säurefestigkeit zeigen. Prinzipiell werden zur Darstellung säurefester Bakterien zwei Färbemethoden angewendet, die Ziehl-Neelsen-Färbung und die Auramin-Rhodamin-Färbung. Die Ziehl-Neelsen-Färbung erfolgt mit einer Karbolfuchsinlösung, die in der Regel bis zur Dampfbildung erhitzt wird. Danach wird eine Entfärbung mit Salzsäurealkohol und die Gegenfärbung mit Löfflers Methylenblau durchgeführt. Mykobakterien erscheinen kräftig rot gefärbt auf blauem Hintergrund (ROLLE & MAYR, 1978). Zur Untersuchung wird ein Präparat mindestens 10 Minuten mikroskopisch begutachtet, bis es als negativ gewertet werden kann (KOPPERS, 1989). Bereits bei einem einzelnen Stäbchen erfolgt die Diagnose „säurefeste Stäbchen“ positiv. Die Sensitivität der Ziehl-Neelsen-Färbung wird von Müller-Beißer (1994) und SCOPE (2007) etwa bei  $10^3$  bis  $10^4$  Mykobakterien

pro Gramm Kot angegeben. Um die Sensitivität zu erhöhen, kann eine Vorbehandlung von Sputum mittels Sputofluol<sup>®</sup> (Firma Merck, Darmstadt) erfolgen. Dabei wird organisches Material durch Hypochlorit auf oxidativem Weg aufgelöst (SCOPE, 2007). KOPPERS (1989) verwendet das Sputofluol<sup>®</sup> zur Behandlung von Kotproben vor dem Färben. Dazu wird eine walnussgroße Menge Kot mit 20 ml Sputofluol<sup>®</sup> (Konzentration nicht angegeben) versetzt. Vor, nach und während der Einwirkphase von 20 Minuten wird die Mischung mehrfach geschüttelt. Danach erfolgt eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 10.000 RZB. Der Überstand wird verworfen und eine Öse Material aus der obersten Sedimentschicht mit Hilfe zweier Objektträger dünn ausgebracht und nach Trocknung anschließend gefärbt. Das Ergebnis einer Ziehl-Neelsen-Färbung ist in Abbildung 2 zu sehen.



**Abbildung 2: Quetschpräparat vom Knochen eines Bussards nach Ziehl-Neelsen-Färbung (1000 fache Vergrößerung). Auf dem blau gefärbten Hintergrund sind die säurefesten Stäbchen (rot) zu erkennen.**

Die Auramin-Rhodamin-Färbung dient zur direkten Fluoreszenzmikroskopie. Ein Färbeprotokoll (ROLLE & MAYR, 1978) gibt eine Färbung mit Auraminlösung sowie mit Phenolum liquefactum an. Nach dem Färbeschritt erfolgt das Entfärben mit Salzsäurealkohol analog zu der Ziehl-Neelsen-Färbung. In den nächsten Schritten

erfolgt die Gegenfärbung mit Kaliumpermanganat und alkoholisierte Methyleneblaulösung. Mykobakterien erscheinen dann goldgelb fluoreszierend, während sich die restlichen Zellen dunkelviolett anfärben.

### 2.3.2 Anzucht

Zum Nachweis von Mykobakterien stellt derzeit die Anzucht aus geeignetem Untersuchungsmaterial noch die Methode der Wahl dar. Um die Erreger eindeutig identifizieren zu können, müssen die Mykobakterien in Form von Bakterienreinkulturen vorliegen. Die Kulturen werden dann für die weitere Differenzierung verwendet. Das Temperaturoptimum für das Wachstum liegt für die meisten Mykobakterien zwischen 30°C und 42°C (SELBI TZ, 2002). Eine mikroaerobe Bebrütung fördert das Wachstum, ist allerdings nicht obligat. Die Anzucht kann auf festen und in flüssigen Nährmedien erfolgen. Eine Ausnahme bildet dabei *M. genavense*, eine Spezies, die nach heutigem Kenntnisstand weitestgehend nur in flüssigen Medien wie flüssigem BACTEC-Medium® (Firma Becton Dickenson, Heidelberg) oder flüssigem Middlebrook 7H12-Agar wächst (BÖTTGER et al., 1993). Vereinzelt gelingt die Anzucht auf festem Middlebrook 7H11 Agar mit zugesetztem Mycobactin J (COYLE et al., 1992). Andere gängige Nährmedien sind Löwenstein-Jensen-Agar oder Middlebrook 7H11-Agar (DVORSKA et al., 2003). Einige Mykobakterien wie zum Beispiel *M. avium ssp. paratuberculosis* benötigen zum Wachsen Mycobactin, ein von anderen Mykobakterien produzierter oder künstlich zugesetzter Wachstumsfaktor.

### 2.3.3 Nachweis der Immunreaktion

Der Tuberkulintest ist beim Vogel im Gegensatz zu Säugetieren und Menschen von untergeordneter Rolle. Es gibt spezielles Geflügeltuberkulin zum Nachweis von *M. avium*. Bei dem Tuberkulintest wird die Immunreaktion auf zellulärer Ebene getestet. Die Applikation erfolgt intrakutan, bei Hühnern bevorzugt am Kehllappen. Bei anderen Vogelarten kann die Applikation auch in das Augenlid oder in eine Hautfalte erfolgen. Abgelesen wird das Ergebnis nach 48 Stunden. Dabei wird die Hautdickenzunahme beurteilt. Vorherige Schwellungen an der Injektionsstelle können aufgrund von Kreuzreaktionen herbeigeführt worden sein. Des Weiteren

kann es zu falsch negativen Ergebnissen kommen (WEDEL, 1999). CHEVILLE & RICHARDS (1971) konnten nachweisen, dass zellvermittelte Abwehrmechanismen bei Hühnerküken für den Tuberkulintest eine Rolle spielten. Dabei machte es keinen Unterschied, ob der Thymus operativ vor der Infektion entfernt wurde oder nicht. Im Stadium der Kachexie vor dem Tod der Tiere blieb der Tuberkulintest negativ.

KOPPERS (1989) beschrieb zwei Verfahren zur serologischen Diagnostik von Mykobakteriosen. Ein Verfahren zum Nachweis von Mykobakterien-Antikörpern ist die Objektträgerschnellagglutination. Dabei wird Plasma der zu untersuchenden Tiere und eine Antigensuspension auf einem Objektträger gemischt. Unter Schwenken wird der Objektträger mindestens drei Minuten beobachtet, ob es zu einer Agglutination kommt. Diese Agglutinationen zeigen sich als weiße Ausflockungen. Wichtig ist dabei die Verwendung eines dunklen Hintergrundes, um feinste Agglutinationen erkennen zu können. Die Antigensuspensionen müssen im Labor selbst hergestellt werden, da es momentan keine kommerziellen Lösungen zu beziehen gibt.

Bei der Serumlangsamagglutination wird 0,5 ml Plasma mit 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und diese Mischung dann in einer 1:2 Verdünnungsreihe weiter verdünnt. Zu jeder Verdünnungsstufe wird Antigensuspension pipettiert, die mit ANZ-Puffer auf eine optische Dichte von 0,6 im Photometer bei einer Wellenlänge von 546 nm eingestellt wurde. Nach 24 Stunden kann das Ergebnis abgelesen werden. Die Verdünnungsstufe, bei der eine Agglutination gerade noch erkennbar ist, wird dabei als Titer bezeichnet. Bei der Objektträgerschnellagglutination positive Seren zeigten einen Titer in der Serumlangsamagglutination von 1:32 bis 1:64 (KOPPERS, 1989).

## **2.4 Nachweis der DNA**

### **2.4.1 DNA-Extraktion bei Mykobakterien**

BARTOS et al. (2006) isolierten DNA aus Mykobakterienkolonien lediglich durch Kochen von Koloniematerial mit destilliertem Wasser für 20 Minuten und

anschließender Zentrifugation in der Mikrozentrifuge bei 14000 x g für 5 Minuten. Der Überstand enthielt danach die Mykobakterien-DNA.

TELL et al. (2003a) verglichen vier Extraktionsverfahren. Dabei wurden Suspensionen von *M.a.a.*, *M. genavense* sowie *M. fortuitum* einer enzymatischen Lyse unterzogen. Zur Extraktion fand das Qiagen blood and tissue kit<sup>®</sup> (Firma Qiagen, Hilden) Anwendung. Das erste Verfahren beinhaltete keine weitere Vorbehandlung. Bei dem zweiten Verfahren wurden die Suspensionen erst für 30 Minuten bei 95°C erhitzt und dann die DNA extrahiert. Bei dem dritten Verfahren wurde der Erhitzungsschritt durch 4 Zyklen von Einfrieren in flüssigem Stickstoff für 1 Minute und erneutes Auftauen von 5 Minuten bei 70°C ersetzt. Im vierten Verfahren erfolgte ein mechanisches Zerstören der Zellwand durch Schreddern vor der enzymatischen Lyse. Dabei wirkte sich das Zerstören der Zellwand mittels Schreddern positiv aus. DNA konnte allerdings auch mit den anderen drei Methoden gewonnen werden. Die extrahierte Menge an DNA war beim Schreddern etwa dreimal so hoch wie bei den anderen Verfahren. Das schlechteste Ergebnis für *M. avium ssp. avium* wurde durch Erhitzen und anschließender Extraktion erreicht. Auswirkungen auf das PCR-Ergebnis gab es dadurch allerdings nicht. Bei *M. genavense* und *M. fortuitum* konnte mit den Extraktionsverfahren jeweils mehr DNA gewonnen werden als bei *M. avium ssp. avium* (TELL et al., 2003a).

#### **2.4.2 PCR-basierte Nachweismethoden**

Die Amplifizierung und der Nachweis von DNA von Mykobakterien können mittels PCR erfolgen. Hierzu gibt es bereits eine Reihe von verschiedenen Methoden.

Eine Methode ist die Vervielfältigung der extrahierten DNA mit anschließender Sequenzierung bestimmter Gensequenzen. Hierbei werden vor allem die Sequenzen des Hitzeschockproteins hsp65, der 16SrRNA und der 16S-23SrRNA Spacerregion verwendet. Diese erlauben eine Differenzierung der Mykobakterien bis auf Speziesebene. Allerdings können Subspezies von *M. avium* nicht unterschieden werden. Eine Differenzierung von *M. intracellulare* ist möglich (FROTHINGHAM & WILSON, 1993; BEGGS et al., 2000). CLOUD et al. (2002) verglichen ein kommerzielles Sequenzierkit mit dem AccuProbe-System und der HPLC-Methode.

Für das Sequenzieren wurde in einem ersten Schritt aus Mykobakterienkulturen die DNA extrahiert. Die gewonnene DNA wurde mit den im Sequenzierkit enthaltenen Primern im Bereich der 16SrRNA vervielfältigt. Nach einer Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte die Sequenzierung. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe von zwei Datenbanken mit bekannten Mykobakteriensequenzen verglichen. Somit konnten die Stämme bis zur Speziesebene differenziert werden. In einer Datenbank waren weitere Subspezies differenzierbar, deren Sequenzen in der anderen Datenbank fehlten. Ansonsten ergaben sich immer die gleichen Ergebnisse für die Sequenzierung. Diese konnten allerdings von anderen Bestimmungsmethoden wie HPLC abweichen.

Ein weiteres Verfahren nutzt Gensonden. Im ersten Schritt erfolgt die Extraktion der Mykobakterien-DNA. Bei dem AccuProbe-System (Hain Lifescience, Nehren) muss dazu vorher eine Kultur angezchtet werden. In das Inno LiPA-Kit (Innogenetics, Hannover) kann klinisches Probenmaterial auch direkt eingesetzt werden. Danach erfolgt die Vermehrung der DNA mittels PCR unter Verwendung von Primern, die von den Firmen in den jeweiligen Test-Kits angeboten werden. Im dritten Schritt wird die amplifizierte DNA mit präparierten Teststreifen inkubiert. Diese Teststreifen sind mit Gensonden präpariert, mit denen die Mykobakterien-DNA hybridisiert. Es ergeben sich Bandenmuster, die mittels Schablone ausgewertet werden. (DEVALLOIS et al., 1996; MILLER et al., 2000; JOHANSEN et al., 2002). Informationen zu den in den Kits verwendeten Zielgenen sowie genauere Beschreibungen der Primer sind nicht verfügbar.

Bei der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusanalyse (RFLP) wird isolierte DNA meist erst mittels PCR amplifiziert und danach mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten. Hierbei werden nur bestimmte Gene berücksichtigt. Diese sind genau wie bei der Sequenzierung und dem Nachweis mittels Gensonden in der Regel hsp65 (KIM et al., 2005) oder die 16SrRNA als Zielgene verwendet. JOHANSEN et al. (2007) nutzte IS1245 und IS1311. Die mittels Restriktionsenzymen geschnittene DNA wird unter Anwendung von Agarosegelelektrophoresen nach Größe aufgetrennt. Nach Sichtbarmachen der Banden erhält man somit spezifische Bandenmuster, die für die einzelnen Spezies der Mykobakterien charakteristisch sind. Nur bei wenigen Ausnahmen gibt es mehr

als ein spezifisches Bandenmuster pro Spezies. Mit dieser Methode lassen sich *M. avium*, *M. intracellulare* und *M. genavense* sicher unterscheiden. Allerdings erfolgt bislang keine Differenzierung zwischen *M. avium ssp. avium* und *M. avium ssp. paratuberculosis* (DEVALLOIS et al., 1997; DVORSKA et al., 2003; DVORSKA et al., 2007). GÜRTLER et al (2006) verglichen den Einsatz von 12 Restriktionsenzymen bei der Analyse der 16SrDNA Spacerregion miteinander. Dabei zeigte sich, dass für die Differenzierung der Mykobakterien mittels RFLP Kombinationen von Enzymen notwendig sind. Die besten Ergebnisse wurden mit der Kombination von *HaeIII* und *Sau96I* erreicht. Auf diese Weise konnten *M. avium* und *M. intracellulare* innerhalb des MAC differenziert werden.

Vereinzelt wurden auch konventionelle PCR-Verfahren mit Primern für das IS900 (vorhanden in *M. avium ssp. paratuberculosis*) und IS901 beschrieben (AHRENS et al., 1995). Dabei konnte IS901 bei Mykobakterien-Isolaten aus Menschen, Wiederkäuern und Wildvögeln nachgewiesen werden. BARTOS et al. (2006) benutzten PCR-Assays mit Primern für IS900, IS901, IS1245 und FR300 (flanking region des IS901) und konnten zeigen, dass alle untersuchten Stämme von *M. avium ssp. paratuberculosis* IS900 und FR300 positiv sowie IS901 und IS1245 negativ waren. *M. avium ssp. silvaticum* zeigte lediglich bei IS900 ein negatives Ergebnis. *M. avium ssp. avium* (Serovar S1-3) zeigte positive Reaktionen bei IS901 und IS1245. Bei FR300 zeigte sich ein variables Ergebnis. Bei *M. avium ssp. hominissuis* waren IS1245 und FR300 positiv und IS901 negativ. Bei Mykobakterien des Tuberkulose-Komplexes und bei *M. intracellulare* konnte keine der einbezogenen Sequenzen nachgewiesen werden. Diese Studie belegte somit ein Vorkommen von IS901 bei *M. avium ssp. silvaticum* und *M. avium ssp. avium* (BARTOS et al., 2006). Verschiedene Primersequenzen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Die bisher entwickelten PCR-Assays dienen primär dazu, Subspezies innerhalb der Art *M. avium* zu identifizieren und zu charakterisieren und gegebenenfalls die Pathogenität für Mensch und verschiedene Tiere zu bestimmen. Untersuchungsmethoden zum Nachweis von aviären Mykobakterien direkt aus klinischem Material, zum Beispiel Kot, existieren für Vögel bislang nicht.

### 2.4.3 Pulsfeldgelelektrophorese

Bei der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wird die gesamte DNA aus den Mykobakterien isoliert, mittels Restriktionsenzymen geschnitten und dann mittels Elektrophorese aufgetrennt. Das entstehende Bandenmuster kann dann verschiedenen Mykobakterien zugeordnet werden. BONO et al. (1995) und PESTEL-CARON et al. (1999) nutzten dazu zum Beispiel das Restriktionsenzym *Asel*. Bei diesem Verfahren erfolgt keine Vermehrung der DNA mittels PCR.

## 2.5 Weitere Nachweismethoden

Chromatographische Untersuchungen können zur Differenzierung von Mykobakterien auf Speziesebene herangezogen werden (MOSCA et al., 2007). Dabei werden zelluläre Fettsäuren und / oder Mycolsäuren isoliert und chromatographisch aufgetrennt. TORKKO et al. (2003) nutzte dazu die Gas-Liquid-Chromatographie und trennte die zellulären Fettsäuren ab, wohingegen CHOU et al. (1998) sowohl Fettsäuren als auch Mycolsäuren mit dieser Methode auftrennte.

WITTKOWSKI (2005) beschreibt das Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization-Time-of Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF MS)-Verfahren für einen Stamm von *M. avium* mit zwei unterschiedlichen Koloniemorphologien in der Anzucht. Dabei wurden die zu untersuchenden Proben mit Ionen beschossen. Mit Hilfe der dabei entstehenden Spektren konnte die Masse der zu untersuchenden Substanz (Arabinomannane) bestimmt werden. Für die Stämme konnten unterschiedliche Werte erhalten werden. Andere Mykobakterien wurden nicht untersucht.

**Tabelle 3: verschiedene in der Literatur beschriebene Primersequenzen zum Nachweis unterschiedlicher Mykobakterien**

<b>Autor</b>	<b>Zielgen</b>	<b>nachweisbare Mykobakterien</b>	<b>Primer forward</b>	<b>Primer revers</b>
FROTHINGHAM et al. (1993)	16S-23S-spacer-region	MAC	5'-GCG CAA TTA ACC CTC ACT AAA GGG AAT TGT ACA CAC CGC CCG CA-3'	5'-AAT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG ATC TCG ATG CCA AGG CAT CCA CC-3'
BEGGS et al. (2000)	<i>mig</i>	MAC	5'-CCC GTT CAA CGT CAA CTT CC-3'	5'-GGG CTC GCC GGT CAT CAG GT-3'
KIM et al. (2005)	<i>hsp65</i>	<i>Mycobacterium sp.</i>	5'-ATCGCC AAG GAG ATC GAG CT-3'	5'-AAG GTG CCG CCGATC TTG TT-3'
JOHANSEN et al. (2007)	IS1245 und IS1311	M.a.a. und M.a.h.	nicht angegeben	nicht angegeben
AHRENS et al. (1995)	IS900 IS901	M.a.p. M.a.s. und M. avium ssp.	CGT CGT TAA TAA CAA TGC AG GTC TGG GAT TGG ATG TCC TG	GGC CGT GCG TTA GGC TTC GA CAC CAC GTG GTT AGC AAT CC
BARTOS et al. (2006)	IS 900 IS901 IS1245 FR300	M.a.p. diverse	5'-GGG TGT GGC GTT TTC CTT CG-3'	5'-TCC TGG GCG CTG AGT TCC TC-3'
			nicht angegeben	nicht angegeben

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Mykobakterien-Referenzstämme

Insgesamt wurden bei der Entwicklung der PCR 13 Referenzstämme von *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *silvaticum*, *M. avium* ssp. *hominissuis*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, *M. genavense*, *M. fortuitum*, *M. simiae* und *M. malmoense* einbezogen. Die Herkunft und Benennung der einzelnen Stämme ist in Tabelle 4 aufgeführt. Die Mykobakterien-Stämme wurden überwiegend als gewachsene Kulturen auf festen oder in flüssigen Nährmedien zur Verfügung gestellt. Die von der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogenen Stämme wurden als gefriergetrocknete Pellets geliefert.

#### 3.1.2 Kot von SPF-Tauben

Zur Überprüfung der Sensitivität und Spezifität der entwickelten PCR wurde Kot von Tauben verwendet, der für die Untersuchungen mit Mykobakteriensuspensionen bestimmter Konzentrationen versetzt wurde. Der Kot stammte aus einem SPF-Taubenbestand von 22 Vögeln der Rasse Texaner, der an der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische der LMU München unter SPF- (spezifiziert pathogenfreien) Bedingungen gehalten wird. Der Gesundheits- und Infektionsstatus der Gruppe, auch bezüglich Infektionen mit Mykobakterien, wurde regelmäßig überprüft und dadurch der SPF-Status belegt. Außerdem ergaben sich in der Vergangenheit (Dokumentation von 2007 bis heute) bei Sektionen keinerlei Hinweise auf das Vorliegen von Mykobakteriosen.

Zusätzlich wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn weitere Tests zur Bestätigung der Freiheit der Tauben von Mykobakterien durchgeführt. So wurde eine Stichprobe aus fünf der 22 Tiere serologisch auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen

**Tabelle 4: Herkunft der Referenzstämme**

<b>Art oder Unterart</b>	<b>Stamm-Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>
<i>M. avium ssp. avium</i>	DSM 44156	DSMZ
<i>M. avium ssp. avium</i>	Stamm Av 56	DSMZ
<i>M. avium ssp. avium</i>	M.a.a. FLI	FLI Jena
<i>M. avium ssp. silvaticum</i>	DSM 44157	DSMZ
<i>M. avium ssp. hominissuis</i>	M.a.h. 1	LGL Oberschleißheim
<i>M. avium ssp. hominissuis</i>	M.a.h. 2	LGL Oberschleißheim
<i>M. intracellulare</i>		LGL Oberschleißheim
<i>M. avium ssp. paratuberculosis</i>	M.a.p. 1	LGL Oberschleißheim
<i>M. avium ssp. paratuberculosis</i>	M.a.p. 2	LGL Oberschleißheim
<i>M. genavense</i>		LGL Oberschleißheim
<i>M. fortuitum</i>		LGL Oberschleißheim
<i>M. simiae</i>		LGL Oberschleißheim
<i>M. malmoense</i>		LGL Oberschleißheim
<i>Taylorella equigenitalis</i>	DSM 10668	DSMZ

Mykobakterien der Serovare S1-4, S6, S9 und Ultra 28a untersucht. Dazu wurde 1 ml Blut aus der Vena ulnaris entnommen und mit 3,7-prozentigem Natriumcitrat als Gerinnungshemmer versetzt. Das abzentrifugierte Plasma wurde für 30 Minuten bei 56 °C deaktiviert. Im Anschluss erfolgte eine Objektträgerschnellagglutination in Anlehnung an KOPPERS (1989). Dabei wurden 30 µl Plasma mit 30 µl Antigensuspension gemischt und unter Schwenken drei Minuten lang auf Agglutination beobachtet. Die Antigensuspension wurde in der Klinik für Vögel für jedes Serovar selbst hergestellt. Zusätzlich wurden zwei Sammelkotproben des SPF-Taubenbestandes im Anschluss an eine Sputofluorbehandlung nach Ziehl-Neelsen gefärbt und ein Freisein von säurefesten Stäbchen durch eine ca. zehnmütige Begutachtung bei 1000facher Vergrößerung im Mikroskop bestätigt.

### 3.1.3 Patientenproben

Für die Etablierung der PCR wurden zudem Organproben, Kotproben und Mykobakterienstämme, die von Vogelpatienten gewonnen worden waren, verwendet. Dabei wurden 27 Organproben (10x Leber, 11x Milz, 6x Darm) sowie 18 Kotproben von insgesamt 29 Vögeln einbezogen. Die Organproben stammten von Vögeln, bei denen an der Klinik für Vögel eine Sektion durchgeführt worden war. Die Kotproben wurden entweder ebenfalls von Klinikpatienten gesammelt oder waren im Rahmen der klinikeigenen Routinediagnostik zur Untersuchung auf aviäre Mykobakteriose eingeschickt worden. Insgesamt 12 Mykobakterienstämme, die aus Organen mit Nachweis von säurefesten Stäbchen angezüchtet und bis zur Verwendung bei -80°C in speziellen Mikrobankröhrchen (Firma Mast Diagnostica Laboratoriums-Präparate GmbH, Reinfeld) gelagert worden waren, wurden ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen. Diese Stämme waren mittels AccuProbe-System (Hain Lifescience, Nehren) am Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit Oberschleißheim als *M. avium* differenziert worden, jedoch war keine Bestimmung der Subspezies erfolgt. Die Vogelarten, denen die Patienten zugeordnet waren, sind in Tabelle 13 und Tabelle 14 aufgeführt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Mykobakterienanzucht

Die Anzucht der Referenzstämme mit Ausnahme von *M. avium ssp. paratuberculosis* und *M. genavense* erfolgte an der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische. Gefriergetrocknete Bakterienpellets wurden dazu zunächst in etwa 5 ml steriler physiologischer 0,9-prozentiger Kochsalzlösung suspendiert und die Suspension auf Schrägagarröhrchen mit Löwenstein-Jensen-Agar und Middlebrook-Agar verimpft. Dabei wurde die Suspension mit Hilfe einer Pipette über die ganze Oberfläche des Agars gleichmäßig verteilt. Nach maximal 15 min Antrocknungszeit wurden die beimpften Agarröhrchen bei 37+/-1°C unter aeroben Bedingungen bis zum Koloniewachstum (Sichtbarwerden von Bakterienrasen oder einzelnen weißen bis leicht gelblichen Kolonien) bebrütet. Die Anzucht von *M. genavense* in flüssigen MGIT-Agar und *M. avium ssp. paratuberculosis* auf Herrold's Egg Yolk Agar mit

Mycobactin J erfolgte am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim ebenfalls bei 37°C unter aeroben Bedingungen.

### 3.2.2 Spicken von Kotproben

Zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität der entwickelten PCR und für einen Vergleich mit dem Nachweis mittels Ziehl-Neelsen-Färbung wurden Kotproben von SPF-Tauben mit Mykobakterien versetzt. Dazu wurde dem Kot zunächst physiologische Kochsalzlösung zugegeben, bis eine knetbare Konsistenz erreicht war. Dies diente der besseren Mischfähigkeit. Anschließend wurde der gesamte Kot in einer Plastiktüte zum Homogenisieren durchgeknetet und mittels Feinwaage in Portionen à 15 g in Plastikbechern mit Schraubdeckel abgewogen. Die anschließende Lagerung der verschlossenen Gefäße erfolgte im Kühlschrank bis zur weiteren Bearbeitung.

Zum Spicken der Kotproben wurde eine Suspension von Mykobakterien des Stamms M.a.a. DSMZ 44156 verwendet. Dazu wurden Einzelkulturen in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, bis eine deutliche Trübung erreicht wurde. Die Bakterienkonzentration wurde bestimmt, indem im Doppelansatz 1 µl dieser Suspension auf einen Objektträger aufgebracht, mittels Pipettenspitze ausgestrichen und nach dem Trocknen nach GRAM gefärbt wurde. Anschließend wurden die Mykobakterien lichtmikroskopisch bei 1000facher Vergrößerung mit Ölimmersion ausgezählt. Von dieser Stammsuspension mit einer Konzentration von  $7,9 \times 10^6$  Mykobakterien pro Milliliter wurde eine Verdünnungsreihe 1:10 bis 1:100.000 hergestellt. Dies entspricht einer Mykobakterienzahl von etwa  $10^6$  bis  $10^2$  pro ml Bakteriensuspension. Jeweils 4 Kotproben à 15 g wurden mit 1,9 ml Bakteriensuspension der oben genannten Verdünnungsstufen oder der entsprechenden Menge physiologischer Kochsalzlösung versetzt und mittels Holzspatel gut durchmischt. Je zwei Kotproben wurden mit der unverdünnten Stammsuspension, also mit  $10^7$  Bakterien pro ml, gespickt oder blieben völlig ohne weitere Behandlung. Die Kotproben enthielten somit Mykobakterien in einer Zahl von etwa  $1,5 \times 10^7$  bis 0 in 15 g Kot, demnach  $10^6$  bis 0 Bakterien pro Gramm Kot. Die so vorbereiteten Proben wurden geblindet, ihnen also per Zufallsprinzip Codenummern

zugeordnet. Die Zuordnung der Codes zu den entsprechenden Proben und Verdünnungsstufen war den Personen, die die PCR und die Ziehl-Neelsen-Färbungen durchführten, nicht bekannt.

### **3.2.3 Mikroskopische Untersuchung auf säurefeste Stäbchen**

Alle Patientenproben (Organe und Kotproben) und alle gespickten Kotproben wurden in einem ersten Schritt mittels Ziehl-Neelsen-Färbung auf das Vorliegen von säurefesten Stäbchen untersucht. Von Organproben wurde dazu jeweils ein kleines Stück von ca. 5 mm Kantenlänge entnommen und zwischen zwei Objektträgern gequetscht. Kotproben wurden zuerst mit Sputofluol behandelt. Dazu wurde in Anlehnung an KOPPERS (1989) eine ca. hasel- bis walnussgroße Menge Kot mit 10 ml einer 15-prozentigen Sputofluollösung versetzt und gut gevortext. Nach einer Einwirkzeit von 20 Minuten wurde bei 10.000 RZB für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Probenahme erfolgte an der Oberfläche des Bodensatzes mittels Einmalösen. Das so entnommene Material wurde nun, analog zu den Organproben, zwischen zwei Objektträgern gequetscht. Nach dem Trocknen der Objektträger wurde eine Färbung nach Ziehl-Neelsen nach Standardprotokollen, wie im Anhang 9.4.2 dargestellt, durchgeführt. Alle Objektträger wurden lichtmikroskopisch bei 1000facher Vergrößerung mittels Ölimmersion ca. 15 min lang auf das Vorhandensein säurefester Stäbchen untersucht.

### **3.2.4 DNA-Extraktion**

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Firma Qiagen, Hilden).

Für die DNA-Extraktion aus Mykobakterienkulturen wurden so viele Kolonien vom Nähragar abgenommen bis makroskopisch erkennbar war, dass Bakterienmaterial an der Öse haftete. Die Bakterien wurden dann mit Hilfe der Öse in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 180µl ATL-Puffer suspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K erfolgte die Lyse und Freisetzung der DNA bei 56°C für etwa 30 Minuten. Die weitere Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben. Die DNA wurde

schließlich in 200 µl Puffer AE eluiert und entweder sofort in die PCR eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Bei Organen wurde ein Quader von ca. 1 mm Kantenlänge in den ATL-Puffer gegeben. Die Lyse mit Proteinase K erfolgte hierbei über Nacht. Nach der Lyse wurden vor der weiteren Extraktion 4 µl einer *Taylorella*-DNA-Lösung (siehe Kapitel 3.2.5) zugesetzt.

Zur DNA-Extraktion aus Kotproben wurden maximal 10 mg Probenmaterial eingesetzt. Die weitere Bearbeitung der Patientenkotproben und der mit M.a.a. gespickten Taubenkotproben erfolgte analog zu der Bearbeitung der Organproben.

### 3.2.5 Entwicklung und Durchführung der Realtime-PCR

#### Auswahl des Mykobakterien-Zielgens

Die zu entwickelnde PCR sollte die vogelpathogenen Mykobakterien *M. avium* ssp. *avium* und *M. avium* ssp. *silvaticum* erkennen, aber keine Reaktivität mit anderen Arten und Unterarten der Gattung *Mycobacterium* zeigen. Zur Identifizierung geeigneter Targets wurden daher Analysen der Sequenzen von hsp65 und der 16SrRNA sowie von Insertionselementen von Mykobakterien durchgeführt. In die Sequenzvergleiche einbezogen wurden dabei insgesamt 154 Sequenzen des hsp65 von M.a.a., M.a.s. und der Taxa *M. avium*, MAC, *M. avium* ssp. *hominissuis*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, *M. chimaera*, *M. fortuitum*, *M. genavense*, *M. intracellulare*, *M. malmoense* und *M. simiae*, die in der NCBI Sequenzdatenbank GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zur Verfügung stehen. Bei der Analyse der 16S rRNA-Gene wurden insgesamt 204 Sequenzen ebenfalls von M.a.a., M.a.s. und *M. avium*, MAC, *M. avium* ssp. *hominissuis*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, *M. chimaera*, *M. fortuitum*, *M. genavense*, *M. intracellulare*, *M. malmoense* und *M. simiae* untersucht. Da die Subspezies *M. avium* ssp. *avium* und *M. avium* ssp. *silvaticum* durch das Vorhandensein von Insertionselementen IS901 bzw. IS902 charakterisiert sind, wurden diese 19 Sequenzen als Ansatzpunkt zur Entwicklung der eigenen Realtime-PCR ebenfalls einbezogen. Zuerst wurden Sequenzen des hsp65 und der 16SrRNA, wie oben erwähnt, sowie alle verfügbaren Sequenzen des IS901 und IS902 von Mykobakterien aus der GenBank herunter geladen.

Sequenzvergleiche, nach Genen getrennt, wurden unter Verwendung des im Softwarepaket DNAMAN (Lynnon Corporation, Pointe-Claire, Quebec, Canada) enthaltenen Programms „Multiple Sequence Alignment“ unter Verwendung von Clustal W (FENG & DOOLITTLE 1987, THOMPSON et al. 1994) durchgeführt. Basierend auf diesen Vergleichen der Genabschnitte (Alignments) wurden für jedes Gen und dabei für die einzelnen Mykobakterienarten oder -unterarten Konsensussequenzen erstellt, um Sequenzbereiche zu identifizieren, die für M.a.a. und M.a.s. spezifisch sind und daher potentielle Zielregionen für PCR-Primer und -Sonden darstellen.

### **Primer- und Sondenkonstruktion für M.a.a. und M.a.s.**

Basierend auf den Ergebnissen der Sequenzanalysen wurden unter Zuhilfenahme der Software Beacon Designer Version 7.5 (Premier Biosoft International, Palo Alto, Californien, USA) Primer und Realtime-PCR-Sonden, die auf die Insertionselement IS901 gerichtet sind, konstruiert. Als Sondentyp wurde dabei eine Taqman-Sonde, auch als Hydrolyse-Sonde bezeichnet, gewählt. Die Sonde, als MAA/S-P bezeichnet, wurde am 5'-Ende mit dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluoreszein (6-FAM) und am 3'-Ende mit dem Quencher TAMRA markiert. Nach Hybridisierung der Sonde mit dem Zielstrang wird der Quencher durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgespalten und die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes FAM sichtbar. Sequenzen der für die Amplifikation der DNA von M.a.a. und M.a.s. verwendeten Primer und der Sonde sind in Tabelle 5 dargestellt. Mittels BLAST-Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) wurde die Spezifität der Primer überprüft.

### **Etablierung einer internen Kontrolle**

Um das Vorkommen möglicher PCR-Inhibitoren zu erkennen, wurde eine interne Kontrolle in Form einer Realtime-PCR einbezogen. Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Nachweisverfahren wurde dabei als so genannte Duplex-PCR konzipiert, bei dem sowohl die Mykobakterien-PCR als auch die Kontroll-PCR gleichzeitig in einem Gefäß durchgeführt werden. Als interne Kontrolle wurde dabei die Realtime-PCR von *Taylorella equigenitalis* nach WAKELEY et al. (2006), die auf das 16SrRNA-Gen dieser für Pferde pathogenen Bakterien gerichtet ist, unter modifizierten Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Sequenzen der Primer und

der Sonde, die mit dem Reporterfarbstoff 5-Hexachloro-Fluorescein (5-HEX) markiert wurde, sind in Tabelle 6 dargestellt.

Um das Risiko einer Inhibition der MAA/S-PCR zu minimieren, wurde nur so wenig DNA von *Taylorella* eingesetzt, dass ein ct-Wert der *Taylorella*-PCR von etwa 30 erreicht wurde.

Bei dem Stamm von *Taylorella equigenitalis* handelt es sich um den Referenzstamm DSM 10668 der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig. Nach Resuspension der von der DSMZ erhaltenen gefriergetrockneten Pellets der DSMZ nach mitgelieferter Anweisung erfolgte die Anzucht auf Schafkochblutagarplatten, die vom Institut für Bakteriologie und Mykologie der LMU München zur Verfügung gestellt wurden, unter mikroaeroben Bedingungen für 72 Stunden bei 37±1°C. Danach konnten die Bakterienkulturen in steriler Natriumchloridlösung suspendiert werden. 40 µl dieser Suspension wurden zur DNA-Extraktion eingesetzt, die analog zur Mykobakterien-DNA-Extraktion aus Kulturen durchgeführt wurde. Die erhaltene DNA wurde 1:1000 verdünnt, um einen optimalen ct-Wert von etwa 30 zu erhalten. 4 µl der 1:1000 verdünnten DNA wurden zur Extraktion der Proben, die auf Mykobakterien untersucht werden sollten, nach dem Lyseschritt hinzu pipettiert.

**Tabelle 5: Sequenzen der zur Amplifikation und Detektion der IS901-DNA von M.a.a. und M.a.s. konstruierten Primer (Forward-Primer MAA/S-for und Reverse-Primer MAA/S-rev) und Sonde (MAA/S-P)**

MAA/S-for	5'-TCA CCC TTC CCG GCG AAG-3'
MAA/S-rev	5'-TGG GATG CTC ACG AAA TTT GTT G-3'
MAA/S-P	5'-FAM- CTC ATC AAG CAA CTC GCA GCA CGG C-Tamra-3'

**Tabelle 6: Sequenzen der zur Amplifikation und Detektion der 16SrRNA von *Taylorella equigenitalis* eingesetzten Primer (Forward-Primer Tay-for und Reverse-Primer Tay-rev) und Sonde (Tay-S) nach WAKELEY et al. (2006)**

Tay-for	5'-CCG CGT GTG CGA TTG A -3'
Tay-rev	5'-TTT GCC GGT GCT TAT TCT TCA -3'
Tay-S	5'-HEX- AAA GGT TTG TGT TAA TAC CAT GGA CTG CTG ACG G -Tamra-3'

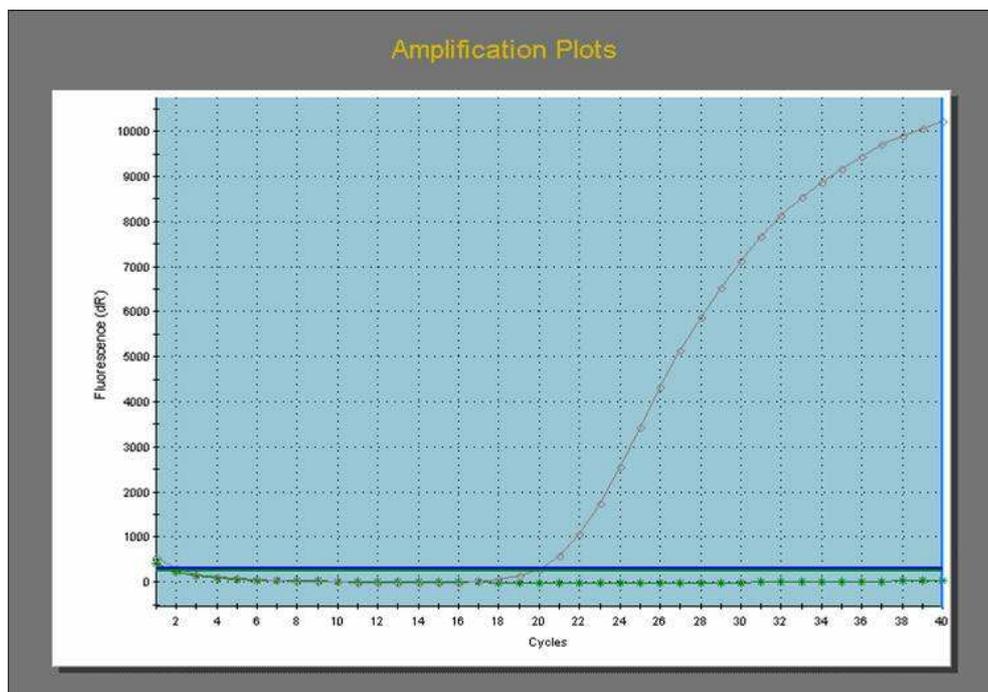
### Durchführung und Auswertung der Realtime-PCR

Alle Reaktionen wurden mit dem Realtime-PCR-Gerät Mx3000P der Firma Agilent Technologies, Santa Clara, USA, und der zugehörigen Software MxPro durchgeführt und ausgewertet. Dabei wurde eine Reaktion als positiv bewertet, wenn ein ct-Wert messbar war. ct ist die Abkürzung für den englischen Begriff „threshold cycle“, im deutschen als Fluoreszenz-Schwellenwert benannt. Dieser Wert gibt an, bei welchem PCR-Zyklus die Fluoreszenz der Reporterfarbstoffe die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet. Zur Kontrolle der PCR wurden bei jedem PCR-Ansatz mindestens eine Positivkontrolle sowie eine Extraktionskontrolle mitgeführt.

### PCR-Optimierung

Bei der Optimierung und Durchführung der Realtime-PCR wurde bezüglich des Thermalprofils nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 15 Minuten, die für die Aktivierung der verwendeten Hotstart-Taq-Polymerase (HotStar-Taq-Polymerase, Qiagen) notwendig ist, stets ein Standard-Temperatur-Protokoll angewendet, bei dem sich an die initiale Denaturierung 40 Zyklen von Denaturierung für 15 Sekunden bei 95°C und Annealing / Elongation für 60 Sekunden bei 60°C anschlossen. Denaturierung bezeichnet das Trennen der DNA-Stränge voneinander. Bei dem Annealing-Schritt lagern sich die Primer an die passenden Stellen der DNA-Stränge an, während Elongation die Verlängerung der Primer komplementär zum Matrizenstrang bezeichnet. Bei der Taqman-Realtime-PCR werden Annealing und Elongation in der Regel bei einer Temperatur von 60 °C durchgeführt.

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen der Realtime-PCR wurde DNA von M.a.a. (*M. avium ssp. avium* Av 56 vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität, Gießen, zur Verfügung gestellt) verwendet. Dabei wurden in ersten Tests zunächst PCR-Läufe für Mykobakterien und die interne Kontrolle einzeln, also als Singleplex-Realtime-PCR durchgeführt (Abbildung 3). Für die MAA/S-PCR wurden in mehreren Ansätzen die Konzentrationen von Magnesiumionen und Sonde variiert. Dabei wurde eine Menge von 0  $\mu$ l, 1  $\mu$ l und 2  $\mu$ l einer 25 mM-Lösung Magnesiumchlorid in einem Ansatzvolumen von 25  $\mu$ l verwendet. Die Sondenmenge betrug 0,05  $\mu$ l, 0,1  $\mu$ l und 0,2  $\mu$ l einer 10  $\mu$ M Lösung. Hierbei wurden zunächst konstant 0,2  $\mu$ l 50  $\mu$ M Primer und 0,1  $\mu$ l dNTP's (25  $\mu$ M each) eingesetzt.



**Abbildung 3: Exemplarische Darstellung des Ergebnisses einer MAA/S-Singleplex-Realtime-PCR. Schwellenwert für den Fluoreszenzfarbstoff FAM (blaue Linie), Extraktionskontrolle (grüne Kurve) und DNA von M.a.a. Av 56 (graue Kurve). Die graue Kurve zeigt einen typischen sigmoiden Verlauf mit linearen Phasen an Beginn und Ende der PCR sowie die Phase des exponentiellen Anstiegs in der Mitte. Der ct-Wert liegt etwa bei 20. Diese PCR lief ohne interne Kontrolle.**

Nach Etablierung der beiden einzelnen PCR-Protokolle wurden diese im selben Ansatz als so genannte Duplex-Realtime-PCR durchgeführt. Bei der Optimierung der Duplex-PCR wurde sowohl auf das Erreichen optimaler ct-Werte der MAA/S-PCR, als auch auf die Vermeidung der Hemmung dieser PCR durch die Kontroll-PCR geachtet. Im ersten Schritt wurde zu der Single-PCR für M.a.a. und M.a.s. Primer und Sonde für die interne Kontrolle dazu pipettiert. Die erhaltenen Werte dienten als Anhaltspunkt für eine weitere Optimierung. Im nächsten Schritt erfolgte ähnlich zu der Optimierung der Single-PCR eine Variation von Magnesiumchlorid- und dNTP-Konzentration (Tabelle 7). In der folgenden Darstellung des Vorgehens bei der Optimierung werden aus Gründen der Übersichtlichkeit stets nur die Volumina der einzelnen Komponenten genannt. Die Konzentrationen der verwendeten Substanzen pro zugegebenen  $\mu\text{l}$  waren dabei immer konstant und sind in Tabelle 10 angegeben. Das Volumen der Reaktionsansätze lag stets bei 25  $\mu\text{l}$ .

Bei der Optimierung der Duplex-PCR wurden zunächst die Magnesiumionen- und dNTP-Konzentration in Kombination optimiert. Die eingesetzte Magnesiumchloridmenge variierte dabei von 1,5  $\mu\text{l}$  über 2  $\mu\text{l}$  bis zu 3  $\mu\text{l}$ . Die Menge von dNTP's betrug 0,05  $\mu\text{l}$ , 0,1  $\mu\text{l}$  und 0,2  $\mu\text{l}$ . Danach wurden noch einmal bei einer dNTP-Zugabe von 0,1  $\mu\text{l}$  eine Menge von 3  $\mu\text{l}$ , 4  $\mu\text{l}$  und 5  $\mu\text{l}$  Magnesiumchlorid ausgetestet. Im dritten Schritt wurden bei Einsatz von 4  $\mu\text{l}$  Magnesiumchlorid und 0,1  $\mu\text{l}$  dNTP die Menge der Primer MAA/S-for und MAA/S-rev sowie der Sonde MAA/S-P variiert. Die zupipettierten Volumina betragen jeweils 0,1  $\mu\text{l}$ , 0,2  $\mu\text{l}$  und 0,3  $\mu\text{l}$  für die Primer und 0,05  $\mu\text{l}$ , 0,1  $\mu\text{l}$  und 0,2  $\mu\text{l}$  für die Sonde.

**Tabelle 7: Übersicht über die einzelnen Schritte der Optimierung der Duplex-PCR**

Schritt	Optimierung von	konstante Mengen
1. Schritt	MgCl <sub>2</sub> , dNTP	MAA/S-for, MAA/S-rev, MAA/S-P, Komponenten der Kontroll-PCR
2. Schritt	MgCl <sub>2</sub>	dNTP, MAA/S-for, MAA/S-rev, MAA/S-P, Komponenten der Kontroll-PCR
3. Schritt	MAA/S-for, MAA/S-rev, MAA/S-P	dNTP, MgCl <sub>2</sub> , Komponenten der Kontroll-PCR

### **Ermittlung der Nachweisgrenze**

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze der Duplex-PCR wurde anhand der gespickten Kotproben, bei denen die Anzahl der Mykobakterien pro Gramm Kot bekannt war, die Verdünnungsstufe ermittelt, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde. Anhand folgender Formel wurde errechnet, welcher Zahl Mykobakterien pro PCR-Ansatz dies entspricht.

$$\text{Zahl Mykobakterien im PCR-Ansatz} = \frac{\begin{array}{l} \text{Anzahl der Mykobakterien pro g Kot} \times \\ \text{x Kotmenge in Extraktion (g)} \\ \text{x in PCR eingesetztes DNA-Volumen (\mu l)} \end{array}}{\text{DNA-Elutionsvolumen (\mu l)}}$$

### **Ermittlung der Sensitivität und Spezifität der Duplex-Realtime-PCR**

Zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität wurde die Duplex-Realtime-PCR mit den in Tabelle 4 genannten Referenzstämmen von Mykobakterien durchgeführt. Außerdem wurden gespickte und ungespickte Kotproben von SPF-Tauben, die Mykobakterien-frei waren, ebenfalls mit der Duplex-Realtime-PCR getestet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Auswahl des Zielgens

Bei der Analyse der hsp65- und 16S-rRNA-Gensequenz-Alignments ergaben sich einerseits hypervariable Regionen, die auch innerhalb der Arten und Unterarten stark variierten, und andererseits hochkonservierte Bereiche, die eine Identifizierung von ausreichend langen Sequenzabschnitten mit einem für die Primer- und Sondenkonstruktion geeigneten Polymorphismusgrad erschwerte. Die Analyse der für M.a.a. charakteristischen IS901 und der für M.a.s. als typisch angesehenen IS902 dokumentierte allerdings, dass die bisher in der GenBank deponierten Insertionselementen von M.a.a. und M.a.s. innerhalb der Unterarten, aber auch zwischen M.a.a. und M.a.s. identische Basenabfolgen zeigten, die sich zudem von Nukleotidsequenzen anderer Bakterien deutlich abgrenzen. Daher wurden diese Insertionselemente als Zielgen für den Nachweis von M.a.a. und M.a.s. ausgewählt und darauf gerichtete Primer und Sonden konstruiert. Blast-Analysen der Primer- und SONDENSEQUENZEN ergaben zudem keine Identitäten mit Nukleotidsequenzen anderer Mykobakterien oder weiter entfernt verwandter Organismen, insbesondere am für die Spezifität kritischen 3'-Ende der Primer, die eine Amplifikation der DNA dieser anderen Erreger erwarten lassen würde.

### 4.2 Interne Kontrolle

Bei einer Verdünnung der aus Bakterienkultur extrahierten *Taylorella*-DNA um 1:1000 wurden die angestrebten ct-Werte von etwa 30 erreicht. Die ct-Werte der MAA/S-PCR unterschieden sich bei der Überprüfung in Doppelansätzen nicht wesentlich, wenn bei gleicher Mykobakterien-DNA-Ausgangskonzentration diese PCR als Singleplex-PCR oder als Duplex-PCR, also inklusive Primer und Sonde der PCR der internen Kontrolle, durchgeführt wurde, und letztere unabhängig davon, ob Kontroll-DNA zugesetzt wurde oder nicht (Tabelle 8). Bei Einsatz dieser *Taylorella*-DNA-Ausgangskonzentration wurde demnach eine Hemmung der Mykobakterien-PCR durch die interne Kontrolle nicht beobachtet.

**Tabelle 8: Vergleich der Ergebnisse der MAA/S-Realtime-PCR bei Einsatz identischer Menge an DNA von M.a.a Av 56 in Form einer Singleplex- oder Duplex-PCR (Angabe der ct-Werte der Doppelansätze)**

	ct-Wert	
MAA/S-Singleplex-PCR	29,12	29,31
Duplex-PCR ohne Zugabe von DNA der internen Kontrolle	28,14	27,67
Duplex-PCR mit Zugabe von DNA der internen Kontrolle	27,87	25,32

Wie in Tabelle 12 ersichtlich, variierten die ct-Werte der PCR der internen Kontrolle auch bei unterschiedlicher Ausgangskonzentration von Mykobakterien-DNA nur gering und lagen bei den gespickten Kotproben in einem Bereich von 29,32 bis 30,56. Nur bei einem sehr niedrigen ct-Wert der Mykobakterien-PCR unter 26,94 (siehe Tabelle 13, Patientenummer 12814), also bei einer sehr hohen Ausgangskonzentration der DNA der Mykobakterien, war eine Hemmung der PCR der internen Kontrolle, verbunden mit einer Erhöhung des ct-Wertes oder gar keine Amplifikation erkennbar.

### 4.3 PCR-Optimierung

Bei ersten Tests und Optimierungen der Realtime-PCR, bei denen die MAA/S-PCR zunächst als Singleplex-PCR durchgeführt wurde, ergaben sich Optima bei etwa 3 mM MgCl<sub>2</sub> (dies entspricht der Zugabe von 1,5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>) und 0,1 µl 10 mM Sonde (Tabelle 9). Verglichen wurden hierbei Magnesiumchloridkonzentrationen von 1,5 bis 3,5 mM in Kombination mit der Zugabe von 0,05 bis 0,2 µl 10 µM Sonde in Ansatzvolumina von 25 µl.

**Tabelle 9: Ergebnis der Optimierung der Single-PCR: Angabe der erreichten ct-Werte (Gesamtvolumen des Ansatzes 25 µl)**

	Menge an Magnesiumchlorid (25 mM)			
		0µl	1µl	2µl
Menge an Sonde (10 µM)	0,05µl	26,73	19,82	k.W.
	0,1µl	31,20	19,46	19,27
	0,2µl	25,99	19,63	18,97

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Optimierung der Duplex-PCR mit DNA von M.a.a. und der Kontroll-DNA hinsichtlich der Magnesiumionen- und dNTP-Konzentration sowie der Konzentrationen der Primer MAA/S-for und MAA/S-rev sowie der Sonde MAA/S-P durchgeführt. Dabei zeigten sich Reaktions-Optima bei der Zugabe von 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (dies entspricht unter Einbeziehung des Magnesiumgehaltes des 10x-Puffers einer Endkonzentration von 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>), von 0,1 µl dNTP (25 µM each), jeweils 0,3 µl der Primer (jeweils 50 µM) und 0,1 µl Sonde (10 µM) in einem Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes von 25 µl. Die Primer- und Sondenkonzentrationen der PCR für die interne Kontrolle wurden stets wie bei WAKELEY et al. (2006) verwendet. Ein Pipettierschema zur Durchführung der Duplex-PCR ist in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10: Pipettierschema der PCR zum Nachweis von M.a.a. und M.a.s. einschließlich der internen Kontrolle**

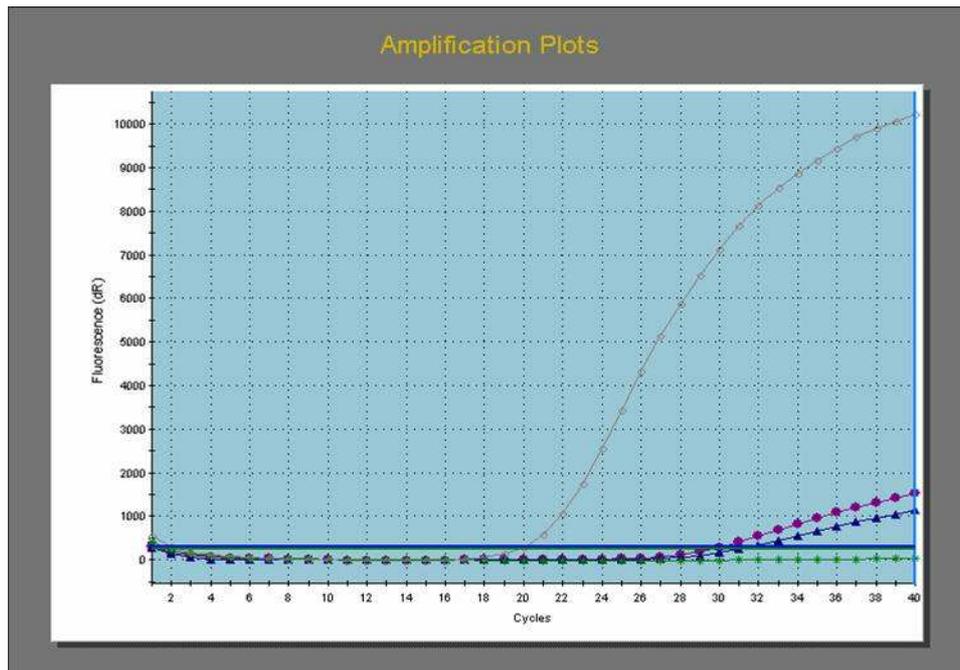
<b>Komponente</b>	<b>Menge / Ansatz in <math>\mu</math>l</b>
10x Puffer (enthält 15 mM $MgCl_2$ )	2,5
Primer MAA/S-for (50 $\mu$ M)	0,3
Primer MAA/S-rev (50 $\mu$ M)	0,3
Sonde MAA/S-P (10 $\mu$ M)	0,1
Primer Tay-for (50 $\mu$ M)	0,1
Primer Tay-rev (50 $\mu$ M)	0,1
Sonde Tay-S (10 $\mu$ M)	0,25
dNTP-Mix (25 $\mu$ M each)	0,1
$MgCl_2$ (25 mM)	4
DEPC-Wasser	14,625
HotStar-Taq Polymerase (5 u/ $\mu$ l)	0,125
extrahierte DNA	2,5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25</b>

#### 4.4 Ergebnisse der Untersuchung von Referenzstämmen

Die Ergebnisse der PCR nach Testung der vorhandenen Referenzstämmen sind in Tabelle 11 aufgeführt und beispielhaft in Abbildung 4 dargestellt. DNA sämtlicher Stämme von *M. avium ssp. avium* und des *M. avium ssp. silvaticum*-Stammes wurde mit der Duplex-Realtime-PCR nachgewiesen. Die Untersuchung aller anderen getesteten Mykobakterien-Stämme führte zu einem negativen PCR-Ergebnis.

**Tabelle 11: Ergebnisse der Duplex-Realtime-PCR-Untersuchung der Mykobakterien-Referenzstämmen**

Art oder Unterart	Stamm-Bezeichnung	PCR-Ergebnis
<i>M. avium ssp. avium</i>	DSM 44156	positiv
<i>M. avium ssp. avium</i>	Av 56	positiv
<i>M. avium ssp. avium</i>	M.a.a. FLI	positiv
<i>M. avium ssp. silvaticum</i>	DSM 44157	positiv
<i>M. avium ssp. hominissuis</i>	M.a.h. 1	negativ
<i>M. avium ssp. hominissuis</i>	M.a.h. 2	negativ
<i>M. intracellulare</i>		negativ
<i>M. avium ssp. paratuberculosis</i>	M.a.p. 1	negativ
<i>M. avium ssp. paratuberculosis</i>	M.a.p. 2	negativ
<i>M. genavense</i>		negativ
<i>M. fortuitum</i>		negativ
<i>M. simiae</i>		negativ
<i>M. malmoense</i>		negativ



**Abbildung 4: Graphische Darstellung der Fluoreszenzmessung im Verlauf einer Duplex-Realtime-PCR. Kurven mit positiven Reaktionen für M.a.a. Av 56 (graue Kurve, FAM-Signal) und die interne Kontrolle (lila und blaue Kurve, HEX-Signale), eine weitere Probe ist negativ (grüne Kurve, FAM-Signal). Die blaue und die grüne waagerechte Linie entsprechen den Schwellenwerten der Fluoreszenz (Cut off) für FAM und HEX.**

#### 4.5 Ergebnisse der Untersuchung von gespickten Kotproben

Bei der Untersuchung der gespickten Kotproben im Doppelblindverfahren wurde DNA von M.a.a. in der Duplex-Realtime-PCR ab einer Konzentration von  $10^4$  Mykobakterien pro Gramm Kot nachgewiesen (Tabelle 12). Bei Einsatz von 10 mg Kot und einem Elutionsvolumen von 200  $\mu$ l bei der DNA-Extraktion entspricht dies, da 2,5  $\mu$ l DNA-Lösung in die PCR eingesetzt wurden, rein rechnerisch einer Nachweisgrenze von 1,25 Mykobakterien pro PCR-Ansatz.

Mittels Mikroskopie nach Ziehl-Neelsen-Färbung wurde lediglich ein von vier Ansätzen mit  $10^4$  Mykobakterien pro Gramm Kot als positiv erkannt. Erst bei  $10^5$  Mykobakterien pro Gramm Kot wurden alle Ansätze mit diesem Nachweisverfahren als positiv bewertet (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Ziehl-Neelsen-Färbung und PCR bei der Untersuchung gespickter Kotproben**

<b>Anzahl Mykobakterien pro Gramm Kot</b>	<b>Ziehl-Neelsen-Färbung</b>	<b>ct-Wert MAA/S-PCR</b>	<b>ct-Wert interne Kontrolle</b>
ohne Zusatz	negativ	k.W.	30,02
ohne Zusatz	negativ	k.W.	30,01
0	negativ	k.W.	30,09
0	negativ	k.W.	29,87
0	negativ	k.W.	30,00
0	negativ	k.W.	30,02
10 <sup>1</sup>	negativ	k.W.	29,79
10 <sup>1</sup>	negativ	k.W.	29,53
10 <sup>1</sup>	negativ	k.W.	30,40
10 <sup>1</sup>	negativ	k.W.	29,63
10 <sup>2</sup>	negativ	k.W.	29,77
10 <sup>2</sup>	negativ	k.W.	29,73
10 <sup>2</sup>	negativ	k.W.	29,91
10 <sup>2</sup>	negativ	k.W.	30,19
10 <sup>3</sup>	negativ	k.W.	29,88
10 <sup>3</sup>	negativ	k.W.	29,66
10 <sup>3</sup>	negativ	k.W.	30,06
10 <sup>3</sup>	negativ	k.W.	29,81
10 <sup>4</sup>	negativ	32,85	30,46
10 <sup>4</sup>	positiv (+/-)	34,25	29,74
10 <sup>4</sup>	negativ	37,00	30,56
10 <sup>4</sup>	negativ	33,37	29,78
10 <sup>5</sup>	positiv (+/-)	30,61	29,68
10 <sup>5</sup>	positiv (+/-)	30,07	29,82
10 <sup>5</sup>	positiv (+/-)	29,74	29,32
10 <sup>5</sup>	positiv (+/-)	31,17	30,44
10 <sup>6</sup>	positiv (++)	25,30	30,05
10 <sup>6</sup>	positiv (++)	25,19	30,49

++ : mittelgradig positiv (in jedem Gesichtsfeld vereinzelt Mykobakterien)

+/- : geringgradig positiv (vereinzelt Mykobakterien im Präparat)

k.W. : kein ct-Wert messbar

Alle in der Ziehl-Neelsen-Färbung als positiv beurteilten gespickten Kotproben wurden auch in der PCR als positiv erkannt. Bei Betrachtung der Spezifität ist festzustellen, dass keine Probe als falsch positiv beurteilt wurde.

#### **4.6 Ergebnisse der Untersuchungen von Patientenproben**

Die Ergebnisse der PCR-Untersuchung von Patientenproben sind in Tabelle 13 und Tabelle 14 dargestellt. Bei der Untersuchung von 6 Organproben und 14 Kotproben von Vogelpatienten, die lichtmikroskopisch nach Ziehl-Neelsen-Färbung als negativ beurteilt worden waren, bei denen also keine säurefesten Stäbchen (z.B. Mykobakterien) nachgewiesen wurden, wurde auch in der MAA/S-PCR ein negatives Ergebnis erzielt. Bei diesen Proben wurde auch ct-Werte für die interne Kontrolle ermittelt.

Die Kotprobe der Patientennr. 13075 war sowohl in der Ziehl-Neelsen-Färbung als auch in der Duplex-PCR positiv. Bei einer in der ZN-Färbung positiven Kotprobe (Patientennr 12345) konnten bei Einsatz von 2,5 µl DNA aus der Extraktion (unverdünnte DNA) keine ct-Werte in der MAA/S-PCR und für die interne Kontrolle festgestellt werden. Damit war eine Beurteilung dieser Probe nicht möglich. Nach Wiederholung der PCR mit im Verhältnis 1:5 verdünnter DNA ergaben sich ct-Werte sowohl für M.a.a. und M.a.s als auch für die interne Kontrolle, diese Probe wurde somit als PCR-positiv beurteilt. Zwei in der ZN-Färbung positiven Kotproben (Patientennr. 13830 und 14063) ergaben weder bei unverdünnter noch bei verdünnter DNA einen ct-Wert für M.a.a./M.a.s. und die interne Kontrolle. Diese Proben blieben somit nicht auswertbar.

Die PCR-Ergebnisse für die 10 Leberproben stimmten mit den Ergebnissen der Ziehl-Neelsen-Färbung überein. Alle Proben bis auf eine (Patientennr. 11859) waren mit unverdünnter DNA hinsichtlich des Vorhandenseins von M.a.a./M.a.s.-DNA auswertbar. Die DNA der Patientennr. 11859 wurde 1:5 verdünnt und die PCR wiederholt. Das negative Ergebnis der MAA/S-PCR wurde bei einem besseren ct-Wert für die interne Kontrolle bestätigt. Bei drei Leberproben mit M.a.a./M.a.s.-DNA-Nachweis konnte die Kontroll-DNA nicht detektiert werden.

Bei der Untersuchung von zehn Milzproben waren acht bei Einsatz von 2,5 µl unverdünnter DNA auswertbar und wurden im Vergleich mit der Ziehl-Neelsen-Färbung übereinstimmend beurteilt. Ein Ansatz (Patientennr. 11859) zeigte einen sehr hohen ct-Wert für die interne Kontrolle. Bei Wiederholung der PCR mit verdünnter DNA lag der ct-Wert für die interne Kontrolle bei 32,85, die Duplex-PCR war somit auswertbar. Die MAA/S-PCR lieferte dabei in Übereinstimmung mit der ZN-Färbung keinen ct-Wert. Drei weitere Proben, die in der MAA/S-PCR als positiv erkannt wurden, ergaben keinen ct-Wert für die interne Kontrolle, waren aber somit beurteilbar. Die in der ZN-Färbung positive Milzprobe der Patientennr. 583 zeigte bei unverdünnter DNA weder einen Wert für die MAA/S-PCR noch für die interne Kontrolle. Nach Verdünnung der DNA konnte jedoch für beides ein Wert erreicht und die Probe somit als positiv beurteilt werden.

Bei sechs Proben von Därmen wurden zwei in der ZN-Färbung als negativ beurteilt. Bei einer dieser zwei Proben wurde in der Duplex-PCR DNA von M.a.a. oder M.a.s. nicht nachgewiesen. Die andere in der ZN-Färbung negative Probe ergab einen ct-Wert für Mykobakterien nach 5facher Verdünnung der DNA. Das Tier, von dem diese Darmprobe entnommen worden war, wies in anderen Organen säurefeste Stäbchen auf. Eine Probe (Patientennr. 2743) mit Nachweis von säurefesten Stäbchen in der ZN-Färbung wies weder Werte für Mykobakterien noch für die interne Kontrolle auf, war also nicht auswertbar. Die Wiederholung mit verdünnter DNA ergab sowohl für die MAA/S-PCR als auch für die interne Kontrolle einen ct-Wert. Bei zwei weiteren Darmproben konnte kein ct-Wert in der Mykobakterien-PCR ermittelt werden, während die Ziehl-Neelsen-Färbung positiv beurteilt wurde. Der Nachweis der internen Kontrolle war allerdings erfolgreich.

Bei der Untersuchung von 12 aus Patienten angezüchteten Mykobakterienstämmen mittels Duplex-PCR wurde, wie in Tabelle 14 dargestellt ist, bei allen Isolaten M.a.a./M.a.s.-DNA nachgewiesen. Hier war in allen Fällen auch die PCR für die interne Kontrolle positiv.

**Tabelle 13: PCR-Untersuchungsergebnisse der Patientenproben**

Nr.	Tierart	Probenmaterial	Ergebnis der Ziehl-Neelsen-Färbung	ct- Wert MAA/S-PCR	ct-Wert interne Kontrolle
11809	Graupapagei ( <i>Psittacus erithacus</i> )	Kot	negativ	k.W.	28,53
11886	Warzenente ( <i>Cairina moschata</i> )	Kot	negativ	k.W.	29,05
11926	Ziegensittich ( <i>Cyanoramphus novaezelandiae</i> )	Kot	negativ	k.W.	29,39
12023	Weißhaubenturako ( <i>Tauraco leucolophus</i> )	Kot	negativ	k.W.	30,37
12037	Bahamaente ( <i>Anas bahamensis</i> )	Kot	Darm negativ	k.W.	29,54
12069	Fasan / Pfau ( <i>Phasianus colchicus</i> / <i>Pavo sp.</i> )	Kot	negativ	k.W.	29,70
12120	Anden-Felsenhahn ( <i>Rupicola peruvianus</i> )	Kot	negativ	k.W.	30,66
12171	Pommerngans ( <i>Anser anser f. domestica</i> )	Kot	negativ	k.W.	32,64

**Tabelle 13: PCR-Untersuchungsergebnisse der Patientenproben (Fortsetzung)**

Nr.	Tierart	Probenmaterial	Ergebnis der Ziehl-Neelsen-Färbung	ct- Wert MAA/S-PCR	ct-Wert interne Kontrolle
12345	Brantente ( <i>Tadorna tadorna</i> ) (DNA unverd.)	Kot	Darm ++++	k.W.	k.W.
	Brantente ( <i>Tadorna tadorna</i> ) (DNA 1:5 verd.)	Kot	Darm ++++	32,80	33,14
12645	Graupapagei ( <i>Psittacus erithacus</i> )	Kot	negativ	k.W.	32,33
12902	Kronenadler ( <i>Stephanoaetus coronatus</i> )	Kot	negativ	k.W.	32,71
12912	Krontaube ( <i>Goura sp.</i> )	Kot	negativ	k.W.	29,89
12950	Waldrapp ( <i>Geronticus eremita</i> )	Kot	negativ	k.W.	29,48
2331	Graupapagei ( <i>Psittacus erithacus</i> )	Kot	negativ	k.W.	29,92
13104	Gänsegeier ( <i>Gyps fulvus fulvus</i> )	Kot	negativ	k.W.	30,58
13830	Dompfaff ( <i>Pyrrhula pyrrhula</i> )	Kot	negativ	k.W.	k.W.

**Tabelle 13: PCR-Untersuchungsergebnisse der Patientenproben (Fortsetzung)**

Nr.	Tierart	Probenmaterial	Ergebnis der Ziehl-Neelsen-Färbung	ct- Wert MAA/S-PCR	ct-Wert interne Kontrolle
14063	Lannerfalke ( <i>Falco biarmicus</i> )	Kot	negativ	k.W.	k.W.
13075	Stadtttaube ( <i>Columba livia f. domestica</i> )	Kot	Darm +/-	38,58	33,74
5219	Waldrapp ( <i>Geronticus eremita</i> )	Leber	++	27,22	32,64
11259	Mäusebussard ( <i>Buteo buteo</i> )	Leber	+++	33,84	k.W.
9456	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Leber	+++	26,42	30,65
1009	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Leber	++	27,39	34,79
12814	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Leber	+++	26,31	k.W.
583	Gelbwangen-amazone ( <i>Amazona autumnalis autumnalis</i> )	Leber	+++	37,03	28,92
13030	Zwergsäger ( <i>Mergus albellus</i> )	Leber	+/-	33,03	k.W.

**Tabelle 13: PCR-Untersuchungsergebnisse der Patientenproben (Fortsetzung)**

Nr.	Tierart	Probenmaterial	Ergebnis der Ziehl-Neelsen-Färbung	ct- Wert MAA/S-PCR	ct-Wert interne Kontrolle
13075	Stadttaube ( <i>Columba livia f. domestica</i> )	Leber	+/-	36,07	37,10
2331	Graupapagei ( <i>Psittacus erithacus</i> )	Leber	negativ	k.W.	31,87
11859	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ) (DNA unverd.)	Leber	negativ	k.W.	38,26
	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ) (DNA 1 :5 verd.)	Leber	negativ	k.W.	33,45
583	Gelbwangen-amazone ( <i>Amazona autumnalis autumnalis</i> ) (DNA unverd.)	Milz	+++	k.W.	k.W.
	Gelbwangen-amazone ( <i>Amazona autumnalis autumnalis</i> ) (DNA 1:5 verd.)	Milz	+++	31,52	38,00

**Tabelle 13: PCR-Untersuchungsergebnisse der Patientenproben (Fortsetzung)**

Nr.	Tierart	Probenmaterial	Ergebnis der Ziehl-Neelsen-Färbung	ct- Wert MAA/S-PCR	ct-Wert interne Kontrolle
1009	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Milz	+++	25,88	k.W.
13030	Zwergsäger ( <i>Mergus albellus</i> )	Milz	+/-	25,99	38,05
5475	Jungfernkranich ( <i>Anthropoides virgo</i> )	Milz	+/-	28,91	39,61
5219	Waldrapp ( <i>Geronticus eremita</i> )	Milz	++	31,19	35,94
11259	Mäusebussard ( <i>Buteo buteo</i> )	Milz	++	28,93	37,46
12814	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Milz	+++	27,46	k.W.
13075	Stadttaube ( <i>Columba livia f. domestica</i> )	Milz	+++	29,99	k.W.
11859	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ) (DNA unverd.)	Milz	negativ	k.W.	36,76

**Tabelle 13: PCR-Untersuchungsergebnisse der Patientenproben (Fortsetzung)**

Nr.	Tierart	Probenmaterial	Ergebnis der Ziehl-Neelsen-Färbung	ct- Wert MAA/S-PCR	ct-Wert interne Kontrolle
11859	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ) (DNA 1:5 verd.)	Milz	negativ	k.W.	32,85
2331	Graupapagei ( <i>Psittacus erithacus</i> )	Milz	negativ	k.W.	30,72
12987	Stieglitz ( <i>Carduelis carduelis</i> )	Milz	negativ	k.W.	30,97
9456	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Darm	+	25,43	38,31
5219	Waldrapp ( <i>Geronticus eremita</i> )	Darm	+/-	k.W.	30,85
5475	Jungfernkranich ( <i>Anthropoides virgo</i> )	Darm	+	k.W.	29,09
2743	Gelbstirnamazone ( <i>Amazona ochrocephala panamensis</i> ) (DNA unverd.)	Darm	+/-	k.W.	k.W.

**Tabelle 13: PCR-Untersuchungsergebnisse der Patientenproben (Fortsetzung)**

Nr.	Tierart	Probenmaterial	Ergebnis der Ziehl-Neelsen-Färbung	ct- Wert MAA/S-PCR	ct-Wert interne Kontrolle
2743	Gelbstirn-amazone ( <i>Amazona ochrocephala panamensis</i> ) (DNA 1:5 verd.)	Darm	+/-	33,62	33,72
12814	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ) (DNA unverd.)	Darm	negativ	k.W.	38,26
	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ) (DNA 1:5 verd.)	Darm	negativ	36,09	33,84
11859	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Darm	negativ	k.W.	34,69

**Tabelle 14: Ergebnisse der Duplex-PCR aus asservierten Mykobakterienstämmen**

Nr.	Tierart	Ursprungsorgan der Kultur	ct- Wert MAA/S-PCR	ct-Wert interne Kontrolle
1	Turmfalke ( <i>Amazona ochrocephala panamensis</i> )	Darm	27,57	30,00
2	Gelbwangen-amazone ( <i>Amazona autumnalis autumnalis</i> )	diverse Organe gepoolt	27,42	30,14
3	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Leber	25,42	30,82
4	Helmperlhuhn ( <i>Numida meleagris</i> )	Milz	24,16	38,15
5	Venezuelaamazone ( <i>Amazona amazonica</i> )	Milz	25,51	30,82
6	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Leber	26,05	30,28
7	Jagdfasan ( <i>Phasianus colchicus</i> )	Milz	27,18	30,99
8	Pfau ( <i>Pavo sp.</i> )	Leber	26,36	30,40
9	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	diverse Organe gepoolt	26,87	29,60
10	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	diverse Organe gepoolt	26,50	30,05

**Tabelle 14: Ergebnisse der Duplex-PCR aus asservierten Mykobakterienstämme (Fortsetzung)**

<b>Nr.</b>	<b>Tierart</b>	<b>Ursprungsorgan der Kultur</b>	<b>ct- Wert MAA/S-PCR</b>	<b>ct-Wert interne Kontrolle</b>
11	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Milz	27,96	29,55
12	Haushuhn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	diverse Organe gepoolt	27,46	30,89

## 5 Diskussion

Mykobakterien besitzen als Krankheitserreger und insbesondere in der Ziervogelhaltung wegen ihres zoonotischen Potentials besondere Relevanz (CAMPELL, 2004). Da klinische Symptome einer Mykobakteriose beim Vogel sehr unspezifisch sind, ist ein Erregernachweis für die Diagnostik von besonderer Bedeutung. Als Standard gelten derzeit im ersten Schritt die Ziehl-Neelsen-Färbung zum Nachweis säurefester Stäbchen und ein anschließender Anzuchtversuch der Mykobakterien aus klinischem Material, in der Regel aus Organproben. Weitergehende Differenzierungen beteiligter Arten oder Unterarten erfolgen dann mit Bakterien aus den Kulturen (BARTOS et al., 2006). Anzuchtverfahren sind bei Mykobakterien allerdings problematisch, da diese Bakterien durch extrem langsames Wachstum in der Kultur gekennzeichnet sind oder, wie *M. genavense*, bisher sehr schwer in vitro anzüchtbar sind (COYLE et al., 1992; BÖTTGER et al., 1993). Da die Anzucht bei atypischen Mykobakterien und damit die Zeitspanne bis zu einer Diagnosestellung mehrere Wochen dauert, hat das endgültige Untersuchungsergebnis für das weitere Vorgehen bei einem Ziervogelpatienten oftmals keine Relevanz mehr. Aufgrund der teils sehr hohen und speziellen Anforderungen von vogelpathogenen Mykobakterien an die Wachstumsbedingungen ist darüber hinaus die Anzucht nicht in jedem Fall erfolgreich, so dass ein negatives Anzuchtergebnis das Vorhandensein von Mykobakterien nicht mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließt (COYLE et al., 1992; BÖTTGER et al., 1993).

Im tierärztlichen Alltag ist jedoch eine schnelle Diagnosestellung besonders wichtig und daher gewinnen moderne molekularbiologische Nachweisverfahren immer größere Bedeutung. PCR-Tests zur Abgrenzung dieser vogelpathogener Arten von rein säugetierrelevanten Gruppen oder Umweltkeimen, die für den Einsatz in der Routinediagnostik geeignet wären und Kot als Ausgangsmaterial nutzen können, existieren bisher aber nicht (CLOUD et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Realtime-PCR zum Nachweis von *M. avium ssp. avium* und *M. avium ssp. silvaticum* entwickelt.

## 5.1 DNA-Extraktion

Für den Einsatz eines PCR-Assays in der Routinediagnostik ist ein zeit- und kostengünstiges, gut reproduzierbares, gleichzeitig aber effektives DNA-Extraktionsverfahren essentiell. Insbesondere Kotproben, die neben Darm, Leber und Milz primär als Probenmaterial bei der Mykobakteriendiagnostik zu erwarten sind (MÜLLER-BEISSER, 1994; DVORSKA et al., 2007), gelten in der Regel bezüglich der DNA-Extraktion als problematisch, da im Kot vermehrt Inhibitoren vorkommen, die die Taq-Polymerase hemmen und häufig bei der DNA-Extraktion nicht mit ausreichender Effektivität abgetrennt werden können. Zudem wurden im Kot in erhöhter Menge DNAsen nachgewiesen, die die DNA abbauen und somit die Zahl der für die Amplifikation im Ausgangsmaterial zur Verfügung stehenden Templates reduzieren (TELL et al., 2003a). Zudem stellen Mykobakterien wegen ihrer stabilen säurefesten Zellwand möglicherweise erhöhte Ansprüche an die Lyse. Der DNA-Extraktion kommt somit eine besondere Bedeutung zu. In der vorliegenden Arbeit wurde das DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) verwendet, welches auch schon von TELL et al. (2003a) verwendet wurde. Dabei zeigte sich bei einer einstündigen Inkubationsdauer eine verstärkte Hemmung der internen Kontrolle im Vergleich zu der Lyse über Nacht.

Für eine erfolgreiche und verlässliche DNA-Extraktion sind aber auch noch andere Faktoren von Bedeutung. Entscheidend ist unter anderem die eingesetzte Probenmenge. So ist bei einem zu großen Probenvolumen, bei der es zu einer Überladung der bei der Extraktion verwendeten Silikagel-Säule und zu einer unvollständigen Abtrennung von PCR-Inhibitoren kommen kann, eine deutlich verringerte Leistungsfähigkeit der PCR zu sehen. Da die verwendbare Probenmenge also limitiert ist, ist die Entnahme des klinischen Materials von großer Bedeutung. Schon bei der pathologischen Untersuchung müssen gegebenenfalls Veränderungen erkannt, gezielt entnommen und weiter analysiert werden. Dies hat besondere Bedeutung bei lokalisierten Veränderungen, wie sie bei der Mykobakteriose typisch sind (THOREL et al., 1997; GONZÁLEZ et al., 2002). Kotproben sollten, bedingt durch eine intermittierende Ausscheidung der Mykobakterien, auf jeden Fall über mehrere Tage gesammelt und vor der Probenentnahme zur Extraktion gut

homogenisiert werden. Das Mischen kann durch Hinzufügen von etwas Kochsalzlösung besonders bei trockenem Kot vereinfacht erfolgen.

## 5.2 Einsatz einer internen Kontrolle

Da bei der Untersuchung von Kotproben und anderen klinischen Materialien von Vögeln das Vorkommen von PCR-Inhibitoren zu erwarten war, wurde entschieden, für den Mykobakterien-Nachweis eine interne Kontrolle zu etablieren, mit der der Erfolg der DNA-Extraktion und das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren überprüft werden kann. Der PCR-Nachweis von *Taylorella equigenitalis* als interne Kontrolle wurde dabei zur Untersuchung von Probenmaterial von Vogelpatienten als gut geeignet angesehen, da diese Bakterienart als Erreger der „Kontagiösen equinen Metritis (CEM)“ nur im Genitaltrakt von Pferden vorkommt und eine Isolation aus der Umwelt bisher nicht berichtet wurde. Eine Bedeutung von *Taylorella equigenitalis* als Darmpassant bei Vögeln mit der Folge einer Kontamination des Vogelkotes mit diesen Erregern ist als minimal anzusehen. Die in vitro-Anzucht ist sehr einfach durchzuführen. Ein Zoonoserisiko besteht nicht. In der vorliegenden Arbeit wurde eine bereits publizierte Realtime-PCR für *Taylorella equigenitalis*-DNA von WAKELEY et al. (2006) verwendet und die dort beschriebene Taqman-Sonde mit dem Farbstoff HEX markiert, damit die Reaktion in Form einer Duplex-PCR von der MAA/S-PCR mit einer mit FAM markierten Sonde abgrenzbar ist.

Insbesondere bei der Untersuchung der Kotproben von Patienten zeigte sich die große Bedeutung der internen Kontrolle für die Beurteilung der PCR-Ergebnisse. So waren, wie in Tabelle 13 dargestellt, bei drei von 18 einbezogenen Kotproben die zunächst negativen oder sehr schwach positiven Ergebnisse der MAA/S-PCR nicht beurteilbar, da die PCR der internen Kontrolle wahrscheinlich durch das Vorhandensein von Inhibitoren stark gehemmt wurde und ebenfalls negativ blieb. Bei einem dieser drei Patienten wurde anschließend durch fünffache Verdünnung der DNA-Lösung eine positive Reaktion der internen Kontrolle und der MAA/S-PCR erreicht, vermutlich dadurch, dass die Konzentration der Inhibitoren stark genug abgesenkt wurde, um die Taq-Polymerase-Aktivität nicht mehr zu hemmen. Bei zwei Proben reichte das allerdings nicht aus, hier wäre eine Wiederholung der DNA-Extraktion mit

weniger Ausgangsmaterial oder die Anwendung einer anderen Extraktionsmethode erforderlich.

Bemerkenswerterweise wurde bei der Analyse der mit M.a.a. versetzten Kotproben von SPF-Tauben keine Hemmung der internen Kontrolle beobachtet. Die ct-Werte lagen hier alle in einem sehr engen Bereich zwischen 29,32 und 30,56 (Tabelle 12), auch unabhängig davon, ob im selben Ansatz DNA von Mykobakterien nachgewiesen wurde oder nicht. Über die Ursache dieser im Unterschied zu Patienten-Kotproben fehlenden Inhibition kann nur spekuliert werden. Dass dies ein tierartspezifischer Effekt ist, wird als unwahrscheinlich angesehen, da bei den Patientenproben auch eine Kotprobe einer Taube einbezogen war und hier zwar nicht ein völliges Versagen, aber immerhin eine deutliche Erhöhung des ct-Wertes auf 33,74 beobachtet wurde, was auf eine Hemmung der Kontroll-PCR hindeutet. Es ist allgemein bekannt, dass Blut, Hämoglobin, Serum-Immunglobuline oder Lactoferrin potente Inhibitoren der Taq-Polymerase darstellen (KERMEKCHIEV et al. 2009), und es ist denkbar, dass die Konzentration solcher Komponenten im Kot kranker, zum Beispiel an Diarrhoe leidender Vögel erhöht ist, so dass diese Stoffe bei der DNA-Extraktion nicht vollständig entfernt werden.

Die Extraktion von DNA aus inneren Organen erwies sich weniger problematisch als die aus Kotproben. So zeigten sich bei der Untersuchung von Proben aus Leber und Milz jeweils nur bei einem Ansatz Effekte, die auf eine Inhibition der PCR deuten. Dies wurde interessanterweise bei Organen, die vom selben Tier, einem Huhn, stammten, beobachtet (Tabelle 13). Lediglich Extraktionen aus dem Darm ergaben, wie erwartet, eine Problematik in einem Ausmaß ähnlich oder sogar größer als bei Kotproben. Hier waren Inhibitionen sogar in zwei von sechs Ansätzen bei Einsatz von unverdünnter DNA aus der Extraktion zu erkennen (Tabelle 13). Nach einer Verdünnung der extrahierten DNA im Verhältnis 1:5 mit AE-Puffer und erneuter PCR zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Werte für die interne Kontrolle. Eine dieser Proben wurde nach Verdünnung als positiv für M.a.a. und M.a.s. erkannt.

Da bei Multiplex-PCR-Ansätzen in Fällen, in denen das Zielgen einer PCR sehr stark amplifiziert wird, häufig andere PCRs gehemmt werden, wurde die Menge an Kontroll-DNA (*Taylorella*-DNA), die bei der Extraktion zugesetzt wurde, so gering wie

möglich gehalten. Sie wurde so gewählt, dass der ct-Wert dieser PCR etwa 30 betrug. Dadurch sollte einerseits eine Hemmung der MAA/S-PCR sicher vermieden werden. Die zugesetzte DNA-Menge sollte andererseits aber noch ausreichend weit von der Nachweisgrenze entfernt sein, um eine nachweisbare Amplifikation sicherzustellen, auch wenn bedingt durch das Ausgangsmaterial eine leichte Hemmung der Taq-Polymerase auftreten sollte. Dass bei einem ct-Wert der internen Kontrolle eine Hemmung der MAA/S-PCR nicht auftrat, konnte durch das Erreichen nahezu identischer ct-Werte in Singleplex- und Duplex-PCR festgestellt werden, wenn identische Mengen an Template-DNA zugegeben wurden (Tabelle 8). Umgekehrt wurde allerdings gelegentlich eine Hemmung der internen Kontrolle beobachtet, wenn sehr viele Mykobakterien im Ausgangsmaterial vorhanden waren und eine starke Amplifikation des Targets der MAA/S-PCR zur Folge hatte (siehe Tabelle 13). Dies führte teilweise bis zu einer vollständigen Hemmung einer nachweisbaren Amplifikation der Kontroll-DNA, was aber die Beurteilung der Patientprobe als positiv nicht einschränkte. Eine Quantifizierung der Mykobakterienzahl im klinischen Material wurde mit dem hier entwickelten Test nicht angestrebt, da dies nicht von klinischer Relevanz ist und, bedingt durch die inhomogene Verteilung der Mykobakterien in Organen oder Kot, keine Rückschlüsse auf die Häufigkeit der Erreger im Vogel erlaubt.

### **5.3 Auswahl des IS901 als Zielgen für die Realtime-PCR**

Umfangreiche Sequenzanalysen ergaben eine besondere Eignung der Insertionselement IS901 für einen spezifischen Nachweis von M.a.a. und M.a.s. mittels PCR. Die Definition der Unterart erfolgt anhand dessen, ob dieser charakteristische Genomabschnitt vorliegt (MÖBIUS et al., 2006). Auch wenn diese Sequenz bei M.a.s. gelegentlich als IS902 bezeichnet wird, zeigten Vergleiche von IS901 und IS902 eine vollständige Identität (Daten nicht dargestellt). Ein Nachweis von Abschnitten dieser Sequenzen begründet daher die Diagnose M.a.a./M.a.s., also der bedeutendsten vogelpathogenen Mykobakterien, und ihre Abgrenzung von anderen Mykobakterien, auch von anderen nahe verwandten Mitgliedern des MAC. Eine Unterscheidung zwischen M.a.a. und M.a.s. ist mit der hier entwickelten Realtime-PCR allerdings nicht möglich. Diese Differenzierung hätte allerdings keine unmittelbare klinische Relevanz oder Bedeutung beim weiteren Vorgehen in Bezug

auf den Vogelpatienten, sondern ist eher von akademischem Interesse oder bei epidemiologischen Fragestellungen wichtig. Therapiemöglichkeiten der aviären Mykobakteriosen sind beschrieben (POLLOCK, 2006). Allerdings ist dies nicht anzuraten, da eine Ausheilung der Erkrankung nicht zu erwarten ist. Da auch eine Übertragung auf den Menschen nicht ausgeschlossen werden kann, ist eine Euthanasie anzuraten (SCOPE, 2007).

#### 5.4 Spezifität und Sensitivität

Die bei der Auswahl des Zielgens theoretisch anhand von Sequenzdaten aus der NCBI Sequenzdatenbank GenBank abgeleitete Spezifität der konstruierten Primer und Sonde für M.a.a. und M.a.s. wurde in der vorliegenden Studie auch experimentell bestätigt. So zeigte sich bei der Untersuchung von bis auf Art oder Unterart exakt definierten Mykobakterien-Referenzstämmen, dass die hier vorgestellte Realtime-PCR nur bei M.a.a. und M.a.s. ein Fluoreszenzsignal lieferte. DNA anderer Arten, und dabei auch der anderer nahe verwandter Taxa des MAC wie *M. avium ssp. hominissuis*, *M. avium ssp. paratuberculosis* und *M. intracellulare* wurde nicht nachweislich amplifiziert.

Dass M.a.a. und M.a.s. unter den Mykobakterien große Relevanz als Vogelpathogene besitzen, belegt der hohe Anteil an positiven Nachweisen unter den klinischen Proben aus erkrankten Vögeln, bei denen in der Ziehl-Neelsen-Färbung säurefeste Stäbchen nachgewiesen worden waren. Hier blieb nur bei zwei in der Färbung positiv beurteilten Patienten ein DNA-Nachweis in der Realtime-PCR eindeutig negativ. Der Dompfaff (Nr. 13830) zeigte eine Dyspnoe sowie im Röntgen einen vergrößerten Leberschatten und dilatierte Darmschlingen. Der Lannerfalke (Nr. 14063) hatte ein abgegrenztes Granulom in der Schnabelhöhle. Dieses wies sowohl säurefeste Stäbchen in der Ziehl-Neelsen-Färbung auf als auch einen positiven ct-Wert in der MAA/S-PCR direkt aus dem Granulommaterial (Daten nicht dargestellt). Zusätzlich wurden in allen 12 Isolaten von säurefesten Stäbchen, die aus Patienten der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische angezüchtet worden waren, DNA von M.a.a./M.a.s. nachgewiesen. Diese Ergebnisse aus klinischem Material und Bakterienkulturen belegen somit auch bei dem hier einbezogenen Patientengut eindeutig die Bedeutung von M.a.a. und M.a.s. als

Krankheitserreger für Vögel und die gute Eignung der hier entwickelten Realtime-PCR für eine rasche Diagnose klinisch relevanter Mykobakterieninfektionen. Bei Betrachtung der diagnostischen Spezifität ist anzumerken, dass bei der geblindeten Untersuchung der gespickten Kotproben alle erregerefreien Ansätze richtig als negativ erkannt wurden.

Die hier entwickelte PCR ist also dazu geeignet, die wichtigsten vogelpathogenen Vertreter des MAC, *M. avium ssp. avium* und *M. avium ssp. silvaticum* spezifisch nachzuweisen. Damit sind zwar nicht alle für den Vogel pathogenen Mykobakterien abgedeckt. Wichtige Spezies wie z.B. *M. genavense* entgehen dieser Methode. Bei positiver Ziehl-Neelsen-Färbung und negativer PCR sind somit weitere Untersuchungen zum Nachweis oder Ausschluss vogelpathogener Mykobakterien nötig.

Mittels Zusatz von unterschiedlichen Mengen an Mykobakterien zu Kotproben wurde die Nachweisgrenze der Realtime-PCR mit  $10^4$  Bakterien pro g Kot ermittelt. Dies entspricht rechnerisch einer Menge von nur 1,25 Mykobakterien pro PCR-Ansatz. Im Vergleich zur Ziehl-Neelsen-Färbung zeigte die Realtime-PCR, die in dieser Arbeit vorgestellt wurde, damit bei Kotproben eine um etwa eine Zehnerpotenz niedrigere Nachweisgrenze. Dies wurde auch bei der Probe aus dem Darm von Nr. 12814 (siehe Tabelle 13) bestätigt. Die Ziehl-Neelsen-Färbung ergab hier einen negativen Befund. In der MAA/S-PCR konnte hingegen DNA mit einem ct-Wert von 36,09 nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Ziehl-Neelsen-Färbung gilt zudem, dass sie insbesondere beim Vorliegen vieler Proben sehr Arbeitszeit-aufwendig ist und große Erfahrung des Begutachters erfordert. Außerdem ist damit nur der Nachweis säurefester Stäbchen möglich, aber keine weitergehende Differenzierung von Mykobakterienarten oder -unterarten.

Wie bei der Untersuchung der gespickten Kotproben deutlich wurde (Tabelle 12), zeigte die MAA/S-PCR für den Nachweis von *M. avium ssp. avium* sehr gute Übereinstimmung mit der Ziehl-Neelsen-Färbung und bei Ansätzen mit Mykobakteriengehalten über der Nachweisgrenze sehr gut reproduzierbare ct-Werte. Sie erwies sich damit als robust.

Bei der Anwendung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Realtime-PCR ist es besonders bei der Interpretation von negativen Testergebnissen wichtig, die interne Kontrolle zu beachten. Ergibt sich hier ebenfalls kein ct-Wert, so muss die Probe als fraglich eingestuft und wiederholt werden. In einem ersten Schritt sollte dazu die extrahierte DNA verdünnt werden. Es wurde schon häufig beobachtet, dass diese Verdünnung die Inhibition der PCR aufhebt, aber die DNA-Konzentration für einen Nachweis immer noch ausreicht (RINDER, persönliche Mitteilung). Falls auch das nicht zum gewünschten Erfolg führt, sollte eine Wiederholung der Extraktion mit einer geringeren Ausgangsmenge an Probenmaterial oder mit einer anderen Extraktionsmethode durchgeführt werden.

Es ist anzumerken, dass bei den in der vorliegenden Studie einbezogenen, in der PCR negativen, aber in der ZN-Färbung positiven Patientenproben unterschiedliche Organ-Fragmente eingesetzt wurden. So waren bei der Sektion einige Granulome in Organen festgestellt worden, die nur für die Färbung verwendet wurden. Für die PCR wurde daher Material eingesetzt, bei dem zumindest makroskopisch keine Granulome erkennbar waren. Dies könnte die negativen Ergebnisse erklären. Es ist allerdings auch möglich, dass es sich im vorliegenden Fall um andere Mykobakterien als *M. avium ssp. avium* und *M. avium ssp. silvaticum* handelte. Eine Anzucht blieb ohne Ergebnis.

Die im Zuge dieser Arbeit neu entwickelte Realtime-PCR stellt ein schnelles und sensitives Verfahren zur spezifischen Diagnostik von M.a.a. und M.a.s. beim Vogel dar. Diese Methode ist für den Erregernachweis aus unterschiedlichem klinischem Probenmaterial wie Organ- und Kotproben geeignet. Insbesondere Kotproben sind einfach zu gewinnen und nicht-invasiv (FOLDENAUER et al., 2007). Kontaminationen aus dem Naturboden mit apathogenen Mykobakterien, die bei der mikroskopischen Untersuchung nach Ziehl-Neelsen-Färbung nicht abgegrenzt werden können, haben kein positives PCR-Ergebnis zur Folge. Durch die Schnelligkeit der Diagnosestellung wird ein rasches Eingreifen im positiven Fall möglich. Das Risiko einer Übertragung der Mykobakterien von Tier zu Tier oder auf den Menschen kann somit reduziert werden.

## 5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Atypische Mykobakterien spielen als Krankheitserreger beim Vogel eine große Rolle. An der Klinik für Vögel sind dies überwiegend *M. avium*-Stämme. Dies ließ sich in der Anzucht bestätigen. Die wichtigsten vogelpathogenen Vertreter *M.a.a.* und *M.a.s.* werden von der neu entwickelten Realtime-PCR sicher und rasch erkannt. Es hat sich gezeigt, dass die Extraktion mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) unter Beachtung der zur Extraktion maximal eingesetzten Probenmenge und bei einer längeren Lysezeit gut funktioniert, auch wenn unter Umständen eine Verdünnung der eluierten DNA notwendig ist. Die Probenmenge liegt bei Organen bei einem Quader von 1 mm Kantenlänge und bei Kotproben bei maximal 10 mg. Der Lyseschritt sollte bei klinischem Material über Nacht erfolgen. Wegen der inhomogenen Verteilung der Mykobakterien im Vogelpatienten und in ausgeschiedenem Kot ist es wichtig, dass eine sorgfältige Probenauswahl erfolgt und insbesondere bei größeren Kotproben oder Sammelkotproben eine Homogenisierung vor der DNA-Extraktion erfolgt. Die in die Extraktion und Realtime-PCR integrierte interne Kontrolle sorgt zusätzlich dafür, dass Inhibitoren der Extraktion oder der PCR erkannt werden. Sie besitzt daher große Bedeutung insbesondere bei der Beurteilung von Untersuchungsergebnissen aus Kot- und Darmproben. Das hier entwickelte Nachweisverfahren hat sich somit als robustes Diagnostikum zur Erkennung einer Mykobakteriose beim Vogel erwiesen. Möglicherweise kann die hier entwickelte Realtime-PCR, bei der *M.a.a.* und *M.a.s.* rasch von anderen Mykobakterien abgegrenzt werden können, auch zur Klärung der Zoonosegefahr, also des Risikos einer Infektion des Menschen mit vogelpathogenen Mykobakterien, beitragen. Für die Zukunft wäre es wünschenswert, in einem weiteren Entwicklungsschritt den Nachweis von *M. genavense* in diese Diagnostik z.B. in Form einer Triplex-PCR zu integrieren, um ein noch größeres Spektrum an Krankheitserregern zu erkennen.

## 6 Zusammenfassung

Infektionen mit Mykobakterien sind beim Vogel weit verbreitet. Am häufigsten werden die Subspezies *M. avium ssp. avium* und *M. avium ssp. silvaticum* nachgewiesen, die schwere chronische Erkrankungen bei einem breiten Spektrum von Vogelarten verursachen. Außerdem muss von einem zoonotischen Potential dieser Keime ausgegangen werden. Da die Mykobakteriose beim Vogel letztlich immer zur Erregerausscheidung führt und meist letal verläuft, ist es insbesondere zur Infektionsprophylaxe in Beständen wichtig, eine Infektion frühzeitig und sicher diagnostizieren zu können. Für die Diagnostik standen neben einer serologischen Untersuchung bisher die Ziehl-Neelsen-Färbung zum Nachweis säurefester Stäbchen und die lang dauernde Anzucht von Mykobakterien aus Organmaterial zur Verfügung. Neuere molekularbiologische Nachweisverfahren können Mykobakterien nur bis auf die Speziesebene differenzieren oder sie sind sehr aufwendig. Insbesondere Kot wurde bisher selten direkt als Ausgangsmaterial für einen Nachweis beim Vogel verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Realtime-PCR zum Nachweis von M.a.a. und M.a.s. in Organproben und Vogelkot entwickelt. Da vor allem bei Kotproben mit dem Vorkommen von PCR-Inhibitoren zu rechnen ist, wurde zur Qualitätssicherung eine interne Kontrolle in die Extraktion und PCR integriert.

Basierend auf den Ergebnissen von Sequenzanalysen von hsp65, der 16SrRNA und von Insertionselementen wurde als Zielgen für die Realtime-PCR das Insertionselement IS901 ausgewählt. Für den Nachweis von M.a.a und M.a.s. wurden anschließend Primer und eine Taqman-Sonde konstruiert, die auf dieses Insertionselement gerichtet sind. Als interne Kontrolle wurde eine Realtime-PCR nach WAKELEY et al. (2006) für *Taylorella equigenitalis* verwendet und die gesamte Realtime-PCR in Form einer Duplex-PCR konzipiert. Die Reaktionsbedingungen dieser Realtime-PCR wurden anschließend hinsichtlich der Konzentrationen von Magnesiumchlorid, dNTP, Primer und Sonden optimiert. Zur Ermittlung der Spezifität wurden 13 Mykobakterien-Referenzstämme mit dieser PCR untersucht. Zur Ermittlung der Nachweisgrenze und Überprüfung der Sensitivität wurden zudem Kotproben von SPF-Tauben mit Suspensionen aus unterschiedlichen Mykobakterienkonzentrationen gespickt und dann geblindet sowohl mittels Ziehl-

Neelsen-Färbung als auch mit der Duplex-Realtime-PCR untersucht. Des Weiteren wurden 27 Organproben, 18 Kotproben sowie 12 asservierte Mykobakterienstämme, die aus Organproben von Vogelpatienten angezüchtet worden waren, einer Testung mittels PCR unterzogen.

Bei der Etablierung der internen Kontrolle wurde die DNA-Menge der internen Kontrolle so eingestellt, dass keine Hemmung der PCR für M.a.a und M.a.s auftrat. Die Relevanz der Verwendung dieser internen Kontrolle wurde insbesondere bei der Untersuchung von 18 Kotproben von Vogelpatienten deutlich, bei der in drei Ansätzen bei der Verwendung von unverdünnter DNA aus der Extraktion eine Inhibition der PCR angezeigt wurde.

Bei der Untersuchung der Referenz-Stämme wurde eine DNA-Amplifikation anhand eines spezifischen Fluoreszenzsignals nur bei den vogelpathogenen Erregern M.a.a. und M.a.s. nachgewiesen. In der geblindeten Untersuchung von mit M.a.a gespickten Kotproben wurde für die Duplex-Realtime-PCR eine Nachweisgrenze von  $10^4$  Mykobakterien pro Gramm Kot ermittelt, was rechnerisch einem Nachweis von 1,25 Mykobakterien pro PCR-Ansatz entspricht. Die mikroskopische Untersuchung nach Ziehl-Neelsen-Färbung zeigte eine höhere Nachweisgrenze mit  $10^5$  Mykobakterien pro Gramm Kot als die PCR und erlaubt zusätzlich keine Aussage darüber, ob es sich um vogelpathogene Mykobakterien handelt. Mit der Realtime-PCR wurden alle negativen Ansätze als negativ erkannt.

Bei der Untersuchung von klinischem Material von Vogelpatienten (27 Organproben, 18 Kotproben) und von 12 asservierten Mykobakterienstämmen, bei denen vergleichend auch mikroskopische Untersuchungen nach Ziehl-Neelsen-Färbung durchgeführt wurden, wurde bei 32 von 34 Proben mit Nachweis von säurefesten Stäbchen auch DNA von M.a.a./M.a.s. mittels Realtime-PCR festgestellt. Dies belegt die Bedeutung dieser beiden Unterarten als Krankheitserreger für Vögel.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Realtime-PCR zum Nachweis von M.a.a. und M.a.s erwies sich als sehr gut für die Diagnostik von klinischem Material und ist somit für die Untersuchung von Vogelpatienten und zur Bestandsuntersuchung geeignet. Insbesondere die in die PCR integrierte interne Kontrolle ist für die Qualitätskontrolle der Diagnostik bedeutend, da, wie hier gezeigt wurde, vor allem Kot- und Darmproben hinsichtlich eines hohen Gehalts an Inhibitoren problematisch sind.

## 7 Summary

Infections with mycobacteria are widespread in birds. The subspecies *M. avium* ssp. *avium* and *M. avium* ssp. *silvaticum* are most commonly detected. They cause serious chronic diseases in a wide range of bird species. A zoonotic potential of these bacteria must be assumed. Since infections with mycobacteria in birds always lead in shedding these pathogens and have a lethal outcome, an early diagnosis is especially important for preventing transmission of them. At present, diagnosis is mainly based on Ziehl-Neelsen staining detecting acid-fast bacilli and on long lasting cultivation of mycobacteria from organ material as well as on serological tests for the detection of antibodies. Recent molecular biological tests can only differentiate avian mycobacteria to the species level or are very time-consuming. In particular, faeces was rarely used directly as starting material for an analysis.

In the present study a real-time PCR for detection of M.a.a. and M.a.s. from organ samples and bird droppings was developed. Since especially in faecal samples the presence of PCR inhibitors had to be expected, an internal control was integrated in the DNA extraction and PCR.

Based on the results of sequence analysis of hsp65, 16SrRNA and of insertion elements the insertion element IS901 was selected as target gene for the real-time PCR and primers and a Taqman-probe were designed for the detection of M.a.a and M.a.s. As an internal control, a real-time PCR by Wakeley et al. (2006) for *Taylorella equigenitalis* was used and the assay was designed in the form of a duplex-PCR. The reaction conditions of this real-time PCR were then optimized with regard to the concentrations of magnesium chloride, dNTP's, primers and probes. To determine the specificity 13 mycobacterial reference strains were tested with this PCR. To determine the detection limit and sensitivity faecal samples from SPF-pigeons were spiked with suspensions of different mycobacteria concentrations, blinded and analyzed by both Ziehl-Neelsen staining and the duplex-real-time PCR. Furthermore, 27 tissue samples, 18 fecal samples and 12 preserved mycobacterial strains that had been cultured from organ samples of bird patients, were tested by PCR.

The DNA amount of the internal control was adjusted so that no inhibition of PCR for M.a.a. and M.a.s. occurred. The relevance of the use of this internal control became especially apparent when bird fecal samples from patients were investigated. In three

out of 18 batches PCR inhibition was shown with the use of undiluted DNA from extraction.

When the reference strains of mycobacteria were tested, specific fluorescent signals indicating DNA amplification were only detected with M.a.a. and M.a.s.. In the blinded analysis of faecal samples spiked with M.a.a. detection limit of the duplex real-time PCR was determined to be  $10^4$  mycobacteria per gram of feces, which corresponds to a calculated detection of 1.25 bacteria per PCR tube. Microscopic examination after Ziehl-Neelsen staining showed a higher detection limit of  $10^5$  mycobacteria per gram of faeces compared with the PCR. In addition this test does not allow a statement about occurrence of mycobacteria pathogenic for birds in the sample. With the real-time PCR, all negative samples were correctly identified as negative.

On examination of clinical materials from bird patients (27 organ samples, 18 fecal samples and 12 preserved mycobacterial strains) with microscopic examinations after Ziehl-Neelsen staining in addition to PCR, DNA of M.a.a./M.a.s. was detected in 32 of 34 samples where acid-fast bacilli had been found. This highlights the importance of these two sub-species as pathogens for birds.

The real-time PCR for the detection of M.a.a. and M.a.s. presented here proved to be very appropriate for the investigation of clinical materials and thus to be suitable for the examination of bird patients and herds. In particular, the integrated internal control is an important tool for the quality control of diagnosis, since, as shown here, especially feces and intestinal samples are problematic with respect to a high content of inhibitors.

## 8 Literaturverzeichnis

1. AHRENS P., GIESE S.B. et al. (1995): Two markers, IS901-IS902 and p40, identified by PCR and by using monoclonal antibodies in *Mycobacterium avium* strains. *J Clin Microbiol* **33**(5): 1049-53.
2. ALAGARSWAMY R.K., HALFPENNY W. et al. (2007): Rare presentation of *Mycobacterium avium*-intracellulare infection. *Br J Oral Maxillofac Surg* **45**(8): 670-2.
3. ÁLVAREZ J., GARCIA I.G. et al. (2008): Genetic diversity of *Mycobacterium avium* isolates recovered from clinical samples and from the environment: molecular characterization for diagnostic purposes. *J Clin Microbiol* **46**: 1246-51.
4. BARTOS M., HLOZEK P. et al. (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**(3): 333-45.
5. BAUER J., ANDERSEN, A. B. (1999): Stability of insertion sequence IS1245, a marker for differentiation of *Mycobacterium avium* strains. *J Clin Microbiol* **37**(2): 442-4.
6. BEGGS M.L., STEVANOVA R. et al. (2000): Species identification of *Mycobacterium avium* complex isolates by a variety of molecular techniques. *J Clin Microbiol* **38**(2): 508-12.
7. BÖTTGER E.C., HIRSCHL B. et al. (1993): *Mycobacterium genavense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **43**(4): 841-3.
8. BONO M., JEMMI T. et al. (1995): Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. *Appl Environ Microbiol* **61**(1): 371-3.

- 
9. BOUGIOUKLIS P, BRELLOU G., et al. (2005): Outbreak of Avian Mycobacteriosis in a Flock of Two-Year-Old Domestic Pigeons (*Columbia livia f. domestica*). Avian Dis **49**: 442-5.
  
  10. BUTLER K.L., FITZGERALD S.D. et al (2001): Experimental Inoculation of European Starlings (*Sturnus vulgaris*) and American Crows (*Corvus brachyrhynchos*) with *Mycobacterium bovis*. Avian Dis **45**: 709-18.
  
  11. CAMPELL I.A. (2004): Opportunist mycobacterial infection. Medicine: 146 – 147
  
  12. CHEVILLE N.F., RICHARDS W.D. (1971): The influence of thymic and bursal lymphoid systems in avian tuberculosis. Am J Pathol **64**: 97-122.
  
  13. CHOU S., CHEDORE P. et al. (1998): Use of gas chromatographic fatty acid and mycolic acid cleavage product determination to differentiate among *Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium simiae*, and *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol **36**(2): 577-9.
  
  14. CLOUD J.L., NEAL H. et al. (2002): Identification of *Mycobacterium* spp. by Using a Commercial 16S Ribosomal DNA Sequencing Kit and Additional Sequencing Libraries. J Clin Microbiol **40**(2): 400-6.
  
  15. CORN J.L., MANNING E.J. et al. (2005): Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from free-ranging birds and mammals on livestock premises. Appl Environ Microbiol **71**(11): 6963-7.
  
  16. COVERT T.C., RODGERS M.R. et al. (1999): Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. Appl Environ Microbiol **65**(6): 2492-6.
  
  17. COYLE M.B., CARLSON D.C. et al. (1992): Laboratory aspects of "Mycobacterium genavense," a proposed species isolated from AIDS patients. J Clin Microbiol **30**(12): 3206-12.

- 
18. DAILLOUX M., LAURAIN C. et al. (1999): Water and nontuberculous mycobacteria. *Water Research* **33**(10): 2219 - 2228.
19. DEVALLOIS A., PICARDEAU M. et al. (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**(11): 2756-9.
20. DEVALLOIS A., GOH K.S. et al. (1997): Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol* **35**(11): 2969-73.
21. DVORSKA L., BULL T.J. et al. (2003): A standardised restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for typing *Mycobacterium avium* isolates links IS901 with virulence for birds. *J Microbiol Methods* **55**(1): 11-27.
22. DVORSKA L., MATLOVA L. et al. (2007): Avian tuberculosis in naturally infected captive water birds of the Ardeidae and Threskiornithidae families studied by serotyping, IS901 RFLP typing, and virulence for poultry. *Vet Microbiol* **119**(2-4): 366-74.
23. FALKINGHAM J.O., 3rd (1996): Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* **9**(2): 177-215
24. FENG D.F., DOOLITTLE R.F. (1987): Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J Mol Evol* **25**: 351-60.
25. FERRER L., RAMIS A. et al. (1997): Granulomatous dermatitis caused by *Mycobacterium genavense* in two psittacine birds. *Vet Dermatol* **8**: 213 - 219.
26. FITZGERALD S.D., BOLAND K.G. et al (2005): Resistance of Mallard Ducks (*Anas platyrhynchos*) to Experimental Inoculation with *Mycobacterium bovis*. *Avian Dis* **49**: 144-6.

- 
27. FITZGERALD S.D., ZWICK L.S. et al. (2003): Experimental Inoculation of Pigeons (*Columba livia*) with *Mycobacterium bovis*. *Avian Dis* **47**: 470-5.
28. FOLDENAUER U., CURD S. et al. (2007): Ante mortem diagnosis of mycobacterial infection by liver biopsy in a budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). *Schweiz Arch Tierheilkd* **149**(6): 273-6.
29. FROTHINGHAM R., WILSON K.H. (1993): Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. *J Bacteriol* **175**(10): 2818-25.
30. GONZÁLEZ M., RODRIGUEZ-BERTOS A. et al. (2002): Outbreak of Avian Tuberculosis in 48-Week-Old Commercial Layer Hen Flock. *Avian Dis* **46**: 1055-61.
31. GUERRERO C., BERNASCONI C. et al. (1995): A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J Clin Microbiol* **33**(2): 304-7.
32. GÜRTLER V., HARFORD C. et al. (2006): Direct identification of slowly growing *Mycobacterium* species by analysis of the intergenic 16S-23S rDNA spacer region (ISR) using a GelCompar II database containing sequence based optimization for restriction fragment site polymorphisms (RFLPs) for 12 enzymes. *J Microbiol Methods* **64**(2): 185-99.
33. HOENERHOFF M., KIUPEL M. et al. (2004): Mycobacteriosis in an American Bald Eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). *Avian Dis* **48**: 437-41.
34. HOLSBOER BUOGO C., BACCIARINI L. et al. (1997): Occurrence of *Mycobacterium genavense* in birds. *Schweiz Arch Tierheilkd* **139**(9): 397 – 402.
35. HOLT J.G., KRIEG N.R. et al. (1994): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9. Auflage. Baltimore, Maryland, Williams & Wilkins.

- 
- 36.**HOOP R.K., BOTTGER E.C. et al. (1993): Mycobacteriosis due to *Mycobacterium genavense* in six pet birds. *J Clin Microbiol* **31**(4): 990-3.
- 37.**HOOP R.K. (2002): *Mycobacterium tuberculosis* infection in a canary (*Serinus canana* L.) and a blue-fronted Amazon parrot (*Amazona amazona aestiva*). *Avian Dis* **46**(2): 502-4.
- 38.**HOOP R.T., GLÜNDER G.: Geflügeltuberkulose aus SIEGMANN O., NEUMANN U. et al. (2005): Kompendium der Geflügelkrankheiten, 6. Auflage. Hannover, Schlütersche Verlagsgesellschaft.
- 39.**HSIEH Y.-C., TSAI K.-Y. et al.(2009): Diagnosis of Avian Tuberculosis in Swinhoe's Pheasants Using Conventional and Molecular-Based Techniques. *Avian Dis* **53**: 629-33
- 40.**JOHANSEN I.S., LUNDGREN B.H. et al. (2002): Rapid differentiation between clinically relevant mycobacteria in microscopy positive clinical specimens and mycobacterial isolates by line probe assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* **43**(4): 297-302.
- 41.**JOHANSEN T.B., OLSEN I. et al. (2007): New probes used for IS1245 and IS1311 restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates of human and animal origin in Norway. *BMC Microbiol* **7**: 14.
- 42.**KERMEKCHIEV M.B., KIRILOVA L.I. et al. (2009): Mutants of Taq DNA Polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, No. 5.
- 43.**KIEHN T.E., HOEFER H. et al. (1996): *Mycobacterium genavense* infections in pet animals. *J Clin Microbiol* **34**(7): 1840-2.

- 
44. KIM H., KIM S.H. et al. (2005): PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm targeting 644 bp Heat Shock Protein 65 (hsp65) gene for differentiation of *Mycobacterium* spp. *J Microbiol Methods* **62**(2): 199-209.
45. KOPPERS N. (1989): Zur Diagnose aviärer Mykobakteriosen. Vet Diss, München
46. KORBEL R., SCHÄFFER E. et al. (1997): Okulare Manifestationen von Mykobakteriosen bei Vögeln. *Tierärztliche Praxis* **25**: 552-58.
47. LEHTOLA M.J., TORVINEN E. et al. (2006): Fluorescence In Situ Hybridization Using Peptide Nucleic Acid Probes for Rapid Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Potable-Water Biofilms. *Appl Environ Microbiol* **72**(1): 848-53.
48. MILLER N., INFANTE S. et al. (2000): Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol* **38**(5): 1915-9.
49. MÖBIUS P., LENTZSCH P. et al. (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**(2-4): 284-91.
50. MOSCA A., RUSSO F. et al. (2007): Utility of gas chromatography for rapid identification of mycobacterial species frequently encountered in clinical laboratory. *J Microbiol Methods* **68**(2): 392-5.
51. MÜLLER-BEISSER E. (1994): Die serologische Diagnose aviärer Mykobakteriosen. VetDiss, München.
52. MÜNCH T.A. (2006): Retrospektive und prospektive Auswertung der Todesursachen von Vögeln im Münchner Tierpark Hellabrunn. VetDiss, München.
53. ÖZCAN K., BEYTUT E. et al. (2001): Tuberculosis in Geese (*Anser anser*) in Turkey. *Avian Dis* **45**: 755-9.

- 
- 54.** PAVLIK I., SVASTOVA P. et al. (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**(2): 212-7.
- 55.** PESTEL-CARON M., GRAFF G. et al. (1999): Molecular analysis of Mycobacterium avium isolates by using pulsed-field gel electrophoresis and PCR. J Clin Microbiol **37**(8): 2450-5.
- 56.** POLLOCK C.G.: Implication of Mycobacteria in Clinical Disorders in HARRISON G.J., LIGHTFOOT T.L. et al. (2006): Clinical Avian Medicine, Volume 2. Palm Beach, Florida, Spix Publishing.
- 57.** RAMIS A., FERRER L. et al. (1996): Mycobacterium genavense Infection in Canaries. Avian Dis **40**: 246-51.
- 58.** RKI (2010a): Homepage des Robert-Koch-Institutes, 21.10.2010. <http://www.fli.bund.de/de/startseite/forschung-institute/institut-fuer-molekulare-pathogenese/referenzlabore/nrl-fuer-tuberkulose.html>
- 59.** RKI (2010b): Homepage des Robert-Koch-Institutes, 24.07.2010. [http://www.rki.de/clin\\_169/nn\\_274324/DE/Content/InfAZ/T/Tuberkulose/Archiv\\_\\_Berichte\\_\\_TB\\_\\_in\\_\\_Dtl\\_\\_tab.html](http://www.rki.de/clin_169/nn_274324/DE/Content/InfAZ/T/Tuberkulose/Archiv__Berichte__TB__in__Dtl__tab.html)
- 60.** RKI (2010c): Homepage des Friedrich-Löffler-Institutes, 24.07.2010. [http://www.fli.bund.de/no\\_cache/de/startseite/aktuelles-presse/aktuelles-tierseuchengeschehen/tuberkulose-beim-rind.html](http://www.fli.bund.de/no_cache/de/startseite/aktuelles-presse/aktuelles-tierseuchengeschehen/tuberkulose-beim-rind.html)
- 61.** ROIZ M.P., PALENQUE E. et al. (1995): Use of restriction fragment length polymorphism as a genetic marker for typing Mycobacterium avium strains. J Clin Microbiol **33**(5): 1389-91.
- 62.** ROLLE M., MAYR A. (1978): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 4. Auflage. Stuttgart, Enke Verlag

- 
- 63.**ROLLE M., MAYR A. (2002): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Auflage. Stuttgart, Enke Verlag
- 64.**SCHLIESSER T.: Mycobacterium aus BLOBEL H., SCHLIESSER T. (1985): Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Band 5. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag. Zitiert nach KOPPERS (1989).
- 65.**SCOPE A.: Mycobacterium aus KALETA E.F., KRAUTWALD-JUNGHANNS M.-E. et al. (2007): Kompendium der Ziervogelkrankheiten, 3. Auflage. Hannover, Schlütersche Verlagsgesellschaft.
- 66.**SELBITZ H.-J.: Gruppe der Actinomyceten aus ROLLE M., MAYR A. (2002): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Auflage. Stuttgart, Enke Verlag
- 67.**SMIT T., EGER A. et al. (1987). Avian tuberculosis in wild birds in the Netherlands. *J Wildl Dis* **23**(3): 485-7.
- 68.**STEINMETZ H.W., RUTZ C. et al. (2006): Possible Human-Avian Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in a Green-Winged Macaw (*Ara chloroptera*). *Avian Dis* **50**: 641-5.
- 69.**TELL L.A., FOLEY J. et al. (2003a): Comparison of four rapid DNA extraction techniques for conventional polymerase chain reaction testing of three *Mycobacterium* spp. that affect birds. *Avian Dis* **47**(4): 1486-90.
- 70.**TELL L.A., WOODS L. et al. (2003b): A Model of Avian Mycobacteriosis: Clinical and Histopathologic Findings in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Intravenously Inoculated with *Mycobacterium avium*. *Avian Dis* **47**: 433-43.
- 71.**THOMPSON J.D., HIGGINS D.G. et al. (1994): CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-80.

- 
- 72.** THOREL M.F., HUCHZERMEYER H. et al (1997): *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review. *Vet Res* **28**(5): 439-47.
- 73.** TORKKO P., KATILA M.L. et al. (2003): Gas-chromatographic lipid profiles in identification of currently known slowly growing environmental mycobacteria. *J Med Microbiol* **52**(Pt 4): 315-23.
- 74.** TORTOLI E., MARIOTTI A. et al. (2003): Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol* **41**(9): 4418-20
- 75.** TRAVIS E.K., JUNGE R.E. et al. (2007): Infection with *Mycobacterium simiae* complex in four captive Micronesian kingfishers. *J Am Vet Med Assoc* **230**(10): 1524-9.
- 76.** WAKELEY R.P., ERRINGTON J. et al. (2006): Development of a real time PCR for the detection of *Taylorella equigenitalis* directly from genital swabs and discrimination from *Taylorella asinigenitalis*. *Vet Microbiol* **118**: 247-54.
- 77.** WASHKO R.M., HOEFER H. et al. (1998): *Mycobacterium tuberculosis* infection in a green-winged macaw (*Ara chloroptera*): report with public health implications. *J Clin Microbiol* **36**(4): 1101-2.
- 78.** WEDEL A. (1999): Ziervögel: Erkrankung, Haltung, Fütterung. Berlin, Parey Verlag
- 79.** WITTKOWSKI M. (2005): Untersuchungen zur Struktur und biologischen Aktivität von Polysacchariden aus der Kapsel von *Mycobacterium avium*. Diss, Lübeck.

## 9 Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: verschiedene Mykobakterienkulturen. Von links nach rechts: M.a.a. Av 56, M.a.a. FLI, M.a.s., M. fortuitum, M. avium (Patientenprobe)..... 11

Abbildung 2: Quetschpräparat vom Knochen eines Bussards nach Ziehl-Neelsen-Färbung (1000 fache Vergrößerung). Auf dem blau gefärbten Hintergrund sind die säurefesten Stäbchen (rot) zu erkennen..... 21

Abbildung 3: Exemplarische Darstellung des Ergebnisses einer MAA/S-Singleplex-Realtime-PCR. Schwellenwert für den Fluoreszenzfarbstoff FAM (blaue Linie), Extraktionskontrolle (grüne Kurve) und DNA von M.a.a. Av 56 (graue Kurve). Die graue Kurve zeigt einen typischen sigmoiden Verlauf mit linearen Phasen an Beginn und Ende der PCR sowie die Phase des exponentiellen Anstiegs in der Mitte. Der ct-Wert liegt etwa bei 20. Diese PCR lief ohne interne Kontrolle..... 38

Abbildung 4: Graphische Darstellung der Fluoreszenzmessung im Verlauf einer Duplex-Realtime-PCR. Kurven mit positiven Reaktionen für M.a.a. Av 56 (graue Kurve, FAM-Signal) und die interne Kontrolle (lila und blaue Kurve, HEX-Signale), eine weitere Probe ist negativ (grüne Kurve, FAM-Signal). Die blaue und die grüne waagerechte Linie entsprechen den Schwellenwerten der Fluoreszenz (Cut off) für FAM und HEX..... 46

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomie der Mykobakterien (ROLLE & MAYR, 2002) .....	10
Tabelle 2: Übersicht über die Anzahl an Tbc-Neuerkrankungen von Menschen in Deutschland.....	13
Tabelle 3: verschiedene in der Literatur beschriebene Primersequenzen zum Nachweis unterschiedlicher Mykobakterien.....	28
Tabelle 4: Herkunft der Referenzstämme .....	30
Tabelle 5: Sequenzen der zur Amplifikation und Detektion der IS901-DNA von M.a.a. und M.a.s. konstruierten Primer (Forward-Primer MAA/S-for und Reverse-Primer MAA/S-rev) und Sonde (MAA/S-P).....	36
Tabelle 6: Sequenzen der zur Amplifikation und Detektion der 16SrRNA von <i>Taylorella equigenitalis</i> eingesetzten Primer (Forward-Primer Tay-for und Reverse-Primer Tay-rev) und Sonde (Tay-S) nach WAKELEY et al. (2006) .....	37
Tabelle 7: Übersicht über die einzelnen Schritte der Optimierung der Duplex-PCR. 39	
Tabelle 8: Vergleich der Ergebnisse der MAA/S-Realtime-PCR bei Einsatz identischer Menge an DNA von M.a.a Av 56 in Form einer Singleplex- oder Duplex-PCR (Angabe der ct-Werte der Doppelansätze).....	42
Tabelle 9: Ergebnis der Optimierung der Single-PCR: Angabe der erreichten ct-Werte (Gesamtvolumen des Ansatzes 25 µl) .....	43
Tabelle 10: Pipettierschema der PCR zum Nachweis von M.a.a. und M.a.s. einschließlich der internen Kontrolle.....	44
Tabelle 11: Ergebnisse der Duplex-Realtime-PCR-Untersuchung der Mykobakterien-Referenzstämme .....	45

---

Tabelle 12: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Ziehl-Neelsen-Färbung und PCR bei der Untersuchung gespickter Kotproben .....	47
Tabelle 13: PCR-Untersuchungsergebnisse der Patientenproben .....	50
Tabelle 14: Ergebnisse der asservierten Mykobakterienstämme .....	57

### 9.3 Zusammensetzung der Fertignährböden

#### **Löwenstein-Jensen-Agar (OXOID)**

Typische Zusammensetzung:

Kaliumdihydrogenphosphat 2,4 g/l

Magnesiumsulfat 0,24 g/l

Magnesiumcitrat 0,06 g/l

Asparagin 3,6 g/l

Glycerol 12,0ml

Kartoffelstärke 30,0 g/l

Frischeimixtur 1.000ml

Malachitgrün 0,4 g/l

#### **Stonebrink-Agar (OXOID)**

Typische Zusammensetzung:

Frischeimixtur 1.000ml

Pyruvat 3,0 g/l

Kaliumdihydrogenphosphat 11,4 g/l

Dinatriumhydrogenphosphat 6,0 g/l

Magnesiumsulfat 0,3 g/l

Malachitgrün 0,125 g/l

Penicillin G 100.000 IU

## 9.4 Färbearbeitungen

Alle Färbelösungen stammen von der Firma Merck KGaA, Darmstadt.

### 9.4.1 GRAM-Färbung

- a) getrocknete Ausstriche 3mal hitzefixieren
- b) Objektträger 3 Minuten in Kristallviolett 1:5 verdünnt eintauchen
- c) spülen mit Wasser
- d) Objektträger 3 Minuten in Lugolsche Lösung eintauchen
- e) spülen mit Wasser
- f) entfärben in 70%igem Alkohol bis keine Farbwolken mehr abgehen
- g) spülen mit Wasser
- i) 10 Sekunden gegenfärben mit Karbolfuchsin 1:10 verdünnt
- j) spülen mit Wasser
- k) Ausstriche trocknen lassen

### 9.4.2 Ziehl-Neelsen-Färbung

- a) getrocknete Ausstriche vollständig mit Karbolfuchsin bedecken und erhitzen bis zur Dampfbildung
- b) 2 bis 3 Minuten einwirken lassen
- c) spülen mit Wasser
- d) entfärben in Salzsäurealkohol (97ml 96%igen Alkohol versetzt mit 3ml 37%iger Salzsäure) bis Präparat fast farblos ist; maximal 20 Minuten
- e) 15 Sekunden gegenfärben mit Löfflers Methylenblau
- f) spülen mit Wasser
- g) Ausstriche trocknen lassen

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen herzlich danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Korbelt danke ich für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas.

Dem LGL Oberschleißheim und dem FLI Jena danke ich für die Überlassung der Referenzstämme sowie dem Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie der tierärztlichen Fakultät der LMU München für die Überlassung der Kochblutagarplatten.

Franz und Monika danke ich für die tolle Unterstützung und für das offene Ohr, dass ihr immer für mich hattet. Und danke auch für die nötigen Anstöße, mehr für die Dissertation zu machen.

Den Mitarbeiterinnen der Bakteriologie an der Vogelklinik danke für die Hilfe. Besonders Daniela und Sabrina, vielen Dank für eure Mitarbeit am Blindversuch und die tatkräftige Unterstützung!

Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen bei uns im Haus und Freunden, die ich hier kennen gelernt habe, bedanken für die Hilfe und Unterstützung.

Tanja – was hätte ich nur ohne dich gemacht.

Und vor allem möchte ich meiner Familie danken, ohne deren Unterstützung ich nie so weit gekommen wäre. Ohne euch wäre mein Traum nie wahr geworden.

## 11 Lebenslauf

Geburtstag und –ort	12. September 1981 in Groß-Gerau
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch
Schulbildung	1988 bis 1992 Grundschule in Nauheim 1992 bis 2001 Prälat-Diehl-Gymnasium in Groß-Gerau
Schulabschluss	Allgemeine Hochschulreife
Studium	Wintersemester 2001 bis Wintersemester 2007 an der Justus-Liebig-Universität Gießen: Studiengang der Tiermedizin
Approbation	April 2007
Beruf	seit Mai 2007 tierärztliche Mitarbeiterin an der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische der Ludwig-Maximilians- Universität München und Anfertigung der Dissertation