

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

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

**Entwicklung einer
Realtime-Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis
von *Mycobacterium genavense*
beim Vogel**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Jessica Michels
aus Trier

München 2014

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korbel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Reinhard Straubinger

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

Für meine Eltern
und Franz Ferdinand Hanika

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht.....	3
2.1.	Taxonomie und Vorkommen von Mykobakterien.....	3
2.2.	<i>Mycobacterium genavense</i>	7
2.2.1.	Erkrankungen beim Vogel	7
2.2.2.	Erkrankungen beim Menschen und zoonotisches Potential	10
2.2.3.	Nachweis.....	13
2.2.3.1.	Mikroskopischer Nachweis	13
2.2.3.2.	Anzucht und deren Besonderheiten	15
2.2.3.3.	Molekularbiologische Nachweismethoden für <i>M. genavense</i>	18
2.2.3.4.	Sonstige Nachweismethoden	20
2.3.	Weitere beim Vogel nachgewiesene Mykobakterien	21
2.3.1.	Atypische Mykobakterien beim Vogel.....	21
2.3.2.	Mykobakterien des Tuberkulosekomplexes beim Vogel.....	23
3.	Material und Methoden	26
3.1.	Material.....	26
3.1.1.	Mykobakterien - Referenzstämme.....	26
3.1.2.	Kotproben.....	26
3.1.3.	Patientenproben	28
3.2.	Methoden	29
3.2.1.	Pathologisch-anatomische Untersuchung	29
3.2.2.	Anzucht von <i>Mycobacterium genavense</i>	29
3.2.3.	Spicken von Kotproben	30
3.2.4.	Mikroskopische Untersuchung auf säurefeste Stäbchen.....	30
3.2.5.	DNA-Extraktion.....	32
3.2.6.	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> - und <i>M. avium</i> ssp. <i>silvaticum</i> -Realtime-PCR.....	33
3.2.7.	Entwicklung und Durchführung der <i>M. genavense</i> -Realtime-PCR	33
4.	Ergebnisse	37
4.1.	Auswahl des Zielgens.....	37
4.2.	Primer- und Sondenkonstruktion	37

4.3.	PCR-Optimierung	38
4.4.	Ergebnisse der Untersuchung von Referenzstämmen	40
4.5.	Ergebnisse der Untersuchung von gespickten Kotproben	42
4.6.	Ergebnisse der Untersuchung von Patientenmaterial.....	44
4.6.1.	Ergebnisse der PCR und der Ziehl-Neelsen-Färbung	44
4.6.2.	Ergebnisse der Sektion	45
5.	Diskussion	52
5.1.	DNA-Extraktion.....	53
5.2.	Auswahl des Zielgens.....	54
5.3.	Sensitivität und Spezifität	55
5.4.	Ergebnisse der Patientenproben	57
5.5.	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	61
6.	Zusammenfassung.....	63
7.	Summary	65
8.	Literaturverzeichnis	67
9.	Anhang	85
9.1.	Tabellenverzeichnis.....	85
9.2.	Abbildungsverzeichnis.....	85
9.3.	Färbearbeitung.....	86
9.4.	Tabellen.....	86
10.	Danksagung.....	128

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	= Abbildung
AE	= Elutionspuffer
AFB	= säurefeste Stäbchen
AIDS	= acquired immunodeficiency syndrome
AL	= Präparationspuffer
ASL	= stool lysis buffer
ATL	= animal tissue lysis buffer
BCG	= Bacillus Calmette-Guérin
BLAST	= Basic Local Alignment Search Tool
bp	= Basenpaar
°C	= Grad Celsius
CD4	= cluster of differentiation 4
Ct	= Cycle Threshold
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
DSM	= Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
et al.	= et alii
FAM	= Carboxyfluorescein
FLI	= Friedrich-Loeffler-Institut
FRET	= fluorescence resonance energy transfer
GLC	= Gas-Flüssigkeits-Chromatographie
HIV	= Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	= Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
hsp	= Hitzeschockprotein

kb	= Kilobase
kDa	= Kilodalton
k.W.	= kein Ct-Wert in der PCR messbar
LMU	= Ludwig-Maximilians-Universität
M.	= <i>Mycobacterium</i>
M.a.a.	= <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>avium</i>
MAA/S-PCR	= PCR zum Nachweis von <i>M. avium</i> subspecies <i>avium</i> und <i>M. avium</i> subspecies <i>silvaticum</i>
MAC	= <i>Mycobacterium-avium</i> -Komplex
M.a.h.	= <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>hominissuis</i>
M.a.p.	= <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
MGIT	= Mycobacterial Growth Indicator Tube
MOTT	= atypische Mykobakterien (mycobacteria other than tuberculosis)
NCBI	= National Center for Biotechnology Information
NTM	= atypische Mykobakterien (nontuberculous mycobacteria)
OADC	= Oleic acid, Albumin, Dextrose, Catalase
OSCPH	= Oligonucleotide Specific Capture Plate Hybridization
PANTA	= Polymyxin B, Amphoterecin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim, Azlocillin
PCR	= Polymerase-Kettenreaktion
RFLP	= Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusanalyse
RKI	= Robert-Koch-Institut
RNA	= Ribonukleinsäure
rpoB	= Gen der Beta Untereinheit der Ribonukleinsäure-Polymerase

rRNA	= ribosomale Ribonukleinsäure
SPF	= Spezifiziert Pathogen Frei
sp.	= species
ssp.	= subspecies
TAMRA	= Tetramethylrhodamin
TLC	= Dünnschichtchromatographie
WHO	= Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

Mykobakterielle Erkrankungen werden bei Vögeln vor allem durch *Mycobacterium avium* ssp. *avium* und *Mycobacterium genavense* ausgelöst. Die aviäre Mykobakteriose tritt heutzutage vor allem bei Wild-, Zier- und Zoovögeln sowie extensiven Geflügelhaltungen auf (MARTIN & SCHIMMEL, 2000). Aufgrund der Haltungsbedingungen des Mastgeflügels mit einer hohen Hygiene, einer kurzen Lebensdauer und regelmäßigen Gesundheitskontrollen spielt die Geflügeltuberkulose in diesem Bereich nur noch eine untergeordnete Rolle. *M. avium* und *M. genavense* führen bei Vögeln meist zu einer schwerwiegenden chronischen Infektion. Klinische Symptome sind vielgestaltig und unspezifisch. Bei Ziervögeln kommt häufig die sogenannte atypische Verlaufsform vor, bei der typische Granulome fehlen, was die Diagnose anhand des pathologisch-anatomischen Bildes deutlich erschwert. Bei dieser Vogelgruppe konnte in den letzten Jahren gehäuft *M. genavense* als Ursache mykobakterieller Erkrankungen nachgewiesen werden.

Aviäre Mykobakteriosen besitzen zoonotisches Potential. So ist bekannt, dass insbesondere bei stark immunsupprimierten Menschen sowie bei älteren Personen und Kindern *M. genavense* und *M. avium* zu schweren disseminierten sowie schwer therapierbaren Infektionen führen können. Über den Kot infizierter Tiere werden große Mengen an Mykobakterien ausgeschieden und gelangen in die Umwelt. Diese Tiere stellen daher eine potentielle Infektionsquelle dar, weshalb ein Kontakt mit infizierten Tieren vermieden werden sollte.

Auch im Hinblick auf ein Infektionsrisiko für den Menschen kommt daher einer schnellen und sicheren Diagnostik von Infektionen mit aviären Mykobakterien bei Vögeln eine große Bedeutung zu. Am lebenden Tier bietet sich die Untersuchung von Kotproben als schnelle und nichtinvasive Möglichkeit an. Mykobakterien werden allerdings nur intermittierend mit dem Kot ausgeschieden und im Kot enthaltene Inhibitoren erschweren molekularbiologische Nachweismethoden wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Postmortem eignet sich eine Untersuchung innerer Organe wie Darm, Leber und Milz. Derzeit basiert die Diagnostik beim Vogel allerdings häufig lediglich auf dem Nachweis säurefester Stäbchen, ist also relativ unspezifisch.

Zur Identifizierung der Spezies ist eine Anzucht in Verbindung mit weiterführenden

Untersuchungen, wie biochemischen Tests oder eine Charakterisierung mittels molekularbiologischer Methoden notwendig. Die Isolierung und Identifizierung von *M. genavense* mittels Anzucht ist aufgrund eines langsamen Wachstums und großen Anspruchs bezüglich Kulturmedien und -bedingungen dieser Art allerdings sehr schwierig (BÖTTGER et al., 1993). *M. genavense* wächst in vielen Fällen nicht auf festen Medien und zur Erstisolierung werden spezielle Flüssigmedien wie das BACTEC-System mit einer langen Inkubationszeit von 8 bis 12 Wochen empfohlen (BÖTTGER et al., 1993; COYLE et al., 1992).

Molekularbiologische Methoden direkt aus Gewebeproben (CHEVRIER et al., 1999; HOOP et al., 1996) und Kotproben (LEDWON et al., 2008a) stellen daher sehr oft die einzige Möglichkeit dar, *M. genavense* nachzuweisen. Derzeit existierende Tests basieren jedoch häufig auf der aufwendigen Kombination mehrerer Methoden, wie zum Beispiel PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusanalyse (PCR-RFLP) (BOIAN et al., 1997) oder PCR mit anschließender Sequenzierung (BÖTTGER et al., 1992).

Beschriebene Realtime-PCR-Methoden weisen keine Nachweisgrenze auf, können *M. genavense* nicht von anderen Mykobakterienspezies differenzieren oder nähere Informationen zur verwendeten Realtime-PCR sind nicht beschrieben.

In dieser Arbeit sollte eine molekularbiologische Methode entwickelt werden, die einen schnellen und einfachen, dabei aber gleichzeitig auch sensitiven und spezifischen Direktnachweis von *M. genavense* aus Kot- und Organproben von Vögeln ermöglicht. Dazu wurde eine Realtime-PCR etabliert, die für die Erkennung von PCR-Inhibitoren in Form einer Duplex-PCR mit Einsatz einer internen Kontrolle konzipiert wurde, um insbesondere auch Kot- und Darmproben sicher beurteilen zu können.

2. Literaturübersicht

2.1. Taxonomie und Vorkommen von Mykobakterien

Mykobakterien zählen zur Ordnung der *Actinomycetales* und sind die einzigen Vertreter aus der Familie der *Mycobacteriaceae* (PFYFFER, 2007). Sie sind aerobe, unbewegliche, gerade bis leicht gekrümmte Stäbchen von 0,2-0,6 x 1-10 µm Größe, die keine Sporen und Hyphen bilden. Ein Charakteristikum der Mykobakterien ist der Aufbau der Zellwand, der durch einen hohen Lipidanteil mit langkettigen Mykolsäuren gekennzeichnet ist (WAYNE & KUBICA, 1986). Dadurch erhalten sie ihre Alkohol-Säurefestigkeit, weshalb sie mit besonderen Färbemethoden nachgewiesen werden müssen. Sie werden zwar als grampositiv eingestuft, können aber nicht mit den üblichen Anilin-Farbstoffen angefärbt werden (PFYFFER, 2007). Mykobakterien werden weiterhin durch einen hohen Guanin- und Cytosin-Gehalt ihrer DNA von 61-71 mol% (Ausnahme *M. leprae* mit 55 mol%) gekennzeichnet (PFYFFER, 2007). Sie sind eng verwandt mit den Gattungen *Corynebacterium*, *Nocardia* und *Rhodococcus*, die eine partielle Säurefestigkeit aufweisen können (WAYNE & KUBICA, 1986).

Mykobakterien können in zwei Gruppen unterteilt werden: in den *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex und in die sogenannten atypischen, nichttuberkulösen Mykobakterien (MOTT=mycobacteria other than tuberculosis oder NTM=nontuberculous mycobacteria).

Atypische Mykobakterien können nach Wachstumsgeschwindigkeit und Pigmentbildung in vier Runyon-Gruppen eingeteilt werden (ROLLE & MAYR, 2002). In Tabelle 1 sind die vier Gruppen mit klinisch relevanten Vertretern aus der Gruppe der atypischen Mykobakterien dargestellt. Schnellwachsende Mykobakterien benötigen weniger als 7 Tage zur Bildung sichtbarer Kolonien, während langsam wachsende mehr als 7 Tage benötigen (PFYFFER, 2007). Mykobakterien des Tuberkulosekomplexes zählen zu den langsam wachsenden Mykobakterien.

Eine Ausnahme bildet hier *Mycobacterium leprae*, da dieses bisher in vitro nicht kultiviert werden konnte (RICHTER, 2009).

Tabelle 1: Beschreibung der vier Runyon-Gruppen mit klinisch relevanten Vertretern aus der Gruppe der atypischen Mykobakterien

Runyon-Gruppe	Eigenschaft	Vertreter aus der Gruppe der atypischen Mykobakterien
I	langsam wachsend, photochromogen	<i>M. simiae</i> <i>M. marinum</i> <i>M. kansasii</i>
II	langsam wachsend, skotochromogen	<i>M. szulgai</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. gordonae</i>
III	langsam wachsend, nichtchromogen	<i>M. avium</i> -Komplex <i>M. genavense</i> <i>M. ulcerans</i>
IV	schnellwachsend	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i>

Der *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex ist Auslöser der bei Mensch und Tier vorkommenden Infektionskrankheit Tuberkulose und beinhaltet die Spezies *M. tuberculosis*, *M. bovis* [*M. bovis* ssp. *bovis*, *M. bovis* ssp. *caprae*, *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG)], *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii* und dem 2010 neu beschriebenen *M. mungi* (ALEXANDER et al., 2010). Da die Erreger des Tuberkulosekomplexes genetisch so eng miteinander verwandt sind, sollte man eher von Subspezies als von Spezies sprechen (VAN SOOLINGEN et al., 1997). Diese Erreger haben ein zoonotisches Potential und können zwischen Mensch und Tier übertragen werden.

Die Tuberkulose des Menschen ist meldepflichtig und wird von den Erregern des Tuberkulosekomplexes, vor allem aber *M. tuberculosis*, ausgelöst. Meldepflichtig ist der Nachweis aller Erreger des *M. tuberculosis*-Komplexes, mit Ausnahme des

attenuierten Impfstammes *M. bovis* BCG (RKI, 2013). Weltweit ist die Tuberkulose des Menschen eine ernst zu nehmende Infektionskrankheit, die unbehandelt zu einer hohen Mortalität führt. Im Jahr 2011 erkrankten in Deutschland 4.317 Menschen an einer Tuberkulose, was einer Inzidenz von 5,3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner entspricht. Die Anzahl der Verstorbenen aufgrund einer Tuberkulose lag im Jahr 2011 bei 162 Patienten (RKI, 2013). Weltweit wurden die Neuerkrankungen im Jahr 2011 auf 8,7 Millionen Fälle geschätzt, 1,4 Millionen Menschen starben an einer Tuberkulose (WHO, 2012).

Die Rindertuberkulose, ausgelöst durch *M. bovis*, zählt zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen. 2012 und 2013 wurden einige Rindertuberkulosefälle im Allgäu und in Niedersachsen festgestellt, weshalb Monitoring-Maßnahmen eingeführt werden, um die Tuberkulosesituation in Deutschland weiter im Blick zu behalten (BTK-HOMEPAGE, 2013). Denn seit 1997 gilt Deutschland dank intensiver Bekämpfungsmaßnahmen offiziell als Rindertuberkulose frei, was bedeutet, dass in mehr als 99,8% der Rinderbestände keine Tuberkulose mehr auftrat (FLI-HOMEPAGE, 2013).

Atypische Mykobakterien sind im Gegensatz zum *M. tuberculosis*-Komplex nicht obligat pathogen. Viele der NTM kommen ubiquitär in der Umwelt vor und konnten bereits aus Wasser (Oberflächenwasser, Trinkwassersysteme), Erdboden, Staub und Aerosolen isoliert werden (COVERT et al., 1999; FALKINHAM, 1996). Einige dieser Erreger können bei Mensch und Tier zu Erkrankungen führen, die als Mykobakteriosen bezeichnet werden. In einer retrospektiven Studie über die Häufigkeit von NTM-Isolaten in klinischen Laboren konnten in absteigender Reihenfolge am häufigsten der *M. avium*-Komplex, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. kansasii* und *M. fortuitum* isoliert werden (MARTIN-CASABONA et al., 2004). *M. gordonae* ist das häufigste nichtpathogene NTM, welches in Kliniklaboren isoliert wird und nur äußerst selten zu einer Erkrankung beim Menschen führt (PFYFFER, 2007).

Einer der bekanntesten Vertreter der atypischen Mykobakterien ist der *M. avium*-Komplex (MAC), mit den Spezies *M. avium* und *M. intracellulare*. Erreger des *M. avium*-Komplexes sind weit verbreitet in der Umwelt und konnten bereits aus Vögeln, Säugetieren und Menschen isoliert werden (INDERLIED et al., 1993). Bei immunkompetenten Menschen kann der *M. avium*-Komplex zu Lungenerkrankungen

und lokalisierten Hautinfektionen führen und bei Kindern ist der Komplex häufige Ursache einer mykobakteriellen Lymphadenitis (FALKINHAM, 1996). Bei AIDS-Patienten ist *M. avium* die häufigste Ursache disseminierter mykobakterieller Infektionen (FALKINHAM, 1996).

Der *M. avium*-Komplex besteht aus den Spezies *M. avium*, mit den Subspezies *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *silvaticum*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (THOREL et al., 1990) und *M. avium* ssp. *hominissuis* (MIJS et al., 2002) und *M. intracellulare*. Zusätzlich werden *M. chimaera* (TORTOLI et al., 2004) und *Mycobacterium* Spezies X (FALKINHAM, 1996) dazugezählt.

Zurzeit werden dem *M. avium*-Komplex 28 Serovare zugeschrieben, wobei *M. avium* die Serovare 1-6, 8-11 und 21 und *M. intracellulare* die Serovare 7, 12-20 und 25 zugeteilt werden (MÖBIUS et al., 2006; SAITO et al., 1990; WAYNE et al., 1993). Die restlichen Serovare können aufgrund ihrer Heterogenität keiner der beiden Spezies zugeordnet werden. Die Serovare 1-3 werden *M. avium* ssp. *avium* zugeordnet.

M. avium ssp. *avium*-Stämme sind Auslöser der aviären Mykobakteriose. In den letzten Jahren konnte aber zunehmend und häufig *M. genavense* als Ursache mykobakterieller Infektionen bei Ziervögeln der Ordnung Psittaciformes und Passeriformes festgestellt werden (HOLSBOER BUOGO et al., 1997; HOOP et al., 1996; MANAROLLA et al., 2009). *M. avium* ssp. *silvaticum*-Stämme („Ringeltauben“-Mykobakterium) können bei Vögeln zu einer Mykobakteriose und bei Säugetieren zu einer Paratuberkulose führen, wurden aber bisher noch nicht aus der Umwelt isoliert (LEHTOLA et al., 2006). *M. avium* ssp. *avium*- und *M. avium* ssp. *silvaticum*-Stämme werden durch das Vorkommen der Insertionssequenzen IS901 und IS1245 charakterisiert. Mykobakterien des MAC, die die Insertionssequenz IS901 beinhalten, erwiesen sich in Untersuchungen als hochpathogen für Vögel (BONO et al., 1995; PAVLIK et al., 2000). BONO et al. (1995) und MÖBIUS et al. (2006) konnten bei Mensch und Säugetieren in ihren Untersuchungen keine Mykobakterien-Stämme mit der Insertionssequenz IS901 finden. PAVLIK et al. (2000) konnten wenige humane Mykobakterien-Stämme mit der Insertionssequenz IS901 finden. Diese waren allerdings nicht pathogen für Vögel.

Die Serotypen 4-6, 8-11 und 21 wurden im letzten Jahrzehnt der neuen Subspezies *M. avium* ssp. *hominissuis* zugeordnet, welche über die Insertionssequenz IS1245, nicht aber über die Insertionssequenz IS901 verfügt (MIJS et al., 2002). Diese

Stämme konnten bisher überwiegend aus der Umwelt, aus Humanproben und aus verschiedenen Säugetieren, darunter Schwein und Rind, isoliert werden (MIJS et al., 2002; MÖBIUS et al., 2006), für Vögel sind sie nur schwach virulent (PAVLIK et al., 2000). In Japan konnte in einem Fall Serovar 9 aus tuberkulösen Organläsionen einer Zwergwachtel (*Excalfactoria chinensis*) isoliert werden (MORITA et al., 1999).

M. avium ssp. *paratuberculosis* ist obligat pathogen und verursacht beim Wiederkäuer eine schwerwiegende chronische Darmentzündung, die Paratuberkulose und beim Menschen wird eine Beteiligung an der Krankheit Morbus Crohn diskutiert (ROLLE & MAYR, 2002). Diese Stämme verfügen über die Insertionssequenz IS900 (ROLLE & MAYR, 2002).

2.2. *Mycobacterium genavense*

2.2.1. Erkrankungen beim Vogel

Bis vor etwa 20 Jahren wurden aviäre Mykobakteriosen hauptsächlich dem *M. avium*-Komplex zugeschrieben, wobei ein wesentlicher Anteil aus nicht identifizierbaren Mykobakterien bestand (FORSTER, 1987; KEYMER et al., 1982; TELL et al., 2001). Mit dem Einsatz molekulardiagnostischer Methoden wurde Anfang der neunziger Jahre *M. genavense* als neuer Erreger der aviären Mykobakteriose entdeckt (HOOP et al., 1993). Vor allem bei Psittaciformes und Passeriformes konnte bis heute mehrfach *M. genavense* als Ursache schwerwiegender mykobakterieller Infektionen nachgewiesen werden (HOLSBOER BUOGO et al., 1997; HOOP et al., 1993; MANAROLLA et al., 2009; PALMIERI et al., 2012; PORTAELS et al., 1996). In Untersuchungen konnte bei Vögeln in den USA, der Schweiz und Italien *M. genavense* als häufigste Mykobakterienart bei Ziervögeln identifiziert werden mit einem Vorkommen von 30,9 % bis 95,8% der nachgewiesenen Mykobakterien (HOLSBOER BUOGO et al., 1997; HOOP et al., 1996; MANAROLLA et al., 2009; PALMIERI et al., 2012). Der Keim wurde auch bei einem Riesentukan aus der Ordnung der Piciformes nachgewiesen (HOLSBOER BUOGO et al., 1997). Bei Vögeln der Ordnungen Passeriformes, Psittaciformes, Coraciiformes, Piciformes und Galliformes aus einem Zoo in Belgien wurden Infektionen mit anspruchsvollen, schwer anzüchtbaren Mykobakterien nachgewiesen (PORTAELS et al., 1996). Bei 7 Tieren (Ordnung Passeriformes und

Psittaciformes) konnten diese anspruchsvollen Mykobakterien mittels PCR als *M. genavense* identifiziert werden (PORTAELS et al., 1996).

Bei einem Papageienvogel (*Touit* sp.) konnte eine Mischinfektion mit *M. genavense* und *M. avium* nachgewiesen werden (PALMIERI et al., 2012).

Generell können bei der aviären Mykobakteriose drei Verlaufsformen unterschieden werden, die klassische mit Granulomen einhergehende, die paratuberkulöse und die nicht-tuberkulöse, atypische Form (GERLACH, 1994). Bei Ziervögeln wie Passeriformes und den meisten Psittaciformes findet sich in der Mehrzahl der Fälle die nicht-tuberkulöse Form, da sichtbare Granulome oft fehlen (GERLACH, 1994). Diese Verlaufsform kennzeichnet sich durch ein unspezifisches Bild in der Sektion, was eine Diagnose anhand des pathologisch-anatomischen Bildes erheblich erschwert. Verschiedene Papageienvögel wurden auf das Vorliegen einer Mykobakteriose untersucht und es konnten bei keinem dieser Vögel makroskopisch Granulome in Organen beobachtet werden (FORSTER et al., 1988). Vögel der Gattungen *Amazona*, *Pionus*, *Brotogeris*, *Psittacula* und Hornsittiche (*Eunymphicus cornutus*) sind anfällig für die sogenannte paratuberkulöse Verlaufsform (GERLACH, 1994). Charakteristisch hierfür ist eine Hypertrophie der Darmzotten mit einer keulenförmigen Verdickung. Diese Veränderungen ähneln den Darmveränderungen der Paratuberkulose der Wiederkäuer und sind für eine aviäre Mykobakteriose verdächtig (FORSTER et al., 1988).

M. genavense und *M. avium* verursachen bei Ziervögeln eine disseminierte systemische Erkrankung, die in ihrer Klinik und Histopathologie nicht zu unterscheiden sind (HOOP et al., 1993; PORTAELS et al., 1996; SCHMIDT et al., 2003). *M. genavense*-Infektionen manifestieren sich primär im Magen-Darm-Trakt, weshalb eine orale Infektion vermutet wird (HOOP et al., 1993; MANAROLLA et al., 2009; PORTAELS et al., 1996; RAMIS et al., 1996; SCHMIDT et al., 2003). Vom Darm ausgehend kommt es zu einer Streuung in weitere Organe insbesondere Leber, Milz und Lunge (MANAROLLA et al., 2009; PORTAELS et al., 1996; SCHMIDT et al., 2003). Danach folgen weiterhin Luftsäcke, Haut und Knochenmark, wobei jedes Organsystem betroffen sein kann (SCHMIDT et al., 2003). Ein aerogener Infektionsweg scheint selten zu sein. Dieser kann aber nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da einige Fälle mit hochgradigem Befall der Lunge beschrieben sind (HOLSBOER BUOGO et al., 1997; PORTAELS et al., 1996). Bei

einem Stieglitz (*Carduelis carduelis*) wurde eine Coinfektion mit *M. genavense* und dem aviären Polyomavirus beschrieben. Es konnten hochgradige mykobakterielle Läsionen der Lungen, Luftsäcke und der Nebenniere sowie eine mykobakterielle Meningoenzephalitis festgestellt werden. Der Magen-Darm-Trakt zeigte keinerlei Veränderungen, weshalb eine aerogene Übertragung hier nicht ausgeschlossen werden kann (MANAROLLA et al., 2007). Ein Befall des zentralen Nervensystems ist generell selten. Bei einer Weißstirnamazone (*Amazona albifrons*), einem Fliegenschnäpper (*Cyanoptila cyanomelana*) und einem Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*) konnte bei einer disseminierten *M. genavense*-Infektion eine Beteiligung des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden (GOMEZ et al., 2011; HOOP et al., 1993).

Lokalisierte Infektionen sind eher selten. Bei einem Allfarblori (*Trichoglossus haematodus*) wurde eine lokalisierte Infektion der Haut beschrieben, bei einer Weißstirnamazone (*Amazona albifrons*) lag neben einem Befall der Haut auch eine systemische Beteiligung vor (FERRER, 1997). Bei einem Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*) konnte *M. genavense* aus Gewebeproben einer knotigen Bindehautentzündung nachgewiesen werden (KUMMERFELD et al., 2009).

Erkrankte Tiere werden meist mit unspezifischen Symptomen vorgestellt. Abmagerung, Schwäche, Lethargie, aufgeplustertes Gefieder, aber auch plötzliche Todesfälle ohne vorherige Symptomatik sind beschrieben (HOOP et al., 1993; PORTAELS et al., 1996; RAMIS et al., 1996; SHITAYE, 2010).

In der Sektion zeigen sich häufig nur unspezifische Veränderungen. Ein reduzierter Ernährungszustand, Atrophie der Brustmuskulatur, Leber- und Milzschwellung, die mit Farbveränderungen einhergehen können sowie dilatierete oder verdickte Darmschlingen werden häufig vorgefunden (GOMEZ et al., 2011; HOOP et al., 1993; HOOP et al., 1996; PORTAELS et al., 1996; STEIGER et al., 2003).

Histopathologisch können bei der nicht-tuberkulösen Form fokale oder flächenhafte Ansammlungen von Makrophagen mit säurefesten Stäbchen nachgewiesen werden, mit variablen Vorkommen von Nekrosen und vereinzelt Anhäufungen von Lymphoidzellen und Heterophilen (MANAROLLA et al., 2009).

Diffuse oder knollenförmige Verdickungen der Darmwand aufgrund einer Zotteninfiltration sind hinweisend (SCHMIDT et al., 2003). Gelegentlich können auch

bei Ziervögeln makroskopisch Granulome auftreten, die sich beispielsweise als weißliche Knoten in Leber (PALMIERI et al., 2012; SCHMIDT et al., 2003) oder in Form von Granulomen in Haut und Lunge (FERRER, 1997; HOOP et al., 1993) darstellen können. KIEHN et al. (1996) beschrieben eine Gelbscheitelamazone (*Amazona ochracephala*) mit respiratorischer Symptomatik, bei der eine disseminierte *M. genavense*-Infektion mittels PCR und anschließender Sequenzierung festgestellt wurde. Makroskopisch konnte in der Sektion eine bröckelige Masse in der Luftröhre festgestellt werden, die sich histologisch als granulomatöse Tracheitis mit zahlreichen säurefesten Stäbchen darstellte. Histologisch konnte dann eine disseminierte *M. genavense*-Infektion mit einer granulomatösen Hepatitis, Entertitis und Pneumonie festgestellt werden (KIEHN et al., 1996).

M. genavense konnte auch bereits aus Kotproben gesunder Papageienvögel isoliert werden. LEDWON et al. (2008) untersuchten Kotproben von gesunden Papageienvögeln aus Zoos und privaten Haushalten in Polen. Zum Zeitpunkt der Untersuchung wurde eine mykobakterielle Erkrankung ausgeschlossen. In 31 von 326 untersuchten Kotproben konnte DNA von *M. genavense* mittels PCR nachgewiesen werden, alle Kulturen blieben allerdings negativ. Die überwiegende Mehrzahl der Nachweise erfolgte bei Zoovögeln, nur eine positive Probe kam von einem Papageienvogel aus einem privaten Haushalt.

2.2.2. Erkrankungen beim Menschen und zoonotisches Potential

HIRSCHEL et al. (1990) beschrieben einen Patienten mit fortgeschrittenem acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), der an einer schweren, disseminierten Infektion mit einem unbekanntem Mykobakterium litt. Die Symptome ähnelten einer Infektion mit dem *Mycobacterium avium*-Komplex (MAC), die gekennzeichnet war durch Fieber, Gewichtsverlust und Durchfall. Anzuchtversuche auf konventionellen festen Medien waren erfolglos und Versuche an Mäusen zeigten, dass sich der Keim in athymischen Nacktmäusen vermehrte, in immunkompetenten Kontrollmäusen jedoch nicht. Die Untersuchung des Mykolsäuremusters ergab Ähnlichkeiten mit dem von *Mycobacterium simiae* und *Mycobacterium malmoense* (HIRSCHEL et al., 1990).

1992 berichteten BÖTTGER et al. über 18 Personen mit AIDS mit ähnlichem

Krankheitsbild, darunter auch der oben beschriebene Fall. Blut- und Gewebeprobe zeigten ein spärliches Wachstum in flüssigem Middlebrook 13A Medium, aber es erfolgte kein Wachstum auf festen Medien. Durch Amplifikation der 16S rRNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und anschließender Sequenzierung konnten die säurefesten Stäbchen als neues Mitglied des Genus Mykobakterium identifiziert werden, wofür der Name „*Mycobacterium genavense*“ vorgeschlagen wurde. Das neue Mykobakterium zählt zu den langsam wachsenden Mykobakterien und ist nahe verwandt mit *Mycobacterium simiae* (BÖTTGER et al., 1992). JACKSON et al. (1992) beschrieben ein anspruchsvolles Mykobakterium bei 2 AIDS-Patienten, welches nach Sequenzierung der 16S rRNA eine 99,86 prozentige Homologie mit der *M. genavense*-Sequenz zeigte. In flüssigem BACTEC-Medium konnte ein Wachstum festgestellt werden und nach 6 Monaten konnte der Erreger auf festem Middlebrook 7H9 Medium mit Charcoal und Hefeextrakt kultiviert werden (JACKSON et al., 1992).

Von dort an wurden weitere Fälle von *M. genavense* als Ursache disseminierter Infektionen bei humanen Immundefizienz-Virus (HIV)-positiven Erwachsenen in Europa (CHARLES et al., 2011; MASCHEK et al., 1994; PECHERE et al., 1995; THOMSEN et al., 1999; TORTOLI et al., 1998), Nordamerika (BESSESEN et al., 1993; COYLE et al., 1992; GAYNOR et al., 1994; SHAFRAN et al., 1995) und Südamerika (HADAD et al., 2003) beschrieben. Im Zeitraum von 1990 bis 1992 konnte *M. genavense* in der Schweiz als Ursache disseminierter mykobakterieller Infektionen in 12,8 % der Fälle bei HIV-positiven Personen nachgewiesen werden (PECHERE et al., 1995). Auch bei HIV-positiven Kindern konnten disseminierte *M. genavense*-Infektionen nachgewiesen werden (NADAL et al., 1993; REYMOND et al., 1995). Bei gesunden Kindern wurden bisher zervikale Lymphadenitiden (LIBEREK et al., 1996) und eine disseminierte Infektion (MIYOSHI et al., 2010) beschrieben.

Die häufigsten Symptome und klinischen Erscheinungen der disseminierten Infektion mit *M. genavense* gleichen einer Infektion mit Mykobakterien des MAC und sind geprägt von Fieber, Gewichtsverlust, gastrointestinalen Erscheinungen (Bauchschmerzen, Durchfall, Hepatosplenomegalie), geschwollenen Lymphknoten, Anämie und einer CD4+-Lymphozytenzahl von unter 100 Zellen/ μ l Blut (BÖTTGER et al., 1992; MASCHEK et al., 1994; PECHERE et al., 1995; TORTOLI et al., 1998). Seltener ist die Lunge betroffen, die in Röntgen- oder computertomographischen Untersuchungen Infiltrate oder Hohlrumbildung aufweisen kann (HOEFSLOOT et

al., 2012; MONILL et al., 2001; RAMMAERT et al., 2011). Dies kann sich mit Symptomen wie Husten und Dyspnoe äußern. Berichte über seltene Manifestationen von *M. genavense* bei AIDS-Patienten beschrieben eine solitäre Hirnmasse (BERMAN et al., 1994), Beteiligung der Haut mit Knotenbildung (FOURNIER et al., 1998) und eine Genitalinfektion (VERGNAUD et al., 1998).

Disseminierte *M. genavense*-Infektionen treten auch bei HIV-negativen Personen auf. Betroffen sind Personen, die eine angeborene oder erworbene Immunschwäche haben oder immunsupprimierende Medikamente einnehmen müssen. Solche Infektionen wurden beschrieben im Zusammenhang mit Organtransplantationen (CHARLES et al., 2011; DOGGETT & STRASFELD, 2011; LHUILLIER et al., 2012; NURMOHAMED et al., 2007), systemischen Lupus erythematoses-Infektionen (LORENZEN et al., 2009), Sarkoidosen (DUMOUCHEL-CHAMPAGNE et al., 2009; HOEFSLOOT et al., 2012), chronisch lymphatischen Leukämien (KREBS et al., 2000) oder anderweitig angeborener oder erworbener Immunkrankheiten oder Erkrankungen, die hochdosierte Immunsuppressiva benötigen (BOGDAN et al., 1997; HOEFSLOOT et al., 2012; TASSONE et al., 2012). Über eine lokalisierte subkutane Weichteilschwellung aufgrund von *M. genavense* wurde bei einer HIV-negativen, immunsupprimierten Frau berichtet (LEAUTEZ et al., 2000).

Mischinfektionen mit *M. genavense* und *M. avium* wurden ebenfalls bei AIDS-Patienten beschrieben (ALBRECHT et al., 1995; KIRSCHNER et al., 1994; TORTOLI et al., 1995b).

Vermutlich steht am Anfang einer Infektion die Besiedlung des Darms durch orale Aufnahme des Erregers, von wo der Erreger in andere Organe streut (BÖTTGER et al., 1992; MASCHEK et al., 1994; PECHERE et al., 1995). Eine aerogene Infektion wurde weniger in Betracht gezogen. Sie kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da lokalisierte Infektionen der Lunge bei Mensch und Tier beschrieben wurden (HOEFSLOOT et al., 2012; LUDWIG et al., 2009).

Die Infektionsquelle von *M. genavense* ist noch unklar, aber es wird vermutet, dass *M. genavense* ein in der Umwelt vorkommender opportunistischer Keim ist (BOIAN et al., 1997; BÖTTGER, 1994; PORTAELS et al., 1996). Diese These könnte durch das weltweite Auftreten von Erkrankungen unterstützt werden (BÖTTGER, 1994; PECHERE et al., 1995). Bei verschiedenen Tierspezies konnte *M. genavense* bisher nachgewiesen werden, darunter bei Ziervögeln wie zum Beispiel Wellensittich

(*Melopsittacus undulatus*) und Zebrafink (*Taeniopygia guttata*) (HOOP et al., 1993), zwei Frettchen (*Mustela putorius furo*) (LUCAS et al., 2000), eine FIV-positive Katze (HUGHES et al., 1999), ein Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) (LUDWIG et al., 2009), ein Riesenhörnchen (*Ratufa macroura*) (THEUSS et al., 2010), ein Hund (KIEHN et al., 1996) und ein Affe (*Lemur macaco mayottensis*) (STEIGER et al., 2003). *M. genavense* konnte mittels molekularbiologischer Nachweismethoden in Krankenhauswasserleitungen und Leitungswasser privater Haushalte nachgewiesen werden (BRIANCESCO et al., 2010; HILLEBRAND-HAVERKORT et al., 1999). In Darmgewebeproben HIV-negativer Personen ohne Hinweis auf eine mykobakterielle Erkrankung konnte DNA von *M. genavense* nachgewiesen werden, was ebenfalls eine ubiquitäre Verbreitung von *M. genavense* vermuten lässt (DUMONCEAU et al., 1995; DUMONCEAU et al., 1997).

Informationen über die Lebensweise infizierter Personen, wie zum Beispiel Aufenthaltsorte, Haustiere, Essgewohnheiten oder Informationen über den Gesundheitsstatus der Kontakttiere eines erkrankten Menschen, die auf eine potenzielle Infektionsquelle deuten könnten, fehlen häufig (CHARLES et al., 2011; MIYOSHI et al., 2010), sodass die Infektionsquelle unbekannt bleibt.

Für Personen mit einem intakten Immunsystem scheint *M. genavense* keine Gefahr darzustellen. Vor allem bei Personen mit einem stark supprimierten Immunsystem und Kindern sollten Tiere mit einer bestätigten Mykobakteriose aus dem Haushalt entfernt werden, da hier ein zoonotisches Risiko nicht ausgeschlossen werden kann (LENNOX, 2007; MANAROLLA et al., 2009; TELL et al., 2001). Da bisher noch nicht geklärt wurde, ob es Unterschiede zwischen humanen und aviären *M. genavense*-Stämmen gibt, kann ein zoonotisches Risiko ausgehend von Ziervögeln nicht ausgeschlossen werden (HOLSBOER BUOGO et al., 1997).

2.2.3. Nachweis

2.2.3.1. Mikroskopischer Nachweis

Mykobakterien weisen durch ihren speziellen Wandaufbau eine Säure-Alkoholfestigkeit auf, was bedeutet, dass der beim Färben aufgenommene Farbstoff nicht mehr durch Salzsäurealkohol entfernt werden kann (SCHLIESSER, 1985).

Auch Bakterien der Gattungen *Nocardia*, *Rhodococcus* und *Corynebacterium* können eine partielle Säurefestigkeit aufweisen (WAYNE & KUBICA, 1986).

Zur mikroskopischen Darstellung von Mykobakterien können verschiedene Färbetechniken angewendet werden. Die Färbung nach Ziehl-Neelsen ist hierbei die gebräuchlichste Methode (ROLLE & MAYR, 2002). Eine weitere Methode beruht auf dem Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie (SCHLIESSER, 1985).

Die mikroskopische Untersuchung von Organ- oder Kotproben kann relativ schnell erste Hinweise auf eine Mykobakteriose geben. Allerdings erlaubt diese Methode keine Speziesdifferenzierung und lässt im positiven Fall nur die Diagnose „säurefeste Stäbchen nachgewiesen“ zu (ROLLE & MAYR, 2002). Zudem ist diese Methode nicht sehr sensitiv, da zum Nachweis Keimmengen von etwa 10^4 bis 10^5 pro Milliliter benötigt werden (SCHLIESSER, 1985).

Bei der Ziehl-Neelsen-Färbung werden Mykobakterien durch den Farbstoff Karbolfuchsin rot angefärbt. Durch Erhitzen dringt der Farbstoff in die Zellwand der Mykobakterien ein und verbleibt dort auch nach dem Entfärben mit Salzsäurealkohol. Für die Gegenfärbung wird Methylenblau verwendet. Im Anschluss wird das Präparat bei einer 1000fachen Vergrößerung angeschaut und die Mykobakterien erscheinen rot auf blauem Hintergrund (SCHLIESSER, 1985) (Abbildung 1). Typisch für *M. genavense* ist das Auftreten von kokkoiden Stäbchen im mikroskopischen Präparat (BÖTTGER et al., 1993).

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden die Mykobakterien mit dem fluoreszierenden Farbstoff Auramin angefärbt, wodurch sie unter ultraviolettem Licht goldgelb auf schwarzem Hintergrund erscheinen. Diese Methode ist im Gegensatz zur Ziehl-Neelsen-Färbung sensitiver und das Präparat kann hier bei einer 40fachen Vergrößerung angeschaut werden, sodass eine größere Fläche in kürzerer Zeit angeschaut werden kann (SCHLIESSER, 1985).

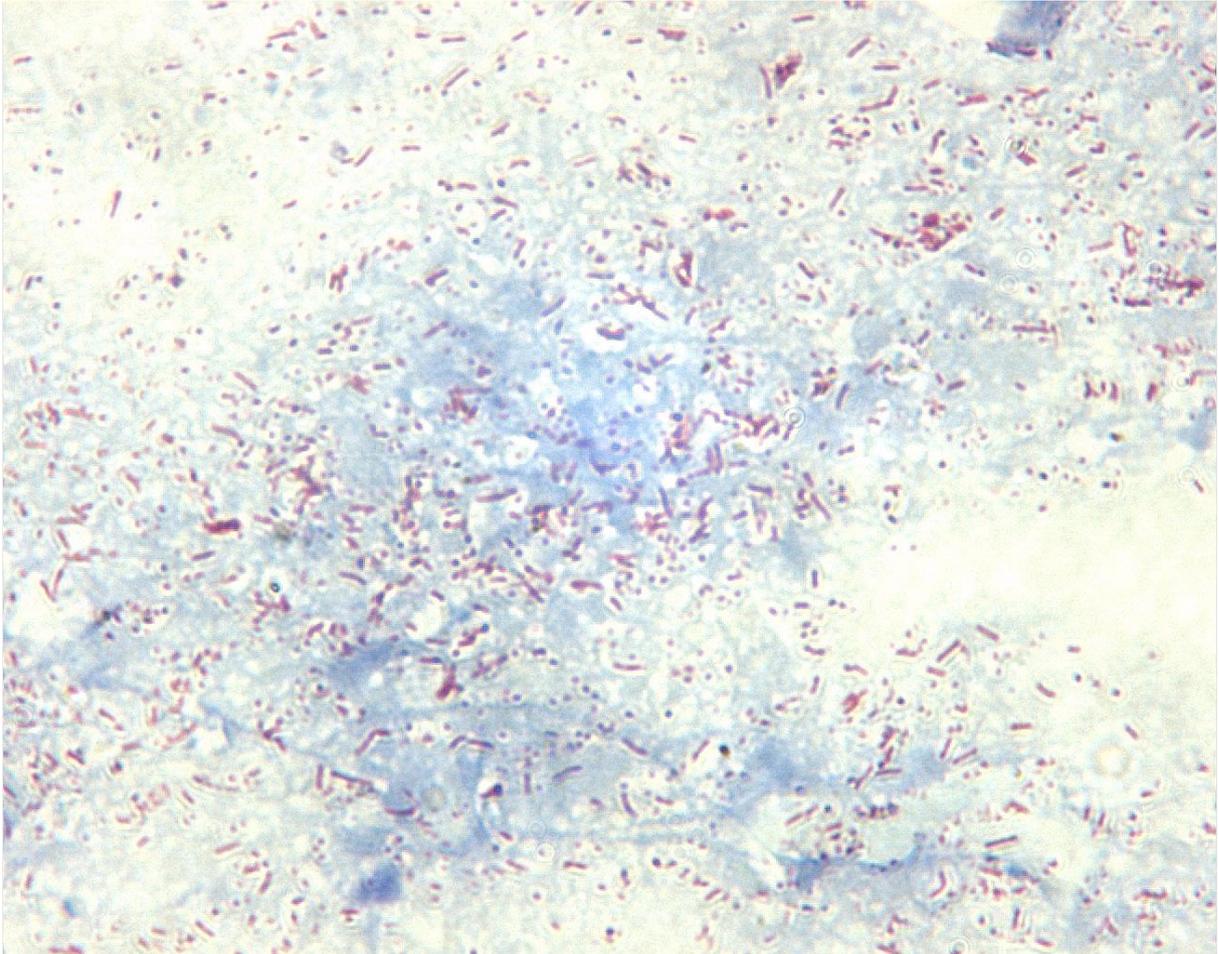


Abbildung 1: Die Abbildung zeigt das Quetschpräparat einer Umfangsvermehrung am Augenlid eines Wellensittichs. Die Mykobakterien erscheinen rot auf blauem Hintergrund. Mittels PCR konnte hier *M. genavense* nachgewiesen werden. Deutlich erkennbar auch die kokkobazilläre Erscheinung von *M. genavense*.

2.2.3.2. Anzucht und deren Besonderheiten

M. genavense ist ein langsam wachsender und sehr anspruchsvoller Keim und wächst in vielen Fällen nicht auf festen Medien (BÖTTGER et al., 1993; BÖTTGER et al., 1992; DOGGETT & STRASFELD, 2011; HIRSCHL et al., 1990; RAMIS et al., 1996). In einigen Fällen konnte ein Wachstum auf festen Standardmedien erreicht werden (Löwenstein-Jensen Medium, Middlebrook 7H11, Middlebrook 7H10), meist aber nur spärlich und mit einer langen Inkubationszeit von bis zu 6 Monaten (BESSESEN et al., 1993; COYLE et al., 1992; HOOP et al., 1996; PORTAELS et al., 1996; THOMSEN et al., 1999). Mycobactin J kann ein Wachstum auf festen Medien

zur Subkultivierung fördern (COYLE et al., 1992). Feste Medien werden allerdings nicht zur Primärisolierung von *M. genavense* empfohlen (BÖTTGER et al., 1993; HOOP et al., 1996).

Zur Erstisolierung von *M. genavense* werden Flüssigmedien, wie zum Beispiel Middlebrook 7H12 Medium, BACTEC13A Medium, Middlebrook 7H9 Medium, BACTEC Pyrazinamidase Test Medium mit einer 8- bis 12- wöchigen Inkubationszeit, empfohlen (BÖTTGER et al., 1993; COYLE et al., 1992; HOOP et al., 1996). Gute Wachstumserfolge können mit dem radiometrischen BACTEC-System erzielt werden, wobei hier für Gewebeproben von Mensch und Tier das BACTEC 12B Flüssigmedium verwendet wird (HOOP et al., 1996; REALINI et al., 1997; THOMSEN et al., 1999). Der Nachweis beruht auf der Entstehung von $^{14}\text{CO}_2$ aus radioaktiv markierter Palmitinsäure, das im BACTEC 460TB-System detektiert wird (RICHTER, 2009). Aufgrund der arbeitssicherheitsbezogenen Probleme bei Verwendung von Radioaktivität wurden aber zunehmend andere Systeme entwickelt. Dazu zählen fluorometrische Systeme, wie das manuelle BBL MGIT System oder automatisierte Systeme, wie das BACTEC MGIT 960 System (RICHTER, 2009). In beiden Systemen konnte *M. genavense* aus Vogelorganen angezüchtet werden (SHITAYE, 2010).

REALINI et al. (1999) testete verschiedene weitere Medien für die Anzucht, da ein Nachweis von *M. genavense* mittels PCR oder BACTEC-System wie er beispielsweise von HOOP et al. (1996) empfohlen wurde, in vielen Laboratorien nicht möglich ist. Dabei erzielte Middlebrook 7H11 Agar mit Schafblut und Charcoal bei einem pH-Wert von $6,2 \pm 0,2$ die besten Ergebnisse (REALINI et al., 1999).

In Untersuchungen über verschiedene Kulturbedingungen konnte gezeigt werden, dass ein saurer pH-Wert von 5,5 bis 6 und eine mikroaerophile Bebrütung das Wachstum von *M. genavense* fördert (HOOP et al., 1993; HOOP et al., 1996; REALINI et al., 1997; THOMSEN et al., 1999; TORTOLI et al., 1994b). Als optimale Wachstumstemperatur wurde 37°C ermittelt, wobei in saurem Milieu noch ein geringes Wachstum bei 32°C und 42°C erreicht werden konnte (TORTOLI et al., 1994a; TORTOLI et al., 1994b).

HOOP et al. (1993) beschrieben eine Kultivierung von *M. genavense* aus Gewebeproben von Vögeln in Middlebrook 7H12 mit PANTA (Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim, Azlocillin) sowie mit und ohne

Mycobactin J. Einige Stämme wuchsen mit und ohne Mycobactin, andere wiederum nur ohne Mycobactin (HOOP et al., 1993). Bei SHITAYE et al. (2010) führt Middlebrook 7H9 mit Zugabe von OADC und PANTA zu einem positiven Anzuchtergebnis.

Andere Untersuchungen zeigen, dass gewisse Zusätze wie Mycobactin, Polyoxyethylen Stearat und PANTA zu einer Wachstumshemmung von *M. genavense* in flüssigen Primärkulturen führen können (REALINI et al., 1997; TORTOLI et al., 1994a). REALINI et al. (1997) empfahlen daher Middlebrook 7H12 Medium ohne Zusätze mit einem pH von 6,0 im BACTEC-System zur Primärisolierung von *M. genavense*. Es zeigte sich, dass sich verschiedene *M. genavense*-Stämme sehr unterschiedlich verhalten können. Faktoren wie Art des Mediums, Dekontaminationsmethode und Sauerstoffgehalt beeinflussten die Erstisolierung von *M. genavense* (REALINI et al., 1998). Gegenüber Dekontaminationsprozessen scheint *M. genavense* sensibel zu sein (PORTAELS et al., 1996; REALINI et al., 1998).

Aufgrund der Schwierigkeiten in der Anzucht werden phänotypische und biochemische Test zur Identifizierung von *M. genavense* deutlich erschwert, weshalb in vielen Fällen molekularbiologische Methoden zur endgültigen Identifizierung benötigt werden (BOIAN et al., 1997; BÖTTGER et al., 1992; HOOP et al., 1996; PORTAELS et al., 1996).

Zahlreiche Publikationen belegen falsch negative Ergebnisse von Anzuchtversuchen. So wurde zwar in Kotproben von Papageienvögeln mittels PCR DNA von *M. genavense* nachgewiesen, Anzuchtversuche auf Middlebrook 7H11 mit Mycobactin J blieben aber negativ (LEDWON et al., 2008a). Bei vier Kanarienvögeln (*Serinus canarius*) konnte *M. genavense* ebenfalls mittels PCR aus Gewebeproben identifiziert werden, auch wenn bei Anzuchtversuchen auf Coletsos Medium und Löwenstein-Jensen Medium ohne Glycerol nach 6 Monaten kein Wachstum festgestellt werden konnte (RAMIS et al., 1996). Aus Bindehautmaterial eines Frettchens konnte *M. genavense* mittels PCR identifiziert werden (LUCAS et al., 2000). Anzuchtversuche blieben allerdings negativ. Im Routinelabor waren Ogawa Eimedium und Blutagar nach 17 Tagen negativ. In einem Referenzlabor waren Löwenstein-Jensen Medium (mit und ohne Zusatz von Pyruvat oder Eisen), Middlebrook halbfester Agar und BACTEC 12B Flüssigmedium nach 8 Wochen

negativ (LUCAS et al., 2000).

2.2.3.3. Molekularbiologische Nachweismethoden für *M. genavense*

Molekularbiologische Methoden gewinnen in der mykobakteriellen Diagnostik immer mehr an Bedeutung. Diese Methoden können Mykobakterien schnell identifizieren und bieten die Möglichkeit der Spezies- bis hin zur Subspeziesdifferenzierung. Gerade bei schwer anzüchtbaren Mykobakterien, wie *M. genavense*, stellen molekularbiologische Untersuchungsmethoden oftmals die einzige Möglichkeit dar, diesen Erreger aus Gewebeproben zu identifizieren (CHEVRIER et al., 1999; HOOP et al., 1996).

Eine häufig angewendete Methode zur Identifizierung von Mykobakterien ist die Vervielfältigung von DNA mittels PCR mit anschließender Sequenzierung (EDWARDS et al., 1989; ROGALL et al., 1990). Zuvor muss die DNA aus den Mykobakterien extrahiert werden, was direkt aus klinischem Material und aus Bakterienkulturen möglich ist. Die Methode beruht auf der Amplifikation der DNA mit spezifischen Primern und anschließender Sequenzierung der Amplikons. Die entstehende Sequenz wird mit bereits bekannten Gensequenzen aus Gendatenbanken verglichen. Es gibt verschiedene Zielsequenzen, die für die Amplifikation ausgewählt werden können. *M. genavense* wurde erstmals auf Basis des 16S rRNA-Gens nachgewiesen (BÖTTGER et al., 1992). In den folgenden Jahren wurde die 16S rDNA häufiger als Zielsequenz gewählt (HOOP et al., 1993; KIRSCHNER et al., 1993; PORTAELS et al., 1996), wobei auch das Hitzeschockprotein 65 (hsp65)-Gen (PAI et al., 1997), die 16-23S rDNA Internal Transcribed Spacer Region (ROTH et al., 1998) und das DNAJ-Gen (GOMEZ et al., 2011) als Zielsequenz eingesetzt wurden.

CHEVRIER et al. (1999) isolierten ein 1,7-kb langes Fragment aus *M. genavense*-Stämmen, welches anhand von Untersuchungen basierend auf der Southern Blot Hybridisierung, PCR und Sandwich Hybridisierung als spezifisch für *M. genavense* angesehen wurde. Andere Hybridisierungsmethoden wie beispielsweise die Oligonucleotide Specific Capture Plate Hybridization (OSCPH) und die Methodik der Reversen Hybridisierung wurden zum Nachweis von verschiedenen Mykobakterienspezies, darunter auch *M. genavense*, basierend auf der 16S rRNA-

Gensequenz entwickelt (DE BEENHOUWER et al., 1995; KOX et al., 1997; SANGUINETTI et al., 1998).

Die Gensonden-Technik, basierend auf dem Prinzip der reversen Hybridisierung, hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen, da mittlerweile kommerzielle Kits zur Verfügung stehen. Die Streifensondentechnik beinhaltet die Amplifikation von Mykobakterien-DNA mittels PCR unter Verwendung biotinylierter Primer und eine anschließende Hybridisierung der PCR-Produkte mit spezies-spezifischen Gensonden in Form einer reversen Hybridisierung. Die Hybridisierungssonden sind dabei auf einer streifenförmigen Matrix in parallelen Linien angeordnet, und die Hybridisierung wird mittels Farbreaktion sichtbar (NEONAKIS et al., 2008). Zum Nachweis von *M. genavense* und weiteren klinisch wichtigen Mykobakterienarten aus Probenmaterial, Fest- und Flüssigkulturen kann das INNO-LiPA-Mycobacteria v2-System (Innogenetics, Gent, Belgien) verwendet werden (HOEFSLOOT et al., 2012; TORTOLI et al., 2003; TRUEBA et al., 2004). Dieser Test basiert auf der Amplifizierung der 16-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region. Ein weiteres Kit, welches die Streifensondentechnik verwendet, ist das GenoType Mycobacterium CM/AS Kit (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland), welches auf der Amplifizierung des 23S rRNA-Gens basiert. Mit diesem Kit konnte *M. genavense* aus Darmgewebeproben eines Schwarzohrpapageis (*Pionus mentruus*) identifiziert werden, bei dem eine Mykobakteriose diagnostiziert wurde (SHITAYE, 2010).

Neben konventionellen PCR-Techniken, wurden in den letzten Jahren Realtime-PCR-Systeme verwendet. Bei dieser Technik werden die bei der konventionellen PCR anfallenden Teilschritte der Amplifikation und Detektion in einem Schritt vereint. Mit Hilfe von DNA-Farbstoffen oder fluoreszierenden Sonden kann sowohl ein qualitativer als auch quantitativer Nachweis stattfinden (SCHALASTA, 2009). Eine für den Nachweis von *M. genavense* und den *M. avium*-Komplex aus Gewebeproben von Vögeln entwickelte Realtime-PCR verwendet fluoreszierende Taqman-Sonden. Als Zielsequenz wurde hier das hsp65-Gen ausgewählt. Eine Differenzierung zwischen den nachzuweisenden Spezies war allerdings nicht möglich und eine Ermittlung der Nachweisgrenze erfolgte hier nicht (TELL et al., 2003c). Mittels SYBR Green Realtime-PCR basierend auf dem hypothetischen 21 kDa-Protein-Gen konnte LEDWON et al. (2009) *M. genavense* aus Leber, Milz und Lunge eines Katharinasittichs (*Bolborhynchus lineola*) nachweisen. Über eine Ermittlung der Nachweisgrenze ist nichts beschrieben. Eine weitere Realtime-PCR-Methode zur

Differenzierung von 18 Mykobakterienarten bis zur Gattungs- oder Speziesebene wurde unter Verwendung von unterschiedlichen „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET)-Sonden in Kombination mit Schmelzkurvenanalysen entwickelt. Als Zielsequenz wurde das *rpoB*-Gen ausgewählt. Mit diesem Test konnten humanrelevante Mykobakterienspezies identifiziert und differenziert werden. *M. genavense* und *M. simiae* konnten allerdings mit den verwendeten Sonden und ermittelten DNA-Schmelztemperaturen nicht differenziert werden (LIM et al., 2008).

Bei der PCR-Restriktionsanalyse oder PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusanalyse (PCR-RFLP) werden DNA-Abschnitte zuerst mittels PCR amplifiziert und im Anschluss mit sogenannten Restriktionsendonukleasen geschnitten. Dabei entstehen unterschiedlich lange Fragmente der PCR-Produkte, die gelelektrophoretisch aufgetrennt werden und zu charakteristischen Bandenmustern, sogenannten Restriktionskarten, führen. Eine Identifizierung bis auf Speziesebene ist möglich. Häufig wird das *hsp 65*-Gen als Zielsequenz gewählt, somit kann unter anderem auch *M. genavense* identifiziert werden (BOIAN et al., 1997; LECLERC et al., 2000; MENDENHALL et al., 2000; PALMIERI et al., 2012; TELENTI et al., 1993). Als weitere Zielsequenz wurde auch die 16-23S rDNA Spacer Region (ROTH et al., 2000) und das 16S rRNA-Gen (BOIAN et al., 1997) verwendet.

2.2.3.4. Sonstige Nachweismethoden

Es gibt verschiedene biochemische Tests, die zur Identifizierung von Mykobakterienspezies hergenommen werden. Für diese Tests wird eine große Menge an Kulturmateriale benötigt. Daher ist ein Nachweis von *M. genavense* mittels biochemischer Tests oftmals schwierig oder unmöglich (COYLE et al., 1992). Biochemische Charakteristika für *M. genavense* beinhalten unter anderem fehlende Pigmentbildung und Nitratreduktion, positiver Urease-, Katalase- und Pyrazinamidasetest und negativer Niacin-, Tweenhydrolyse- und Arylsulfatasetest (COYLE et al., 1992).

Mykobakterienspezies können anhand ihres Mykolsäuremusters identifiziert werden. Für die Mehrheit der häufig vorkommenden Mykobakterienspezies sind die Mykolsäureprofile bereits bekannt. Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

(HPLC) wurde das Mykolsäuremuster von *M. genavense* und *M. simiae* untersucht, die beide ein trimodales Muster aufweisen, *M. genavense* aber die terminale Spitze der dritten Gruppe fehlt (COYLE et al., 1992; RITTER et al., 1996; TORTOLI et al., 1995a). Untersuchungen zum Mykolsäuremuster mittels Dünnschichtchromatographie (TLC) zeigten, dass *M. genavense* mit *M. simiae* und *M. malmoense* eng verwandt ist (HIRSCHEL et al., 1990).

Weiterhin können Mykobakterienspezies anhand ihres Fettsäuremusters mittels Gas-Flüssigkeits-Chromatographie (GLC) identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass die Muster von *M. genavense* und *M. fortuitum* sehr ähnlich sind, was zu Verwechslungen führen kann (COYLE et al., 1992).

2.3. Weitere beim Vogel nachgewiesene Mykobakterien

2.3.1. Atypische Mykobakterien beim Vogel

Bei den atypischen Mykobakterien ist neben *M. genavense* vor allem *M. avium* ssp. *avium* Serotyp 1-3, in Einzelfällen auch *M. intracellulare*, Ursache für aviäre Mykobakteriosen (HOOP et al., 1996; MANAROLLA et al., 2009; TELL et al., 2001). *M. avium* ssp. *silvaticum* wurde bisher vor allem bei Ringeltauben nachgewiesen (GERLACH, 1994).

Die aviäre Mykobakteriose kann jede Vogelspezies treffen. Aufgrund heutiger Haltungsformen des Mastgeflügels mit hohen Hygienestandards, regelmäßigen Gesundheitskontrollen und einer kurzen Lebensdauer der Tiere spielt diese Infektion in großen Geflügel- und Putenhaltungen nur noch eine geringe Rolle (MARTIN & SCHIMMEL, 2000). Heutzutage betrifft die Erkrankung überwiegend Zier-, Zoo- und Wildvögel, sowie extensive Geflügelhaltungen (MARTIN & SCHIMMEL, 2000; TELL et al., 2001).

M. avium löst meist eine systemische Infektion aus, mit unspezifischen klinischen Symptomen wie chronische Abmagerung bei erhaltenem Appetit, Durchfall, Polyurie, Anämie und stumpfes Gefieder (GERLACH, 1994). Die klassische Form mit charakteristischen Granulomen in Organen vor allem in Darmtrakt, Leber, Milz und Knochenmark betrifft häufig Vögel der Ordnungen Falconiformes, Accipitriformes,

Strigiformes, Phasianiformes, Charadriiformes, Ciconiiformes, Cuculiformes, Piciformes und Ralliformes (GERLACH, 1994). Bei einem Weißkopfseeadler (*Haliaeetus leucocephalus*) führte beispielsweise *M. avium* ssp. *avium* zu einer generalisierten Infektion mit multiplen Granulomen in Lunge, Mesenterium, Pharynx, Pleura und Leber. Weiterhin zeigte der Vogel eine große subkutane Umfangsvermehrung am rechten Ellbogen, aus der *M. avium* ssp. *avium* isoliert werden konnte (HOENERHOFF et al., 2004). Bei einer Wildpute konnten in der Leber typische Granulome nachgewiesen werden, die ebenfalls durch *M. avium* ssp. *avium* ausgelöst wurden (GERHOLD & FISCHER, 2005).

Die nicht-tuberkulöse Form, wie bereits beschrieben, die mit unspezifischen Organveränderungen und fehlenden Granulomen einhergeht, betrifft häufig Columbiformes, Anatiformes, Passeriformes und die Mehrheit der Psittaciformes. Verschiedene Papageienvögel sind anfällig für die paratuberkulöse Form (GERLACH, 1994).

Beschrieben sind bei Vögeln verschiedener Ordnungen auch okuläre Manifestationen, die sowohl die äußeren Strukturen (Konjunktiva, Tränendrüse), als auch die inneren Augensegmente betreffen können (KORBEL, 1997; POCKNELL et al., 1996).

Weitere atypische Mykobakterien werden seltener beim Vogel nachgewiesen. Bei Ziervögeln mit einer diagnostizierten Mykobakteriose konnte bei zwei Vögeln der Familie Melopsittidae *M. fortuitum*, bei einem Vogel der Unterfamilie Amazoninae *M. gordonae* und bei einem Kanarienvogel (*Serinus canaria*) *M. nonchromogenicum* nachgewiesen werden (HOOP et al., 1996). *M. fortuitum* konnte aus dem Darm eines Muskatfinken (*Lonchura punctulata*) isoliert werden, wo ebenfalls säurefeste Stäbchen bakteriologisch und histologisch in Lunge und Leber nachgewiesen werden konnten (HOLSBOER BUOGO et al., 1997). Bei drei Mäusebussarden (*Buteo buteo*) konnte *M. fortuitum* und *M. terrae* aus einer Krallenentzündung isoliert werden. Bei einer Sturmmöwe (*Larus canus*) konnte eine granulomatöse Darmentzündung durch *M. nonchromogenicum* festgestellt werden. Bei einer Dohle (*Corvus monedula*) konnte aus einer Schnabel- und Fußentzündung *M. fortuitum* isoliert werden. Bei einem Fasan (*Phasianus colchicus*) wurde *M. flavescens* in einer Leber- und Milznekrose nachgewiesen (SMIT et al., 1987). In einem australischen Zoo wurde ein Ausbruch mit *M. peregrinum* in einer Voliere mit Gouldamadinen (*Erythrura*

gouldiae) beschrieben. Bei einigen Tieren konnte eine Hepatitis und Enteritis festgestellt werden. Eine Gouldamadine zeigte in der histopathologischen Untersuchung eine schwere granulomatöse Splenitis, lymphoplasmazytäre Hepatitis und pyogranulomatöse Bronchitis (VITALI et al., 2006).

M. avium ssp. *hominissuis* konnte aus Organläsionen von Wasservögeln isoliert werden (DVORSKA et al., 2007). Bei einer Blaustirnamazone (*Amazona aestiva*) führte *M. avium* ssp. *hominissuis* zu einer systemischen Infektion mit Aszites, Leber- und Milzschwellung und einer hämorrhagischen Enteritis (SHITAYE et al., 2009).

Bei einem Diamantfink (*Emblema guttata*) mit Durchfall und respiratorischen Symptomen konnte in Leber und Darm *M. avium* ssp. *paratuberculosis* nachgewiesen werden. In der Sektion konnte eine Hepato- und Splenomegalie festgestellt werden und die Leber wies 1 bis 2 mm im Durchmesser große Umfangsvermehrungen auf (MIRANDA et al., 2009). In einer Überwachungsstudie zur Verbreitung von *M. avium* ssp. *paratuberculosis* in einem deutschen Zoo konnte aus Kotproben von Vögeln der Spezies Schneeeule (*Bubo scandiacus*), Papagei (*Ara*), Geierperlhuhn (*Acryllium vulturinum*) und Emu (*Dromaius novaehollandiae*) DNA von *M. avium* ssp. *paratuberculosis* mittels PCR nachgewiesen werden. Als die Kotproben gesammelt wurden, gab es keinen Fall einer klinischen Paratuberkulose (MUNSTER et al., 2013).

2.3.2. Mykobakterien des Tuberkulosekomplexes beim Vogel

Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis* oder *Myobacterium bovis* stellen eine seltene Ursache von mykobakteriellen Infektionen bei Vögeln dar (SCHMIDT et al., 2003; TELL et al., 2001). Berichte über *M. tuberculosis* infizierte Vögel betreffen fast ausschließlich *Psittaciformes*. Veränderungen befinden sich häufig im Kopfbereich und in der Schnabelhöhle und wurden in Form von exophytischen Hautveränderungen, sublingualen Knoten, Granulomen in der Larynxregion, auf der Zunge, an der Glottis und Granulomen am Augenlid, an den Konjunktiven und in der Membrana nictitans beschrieben (ACKERMAN et al., 1974; PETERS et al., 2007; SCHMIDT et al., 2008; WASHKO et al., 1998). Primärläsionen können sich aber auch als Weichteilschwellung an den Gliedmaßen, zum Teil mit Knochenbeteiligung, darstellen (HOOP, 2002; LANTERI et al., 2011; STEINMETZ et al., 2006). Zusätzlich

konnte nach makroskopischer und histologischer Untersuchung regelmäßig eine systemische Beteiligung, in Form von Granulomen in Lunge, Leber und anderen Organen, festgestellt werden (ACKERMAN et al., 1974; HOOP, 2002; LANTERI et al., 2011; PETERS et al., 2007; SCHMIDT et al., 2008; STEINMETZ et al., 2006; WASHKO et al., 1998). 2002 wurde erstmals ein Kanarienvogel mit einer *M. tuberculosis* Infektion beschrieben. Der Vogel zeigte in der Sektion eine käsige Umfangsvermehrung in der Lunge und Veränderungen an Leber und Darm (HOOP, 2002).

Infektionsquelle und Übertragungswege sind noch nicht vollkommen geklärt, aber in einigen Fällen vermutet man eine Übertragung vom Menschen auf den Vogel. In diesen Fällen fütterten die nachweislich an Lungentuberkulose erkrankten Kontaktpersonen die Papageien vom Mund in den Schnabel oder über vorgekauhtes Futter (PETERS et al., 2007; SCHMIDT et al., 2008; STEINMETZ et al., 2006; WASHKO et al., 1998). Eine Übertragung könnte über den Mund beziehungsweise Sputum oder via Aerosol stattgefunden haben (HOOP, 2002; SCHMIDT et al., 2008). In zwei Fällen wurden die humanen und aviäre Isolate miteinander verglichen und es konnten identische Spoligotyping Muster festgestellt werden (PETERS et al., 2007; SCHMIDT et al., 2008).

Verschiedene Vogelarten wurden mit *M. bovis* experimentell infiziert. In einem Versuch wurden Stare und Krähen intraperitoneal oder oral mit *M. bovis* infiziert. Keines der Tiere zeigte klinische Symptome. Nach intraperitonealer Infektion konnte bei drei von vier Staren und bei zwei von vier Krähen *M. bovis* aus Gewebe kultiviert werden, allerdings nicht aus dem Kot. Kultur-positive Tiere zeigten auch histologische Veränderungen (BUTLER et al., 2001). Mit *M. bovis* infizierte Tauben zeigten nach oraler oder intratrachealer Gabe nach 90 Tagen post infectionem keine klinischen Symptome. Zwei der 6 intratracheal infizierten Tauben zeigten histologisch Granulome in der Lunge beziehungsweise Leber. Eine Ausscheidung von *M. bovis* mit dem Kot konnte bei zwei Tieren an Tag 1 und bei einem Tier an Tag 60 nach der Infektion festgestellt werden. Bei drei Tieren konnte *M. bovis* aus Gewebe kultiviert werden (FITZGERALD et al., 2003). Bei Stockenten konnten nach oraler und intratrachealer Verabreichung von *M. bovis* keinerlei makroskopische und histologische Veränderungen festgestellt werden und alle Kotproben waren negativ. Lediglich bei einer intratracheal infizierten Ente konnte *M. bovis* nach 30 Tagen post

infectionem isoliert werden (FITZGERALD et al., 2005). Wellensittiche wurden unter anderem intramuskulär mit *M. tuberculosis* und *M. bovis* infiziert. Dabei zeigte sich, dass *M. bovis* deutlich pathogener für Wellensittiche war als *M. tuberculosis* (LEDWON et al., 2008b).

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Mykobakterien - Referenzstämme

Zur Testung der Spezifität der Realtime-PCR wurden 20 Referenzstämme der Mykobakterienspezies und -subspezies *M. avium*, *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *silvaticum*, *M. avium* ssp. *hominissuis*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. malmoense*, *M. fortuitum*, *M. simiae*, *M. marinum* und *M. genavense* getestet. In Tabelle 2 sind die Herkunft der verschiedenen Mykobakterienspezies und deren Bezeichnung dargestellt. *M. genavense*-Stamm 177414/08 und 1603/04, ebenso wie *M. marinum*, wurden in flüssiger Kultur zur Verfügung gestellt. *M. genavense*-Stamm N86/04 und N87/04 lagen als lyophilisierte DNA vor. Die weiteren Stämme lagen bereits als tiefgefrorene DNA vor.

3.1.2. Kotproben

Zur Bestimmung der Sensitivität der entwickelten PCR wurde Kot von spezifiziert pathogenfreien (SPF) Tauben mit *Mycobacterium genavense* unterschiedlicher Konzentrationen gespickt. Die Tiere stammten aus einem SPF-Bestand der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München. Die 20 SPF-Tauben der Rasse Texaner wurden unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen gehalten und zur Aufrechterhaltung des SPF-Status in regelmäßigen Abständen auf infektiöse Erreger einschließlich Mykobakterien untersucht. Die Untersuchungen fielen immer negativ aus.

Tabelle 2: Herkunft und Bezeichnung der Mykobakterien –Referenzstämme

Referenzstamm	Stamm-Bezeichnung	Herkunft
<i>M. genavense</i>		LGL Oberschleißheim
<i>M. genavense</i>	Stamm 177414/08	Institut für medizinische Mikrobiologie, Universität Zürich
<i>M. genavense</i>	Stamm 1603/04	Institut für medizinische Mikrobiologie, Universität Zürich
<i>M. genavense</i>	Stamm N86/04	Institut für medizinische Mikrobiologie, Universität Zürich
<i>M. genavense</i>	Stamm N87/04	Institut für medizinische Mikrobiologie, Universität Zürich
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	DSM 44156	DSMZ
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	M.a.a. FLI	FLI Jena
<i>M. avium</i> spp. <i>avium</i>	Stamm Av 56	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen
<i>M. avium</i>		LGL Oberschleißheim
<i>M. avium</i> ssp. <i>silvaticum</i>	DSM 44175	DSMZ
<i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i>		FLI Jena
<i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i>	M.a.h. 1	LGL Oberschleißheim

Referenzstamm	Stamm-Bezeichnung	Herkunft
<i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i>	M.a.h. 2	LGL Oberschleißheim
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	M.a.p. 1	LGL Oberschleißheim
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	M.a.p. 2	LGL Oberschleißheim
<i>M. intracellulare</i>		LGL Oberschleißheim
<i>M. simiae</i>		LGL Oberschleißheim
<i>M. malmoense</i>		LGL Oberschleißheim
<i>M. fortuitum</i>		LGL Oberschleißheim
<i>M. marinum</i>		LGL Oberschleißheim

3.1.3. Patientenproben

Von Februar 2011 bis Februar 2012 wurden Organproben von 265 Papageien- und Finkenvögeln gesammelt, die routinemäßig an der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische der Ludwig-Maximilians-Universität München pathologisch-anatomisch untersucht wurden. 214 Vögel gehörten der Ordnung Psittaciformes und 51 Vögel der Ordnung Passeriformes an. Die Taxonomie mit lateinischer und deutscher Bezeichnung sowie die Anzahl der untersuchten Vögel sind in Tabelle 9 (siehe Anhang) dargestellt. 232 Tiere stammten aus Privathaltungen, 15 Tiere aus dem Bestand der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische, 14 Vögel aus anderen Einrichtungen wie Zoo, Tierheim oder Freizeitpark und 4 Tiere waren unbekannter Herkunft, da sie als Fundvögel in die Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische eingeliefert wurden. Für die Untersuchung standen insgesamt 265 Leberproben, 264 Darmproben und 181 Milzproben zur Verfügung. Zusätzlich wurden makroskopisch auffällige Organe entnommen. Dazu zählten 13x Lunge, 4x Augenlid, 5x Umfangsvermehrungen an Gelenken, 2x Knochenmark, 3x

Niere, 3x Drüsenmagen, 2x Luftsack, 2x Bürzeldrüse, 1x Hoden, 2x subkutane Umfangsvermehrungen (1x in der Halsregion und 1x am Ohr), 1x Pankreas, 1x Auge, 1x Hirn und 1x Aorta. Bei einer positiven Ziehl-Neelsen-Färbung wurden die Organe eines Tieres getrennt in der PCR untersucht.

3.2. Methoden

3.2.1. Pathologisch-anatomische Untersuchung

Jedes Tier wurde vor der Entnahme der zu untersuchenden Organproben einer pathologisch-anatomischen Untersuchung unterzogen. Festgehalten wurde das äußere Erscheinungsbild wie Gefiederzustand, Schnabel- und Krallenwachstum. Der Ernährungszustand wurde anhand des Gewichtes, der Brustmuskulatur und des Herzkranzfettes beurteilt. Weiterhin wurden alle wichtigen Organsysteme beurteilt. Es wurden Veränderungen jeder Art festgehalten. Dazu zählte Vergrößerung/Schwellung des Organs, Farbänderungen, Umfangsvermehrungen, Konsistenz, Auflagerungen, Oberflächenbeschaffenheit und Schnittfläche. Die Veränderungen wurden von geringgradig bis höchstgradig beurteilt. Besonderes Augenmerk wurde auf die Untersuchung der häufig mit Mykobakterien befallenen Organe wie Leber, Milz und Magen-Darm-Trakt gelegt.

Die entnommenen Organe wurden getrennt voneinander in Zwölflochplatten aufbewahrt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

3.2.2. Anzucht von *Mycobacterium genavense*

Die Anzucht der *M. genavense*-Stämme erfolgte am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Zürich. Die Anzucht wurde bei 37°C in flüssigem Middlebrook 7H9 Medium angereichert mit OADC und Mycobactin pH 6.8 im automatischen BACTEC MGIT 960 Mycobacterial Detection System (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) durchgeführt.

3.2.3. Spicken von Kotproben

Zur Bestimmung der Sensitivität der entwickelten Realtime-PCR wurde Kot von SPF-Tauben mit einem suspendierten *M. genavense*-Stamm in unterschiedlichen Konzentrationen gespickt. Die Nachweisgrenze wurde mittels PCR und im Vergleich dazu mittels Ziehl-Neelsen-Färbung ermittelt.

Zu Beginn wurde dem Kot physiologische Kochsalzlösung zugegeben, um eine homogene, knetbare Konsistenz zu erhalten. Im Anschluss wurde der Kot in Portionen je 15 Gramm in Schraubbechern abgewogen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Zum Spicken der Kotproben wurde eine *M. genavense*-Suspension mit dem Stamm 177414/08 verwendet. Um die Bakterienkonzentration in der Stammlösung zu bestimmen, wurde 1 µl einer 1:100 Verdünnung der *M. genavense*-Suspension auf einen Objektträger aufgebracht und nach Ziehl-Neelsen gefärbt. Bei einer 1000fachen Vergrößerung wurden die Mykobakterien mikroskopisch ausgezählt, dabei ergab sich eine Konzentration von 4×10^8 Mykobakterien pro ml. Die Stammlösung wurde 1:53 verdünnt und von dieser Verdünnung ausgehend, wurden weitere Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1: 100.000 angefertigt.

Die einzelnen Kotbecher wurden nun mit jeweils 2 ml der verschiedenen Verdünnungsstufen gespickt, sodass sich eine Konzentration von 10^1 bis 10^5 Mykobakterien pro Gramm Kot ergab. Das Spicken erfolgte in je zwei Doppelansätzen. Zudem wurde noch ein zweifacher Doppelansatz mit der ursprünglich verdünnten Stammlösung angefertigt, um eine Konzentration von 10^6 Mykobakterien pro Gramm Kot zu erhalten. Zwei Doppelansätze blieben als Negativkontrollen frei von *M. genavense* und wurden entweder mit 2 ml 0,9-prozentiger Kochsalzlösung oder ohne jeglichen Zusatz behandelt.

Das Spicken der Kotproben erfolgte geblindet. Die Person, die im Anschluss die PCR und Ziehl-Neelsen-Färbung durchführte, wusste nicht, welcher Schraubbecher mit welcher Konzentration gespickt war.

3.2.4. Mikroskopische Untersuchung auf säurefeste Stäbchen

Insgesamt wurden 752 Organproben und 28 gespickte Kotproben mikroskopisch auf

säurefeste Stäbchen untersucht.

Von jedem Organ wurde ein kleines Stück entnommen und ein Quetschpräparat angefertigt. Nach dem Trocknen wurden die Präparate nach Ziehl-Neelsen gefärbt (Färbanleitung im Anhang) und mikroskopisch bei einer 1000fachen Vergrößerung angeschaut. Jedes negativ eingestufte Präparat wurde bis zu 20 Minuten untersucht. Bei einem Nachweis von nur einem säurefesten Stäbchen wurde das Präparat als positiv eingestuft. In Tabelle 3 wird die Bewertung der mikroskopischen Präparate dargestellt.

Die gespickten Kotproben wurden mit Sputofluol® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) vorbehandelt. Dazu wurde eine ca. walnussgroße Menge Kot mit 10 ml 15-prozentigem Sputofluol® gemischt, gut homogenisiert und 20 Minuten einwirken lassen. Im Anschluss wurde das Gemisch bei 10.000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und mittels Einmalöse die oberste Schicht des Sediments mit den darin enthaltenen Mykobakterien abgenommen und auf zwei Objektträger aufgebracht. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger nach Ziehl-Neelsen gefärbt und bis zu 20 Minuten bei einer 1000fachen Vergrößerung untersucht.

Tabelle 3: Bewertung der mikroskopischen Präparate

Anzahl der säurefesten Stäbchen (AFB)	Bewertungsschema
1-3 AFB/Präparat	+/- positiv
4-10 AFB/Präparat	+ positiv
10-100 AFB/Präparat	++ positiv
1-10 AFB/Gesichtsfeld	+++ positiv
>10 AFB/Gesichtsfeld	++++ positiv

3.2.5. DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus gefrorenem oder frischem Organmaterial und Bakterienkulturen erfolgte mittels DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland).

Zur DNA-Extraktion aus Organen wurde ein Organstück einer Kantenlänge von ca. 1 bis 2 mm in 180 µl ATL-Puffer gegeben. Zur Lyse und Freisetzung der DNA wurden 20 µl Proteinase K zugesetzt und über Nacht bei 56°C inkubiert. Vor der weiteren Bearbeitung wurden jeder Probe 4,5 µl *Taylorella equigenitalis*-DNA als interne Kontrolle für die *M. avium* ssp. *avium/silvaticum*-PCR zugesetzt. Die weitere DNA-Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im letzten Schritt wurde die extrahierte DNA in 200 µl AE-Puffer eluiert und entweder direkt mittels Realtime-PCR untersucht oder bei -20°C gelagert.

Organe eines Tieres, die in der Ziehl-Neelsen-Färbung negativ waren, wurden gepoolt extrahiert.

Für die DNA-Extraktion aus Mykobakterienkulturen wurden ungefähr drei bis fünf Kolonien in 180 µl ATL-Puffer suspendiert oder so viele Kolonien, dass sich die Lösung trübte. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K wurden die Mykobakterien bei 56°C mindestens 10 Minuten lysiert. Die weitere Extraktion erfolgte wie oben beschrieben.

Die DNA-Extraktion aus Kotproben erfolgte mittels QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Hierfür wurden etwa 200 mg Kot eingesetzt. Zur Lyse der im Kot enthaltenen Bakterien wurde nach Zugabe von ASL-Puffer das Gemisch 5 Minuten bei 95°C im Thermomixer erhitzt. Der Inhalt wurde zentrifugiert und der Überstand wurde zur weiteren Verarbeitung in ein neues Eppendorfröhrchen gefüllt und mit einer InhibitEX-Tablette (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) versetzt, wodurch die Bindung der im Kot befindlichen Inhibitoren erfolgte. Nach Abzentrifugieren wurden 200µl des Überstandes mit 15µl Proteinase K und 200µl AL-Puffer versetzt und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Die weitere Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im letzten Schritt wurde die extrahierte DNA in 200 µl AE-Puffer eluiert und bei -20°C eingefroren oder direkt mittels Realtime-PCR untersucht.

Bei allen Extraktionen wurden stets Negativ-Extraktionskontrollen ohne Zusatz von

Patienten- oder Kulturmaterial mitgeführt.

3.2.6. *M. avium* ssp. *avium*- und *M. avium* ssp. *silvaticum*-Realtime-PCR

Von jeder Patientenprobe wurde eine Realtime-PCR zum Nachweis von *M. avium* ssp. *avium* und *M. avium* ssp. *silvaticum* nach einem an der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische etablierten Protokoll durchgeführt (STEIN, 2011).

3.2.7. Entwicklung und Durchführung der *M. genavense*-Realtime-PCR

Auswahl des Mykobakterien-Zielgens

Die Realtime-PCR sollte spezifisch für *M. genavense* sein und dabei keine Reaktionen mit anderen Mykobakterien zeigen. Zur Ermittlung geeigneter Zielregionen wurden die Sequenzen der 16S rDNA, 23S rDNA, des hsp 65-Gens und des rpoB-Gens der Mykobakterienspezies und -subspezies *M. avium*, *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *silvaticum*, *M. avium* ssp. *hominissuis*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, *M. avium*-Komplex, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. chimaera*, *M. malmoense* und *M. simiae* mit denen von *M. genavense* verglichen. Weiterhin wurden die Sequenzen des dnaJ1-Gens von *M. genavense*, *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *silvaticum*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. chimaera*, *M. malmoense* und *M. simiae*, die Sequenzen des acr-Gens von *M. genavense*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum* und *M. simiae* und die Sequenzen des internal transcribed spacer 1 von *M. genavense*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. chimaera*, *M. malmoense* und *M. simiae* analysiert. Verglichen wurde auch die Sequenz des hypothetischen 21 kDa-Protein-Gens von *M. genavense* mit dem 21,8 kDa- und 21,4 kDa- Protein-Gens von *M. avium* ssp. *paratuberculosis*.

Die verschiedenen Sequenzen wurden der Gensequenzdatenbank Nucleotide des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Maryland, USA) entnommen.

Mit der Sequenzanalysen-Software DNAMAN Version 5.2.9 (Lynnon Corporation, Pointe-Claire, Quebec, Canada) wurden die Sequenzen der einzelnen Mykobakterienspezies nach Zielgenen getrennt mit dem Programm „Multiple

Sequence Alignment“ abgeglichen. Im Anschluss erfolgte die Erstellung von Konsensussequenzen jeweils für die verschiedenen Mykobakterienspezies um Sequenzabschnitte geeigneter Konserviertheit zur Primer- und Sondenkonstruktion für *M. genavense* zu ermitteln.

Primer- und Sondenkonstruktion für *M. genavense*

Nach Identifikation geeigneter Sequenzabschnitte erfolgte die Konstruktion der spezifischen Primer und der Sonde für *M. genavense* mit der Beacon Designer Software Version 7.7 (Premier Biosoft International, Palo Alto, Californien, USA). Als Sondentyp wurde eine TaqMan-Sonde ausgewählt, die an ihrem 5'-Ende mit dem Reporter-Fluorophor 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) und an ihrem 3'-Ende mit dem Quencher Tetramethylrhodamin (TAMRA) markiert ist. Die Sonde bindet an DNA mit revers komplementärer Sequenz und wird von der verwendeten Taq-Polymerase an ihrem 5'-Ende abgebaut, wodurch sich Reporter-Farbstoff und Quencher voneinander trennen. Somit kommt es zu einer Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes, da er nicht mehr vom Quencher gehemmt wird. Je höher die Fluoreszenz, desto mehr spezifische DNA befindet sich in der Probe (SCHALASTA, 2009). Die Spezifität der Primer und der Sonde wurde mittels BLAST-Analyse (NCBI, Bethesda, Maryland, USA) überprüft.

Durchführung und Auswertung der Realtime-PCR

Die PCR-Reaktionen wurden mit dem Thermocycler Mx3000P von der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, USA) durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels der zugehörigen Software MxPro-Mx3000P Version 4.10. Als positiv wurden die Proben bewertet, die einen sigmoiden Verlauf zeigten und deren Fluoreszenz einen von der Software errechneten Schwellenwert überschritt, der also ein Ct-Wert zugeordnet wurde. Der Ct-Wert (Cycle Threshold = Schwellenwert-Zyklus) zeigt an, ab welchem PCR-Zyklus die Fluoreszenz signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt und somit der Beginn der messbaren Phase. Zur Kontrolle der PCR-Reaktionen wurden immer eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Zur Vermeidung falsch-negativer Ergebnisse wurde eine interne

Kontrolle, bestehend aus DNA, Primern und Sonde (QuantiFast Pathogen PCR + IC Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) eingesetzt.

PCR-Optimierung

Die Realtime-PCR Reaktionen wurden mit dem QuantiFast Pathogen PCR + IC Kit (Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland) durchgeführt.

Das Kit enthält einen 5fach konzentrierten Master Mix, der QuantiFast Pathogen Buffer, ein dNTP Mix und HotStar Taq Plus DNA Polymerase enthält. Den Angaben des Herstellers entsprechend wurde eine 5-minütige Inkubation bei 95°C zur Aktivierung der HotStar Taq Polymerase durchgeführt. Die Denaturierung der Doppelstrang-DNA erfolgte bei 95°C für 15 Sekunden. Annealing und die anschließende Elongationsphase wurden bei 60°C für 30 Sekunden durchgeführt. Insgesamt enthielt das Standardprogramm 50 Zyklen.

Zur Optimierung der PCR wurde ein *M. genavense*-Stamm aus dem Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim verwendet.

Die ersten PCR-Testläufe erfolgten als Singleplex-PCR, das heißt es wurde keine interne Kontrolle eingesetzt. Dabei wurden drei verschiedene Sondenkonzentrationen von 0,1 µM, 0,2 µM und 0,4 µM getestet. Die Primerkonzentration blieb zunächst konstant und betrug für jeden Primer 0,4 µM.

Im nächsten Schritt wurde die Duplex-PCR etabliert. Dabei wurden die vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen der Reagenzien der internen Kontrollreaktion eingesetzt. Zur Optimierung der Duplex-PCR wurden verschiedene Primer- und Sondenkonzentrationen der *M. genavense*-PCR untersucht. Die Primerkonzentrationen 0,2 µM, 0,4 µM und 0,8 µM (beide Primer jeweils in gleicher Konzentration) wurden mit jeder der folgenden Sondenkonzentrationen 0,15 µM, 0,2 µM und 0,3 µM getestet.

Im Anschluss wurde untersucht, ob eine Zugabe von Magnesiumchlorid einen Einfluss auf die PCR-Reaktionen zeigt. Zusätzlich 1 µl, 2µl und 4 µl einer 25 µM Magnesiumchloridlösung und ein Protokoll ohne Zugabe von Magnesiumchlorid wurden miteinander verglichen.

Ermittlung der Sensitivität und Spezifität der Realtime-PCR

Ermittlung der Sensitivität

Anhand der Ergebnisse geblindeter Untersuchungen der mit unterschiedlichen Mengen von *M. genavense* gespickten Kotproben und mit folgender Formel wurde die analytische Sensitivität bestimmt, das heißt, es wurde errechnet bei welcher Mykobakterienanzahl in einem PCR-Ansatz ein positives Ergebnis erreicht werden kann.

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

Zudem wurden zur Ermittlung der diagnostischen Spezifität 5 unterschiedliche *M. genavense*-Stämme getestet.

Ermittlung der Spezifität der Realtime-PCR

Zur Ermittlung der Spezifität wurden 15 sich von *M. genavense* unterscheidende Mykobakterien-Referenzstämme (dargestellt in Tabelle 2) mit der *M. genavense*-Realtime-PCR getestet. Zudem wurden zur Ermittlung der Sensitivität Mykobakterien-freie (n=28) Kotproben, die von SPF-Tauben stammten, eingesetzt.

4. Ergebnisse

4.1. Auswahl des Zielgens

Sequenzvergleiche unter Einbeziehung einer ganzen Reihe von Genen ergaben für das hypothetische 21 kDa-Protein-Gen von *M. genavense* Sequenzbereiche, die sich ausreichend von anderen Arten abgrenzten, so dass die Konstruktion artspezifischer Primer und Sonden möglich war. Mittels BLAST-Analyse unter Einbeziehung ähnlicher Sequenzen verschiedener Mykobakterienspezies ergab sich die höchste Übereinstimmung mit *M. marinum* mit 78 Prozent Identität über das gesamte Gen. Aufgrund der größten Übereinstimmung mit dem 21 kDa-Protein-Gen von *M. genavense*, wurde *M. marinum* in die Untersuchung der Referenzstämme aufgenommen, obwohl es nicht zu den vogelpathogenen Mykobakterien zählt.

4.2. Primer- und Sondenkonstruktion

Die Sequenzen der mit der Software Beacon Designer (Premier Biosoft International, Palo Alto, Californien, USA) konstruierten Primer und der Taqman-Sonde für den Nachweis von *M. genavense* sind in Tabelle 4 aufgeführt. Das durch die Primer amplifizierte DNA-Fragment besitzt eine Länge von 141 bp und erstreckt sich im hypothetischen 21 kDa-Protein-Gen von Position 201 bis 341 (Basennummerierung entsprechend der Sequenz mit der Genbank-Zugangsnummer AF025995, entspricht Basennummer 1147 bis 1287 der dort angegebenen Sequenz). Bei einer BLAST-Analyse zeigte sich, dass der Reverse-Primer auf einer für Mykobakterien stark konservierten Region lag. Die BLAST-Analyse bestätigte aber eine Spezifität des Forward-Primers und der Taqman-Sonde für *M. genavense*.

Tabelle 4: Für den Nachweis von *M. genavense* konstruierte Primer und Sonde (Zielgen: hypothetisches 21 kDa Protein Gen)

Mg- 21 kDa-1 (forward primer)	5'-AAACAGCGTCAGGAAATC-3'
Mg-21 kDa-2 (reverse primer)	5'-GTGGGACGAAGATGTAGT-3'
Mg-21 kDa-S1 (Sonde)	5'-FAM-AACCGCTATCTACATCCGCAG-TAMRA-3'

4.3. PCR-Optimierung

Die PCR-Ansätze wurden stets in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Zur Ermittlung einer Ausgangs-Sondenkonzentration wurde zunächst eine Singleplex-PCR, die nur Primer und Sonde von *M. genavense*, aber nicht für die interne Kontrollreaktion enthielt, durchgeführt. Dabei wurde das beste Ergebnis bei einem Zusatz von 0,5 µl 10 µM Sonde erzielt, was einer Konzentration von 0,2 µM entspricht. Die Primerkonzentration war vorerst gleichbleibend mit 0,4 µM, das heißt es wurden jeweils 0,2 µl einer 50µM Lösung zum Ansatz dazupipettiert.

Zur Erstellung und Optimierung der Duplex-PCR wurden den Angaben des Herstellers folgend jeweils 2,5 µl des 10x konzentrierten Internal Control Assay und 2,5 µl der 10x konzentrierten Internal Control DNA zusätzlich zu den Primern und der Sonde für *M. genavense* zugesetzt. Bei der Auswertung wurden dabei, wie in Abbildung 2 exemplarisch dargestellt ist, in jedem Lauf die Fluoreszenzkurven für die *M. genavense*-Sonde, die mit dem Farbstoff FAM markiert wurde, und für die Sonde der internen Kontrollreaktion, die mit HEX markiert war, berücksichtigt.

Die Testung der verschiedenen Primer- und Sondenkonzentrationen in der Duplex-PCR ergab ein Optimum bei einer Konzentration von 0,16 µM Sonde und je 0,4 µM für beide Primer. Dies entspricht einer Menge von 0,4 µl einer 10 µM Sondenlösung und 0,2 µl der 50 µM Primerlösungen bei einem Gesamtansatzvolumen von 25 µl.

Der Vergleich der Ergebnisse mit und ohne Zugabe von Magnesiumchlorid in der Duplex-PCR ergab keine wesentlichen Unterschiede, so dass die im QuantiFast Pathogen Master Mix enthaltene Magnesiumchlorid-Menge, die vom Hersteller nicht angegeben wird, als Optimum angesehen wurde und auf eine weitere Zugabe von

Magnesiumchlorid im endgültigen Protokoll verzichtet wurde.

Das Pipettierschema zur Durchführung der *M. genavense*-Duplex-Realtime-PCR ist in Tabelle 5 dargestellt.

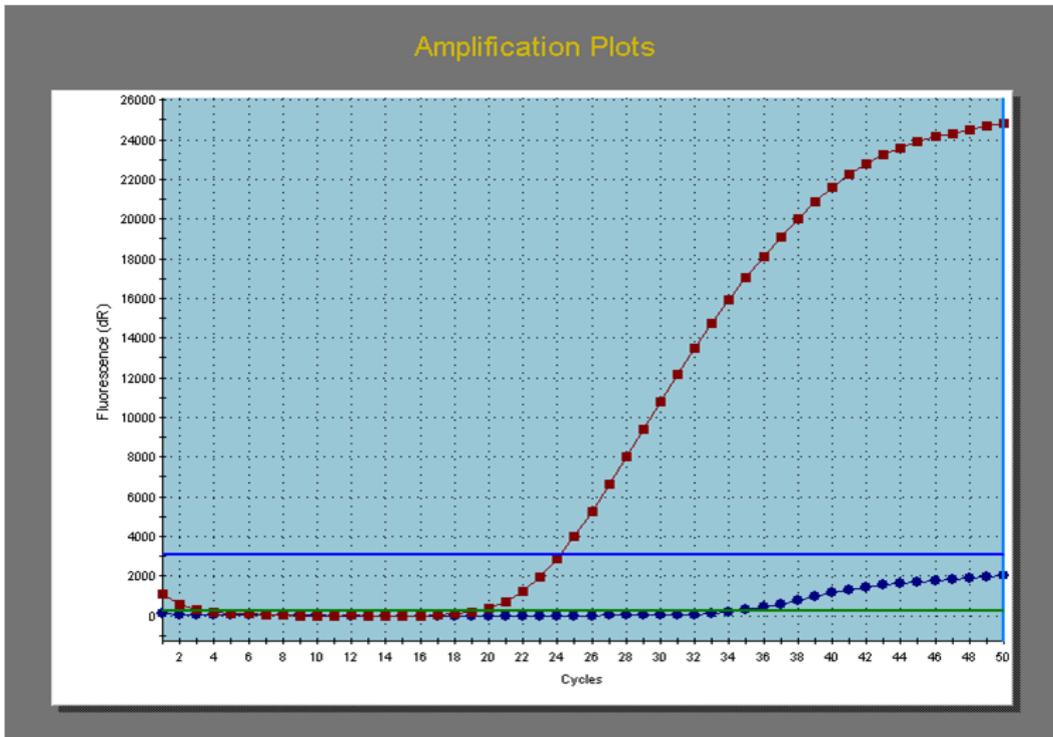


Abbildung 2: Graphische Darstellung einer *M. genavense*-Duplex-Realtime-PCR. Die braune Kurve zeigt den Verlauf einer positiven Messung mit dem *M. genavense*-Referenzstamm 177414/08 (FAM), die blaue Kurve die positive interne Kontrolle (HEX). Die waagerechte blaue und grüne Linie geben den Schwellenwert für FAM beziehungsweise HEX an.

Tabelle 5: Pipettierschema der *M. genavense*-Duplex-Realtime-PCR

Komponente	Menge in μl
5x QuantiFast Pathogen Master Mix	5
Primer Mg-21 kDa-1-for (50 μM)	0,2
Primer Mg-21 kDa-2-rev (50 μM)	0,2
Sonde Mg-21 kDa-S1 (10 μM)	0,4
10x Internal Control Assay	2,5
10x Internal Control DNA	2,5
DEPC-Wasser	11,7
extrahierte DNA	2,5
Gesamtvolumen	25

4.4. Ergebnisse der Untersuchung von Referenzstämmen

Die Ergebnisse der mittels *M. genavense*-Duplex-PCR untersuchten Mykobakterienreferenzstämmen sind in Tabelle 6 aufgeführt. Alle *M. genavense*-Stämme wurden positiv getestet. Die *M. genavense*-PCR ergab bei keinem der weiteren getesteten Referenzstämmen ein positives Signal.

Tabelle 6: Ergebnisse der mittels *M. genavense*-PCR untersuchten Mykobakterien-Referenzstämme

Referenzstamm	Stammbezeichnung	Ct-Wert <i>M. genavense</i>	Ct-Wert interne Kontrolle
<i>M. genavense</i>		32,35	35,09
<i>M. genavense</i>	Stamm 177414/08	23,18	34,76
<i>M. genavense</i>	Stamm 1603/04	23,39	33,77
<i>M. genavense</i>	Stamm N86/04	32,74	34,51
<i>M. genavense</i>	Stamm N87/04	34,18	34,31
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	DSM 44156	k.W.	34,72
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	M.a.a. FLI	k.W.	34,94
<i>M. avium</i> spp. <i>avium</i>	Stamm Av 56	k.W.	35,24
<i>M. avium</i>		k.W.	34,50
<i>M. avium</i> ssp. <i>silvaticum</i>	DSM 44175	k.W.	34,44
<i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i>		k.W.	35,06
<i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i>	M.a.h. 1	k.W.	34,61
<i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i>	M.a.h. 2	k.W.	34,76
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	M.a.p. 1	k.W.	34,65

Referenzstamm	Stammbezeichnung	Ct-Wert <i>M. genavense</i>	Ct-Wert interne Kontrolle
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	M.a.p. 2	k.W.	34,30
<i>M. intracellulare</i>		k.W.	34,10
<i>M. simiae</i>		k.W.	35,30
<i>M. malmoense</i>		k.W.	35,03
<i>M. fortuitum</i>		k.W.	35,28
<i>M. marinum</i>		k.W.	34,60

k.W.: kein Ct-Wert messbar

4.5. Ergebnisse der Untersuchung von gespickten Kotproben

Die Ergebnisse der mit *M. genavense* gespickten Kotproben sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Untersuchung erfolgte mittels Ziehl-Neelsen-Färbung und *M. genavense*-PCR, um die Nachweisgrenze der beiden Methoden miteinander zu vergleichen und wurde geblindet durchgeführt, das heißt, die Untersucherin wusste nicht, ob und welche Konzentrationen von *M. genavense* in den Kotproben enthalten waren. Die Nachweisgrenze lag sowohl in der Ziehl-Neelsen-Färbung als auch in der Duplex-Realtime-PCR bei 10^5 Mykobakterien pro Gramm Kot. Nach der in Material und Methoden aufgeführter Formel entspricht das bei einem Einsatz von 200 mg Kot und einem Elutionsvolumen von 200 µl in der Extraktion sowie dem Einsatz von 2,5 µl Eluat in der PCR einem Nachweis von 250 Mykobakterien pro PCR-Ansatz.

Tabelle 7: Ergebnisse der gespickten Kotproben in der Ziehl-Neelsen-Färbung und der *M. genavense*-PCR

Mykobakterien pro Gramm Kot	Ergebnis der Ziehl-Neelsen-Färbung	Ct-Wert <i>M. genavense</i>	Ct-Wert interne Kontrolle
Ohne Zusatz	negativ	k.W.	34,67
Ohne Zusatz	negativ	k.W.	34,01
Natriumchloridlösung	negativ	k.W.	34,51
Natriumchloridlösung	negativ	k.W.	34,39
10 ¹	negativ	k.W.	34,71
10 ¹	negativ	k.W.	34,11
10 ¹	negativ	k.W.	34,38
10 ¹	negativ	k.W.	34,37
10 ²	negativ	k.W.	34,72
10 ²	negativ	k.W.	34,35
10 ²	negativ	k.W.	34,81
10 ²	negativ	k.W.	34,41
10 ³	negativ	k.W.	34,31
10 ³	negativ	k.W.	34,92
10 ³	negativ	k.W.	34,39
10 ³	negativ	k.W.	34,11
10 ⁴	negativ	k.W.	34,45
10 ⁴	negativ	k.W.	34,21
10 ⁴	negativ	k.W.	33,94
10 ⁴	negativ	k.W.	34,70

Mykobakterien pro Gramm Kot	Ergebnis der Ziehl-Neelsen- Färbung	Ct-Wert <i>M. genavense</i>	Ct-Wert interne Kontrolle
10 ⁵	positiv +	38,00	34,75
10 ⁵	positiv +	38,21	34,62
10 ⁵	positiv +	39,08	33,95
10 ⁵	positiv +	38,76	33,83
10 ⁶	positiv ++	35,38	34,20
10 ⁶	positiv ++	37,31	34,71
10 ⁶	positiv ++	36,10	34,14
10 ⁶	positiv +++	35,29	34,52

k.W.: kein Ct-Wert messbar

4.6. Ergebnisse der Untersuchung von Patientenmaterial

4.6.1. Ergebnisse der PCR und der Ziehl-Neelsen-Färbung

Wie in Tabelle 8 und in Tabelle 10 (im Anhang) dargestellt, wurden bei 41 von 265 in die Untersuchung einbezogenen Vögeln säurefeste Stäbchen oder DNA von *M. genavense* nachgewiesen. Material von 35 Vögeln war in beiden eingesetzten Tests positiv, bei drei Vögeln wurde lediglich DNA von *M. genavense* nachgewiesen (Tiernummern 11736, 18299 und 19597). Bei weiteren drei Vögeln wurden nur säurefeste Stäbchen mikroskopisch festgestellt. Bei den letztgenannten Vögeln (Tiernummern 17271, 17531 und 17605) blieb dabei sowohl die PCR für *M. genavense* als auch die parallel durchgeführte PCR für *M. avium* ssp. *avium* und *M. avium* ssp. *silvaticum* negativ.

Von den 38 Vögeln, bei denen DNA von *M. genavense* nachgewiesen worden waren, gehörten 25 Tiere der Ordnung Psittaciformes und 13 der Ordnung Passeriformes an. Bei einem Kanarienvogel (Passeriformes) waren sowohl die

M. avium ssp. *avium/silvaticum*- als auch die *M. genavense*-PCR positiv. 32 der *M. genavense*-positiven Tiere waren von Privatpersonen gehalten worden. Drei Zebrafinken (Tiernummern 16484, 20759 und 21217) stammten aus demselben Bestand, wobei unklar ist, ob diese Tiere getrennt oder in einer gemeinsamen Voliere gehalten wurden.

Der Häufigkeit des Nachweises von *M. genavense*-DNA in den einzelnen Organen ist in Tabelle 10 (siehe Anhang) dargestellt. Etwa gleich häufig konnte DNA von *M. genavense* in Darm und Leber nachgewiesen werden. Fast genauso häufig wurde *M. genavense*-DNA in der Milz festgestellt, obwohl diese bei deutlich weniger Vögeln untersucht wurde. In einigen Fällen konnte, wenn von einem Vogel Darm, Leber und Milz zur Verfügung stand, *M. genavense* nur in der Milz nachgewiesen werden.

Wie in Tabelle 10 (siehe Anhang) ersichtlich ist, lagen die Ct-Werte der internen Kontrollreaktionen der *M. genavense*-PCR bei den Vögeln mit den Nummern 17531 und 17605 deutlich über 34. Aufgrund des Nachweises von säurefesten Stäbchen im Darm und somit zum Ausschluss des Vorliegens einer PCR-Inhibition wurde daher die PCR wiederholt und auch Verdünnungen der DNA-Lösungen von 1:5 eingesetzt. Dadurch verbesserte sich zwar der Ct-Wert der Kontrollreaktion leicht, DNA von *M. genavense* wurde allerdings erneut nicht nachgewiesen.

Bei drei weiteren Tieren (20837, 21293 und 21329) wurden PCR-Läufe aufgrund hoher interner Kontrollwerte wiederholt, und zwar ebenfalls auch unter Einsatz von 1:5 verdünnten DNA-Lösungen. Auch hier wurden anschließend niedrigere Ct-Werte der Kontrollreaktion erreicht, DNA von *M. genavense* wurde aber erneut nicht nachgewiesen.

Lediglich in einem Fall (ein Kanarienvogel mit der Tiernummer 17469) war die *M. avium* ssp. *avium/silvaticum*-PCR, die bei allen Untersuchungen parallel durchgeführt wurde, positiv (Tabelle 10, siehe Anhang). Dieses Tier wies auch ein positives Ergebnis in der Ziehl-Neelsen-Färbung und in der *M. genavense*-PCR auf.

4.6.2. Ergebnisse der Sektion

In der Sektion waren die vorgefundenen Veränderungen der 38 mittels Realtime-PCR positiv auf *M. genavense* getesteten Tiere in vielen Fällen unspezifisch und

ließen keine Mykobakteriose vermuten.

Der Ernährungszustand von 21 Tieren war reduziert (geringgradig bis hochgradig), bei drei Tieren kachektisch, 12 Tiere wiesen einen normalen Ernährungszustand auf und zwei Tiere waren adipös. 25 Tiere zeigten eine Leberschwellung (geringgradig bis hochgradig), die teilweise mit Farbveränderungen einherging (fleckig marmoriert, stecknadelkopfgroße Rötungen, blass). In 5 Fällen zeigte die Leber nur Verfärbungen (blass/aufgehellt bis hin zu fleckig marmoriert), 5 Tiere wiesen eine unauffällige Leber auf und in drei Fällen konnte die Leber aufgrund von Autolyseprozessen nicht beurteilt werden. Eine Milzschwellung (geringgradig bis hochgradig) konnte in 15 Fällen festgestellt werden, wobei die Milz in einigen Fällen blass bis weiß verfärbt war. Bei 2 Tieren war die Milz blass, aber nicht geschwollen und in 12 Fällen war die Milz unauffällig. In 9 Fällen wurde die Milz nicht untersucht. Bei 15 Tieren konnte eine Dilatation (geringgradig bis hochgradig) des Darms festgestellt werden. Untersuchte Lungen zeigten unspezifische Veränderungen wie Rötungen, Einblutungen und/oder Ödeme. Keine Lunge wies Granulome auf. Bei einem Kanarienvogel (Passeriformes) mit der Nummer 18872 konnte *M. genavense* in Darm, Leber und Augenlid nachgewiesen werden. Neben der bereits oben erwähnten Leberschwellung und Darmdilatation zeigte das Tier lediglich verkrustete Stellen im Hautbereich des Augenlids. Ein Wellensittich (Psittaciformes) mit der Nummer 20910 wies eine Umfangsvermehrung der Niere und ein anderer Wellensittich (Nummer 10392) eine Umfangsvermehrung des Gelenks auf, aber es konnten weder säurefeste Stäbchen noch DNA von *M. genavense* oder *M. avium* ssp. *avium* und *M. avium* ssp. *silvaticum* nachgewiesen werden.

Die drei Tiere, bei denen DNA von *M. genavense*, aber keine säurefesten Stäbchen nachgewiesen werden konnten (Nummer 11736, 18299 und 19597), zeigten nur unspezifische Veränderungen. Ein Wellensittich (11736) wies einen reduzierten, eine Gouldamadine (18299) und eine Braunkopfnone (19597) wiesen einen normalen Ernährungszustand auf. Die Leber des Wellensittichs mit der Nummer 11736 zeigte eine geringgradige und die der beiden anderen Tiere eine mittelgradige Schwellung. Die Milz der Braunkopfnone (19597) zeigte eine mittelgradige Schwellung.

Bei zwei Zebrafinken (16484 und 20759) konnten in der Bürzeldrüse säurefeste Stäbchen und DNA von *M. genavense* nachgewiesen werden. Bei einem Zebrafinken (16484) wies die Bürzeldrüse makroskopisch eine Verdickung und

Krusten auf, während die Bürzeldrüse des anderen Zebrafinken lediglich mit gelblichem Inhalt gefüllt war. Der Zebrafink mit der Nummer 16484 zeigte zudem wolkig aufgetriebene Knochenveränderungen, die auf eine Mykobakteriose hindeuten können.

Bei einer Blaustirnamazone (Tiernummer 8038) konnten vereinzelt und bei einer Gelbwangenamazone (Tiernummer 20820) multiple weiße stecknadelkopf bis 1 mm im Durchmesser große Umfangsvermehrungen in der Darmschleimhaut festgestellt werden. Abbildung 3 zeigt die makroskopischen Darmveränderungen von der Gelbwangenamazone (20820), die auf eine paratuberkulöse Verlaufsform deuten. Ein Wellensittich mit der Tiernummer 18025 wies eine Umfangsvermehrung des Oberlides auf. Ein Kanarienvogel (17469) hatte hochgradig gelblich käsige Auflagerungen im Thorakalluftsack und eine hochgradig geschwollene, weiße Milz. Die Nieren wiesen eine höchstgradige Schwellung mit gelblicher Färbung auf.

Bei den drei Vögeln, die nur in der Ziehl-Neelsen-Färbung ein positives Ergebnis aufwiesen (Tiernummern 17271, 17531 und 17605), wurden in der pathologischen Untersuchung ebenfalls nur unspezifische Veränderungen festgestellt. Ein hellblauer Bischof (Tiernummer 17531) zeigte einen geringgradig reduzierten, ein Schmetterlingsfink (17271) einen normalen und ein Wellensittich (17605) einen adipösen Ernährungszustand. Die Leber wies bei dem Wellensittich (17605) eine mittelgradige und bei den beiden anderen Tieren eine geringgradige Schwellung auf. Bei dem Schmetterlingsfink (17271) wurde die Milz nicht untersucht und der Darm konnte aufgrund der Autolyse nicht beurteilt werden. Die beiden anderen Vögel besaßen eine unauffällige Milz und deren Darm zeigte eine geringgradige Dilatation.

Tabelle 8: Anzahl der mittels Ziehl-Neelsen-Färbung und *M. genavense*-PCR positiv oder negativ getesteten Vögel

Vogelgruppe (n=265)	Ziehl-Neelsen positiv und <i>M. genavense</i> -PCR positiv	Ziehl-Neelsen positiv und <i>M. genavense</i> -PCR negativ	Ziehl-Neelsen negativ und <i>M. genavense</i> -PCR positiv	Ziehl-Neelsen und <i>M. genavense</i> -PCR negativ
Psittaciformes (n=214)	24	1	1	187
Wellensittich (<i>Melopsittacus undulatus</i>) (n=118)	18	1	1	98
<i>Amazona</i> sp. (n=16)	3	-	-	13
Graupapagei (<i>Psittacus erithacus</i>) (n=18)	-	-	-	18
Nymphensittich (<i>Nymphicus hollandicus</i>) (n=22)	1	-	-	21
Agapornide (<i>Agapornis</i>) (n=9)	1	-	-	8
Blaubauch- papagei (<i>Triclaria malachitacea</i>) (n=1)	1	-	-	-

Vogelgruppe (n=265)	Ziehl-Neelsen positiv und <i>M. genavense</i> -PCR positiv	Ziehl-Neelsen positiv und <i>M. genavense</i> -PCR negativ	Ziehl-Neelsen negativ und <i>M. genavense</i> -PCR positiv	Ziehl-Neelsen und <i>M. genavense</i> -PCR negativ
Sonstige Vögel der Ordnung Psittaciformes (n=30)	-	-	-	30
Passeriformes (n=51)	11	2	2	36
Kanarienvogel (<i>Serinus canaria forma domestica</i>) (n=21)	3	-	-	18
Zebrafink (<i>Taeniopygia guttata</i>) (n=9)	4	-	-	5
Gouldamadine (<i>Erythrura gouldiae</i>) (n=6)	2	-	1	3
Gimpel (<i>Pyrrhula pyrrhula</i>) (n=3)	1	-	-	2
Schmetterlings- fink <i>Uraeginthus bengalus</i> (n=1)	-	1	-	-

Vogelgruppe (n=265)	Ziehl-Neelsen positiv und <i>M. genavense</i> -PCR positiv	Ziehl-Neelsen positiv und <i>M. genavense</i> -PCR negativ	Ziehl-Neelsen negativ und <i>M. genavense</i> -PCR positiv	Ziehl-Neelsen und <i>M. genavense</i> -PCR negativ
Hellblauer Bischof (<i>Passerina caerulea</i>) (n=1)	-	1	-	-
Gelbbauch- zeisig (<i>Carduelis xanthogastra</i>) (n=2)	1	-	-	1
Braunkopf- nonne (<i>Lonchura atricapilla brunneiceps</i>) (n=1)	-	-	1	-
Sonstige Vögel der Ordnung Passeriformes (n=7)	-	-	-	7



Abbildung 3: Das Bild zeigt die makroskopischen Darmveränderungen von einer Gelbwangenamazone (Tiernummer 20820). Zu sehen sind multiple verschieden große weißliche Umfangsvermehrungen in der Darmschleimhaut. Im Darm konnten säurefeste Stäbchen und DNA von *M. genavense* nachgewiesen werden.

5. Diskussion

1992 wurde erstmals eine Infektion mit einem neuen Keim „*Mycobacterium genavense*“ beschrieben, der mittels Amplifizierung und Sequenzierung der 16S rRNA identifiziert werden kann (BÖTTGER et al., 1992). Die an *M. genavense* erkrankten HIV-positiven Patienten zeigten eine schwere disseminierte Infektion, die einer *M. avium*-Infektion ähnelte. Anzuchtversuche auf festen Medien blieben erfolglos und in Flüssigmedium konnte nur ein spärliches Wachstum festgestellt werden (BÖTTGER et al., 1992).

Von dem Zeitpunkt an wurden regelmäßig *M. genavense*-Infektionen bei HIV-positiven Patienten als Ursache einer mykobakteriellen Erkrankung identifiziert, wobei die Nachweisrate in einer Schweizer Studie bei 12,8% lag (PECHERE et al., 1995). Überwiegend Menschen mit einem schwachen Immunsystem und einer sehr niedrigen Lymphozytenzahl waren betroffen (BÖTTGER, 1994; BÖTTGER et al., 1992).

M. genavense ist ein anspruchsvoller Keim, der in vielen Fällen nicht auf festen Medien wächst (BÖTTGER et al., 1993; BÖTTGER et al., 1992; DOGGETT & STRASFELD, 2011; HIRSCHHEL et al., 1990; RAMIS et al., 1996). Zur Anzucht wurden Flüssigmedien empfohlen, die aber häufig auch erst nach mehrwöchiger Inkubationszeit ein positives Ergebnis zeigten (COYLE et al., 1992; SHITAYE, 2010; THOMSEN et al., 1999) oder auch negativ bleiben können (NADAL et al., 1993). Die häufig im Routinelabor verwendeten Festmedien wie Löwenstein-Jensen und Middlebrook 7H10 und 7H11 Medium führen häufig zu keinem Wachstum von *M. genavense* (BÖTTGER et al., 1993; NADAL et al., 1993; RAMIS et al., 1996). Einige Stämme wachsen auf Festmedien mit dem Zusatz von Mycobactin J (COYLE et al., 1992). Letztendlich wurden aber für die endgültige Identifizierung von *M. genavense* in den meisten Fällen molekularbiologische Methoden benötigt (BOIAN et al., 1997; BÖTTGER et al., 1992; HOOP et al., 1996; THOMSEN et al., 1999).

Später wurden Infektionen mit *M. genavense* auch bei Tieren beschrieben, insbesondere bei Ziervögeln. Hier wurden für *M. genavense* ein Anteil von 30,9% bis 95,8% an den nachgewiesenen Mykobakterieninfektionen beschrieben, wohingegen *M. avium* in nur wenigen Fällen nachgewiesen werden konnte (HOLSBOER BUOGO

et al., 1997; HOOP et al., 1996; MANAROLLA et al., 2009; PALMIERI et al., 2012).

5.1. DNA-Extraktion

Für den Einsatz von PCR-Techniken in der Diagnostik ist eine effektive, zeit- und kostengünstige DNA-Extraktion wichtig. Für einen erfolgreichen Nachweis von Mykobakterien-DNA aus klinischem Material ist entscheidend, dass die für die Erreger charakteristische dicke, lipidhaltige Zellwand erfolgreich aufgelöst werden kann (TELL et al., 2003a; ZHANG & ZHANG, 2011). Weiterhin ist wichtig, dass PCR-Inhibitoren, die die Taq-Polymerase hemmen und in bestimmten klinischen Probenmaterialien wie Kot in großen Mengen vorkommen können, während der DNA-Extraktion effektiv abgetrennt werden. In dieser Arbeit wurde zur DNA-Extraktion aus Vogelorganen und Mykobakterienkulturen das DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet, welches bereits in anderen Untersuchungen erfolgreich zur DNA-Extraktion aus Vogelorganen verwendet wurde (STEIN, 2011; TELL et al., 2003a, 2003b). Die Lyse der Organe mittels Proteinase-K-Verdauung erfolgte über einen langen Zeitraum über Nacht, um eine gute Freisetzung der DNA zu erreichen.

Um eine effektive Gewinnung der DNA in guter Qualität zu erzielen, ist es wichtig, die Silikagel-Membran-Säulen nicht zu überladen, also darauf zu achten, dass die in die Extraktion eingebrachte Probenmenge nicht zu groß ist. Da Mykobakterien im Gewebe nicht gleichmäßig verteilt sind, sollte bereits bei der Probenentnahme darauf geachtet werden, dass gezielt Material zur Untersuchung auf Mykobakterien eingesetzt wird, welches typische Veränderungen wie Granulome, aufweist. Diese Strategie wird allerdings durch die Tatsache kompliziert, dass infizierte Ziervögel selten Granulome aufweisen (GERLACH, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde auf den Versuch verzichtet durch mechanische Zerstörung der Mykobakterienzellwand, zum Beispiel mittels Glaskugeln, die Effektivität der DNA-Extraktion zu verbessern (AMARO et al., 2008; TELL et al., 2003a). TELL et al. (2003a) konnte unter anderem bei *M. genavense* eine signifikant höhere DNA-Menge durch mechanische Zerstörung und anschließender enzymatischer Lyse feststellen. Der Nachteil dieser Methode liegt in der Notwendigkeit von speziellem Equipment.

Die DNA-Extraktion aus Kotproben erfolgte mittels QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Die im Kit enthaltenen Puffer und speziellen

Tabletten sollen PCR-Inhibitoren effektiv eliminieren. Das Kit erlaubt eine relativ große Materialmenge von 180-220 mg Kot, wodurch eine größere Mykobakterienzahl im Ausgangsmaterial erreicht werden kann. Das Kit wurde für den Einsatz von humanen Stuhlproben entwickelt und in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische für den Einsatz von Vogelkot erfolgreich getestet (Daten nicht veröffentlicht). Da Mykobakterien nur intermittierend im Kot ausgeschieden werden, ist es wichtig, Kotproben über mehrere Tage zu sammeln und gut homogenisiert in der DNA-Extraktion einzusetzen.

5.2. Auswahl des Zielgens

Bei der hier zum Nachweis von *M. genavense* ausgewählten Zielsequenz handelt es sich um das hypothetische 21 kDa-Protein-Gen. Eine 1734-bp lange Sequenz, die einen für dieses Protein kodierenden Bereich von 573 bp enthält, wurde von CHEVRIER et al. (2000) identifiziert und in der Nucleotide-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter der Zugangsnummer AF025995 veröffentlicht. Mittels PCR und Hybridisierung unter Verwendung dieses hypothetischen 21 kDa-Protein-Gen als Zielgen wurde dieses Fragment in den genannten Untersuchungen als spezifisch für *M. genavense* nachgewiesen. Alle dort einbezogenen *M. genavense*-Stämme wurden positiv getestet, während die am nächsten verwandte Art *M. simiae* negativ getestet wurde (CHEVRIER et al., 1999).

In der vorliegenden Studie wurden durch Sequenzanalysen und –vergleiche unter Einbeziehung eines breiten Spektrums an vogelpathogenen Mykobakterien und eng mit *M. genavense* verwandten Arten sowie verschiedener Gen-Abschnitte (rDNA-Gene, hsp 65, rpoB-Gen, 21,8 kDa- und 21,4 kDa- Protein-Gen) die Sequenz des hypothetischen 21 kDa-Protein-Gen als diejenige mit der besten Eignung für die Konstruktion spezifischer Primer und Sonden zum Nachweis von *M. genavense* identifiziert. Die konstruierten Primer und Taqman-Sonde wurden mittels BLAST-Analyse auf ihre Spezifität getestet und dabei mit Sequenzen verschiedener atypischer Mykobakterienspezies verglichen. Dabei wurden insbesondere vogelpathogene sowie eng mit *M. genavense* verwandte Mykobakterienspezies (siehe Referenzstämme Tabelle 2) einbezogen. Da die höchste Übereinstimmung der Zielsequenz und der verwendeten Primer und Sonde mit *M. marinum* festgestellt

wurde, wurde auch von dieser Art ein Referenzstamm in die experimentelle Überprüfung der Spezifität der entwickelten Realtime-PCR einbezogen. *M. marinum* zählt nicht zu den vogelpathogenen Keimen, diese Art befällt vor allem Fische und kann bei Menschen zu Infektionen der Haut führen (BERCOVIER & VINCENT, 2001).

5.3. Sensitivität und Spezifität

Die mittels BLAST-Analyse ermittelte theoretische Sensitivität und Spezifität der Primer und der Sonde konnte im Experiment unter Einbeziehung eines breiten Panels von Referenzstämmen bestätigt werden. In der Realtime-Duplex-PCR zeigten alle getesteten *M. genavense*-Stämme ein positives Signal, wohingegen alle eingesetzten Stämme der anderen Mykobakterienarten mit den neu konstruierten Primern und der Sonde nicht zu einem Fluoreszenzsignal führten, also richtig als nicht-*M. genavense* erkannt wurden. Besonders wichtig war, dass *M. simiae*, welches sehr eng mit *M. genavense* verwandt ist, nicht mit den Primern oder der Sonde reagierte. Auch DNA von *M. marinum*, das ein Gen mit der höchsten Identität mit dem hypothetischen 21 kDa-Protein-Gen von *M. genavense* besitzt, wurde nicht mit den verwendeten Primern und der Sonde nachgewiesen. Zudem wurden alle in die Untersuchung einbezogenen sicher *M. genavense*-freien Kotproben korrekt als negativ erkannt. Dies zeigt ebenfalls eine sehr gute Spezifität des entwickelten Realtime-PCR-Verfahrens an.

Um zu erkennen, dass negative PCR-Ergebnisse durch eine Hemmung der Reaktion aufgrund von PCR-Inhibitoren entstehen und nicht wegen des Fehlens der Target-DNA, wurde in dieser Arbeit eine interne Kontrolle verwendet, die im verwendeten PCR-Kit bereits integriert ist und auf einer synthetischen DNA mit einer einzigartigen Gensequenz basiert. Der Einsatz einer internen Kontrolle ist besonders bei Kot- und Darmproben von Vorteil (STEIN, 2011). Die Menge der internen Kontroll-DNA wurde nach Herstellerangaben zum PCR-Ansatz zugesetzt und führte zur Entstehung eines Ct-Wertes von etwa 34. Während der Optimierung der *M. genavense*-PCR wurde deutlich, dass die interne Kontrollreaktion bei den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen keine inhibitorische Wirkung auf die Mykobakterien-PCR zeigte. Daher wurde diese Empfehlung unverändert beibehalten. Die Nachweisgrenze der in

der vorliegenden Untersuchung neu entwickelten PCR wurde durch Zusatz unterschiedlicher Mengen an Mykobakterien zu Kotproben von spezifisch-pathogenfreien Tauben, die an der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische gehalten werden und deren SPF-Status mit Freiheit von aviären Mykobakterien regelmäßig getestet wird, ermittelt. Die hier ermittelte Nachweisgrenze der entwickelten PCR lag bei 10^5 Mykobakterien pro Gramm Kot, und damit in derselben Größenordnung wie die Nachweisgrenze der Ziehl-Neelsen-Färbung. Für die Realtime-PCR entspricht dies einer Menge von 250 Mykobakterien pro PCR-Ansatz. Die von STEIN (2011) ermittelte Nachweisgrenze der entwickelten Realtime-PCR zum Nachweis von *M. avium* ssp. *avium* und *M. avium* ssp. *silvaticum* konnte für die Realtime-PCR bei 10^4 Mykobakterien pro Gramm Kot ermittelt werden. Nur einer der vier Ansätze war in der Ziehl-Neelsen-Färbung bei 10^4 Mykobakterien pro Gramm Kot positiv, sodass erst bei 10^5 Mykobakterien pro Gramm Kot alle Ansätze mit der Ziehl-Neelsen-Färbung positiv getestet wurden (STEIN, 2011). Es ist bemerkenswert, dass sowohl in der Studie von STEIN (2011) als auch in der hier vorgestellten Untersuchung die Nachweisgrenze durch Zusetzen einer definierten Zahl an Bakterien ermittelt wurde, die durch Auszählen und Herstellung einer Verdünnungsreihe bestimmt wurde. Bei *M. genavense* wurde dieses Vorgehen allerdings durch die Eigenschaft der Bakterien sich zu Ketten und Klumpen zusammenzulagern mit der Konsequenz, dass die Erreger ungleichmäßig verteilt sind, kompliziert. Insbesondere bei vergleichender Beurteilung der Nachweisgrenze der Ziehl-Neelsen-Färbung, die für *M. genavense* in der vorliegenden Studie ebenfalls deutlich schlechter bestimmt wurde als in der Studie von STEIN (2011) für *M. avium* ssp. *avium*, ist daher nicht auszuschließen, dass die Zahl der zu den Kotproben zugesetzten *M. genavense*-Bakterien in der hier präsentierten Untersuchung unter- oder auch überschätzt wurde.

Es ergab sich also für die Realtime-PCR und für die Ziehl-Neelsen-Färbung eine Nachweisgrenze in der gleichen Größenordnung. Mit der Ziehl-Neelsen-Färbung kann allerdings nur die Diagnose „säurefeste Stäbchen“ erfolgen, keine exakte Erregeridentifizierung bezüglich der Gattung oder Art. Zudem besitzt die Ziehl-Neelsen-Färbung bei Vorliegen von vielen Proben den Nachteil eines hohen Arbeitsaufwandes und die Beurteilung der Präparate erfordert insbesondere beim Erkennen von *M. genavense* große Erfahrung. Diese Art zeigt im mikroskopischen Präparat ein kokkobazilläres Aussehen (BÖTTGER et al., 1993) im Unterschied zu

den stäbchenförmigen *M. avium*. Dies kann insbesondere bei Kotproben zu einer erschweren Beurteilung führen, da hier häufig Bestandteile enthalten sind, die sich ebenfalls rot anfärben und kokkoid geformt sind, wie Sporen oder wachsartige Substanzen (WAYNE & KUBICA, 1986). So kann es schwierig sein, diese von säurefesten Bakterien abzugrenzen, auch wenn diese oftmals etwas größer sind als die meist nur 1-2 µm großen *M. genavense*.

5.4. Ergebnisse der Patientenproben

In der vorliegenden Arbeit wurden Organproben von 265 Ziervögeln aus den Ordnungen Psittaciformes und Passeriformes mittels Ziehl-Neelsen-Färbung auf das Vorliegen von säurefesten Stäbchen und mittels Realtime-Duplex-PCR auf das Vorliegen von *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *silvaticum* und *M. genavense* untersucht. Bei 38 Tieren konnten in mindestens einem der untersuchten Organe lichtmikroskopisch säurefeste Stäbchen nachgewiesen werden. Bei 35 von diesen 38 Tieren wurde zusätzlich mittels Realtime-PCR in mindestens einem Organ DNA von *M. genavense* festgestellt. Drei weitere Tiere wiesen keine säurefesten Stäbchen auf, zeigten aber ein positives Ergebnis in der *M. genavense*-PCR. Nur bei einem Tier, einem Kanarienvogel (Tiernummer 17469), konnte in der *M. avium* ssp. *avium/silvaticum*-PCR ein positives Ergebnis erzielt werden. Dieses Tier zeigte ebenfalls eine positive *M. genavense*-PCR. Mischinfektionen mit beiden Erregern sind in der Literatur sowohl beim Menschen als auch bei einem Papageienvogel beschrieben (ALBRECHT et al., 1995; KIRSCHNER et al., 1994; PALMIERI et al., 2012; TORTOLI et al., 1995b).

Die hohen Nachweisraten von *M. genavense* in der vorliegenden Arbeit bestätigen andere Untersuchungen, die die große Bedeutung dieser Mykobakterienart bei Ziervögeln belegen. MANAROLLA et al. (2009) konnte mittels PCR in 23 von 24 Fällen *M. genavense* als Ursache einer Mykobakteriose bei Vögeln der Ordnungen Psittaciformes und Passeriformes nachweisen. Nur bei einem Vogel, einem Stieglitz (*Carduelis carduelis*), wurde *M. avium* als Erreger identifiziert (MANAROLLA et al., 2009). PALMIERI et al. (2012) beschrieben in einer retrospektiven Studie 123 Fälle von Mykobakteriosen bei Psittaziden. 22 dieser Tiere wurden mittels PCR und

anschließender Restriktionsanalyse untersucht. Dabei konnte in 19 von 22 Fällen *M. genavense* identifiziert werden, während bei 2 Vögeln, und zwar bei einer Doppelgelbkopfamazone (*Amazona oratrix*) und einem Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*), *M. avium* sowie bei einem Buntschwanzpapagei (*Touit* sp.) eine Doppelinfektion mit *M. avium* und *M. genavense* nachgewiesen wurde (PALMIERI et al., 2012). Auch bei weiteren Untersuchungen wurde *M. genavense* deutlich häufiger nachgewiesen als andere Mykobakterienspezies (HOLSBOER BUOGO et al., 1997; HOOP et al., 1996).

In der vorliegenden Studie zeigte die Mehrheit der 38 Tiere, bei denen mittels PCR DNA von *M. genavense* nachgewiesen werden konnte, in der pathologisch-anatomischen Untersuchung nur unspezifische Veränderungen, wie Leber- oder Milzschwellung und Dilatation des Darms.

Nur in wenigen Fällen ließen die Veränderungen eine Mykobakteriose vermuten. So konnten zum Beispiel bei einer Blaustirnamazone (Tiernummer 8038) und einer Gelbwangenamazone (Tiernummer 20820) weißliche stecknadelkopf bis 1 mm im Durchmesser große Umfangsvermehrungen der Darmschleimhaut festgestellt werden. Ein Wellensittich (Tiernummer 18025) wies eine Umfangsvermehrung des Oberlides auf und ein Kanarienvogel (Tiernummer 17469) hatte hochgradig gelblich käsige Auflagerungen im Thorakalluftsack und eine hochgradig geschwollene, weiße Milz. Ein Zebrafink (Tiernummer 16484) zeigte wolkig aufgetriebene Knochenveränderungen, die auf eine Mykobakteriose hindeuteten.

M. genavense konnte in dieser Arbeit in einzelnen Fällen in der Niere, Bürzeldrüse, Hoden, Augenlid, Luftsack und Drüsenmagen mittels PCR nachgewiesen werden.

Inwieweit bei allen *M. genavense* positiven Tieren der Keim zu einer Erkrankung und letztendlich die Ursache des Todes war, kann nicht abschließend beurteilt werden, da eine klinische und eine histologische Untersuchung, die zur Beurteilung der Organveränderungen notwendig wäre, nicht durchgeführt wurden.

Die aviäre Mykobakteriose des Ziervogels ist pathologisch-anatomisch schwer zu diagnostizieren, da die Organe in den meisten Fällen nur unspezifische Veränderungen aufweisen und Granulome meist fehlen (FORSTER, 1987; GERLACH, 1994). MANAROLLA et al. (2009) bestätigte in seinen Untersuchungen für Psittaciformes und Passeriformes ein häufiges Vorkommen der für Ziervögel

charakteristischen nicht-tuberkulösen Form der aviären Mykobakteriose. Die an *M. genavense* erkrankten Vögel zeigten fast ausschließlich nicht-tuberkulöse Läsionen und nur zwei Tiere wiesen typische Granulome auf (MANAROLLA et al., 2009). Auch in anderen Untersuchungen über an *M. genavense* infizierten Zier- und Zoovögeln der Ordnungen Psittaciformes und Passeriformes wurden meist nur unspezifische Organveränderungen beschrieben (HOOP et al., 1993; HOOP et al., 1996; PORTAELS et al., 1996; RAMIS et al., 1996).

Pathologische Veränderungen, die eine Verdachtsdiagnose aviäre Mykobakteriose nahe legen, wie zum Beispiel knotige Verdickung der Darmwand aufgrund vergrößerter Darmzotten, multiple weißliche Umfangsvermehrungen in Darm, Leber, Milz, Lunge, Luftsäcke, Brust- und Bauchhöhle, ebenso wie Knoten in der Haut, Bindehaut und Augenlid (FERRER, 1997; HOOP et al., 1993; KUMMERFELD et al., 2009; PALMIERI et al., 2012; SCHMIDT et al., 2003), werden allerdings auch bei Ziervögeln immer wieder beschrieben und wurden in der vorliegenden Studie bei den Vögeln der Tiernummern 8038, 20820, 18025, 17469 und 16484 festgestellt. Dabei ist eine *M. avium*-Infektion allerdings aufgrund des pathologischen Bildes nicht von einer Infektion mit *M. genavense* zu unterscheiden (MANAROLLA et al., 2009; PORTAELS et al., 1996; SCHMIDT et al., 2003).

In den untersuchten Organproben (siehe Tabelle 10, siehe Anhang) mit Veränderungen die auf eine Mykobakteriose deuteten, konnte gezielt das veränderte Material entnommen und eingesetzt werden und es zeigten sich hier immer positive Ziehl-Neelsen und PCR-Ergebnisse. In den unspezifisch veränderten untersuchten Organen konnte nicht bei allen Ziehl-Neelsen-positiven Organen DNA von *M. genavense* nachgewiesen werden und umgekehrt. Dies könnte daran liegen, dass Material eingesetzt wurde, welches keine beziehungsweise nur geringe unter der Nachweisgrenze liegende Mengen an Mykobakterien enthielt. Unspezifische Organveränderungen erschweren eine gezielte Probenentnahme. Für die zwei durchgeführten Untersuchungsmethoden wurde Material von zwei unterschiedlichen Stellen des Organs entnommen. Durch die inhomogene Verteilung der Mykobakterien kann es dann passieren, dass in einer der beiden Methoden Material mit und in der anderen Methode Material ohne Mykobakterien verwendet wurde.

Bei drei Vögeln (Tiernummer 11736, 18299 und 19597) konnten nur DNA von *M. genavense* nachgewiesen werden. Die Organe der Tiere wurden aufgrund des

negativen Ergebnisses der Ziehl-Neelsen-Färbung gepoolt extrahiert und gemeinsam in der PCR untersucht. Die Tiere zeigten in der Sektion unspezifische Veränderungen. Inwieweit *M. genavense* zu einer Erkrankung der Tiere geführt hat, ist unklar. Hierfür wäre eine histologische Untersuchung notwendig. Es wäre aber auch möglich, dass *M. genavense* den Darm besiedelt hat, ohne zu einer Erkrankung der Tiere geführt zu haben. LEDWON et al. (2008) konnte mittels PCR DNA von *M. genavense* aus Kotproben gesunder Papageien isolieren. Ebenfalls konnten bei HIV-negativen Menschen DNA von *M. genavense* in Darmgewebeproben mit entzündlichen und nicht-entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen werden, was ein ubiquitäres Vorkommen des Erregers vermuten lässt (DUMONCEAU et al., 1997).

Bei drei Vögeln (Tiernummer 17605, 17271 und 17531) konnten säurefeste Stäbchen im Darm nachgewiesen werden, jedoch weder DNA von *M. avium* ssp. *avium/silvaticum*- noch DNA von *M. genavense*. In der pathologischen Untersuchung zeigten die Organe der drei Tiere keine Veränderungen, die auf eine Mykobakteriose deuteten. Es könnte sich um andere atypische Mykobakterien oder säurefeste Stäbchen handeln. Viele der atypischen Mykobakterien kommen weit verbreitet in der Umwelt vor und sind opportunistische Keime (FALKINHAM, 1996; PFYFFER, 2007). Verschiedene atypische Mykobakterien, darunter *M. flavescens*, *M. triviale*, *M. neoaurum*, *M. xenopi*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. fortuitum* und *M. avium* ssp. *avium* konnten bereits aus dem Kot gesunder Papageien isoliert werden (LEDWON et al., 2008a). Es könnten auch andere säurefeste Bakterien gewesen sein wie *Nocardia*, *Rhodococcus* und *Corynebacterium*, die ebenfalls eine gewisse Säurefestigkeit aufweisen (WAYNE & KUBICA, 1986). Berichte über *Nocardia* sp. Infektionen beim Vogel sind allerdings selten. *Nocardia asteroides* befällt primär die Lunge und kann von dort in andere Organe streuen (SCHMIDT et al., 2003). Veränderungen, die für eine Nokardien-Infektion sprechen, konnten bei diesen drei Tieren in der Sektion nicht festgestellt werden. Aufgrund fehlender weiterführender Untersuchungen kann man die säurefesten Stäbchen nicht näher identifizieren.

Drei Zebrafinken mit den Tiernummern 16484, 20759 und 21217, bei denen DNA von *M. genavense* nachgewiesen wurde, stammten aus demselben Bestand. Allerdings ist unklar, ob diese Tiere getrennt oder in einer gemeinsamen Voliere gehalten wurden. *M. genavense* wurde bei zwei dieser Vögel und zwar bei denen mit Tiernummern 16484 und 20759 hochgradig in der Bürzeldrüse nachgewiesen. Ob

in diesem Bestand eine Übertragung der Infektion von Vogel zu Vogel stattgefunden hat ist unklar. Es wird vermutet, dass *M. genavense* ein ubiquitär vorkommender Keim ist (BÖTTGER, 1994; DUMONCEAU et al., 1997; PORTAELS et al., 1996). HOOP et al. (1993) stuft das Risiko einer Tier-zu-Tier Übertragung eher als gering ein.

In anderen Untersuchungen konnte allerdings bei mehreren in engem Kontakt stehenden Vögeln eines Besitzers *M. genavense* nachgewiesen und eine Übertragung von Tier-zu-Tier nicht komplett ausgeschlossen werden (MANAROLLA et al., 2009).

Die hier entwickelte PCR stellt eine schnelle und effektive Nachweismethode dar, um *M. genavense* aus Gewebe- und Darmproben von Vögeln zu identifizieren. Bei negativen PCR- aber positiven Ziehl-Neelsen-Ergebnissen müssen jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um andere vogelpathogene Mykobakterien auszuschließen.

5.5. Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Realtime-PCR-Verfahren entwickelt um *M. genavense* schnell, sensitiv und spezifisch in klinischen Probenmaterialien (Kotproben), sowie in Organen von Vögeln ohne vorherige Anzucht nachzuweisen. Beim Einsatz dieser PCR bei der Untersuchung von Ziervögeln der Ordnungen Psittaciformes und Passeriformes, die in der Pathologie der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische der LMU München seziiert wurden, zeigte sich, dass *M. genavense* in diesem Material häufig nachgewiesen wurde und bei dieser Vogelgruppe wesentlich häufiger die Ursache einer Mykobakteriose darstellte als *M. avium*. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Untersuchungen an Ziervögeln aus den letzten Jahren (HOLSBOER BUOGO et al., 1997; HOOP et al., 1996; MANAROLLA et al., 2009; PALMIERI et al., 2012).

Bei der Untersuchung von Organmaterial wird ein Nachweis sicherlich durch die Tatsache erschwert, dass die Mykobakterien in Geweben ungleichmäßig verteilt sind. Eine gezielte Probenentnahme am Tier an veränderten Bereichen ist daher wichtig, allerdings bei Ziervögeln mit einer meist nichttuberkulösen Mykobakteriose und fehlenden Granulomen meist nicht realisierbar. Bei der Untersuchung von

Kotproben ist wichtig, dass bedingt durch eine intermittierende Ausscheidung und inhomogene Verteilung der Mykobakterien im Kot Proben aber unbedingt über mehrere Tage gesammelt und gut homogenisiert eingesetzt werden sollten. Aufgrund des Einsatzes einer internen Kontrolle in diesem PCR-Protokoll wurde die Beurteilung von negativen Ergebnissen insbesondere bei Kot- und Darmproben erleichtert, da dadurch das Vorliegen von PCR-Inhibitoren erkannt und damit das Risiko von falsch-negativen Ergebnissen reduziert werden kann.

Mit der hier entwickelten Realtime-PCR steht nun eine Methode zur Verfügung, die Prävalenzuntersuchungen von *M. genavense* beim Vogel, und zwar nicht nur bei Ziervögeln, sondern bei allen Vogelgruppen, mit geringem Aufwand ermöglicht und es auch erlaubt das zoonotische Risiko zu ermitteln. Die hier entwickelte PCR hat sich auch bei der Untersuchung von Kotproben, die mit *M. genavense* versetzt wurden, bewährt. In Zukunft kann diese PCR daher auch bei lebenden Vogelpatienten für eine Untersuchung zum Vorliegen von *M. genavense* eingesetzt werden.

6. Zusammenfassung

Die aviäre Mykobakteriose ist eine weit verbreitete Infektionskrankheit bei Zier-, Zoo-, Wildvögeln und Geflügel. Am häufigsten werden die Spezies *Mycobacterium avium* und *Mycobacterium genavense* nachgewiesen, wobei *M. genavense* bisher hauptsächlich bei Ziervögeln der Ordnungen Psittaciformes und Passeriformes beschrieben wurde. Meist entwickeln sich schwerwiegende chronische Infektionen, die häufig tödlich enden. Aufgrund des zoonotischen Potenzials ist von einer Therapie abzuraten und Tiere mit einer diagnostizierten Mykobakterieninfektion sollten euthanasiert werden, da infizierte Tiere Mykobakterien mit dem Kot ausscheiden. Daher ist es besonders wichtig, eine Infektion schnell und sicher diagnostizieren zu können. Diagnostische Methoden basieren auf serologischen Verfahren, dem Nachweis von säurefesten Stäbchen in Kot oder Organproben sowie dem Erregernachweis mittels Anzucht oder auf molekularbiologischen Methoden. Zum Diagnostizieren einer *M. avium*-Infektion können serologische Untersuchungen durchgeführt werden. Aufgrund des langsamen Wachstums und der hohen Ansprüche von *M. genavense* bezüglich Anzuchtmedien- und bedingungen kann eine Identifizierung dieses Erregers in den meisten Fällen nur über molekularbiologische Untersuchungen stattfinden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Realtime-PCR entwickelt, die es ermöglicht *M. genavense* direkt aus Organmaterial und Kotproben von Vögeln nachzuweisen. Die hier entwickelten Primer und die Sonde basieren auf dem hypothetischen 21 kDa-Protein-Gen, das von CHEVRIER et al. (1999) als spezifisch für *M. genavense* beschrieben wurde. Um negative Ergebnisse aufgrund von PCR-Inhibitoren ausschließen zu können, wurde eine im PCR-Kit enthaltene interne Kontrolle in das Protokoll integriert. Die Sensitivität und Spezifität der entwickelten Duplex-Realtime-PCR wurde anhand von 20 Mykobakterien-Referenzstämmen getestet. Dabei wurde DNA von allen fünf einbezogenen *M. genavense*-Referenzstämmen in der PCR korrekt nachgewiesen, während die DNA von 14 vogelrelevanten Mykobakterien (*M. avium*, 3x *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *silvaticum*, 3x *M. avium* ssp. *hominissuis*, 2x *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. simiae*, *M. malmoense* und *M. fortuitum*) und von *M. marinum* nicht detektiert wurde. Die Sensitivität und Spezifität der PCR wurde außerdem durch Spicken von Kotproben von SPF-Tauben mit definierten Mengen eines

M. genavense-Stammes ermittelt. Dabei wurden alle negativen Proben richtig als negativ in der PCR erkannt. Die Nachweisgrenze der Realtime-PCR lag bei 10^5 Mykobakterien pro Gramm Kot und damit in der gleichen Größenordnung wie die der Ziehl-Neelsen-Färbung. Die Eignung der PCR wurde an Organproben von 265 Vögeln der Ordnungen Psittaciformes und Passeriformes untersucht. Bei 38 Vögeln wurde *M. genavense*-DNA in mindestens einem Organ nachgewiesen. Mit der zum Vergleich parallel durchgeführten Ziehl-Neelsen-Färbung wurden bei 35 dieser 38 Vögel in mindestens einem Organ säurefeste Stäbchen festgestellt. Bei einem Vogel, einem Kanarienvogel, wurde mittels einer bei allen Proben parallel durchgeführten weiteren Realtime-PCR DNA von *M. avium* ssp. *avium/silvaticum* detektiert und zwar zusätzlich zu DNA von *M. genavense*. Bei drei weiteren Tieren wurden zwar säurefeste Stäbchen im Darm nachgewiesen, aber weder DNA von *M. genavense* oder *M. avium* ssp. *avium/silvaticum*. Diese Untersuchung zeigt die Bedeutung von *M. genavense* bei Ziervögeln der Ordnungen Psittaciformes und Passeriformes.

Die hier entwickelte Realtime-Duplex-PCR erwies sich als schnelle, sensitive und spezifische Methode zum Nachweis von *M. genavense* in Gewebeproben und Kot von Vögeln. Die Verwendung einer internen Kontrolle hilft bei der Beurteilung von negativen PCR-Ergebnissen, da falsch negative Ergebnisse aufgrund von PCR-Inhibitoren erkannt werden können, was insbesondere bei Kot- und Darmproben bedeutend ist.

7. Summary

Avian mycobacteriosis is a widespread infectious disease in pet birds, zoo birds, wild birds and poultry. Most commonly the species *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium genavense* are detected, whereas *M. genavense* is reported nearly exclusively in pet birds of the order Psittaciformes and Passeriformes. In most cases there is development of a serious chronic infection which is often lethal. Because of the zoonotic potential and the fact that infected birds are shedding the mycobacteria via faeces, birds with a known mycobacterial infection should be euthanized and therapy is not recommended. A rapid and effective diagnosis is therefore very important. Diagnostic methods are based on the detection of acid fast bacilli in faeces or tissue specimens with confirmation of the pathogen via culture or molecular techniques. Serological tests can also be used for the diagnosis of *M. avium* infections. *M. genavense* is slowly growing and particularly fastidious with special growth requirements and long incubation periods. In many cases molecular biology methods are the only way to identify *M. genavense*.

Hence in the present study we developed a Realtime-PCR for the detection of *M. genavense* from tissue specimens and faeces of birds. Species-specific primers and probe were developed on the basis of the hypothetical 21 kDa protein gene reported by CHEVRIER et al. (1999) to be highly specific for the *M. genavense* chromosome. An internal control included in the PCR-Kit was used thus false-negative PCR results because of PCR inhibitors can be excluded. Twenty mycobacterial reference strains were used to test sensitivity and specificity of the developed Realtime-Duplex-PCR. A positive PCR result could be seen with all the five different *M. genavense* reference strains included. DNA of reference strains of fourteen bird pathogenic mycobacteria (*M. avium*, 3x *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *silvaticum*, 3x *M. avium* ssp. *hominissuis*, 2x *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. simiae*, *M. malmoense* und *M. fortuitum*) and of *M. marinum* were not detected with the *M. genavense* specific primers and probe. In addition, to establish the sensitivity and specificity of the developed PCR, faeces of SPF pigeons was spiked with known portions of a *M. genavense* reference strain. Negative samples were correctly detected as negative by the PCR. The detection limit for the PCR and the Ziehl-Neelsen stain was 10^5 mycobacteria per gram faeces which was in the same order of magnitude as the Ziehl-Neelsen stain.

In the present study tissue specimens of 265 birds of the order Psittaciformes and Passeriformes were tested. DNA of *M. genavense* was detected in at least one of the tissue specimens in 38 birds while in 35 of these birds acid fast bacilli were also detected in at least one of the tissue specimens. There was only one positive result in the *M. avium* ssp. *avium/silvaticum*-PCR. The same bird was also positive with the *M. genavense*-PCR. In the intestines of three other birds acid fast bacilli were seen but no DNA of *M. genavense* and *M. avium* ssp. *avium/silvaticum* was detected by PCR. The study demonstrates the significance of *M. genavense* especially in birds of the order Psittaciformes and Passeriformes.

The developed Realtime-Duplex-PCR represents a rapid and reliable as well as sensitive and specific method for the detection of *M. genavense* in tissue specimens and faeces of birds. The use of an internal control facilitates the evaluation of negative PCR results particularly when using faeces and intestinal samples because of PCR inhibitors.

8. Literaturverzeichnis

Ackerman, L. J., Benbrook, S. C., & Walton, B. C. (1974). Mycobacterium tuberculosis infection in a parrot (*Amazona farinosa*). *Am Rev Respir Dis*, 109(3), 388-390.

Albrecht, H., Rusch-Gerdes, S., Stellbrink, H. J., et al. (1995). Treatment of disseminated Mycobacterium genavense infection. *AIDS*, 9(6), 659-660.

Alexander, K. A., Laver, P. N., Michel, A. L., et al. (2010). Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis*, 16(8), 1296-1299. doi: 10.3201/eid1608.100314

Amaro, A., Duarte, E., Amado, A., et al. (2008). Comparison of three DNA extraction methods for Mycobacterium bovis, Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium subsp. avium. *Lett Appl Microbiol*, 47(1), 8-11.

Bercovier, H., & Vincent, V. (2001). Mycobacterial infections in domestic and wild animals due to Mycobacterium marinum, M. fortuitum, M. chelonae, M. porcinum, M. farcinogenes, M. smegmatis, M. scrofulaceum, M. xenopi, M. kansasii, M. simiae and M. genavense. *Rev Sci Tech*, 20(1), 265-290.

Berman, S. M., Kim, R. C., Haghghat, D., et al. (1994). Mycobacterium genavense infection presenting as a solitary brain mass in a patient with AIDS: case report and review. *Clin Infect Dis*, 19(6), 1152-1154.

Bessesen, M. T., Shlay, J., Stone-Venohr, B., et al. (1993). Disseminated Mycobacterium genavense infection: clinical and microbiological features and response to therapy. *AIDS*, 7(10), 1357-1361.

Bogdan, C., Kern, P., Richter, E., et al. (1997). Systemic infection with Mycobacterium genavense following immunosuppressive therapy in a patient who

was seronegative for human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*, 24(6), 1245-1247.

Boian, M., Avaniss-Aghajani, E., Walker, R., et al. (1997). Identification of *Mycobacterium genavense* in intestinal tissue from a parakeet using two polymerase chain reaction methods: are pets a reservoir of infection in AIDS patients? *AIDS*, 11(2), 255-256.

Bono, M., Jemmi, T., Bernasconi, C., et al. (1995). Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. *Appl Environ Microbiol*, 61(1), 371-373.

Böttger, E. C. (1994). *Mycobacterium genavense*: an emerging pathogen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 13(11), 932-936.

Böttger, E. C., Hirschel, B., & Coyle, M. B. (1993). *Mycobacterium genavense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 43(4), 841-843.

Böttger, E. C., Teske, A., Kirschner, P., et al. (1992). Disseminated "*Mycobacterium genavense*" infection in patients with AIDS. *Lancet*, 340(8811), 76-80.

Briancesco, R., Semproni, M., Della Libera, S., et al. (2010). Non-tuberculous mycobacteria and microbial populations in drinking water distribution systems. *Ann Ist Super Sanita*, 46(3), 254-258.

BTK-Homepage (2013).

http://www.bundestieraerztekammer.de/index_btk_presse_details.php?X=20130528095036; Pressemitteilung der Bundestierärztekammer vom 28.05.2013.

Butler, K. L., Fitzgerald, S. D., Berry, D. E., et al. (2001). Experimental inoculation of European starlings (*Sturnus vulgaris*) and American crows (*Corvus brachyrhynchos*) with *Mycobacterium bovis*. *Avian Dis*, 45(3), 709-718.

Charles, P., Lortholary, O., Dechartres, A., et al. (2011). Mycobacterium genavense infections: a retrospective multicenter study in France, 1996-2007. *Medicine (Baltimore)*, 90(4), 223-230.

Chevrier, D., Oprisan, G., Maresca, A., et al. (1999). Isolation of a specific DNA fragment and development of a PCR-based method for the detection of Mycobacterium genavense. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 23(3), 243-252.

Covert, T. C., Rodgers, M. R., Reyes, A. L., et al. (1999). Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 65(6), 2492-2496.

Coyle, M. B., Carlson, L. C., Wallis, C. K., et al. (1992). Laboratory aspects of "Mycobacterium genavense," a proposed species isolated from AIDS patients. *J Clin Microbiol*, 30(12), 3206-3212.

De Beenhouwer, H., Liang, Z., De Rijk, P., et al. (1995). Detection and identification of mycobacteria by DNA amplification and oligonucleotide-specific capture plate hybridization. *J Clin Microbiol*, 33(11), 2994-2998.

Doggett, J. S., & Strasfeld, L. (2011). Disseminated Mycobacterium genavense with pulmonary nodules in a kidney transplant recipient: case report and review of the literature. *Transpl Infect Dis*, 13(1), 38-43.

Dumonceau, J. M., Fonteyne, P. A., Realini, L., et al. (1995). Species-specific Mycobacterium genavense DNA in intestinal tissues of individuals not infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol*, 33(9), 2514-2515.

Dumonceau, J. M., Van Gossum, A., Adler, M., et al. (1997). Detection of fastidious mycobacteria in human intestines by the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 16(5), 358-363.

Dumouchel-Champagne, H., Charlier-Woerther, C., Boibieux, A., et al. (2009).

Disseminated nontuberculous infections with *Mycobacterium genavense* during sarcoidosis. *Eur Respir Rev*, 18(114), 299-301.

Dvorska, L., Matlova, L., Ayele, W. Y., 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), 366-374.

Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., et al. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 17(19), 7843-7853.

Falkinham, J. O., 3rd. (1996). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*, 9(2), 177-215.

Ferrer, L., Ramis, A., Fernández, J., Majó, N. (1997). Granulomatous dermatitis caused by *Mycobacterium genavense* in two psittacine birds. *Veterinary Dermatology*, 8, 213-219.

Fitzgerald, S. D., Boland, K. G., Clarke, K. R., et al. (2005). Resistance of Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) to experimental inoculation with *Mycobacterium bovis*. *Avian Dis*, 49(1), 144-146.

Fitzgerald, S. D., Zwick, L. S., Berry, D. E., et al. (2003). Experimental inoculation of pigeons (*Columba livia*) with *Mycobacterium bovis*. *Avian Dis*, 47(2), 470-475.

FLI-Homepage (2013).

http://www.fli.bund.de/no_cache/de/startseite/aktuelles/tierseuchengeschehen/tuberkulose-beim-rind.html; Friedrich-Löffler-Institut, 19.07.2013.

Forster, F. (1987). Mykobakterien bei Psittaciformes. Vet Diss, München.

Forster, F., Gerlach, H., & Kisters, J. (1988). [Mycobacteria in parrots and parakeets

(Psittaciformes)]. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 95(8), 338-342.

Fournier, S., Pialoux, G., & Vincent, V. (1998). Mycobacterium genavense and cutaneous disease in AIDS. Ann Intern Med, 128(5), 409.

Gaynor, C. D., Clark, R. A., Koontz, F. P., et al. (1994). Disseminated Mycobacterium genavense infection in two patients with AIDS. Clin Infect Dis, 18(3), 455-457.

Gerhold, R. W., & Fischer, J. R. (2005). Avian tuberculosis in a wild turkey. Avian Dis, 49(1), 164-166.

Gerlach, H. (1994). Bacteria. In: Avian Medicine, Principles and Application, B. Ritchie, G. Harrison, L. Harrison, Eds., Wingers Publishing, Lake Worth, pp. 949-983.

Gomez, G., Saggese, M. D., Weeks, B. R., et al. (2011). Granulomatous encephalomyelitis and intestinal ganglionitis in a spectacled Amazon parrot (Amazona albifrons) infected with Mycobacterium genavense. J Comp Pathol, 144(2-3), 219-222.

Hadad, D. J., Smole, S. C., Martins, C. C., et al. (2003). Disseminated Mycobacterium genavense in an HIV-infected patient from South America. Int J Tuberc Lung Dis, 7(5), 502-503.

Hillebrand-Haverkort, M. E., Kolk, A. H., Kox, L. F., et al. (1999). Generalized mycobacterium genavense infection in HIV-infected patients: detection of the mycobacterium in hospital tap water. Scand J Infect Dis, 31(1), 63-68.

Hirschel, B., Chang, H. R., Mach, N., et al. (1990). Fatal infection with a novel, unidentified mycobacterium in a man with the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med, 323(2), 109-113.

Hoefsloot, W., van Ingen, J., Peters, E. J. G., et al. (2012). Mycobacterium genavense in the Netherlands: an opportunistic pathogen in HIV and non-HIV

immunocompromised patients. An observational study in 14 cases. *Clinical Microbiology and Infection*, no-no.

Hoenerhoff, M., Kiupel, M., Sikarskie, J., et al. (2004). Mycobacteriosis in an American bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). *Avian Dis*, 48(2), 437-441.

Holsboer Buogo, C., Bacciarini, L., Robert, N., et al. (1997). Occurrence of *Mycobacterium genavense* in birds. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 139(9), 397 - 402.

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), 502-504.

Hoop, R. K., Bottger, E. C., Ossent, P., et al. (1993). Mycobacteriosis due to *Mycobacterium genavense* in six pet birds. *J Clin Microbiol*, 31(4), 990-993.

Hoop, R. K., Bottger, E. C., & Pfyffer, G. E. (1996). Etiological agents of mycobacterioses in pet birds between 1986 and 1995. *J Clin Microbiol*, 34(4), 991-992.

Hughes, M. S., Ball, N. W., Love, D. N., et al. (1999). Disseminated *Mycobacterium genavense* infection in a FIV-positive cat. *J Feline Med Surg*, 1(1), 23-29.

Inderlied, C. B., Kemper, C. A., & Bermudez, L. E. (1993). The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev*, 6(3), 266-310.

Jackson, K., Sievers, A., Ross, B. C., et al. (1992). Isolation of a fastidious *Mycobacterium* species from two AIDS patients. *J Clin Microbiol*, 30(11), 2934-2937.

Keymer, I. F., Jones, D. M., Pugsley, S. L., et al. (1982). A survey of tuberculosis in birds in the Regent's Park gardens of the Zoological Society of London. *Avian Pathol*, 11(4), 563-569.

Kiehn, T. E., Hoefler, H., Bottger, E. C., et al. (1996). Mycobacterium genavense infections in pet animals. J Clin Microbiol, 34(7), 1840-1842.

Kirschner, P., Springer, B., Vogel, U., et al. (1993). Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. J Clin Microbiol, 31(11), 2882-2889.

Kirschner, P., Vogel, U., Hein, R., et al. (1994). Bias of culture techniques for diagnosing mixed Mycobacterium genavense and Mycobacterium avium infection in AIDS. J Clin Microbiol, 32(3), 828-831.

Korbel, R., Schäffer, E.H., Ravelhofer, K., Kösters, J. (1997). Okulare Manifestationen von Mykobakteriosen bei Vögeln. Tierärztl Prax, 25, 552-558.

Kox, L. F., Jansen, H. M., Kuijper, S., et al. (1997). Multiplex PCR assay for immediate identification of the infecting species in patients with mycobacterial disease. J Clin Microbiol, 35(6), 1492-1498.

Krebs, T., Zimmerli, S., Bodmer, T., et al. (2000). Mycobacterium genavense infection in a patient with long-standing chronic lymphocytic leukaemia. J Intern Med, 248(4), 343-348.

Kummerfeld, M., Wohlsein, P., Baumgärtner, W., et al. (2009). Konjunktivale und klassische Mykobakteriose bei Sittichen und Agaporniden. Kleintierpraxis, 54(7), 365-370.

Lanteri, G., Marino, F., Reale, S., et al. (2011). Mycobacterium tuberculosis in a red-crowned parakeet (Cyanoramphus novaezelandiae). J Avian Med Surg, 25(1), 40-43.

Leautez, S., Boutoille, D., Bemer-Melchior, P., et al. (2000). Localized Mycobacterium genavense soft tissue infection in an immunodeficient HIV-negative patient. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 19(1), 51-52.

Leclerc, M. C., Haddad, N., Moreau, R., et al. (2000). Molecular characterization of environmental mycobacterium strains by PCR-restriction fragment length polymorphism of hsp65 and by sequencing of hsp65, and of 16S and ITS1 rDNA. *Res Microbiol*, 151(8), 629-638.

Ledwon, A., Szeleszczuk, P., Zwolska, Z., et al. (2008a). Occurrence of Mycobacterium in the faeces of parrots kept in zoological gardens and private aviaries in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy*, 52, 341-346.

Ledwon, A., Szeleszczuk, P., Zwolska, Z., et al. (2008b). Experimental infection of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) with five Mycobacterium species. *Avian Pathol*, 37(1), 59-64.

Lehtola, M. J., Torvinen, E., Miettinen, I. T., 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), 848-853.

Lennox, A. M. (2007). Mycobacteriosis in companion psittacine birds: a review. *J Avian Med Surg*, 21(3), 181-187.

Lhuillier, E., Brugiere, O., Veziris, N., et al. (2012). Relapsing Mycobacterium Genavense Infection as a Cause of Late Death in a Lung Transplant Recipient: Case Report and Review of the Literature. *Exp Clin Transplant*. doi: 10.6002/ect.2012.0052

Liberek, V., Soravia, C., Ninet, B., et al. (1996). Cervical lymphadenitis caused by Mycobacterium genavense in a healthy child. *Pediatr Infect Dis J*, 15(3), 269-270.

Lim, S. Y., Kim, B. J., Lee, M. K., et al. (2008). Development of a real-time PCR-based method for rapid differential identification of Mycobacterium species. *Lett Appl Microbiol*, 46(1), 101-106.

Lorenzen, J., Meyer-Olson, D., Haubitz, M., et al. (2009). Infection with

Mycobacterium genavense in a patient with systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol, 28 Suppl 1, S39-41.

Lucas, J., Lucas, A., Furber, H., et al. (2000). *Mycobacterium genavense* infection in two aged ferrets with conjunctival lesions. Aust Vet J, 78(10), 685-689.

Ludwig, E., Reischl, U., Janik, D., et al. (2009). Granulomatous pneumonia caused by *Mycobacterium genavense* in a dwarf rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Vet Pathol, 46(5), 1000-1002.

Manarolla, G., Liandris, E., Pisoni, G., et al. (2007). *Mycobacterium genavense* and avian polyomavirus co-infection in a European goldfinch (*Carduelis carduelis*). Avian Pathol, 36(5), 423-426.

Manarolla, G., Liandris, E., Pisoni, G., et al. (2009). Avian mycobacteriosis in companion birds: 20-year survey. Vet Microbiol, 133(4), 323-327.

Martin-Casabona, N., Bahrmand, A. R., Bennedsen, J., et al. (2004). Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. Int J Tuberc Lung Dis, 8(10), 1186-1193.

Martin, G., & Schimmel, D. (2000). Die *Mycobacterium avium*-Infektion des Geflügels-(k)eine Gefahr für die menschliche Gesundheit? Dtsch. tierärztl. Wschr., 107, 53-58.

Maschek, H., Georgii, A., Schmidt, R. E., et al. (1994). *Mycobacterium genavense*. Autopsy findings in three patients. Am J Clin Pathol, 101(1), 95-99.

Mendenhall, M. K., Ford, S. L., Emerson, C. L., et al. (2000). Detection and differentiation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium genavense* by polymerase chain reaction and restriction enzyme digestion analysis. J Vet Diagn Invest, 12(1), 57-60.

Mijs, W., de Haas, P., Rossau, R., et al. (2002). Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(Pt 5), 1505-1518.

Miranda, A., Pires, M. A., Pinto, M. L., et al. (2009). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in a diamond sparrow. *Vet Rec*, 165(6), 184.

Miyoshi, H., Tamura, G., Satoh, T., et al. (2010). Disseminated *Mycobacterium genavense* infection in a healthy boy. *Hum Pathol*, 41(11), 1646-1649.

Möbius, P., Lentzsch, P., Moser, I., 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), 284-291.

Monill, J. M., Franquet, T., Sarnatek, M. A., et al. (2001). *Mycobacterium genavense* infection in AIDS: imaging findings in eight patients. *Eur Radiol*, 11(2), 193-196.

Morita, Y., Maruyama, S., Hashizaki, F., et al. (1999). Pathogenicity of *Mycobacterium avium* complex serovar 9 isolated from painted quail (*Excalfactoria chinensis*). *J Vet Med Sci*, 61(12), 1309-1312.

Munster, P., Fechner, K., Volkel, I., et al. (2013). Distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in a German zoological garden determined by IS900 semi-nested and quantitative real-time PCR. *Vet Microbiol*, 163(1-2), 116-123.

Nadal, D., Caduff, R., Kraft, R., et al. (1993). Invasive infection with *Mycobacterium genavense* in three children with the acquired immunodeficiency syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 12(1), 37-43.

Neonakis, I. K., Gitti, Z., Krambovitis, E., et al. (2008). Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *J Microbiol Methods*, 75(1), 1-11.

Nurmohamed, S., Weenink, A., Moeniralam, H., et al. (2007). Hyperammonemia in generalized *Mycobacterium genavense* infection after renal transplantation. *Am J Transplant*, 7(3), 722-723.

Pai, S., Esen, N., Pan, X., et al. (1997). Routine rapid *Mycobacterium* species assignment based on species-specific allelic variation in the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*). *Arch Pathol Lab Med*, 121(8), 859-864.

Palmieri, C., Roy, P., Dhillon, A. S., et al. (2012). Avian *Mycobacteriosis* in Psittacines: A Retrospective Study of 123 Cases. *J Comp Pathol*.

Pavlik, I., Svastova, P., Bartl, J., 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), 212-217.

Pechere, M., Opravil, M., Wald, A., et al. (1995). Clinical and epidemiologic features of infection with *Mycobacterium genavense*. Swiss HIV Cohort Study. *Arch Intern Med*, 155(4), 400-404.

Peters, M., Prodinger, W. M., Gummer, H., et al. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* infection in a blue-fronted amazon parrot (*Amazona aestiva aestiva*). *Vet Microbiol*, 122(3-4), 381-383.

Pfyffer, G. E. (2007). *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures, in *Manual of Clinical Microbiology*, Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Pfaller, M. A., pp. 543-572, 9th ed., vol. 1, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Pocknell, A. M., Miller, B. J., Neufeld, J. L., et al. (1996). Conjunctival *mycobacteriosis* in two emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Vet Pathol*, 33(3), 346-348.

Portaels, F., Realini, L., Bauwens, L., et al. (1996). *Mycobacteriosis* caused by

Mycobacterium genavense in birds kept in a zoo: 11-year survey. *J Clin Microbiol*, 34(2), 319-323.

Ramis, A., Ferrer, L., Aranaz, A., et al. (1996). *Mycobacterium genavense* infection in canaries. *Avian Dis*, 40(1), 246-251.

Rammaert, B., Couderc, L. J., Rivaud, E., et al. (2011). *Mycobacterium genavense* as a cause of subacute pneumonia in patients with severe cellular immunodeficiency. *BMC Infect Dis*, 11, 311.

Realini, L., De Ridder, K., Hirschel, B., et al. (1999). Blood and charcoal added to acidified agar media promote the growth of *Mycobacterium genavense*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 34(1), 45-50.

Realini, L., De Ridder, K., Palomino, J., et al. (1998). Microaerophilic conditions promote growth of *Mycobacterium genavense*. *J Clin Microbiol*, 36(9), 2565-2570.

Realini, L., Van Der Stuyft, P., De Ridder, K., et al. (1997). Inhibitory effects of polyoxyethylene stearate, PANTA, and neutral pH on growth of *Mycobacterium genavense* in BACTEC primary cultures. *J Clin Microbiol*, 35(11), 2791-2794.

Reymond, D., Birrer, P., & Schaad, U. B. (1995). *Mycobacterium genavense* invasive infection in two children with AIDS: long-term followup. *Eur J Pediatr*, 154(9 Suppl 4), S74-76.

Richter, E. (2009). Mykobakterien, aus *Mikrobiologische Diagnostik*, Neumeister, B., Geiss, H. K., Braun, R. W., Kimming, P., S. 398-418, 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.

Ritter, D., Carlson, L. D., Logan, B. K., et al. (1996). Differentiation of *Mycobacterium genavense* and *Mycobacterium simiae* by automated mycolic acid analysis with high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol*, 34(8), 2004-2006.

RKI. (2013). Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2011, Robert-Koch-Institut, Berlin.

Rogall, T., Flohr, T., & Bottger, E. C. (1990). Differentiation of Mycobacterium species by direct sequencing of amplified DNA. *J Gen Microbiol*, 136(9), 1915-1920.

Rolle, M., & Mayr, A. (2002). Medizinische Mikrobiologie, Infektios- und Seuchenlehre (7. Auflage ed.). Stuttgart: Enke Verlag.

Roth, A., Fischer, M., Hamid, M. E., et al. (1998). Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol*, 36(1), 139-147.

Roth, A., Reischl, U., Streubel, A., et al. (2000). Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *J Clin Microbiol*, 38(3), 1094-1104.

Saito, H., Tomioka, H., Sato, K., et al. (1990). Identification of various serovar strains of Mycobacterium avium complex by using DNA probes specific for Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare. *J Clin Microbiol*, 28(8), 1694-1697.

Sanguinetti, M., Posteraro, B., Ardito, F., et al. (1998). Routine use of PCR-reverse cross-blot hybridization assay for rapid identification of Mycobacterium species growing in liquid media. *J Clin Microbiol*, 36(6), 1530-1533.

Schalasta, G. (2009). Molekulare Diagnostik: Identifizierung von Mikroorganismen, aus Mikrobiologische Diagnostik, Neumeister, B., Geiss, H. K., Braun, R. W., Kimming, P., S. 224-246, 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart

Schliesser, Th. (1985). Mycobacterium, aus Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Blobel, H., Schließer, Th., Band 5, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Schmidt, R. E., Reavill, D. R., & Phalen, D. N. (2003). Pathology of pet and aviary

birds, 1st Edit., Wiley-Blackwell, Ames.

Schmidt, V., Schneider, S., Schlomer, J., et al. (2008). Transmission of tuberculosis between men and pet birds: a case report. *Avian Pathol*, 37(6), 589-592.

Shafran, S. D., Taylor, G. D., & Talbot, J. A. (1995). Disseminated *Mycobacterium genavense* infection in Canadian AIDS patients. *Tuber Lung Dis*, 76(2), 168-170.

Shitaye, E. J., Grymova, V., Grym, M., et al. (2009). *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection in a pet parrot. *Emerg Infect Dis*, 15(4), 617-619.

Shitaye, J.E., Halouzka, R., Svobodova, J., Grymova, V., Grym, M., Skoric, M., Fictum, P., Beran, V., Slany, M., Pavlik, I. (2010). First Isolation of *Mycobacterium genavense* in a blue headed parrot (*Pionus menstruus*) imported from Surinam (South America) to the Czech Republic: a case report. *Veterinari Medicina*, 55(7), 339-347.

Smit, T., Eger, A., Haagsma, J., et al. (1987). Avian tuberculosis in wild birds in the Netherlands. *J Wildl Dis*, 23(3), 485-487.

Steiger, K., Ellenberger, C., Schuppel, K. F., et al. (2003). [Uncommon mycobacterial infections in domestic and zoo animals: four cases with special emphasis on pathology]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 110(9), 382-388.

Stein, K. (2011). Entwicklung einer Realtime-PCR zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *avium* und *Mycobacterium avium* ssp. *silvaticum* beim Vogel. *Vet Diss*, München.

Steinmetz, H. W., Rutz, C., Hoop, R. K., et al. (2006). Possible human-avian transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in a green-winged macaw (*Ara chloroptera*). *Avian Dis*, 50(4), 641-645.

Tassone, L., Carvalho, A. C., Calabresi, A., et al. (2012). Disseminated

Mycobacterium genavense infection after immunosuppressive therapy shows underlying new composite heterozygous mutations of beta1 subunit of IL-12 receptor gene. *J Allergy Clin Immunol*.

Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., et al. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*, 31(2), 175-178.

Tell, L. A., Foley, J., Needham, M. L., 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), 1486-1490.

Tell, L. A., Foley, J., Needham, M. L., et al. (2003b). Diagnosis of avian mycobacteriosis: comparison of culture, acid-fast stains, and polymerase chain reaction for the identification of *Mycobacterium avium* in experimentally inoculated Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Avian Dis*, 47(2), 444-452.

Tell, L. A., Leutenegger, C. M., Larsen, R. S., et al. (2003c). Real-time polymerase chain reaction testing for the detection of *Mycobacterium genavense* and *Mycobacterium avium* complex species in avian samples. *Avian Dis*, 47(4), 1406-1415.

Tell, L. A., Woods, L., & Cromie, R. L. (2001). Mycobacteriosis in birds. *Rev Sci Tech*, 20(1), 180-203.

Theuss, T., Aupperle, H., Eulenberger, K., et al. (2010). Disseminated infection with *Mycobacterium genavense* in a grizzled giant squirrel (*Ratufa macroura*) associated with the isolation of an unknown *Mycobacterium*. *J Comp Pathol*, 143(2-3), 195-198.

Thomsen, V. O., Dragsted, U. B., Bauer, J., et al. (1999). Disseminated infection with *Mycobacterium genavense*: a challenge to physicians and mycobacteriologists. *J Clin Microbiol*, 37(12), 3901-3905.

- Thorel, M. F., Krichevsky, M., & Levy-Frebault, V. V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 40(3), 254-260.
- Tortoli, E., Bartoloni, A., Burrini, C., et al. (1995a). Utility of high-performance liquid chromatography for identification of mycobacterial species rarely encountered in clinical laboratories. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 14(3), 240-243.
- Tortoli, E., Brunello, F., Cagni, A. E., et al. (1998). *Mycobacterium genavense* in AIDS patients, report of 24 cases in Italy and review of the literature. *Eur J Epidemiol*, 14(3), 219-224.
- Tortoli, E., Mariottini, A., & Mazzarelli, G. (2003). Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol*, 41(9), 4418-4420.
- Tortoli, E., Rindi, L., Garcia, M. J., et al. (2004). Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(Pt 4), 1277-1285. doi: 10.1099/ijs.0.02777-0
- Tortoli, E., Simonetti, M. T., Bartoloni, A., et al. (1994a). Investigation on several phenotypic features in two strains of *Mycobacterium genavense*. *New Microbiol*, 17(4), 313-318.
- Tortoli, E., Simonetti, M. T., Dionisio, D., et al. (1994b). Cultural studies on two isolates of "*Mycobacterium genavense*" from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 18(1), 7-12.
- Tortoli, E., Simonetti, M. T., Dionisio, D., et al. (1995b). *Mycobacterium genavense* and *Mycobacterium avium* mixed infection in an AIDS patient. *Clinical Microbiology*

Newsletter, 17, 22.

Trueba, F., Fabre, M., & Saint-Blancard, P. (2004). Rapid identification of *Mycobacterium genavense* with a new commercially available molecular test, INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2. *J Clin Microbiol*, 42(9), 4403-4404.

van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P. E., et al. (1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol*, 47(4), 1236-1245.

Vergnaud, M., Dauga, C., Dompmartin, A., et al. (1998). Genital infection due to *Mycobacterium genavense* in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis*, 27(6), 1531.

Vitali, S. D., Eden, P. A., Payne, K. L., et al. (2006). An outbreak of mycobacteriosis in Gouldian finches caused by *Mycobacterium peregrinum*. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 9(3), 519-522.

Washko, R. M., Hoefler, H., Kiehn, T. E., et al. (1998). *Mycobacterium tuberculosis* infection in a green-winged macaw (*Ara chloroptera*): report with public health implications. *J Clin Microbiol*, 36(4), 1101-1102.

Wayne, L. G., Good, R. C., Tsang, A., et al. (1993). Serovar determination and molecular taxonomic correlation in *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*: a cooperative study of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int J Syst Bacteriol*, 43(3), 482-489.

Wayne, L. G., & Kubica, G. P. (1986). The Mycobacteria, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G., pp. 1435-1457, vol. 2, Williams&Wilkins, Baltimore.

WHO. (2012). World Health Organisation. Global Tuberculosis Report 2012.

WHO/HTM/TB/2012.6. Geneva, Switzerland.

Zhang, M. Z., & Zhang, S. (2011). An efficient DNA extraction method for polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bovine fecal samples. *J Vet Diagn Invest*, 23(1), 41-48.

9. Anhang

9.1. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Beschreibung der vier Runyon-Gruppen mit klinisch relevanten Vertretern aus der Gruppe der atypischen Mykobakterien</i>	4
<i>Tabelle 2: Herkunft und Bezeichnung der Mykobakterien –Referenzstämme</i>	27
<i>Tabelle 3: Bewertung der mikroskopischen Präparate</i>	31
<i>Tabelle 4: Für den Nachweis von M. genavense konstruierte Primer und Sonde (Zielgen: hypothetisches 21 kDa Protein Gen)</i>	38
<i>Tabelle 5: Pipettierschema der M. genavense-Duplex-Realtime-PCR</i>	40
<i>Tabelle 6: Ergebnisse der mittels M. genavense-PCR untersuchten Mykobakterien-Referenzstämme</i>	41
<i>Tabelle 7: Ergebnisse der gespickten Kotproben in der Ziehl-Neelsen-Färbung und der M. genavense-PCR</i>	43
<i>Tabelle 8: Anzahl der mittels Ziehl-Neelsen-Färbung und M. genavense-PCR positiv oder negativ getesteten Vögel</i>	48
<i>Tabelle 9: Taxonomie und Anzahl der auf Mykobakterien untersuchten Vögel; Taxonomie der Papageien- und Finkenvögel nach Howard and Moore, Complete Checklist of the birds of the world, third Edition, 2003</i>	86
<i>Tabelle 10: Ergebnisse der untersuchten Patienten (n=265) mittels Ziehl-Neelsen-Färbung, M. avium ssp. avium/silvaticum- (MAA/S-) und M. genavense-PCR. Positiv getestete Patienten sind fett markiert und im ersten Teil der Tabelle dargestellt.</i>	91

9.2. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Die Abbildung zeigt das Quetschpräparat einer Umfangsvermehrung am Augenlid eines Wellensittichs. Die Mykobakterien erscheinen rot auf bausem Hintergrund. Mittels PCR konnte hier M. genavense nachgewiesen werden. Deutlich erkennbar auch die kokkobazilläre Erscheinung von M. genavense.</i>	15
<i>Abbildung 2: Graphische Darstellung einer M. genavense-Duplex-Realtime-PCR. Die braune Kurve zeigt den Verlauf einer positiven Messung mit dem M. genavense-Referenzstamm 177414/08 (FAM), die blaue Kurve die positive interne Kontrolle (HEX). Die waagerechte blaue und grüne Linie geben den Schwellenwert für FAM beziehungsweise HEX an.</i>	39

Abbildung 3: Das Bild zeigt die makroskopischen Darmveränderungen von einer Gelbwangenamazone (Tiernummer 20820). Zu sehen sind multiple verschieden große weißliche Umfangsvermehrungen in der Darmschleimhaut. Im Darm konnten säurefeste Stäbchen und DNA von *M. genavense* nachgewiesen werden.51

9.3. Färbeanleitung

Ziehl-Neelsen-Färbung

- getrocknete Objektträger vollständig mit Karbolfuchsin bedecken und bis zur Dampfbildung über dem Bunsenbrenner erhitzen
- etwa zwei Minuten einwirken lassen, Karbolfuchsin abgießen und mit Wasser abspülen
- entfärben in 3 prozentigem Salzsäurealkohol; maximal 20 Minuten
- 15 Sekunden gegenfärben mit Löfflers Methylenblau
- mit Wasser abspülen und trocknen lassen

9.4. Tabellen

Tabelle 9: Taxonomie und Anzahl der auf Mykobakterien untersuchten Vögel; Taxonomie der Papageien- und Finkenvögel nach Howard and Moore, Complete Checklist of the birds of the world, third Edition, 2003

Taxonomie	Anzahl Tiere
Ordnung: Psittaciformes	214
Familie: Psittacidae	
Unterfamilie: Psittacinae	
Gattung: <i>Melopsittacus</i>	
Art: <i>Melopsittacus undulatus</i> (Wellensittich)	118
Gattung: <i>Psittacus</i>	

Taxonomie	Anzahl Tiere
Art: <i>Psittacus erithacus</i> (Graupapagei)	
Unterart: <i>Psittacus erithacus erithacus</i> (Kongo-Graupapagei)	15
<i>Psittacus erithacus timneh</i> (Timneh-Graupapagei)	3
Gattung: <i>Amazona</i>	
Art: <i>Amazona aestiva</i> (Blaustirnamazone)	5
<i>Amazona autumnalis</i> (Gelbwangenamazone)	2
<i>Amazona amazonica</i> (Venezuela-Amazone)	2
<i>Amazona oratrix</i> (Doppelgelbkopfamazone)	1
<i>Amazona ochrocephala</i> (Gelbscheitelamazone)	1
<i>Amazona auropalliata</i> (Gelbnackenamazone)	2
<i>Amazona farinosa</i> (Mülleramazone)	1
<i>Amazona festiva</i> (Blaubartamazone)	1
Amazone (Art nicht bekannt)	1
Gattung: <i>Cyanoramphus</i>	
Art: <i>Cyanoramphus novaezelandiae</i> (Ziegensittich)	3
Gattung: <i>Neophema</i>	
Art: <i>Neophema pulchella</i> (Schönsittich)	2
Gattung: <i>Polytelis</i>	
Art: <i>Polytelis anthopeplus</i> (Bergsittich)	1
<i>Polytelis swainsonii</i> (Schildsittich)	1
Gattung: <i>Bolborhynchus</i>	
Art: <i>Bolborhynchus lineola</i> (Katharinasittich)	1
Gattung: <i>Agapornis</i>	

Taxonomie	Anzahl Tiere
Art: <i>Agapornis fischeri</i> (Pfirsichköpfchen)	2
<i>Agapornis roseicollis</i> (Rosenköpfchen)	1
Agapornide (Art nicht bekannt)	6
Gattung: <i>Platycercus</i>	
Art: <i>Platycercus eximius</i> (Rosellasittich)	4
<i>Platycercus elegans</i> (Pennantsittich)	1
Gattung: <i>Eclectus</i>	
Art: <i>Eclectus roratus</i> (Edelpapagei)	2
Gattung: <i>Lathamus</i>	
Art: <i>Lathamus discolor</i> (Schwalbensittich)	1
Gattung: <i>Forpus</i>	
Art: <i>Forpus coelestis</i> (Blaugenick-Sperlingspapagei)	1
Sperlingspapagei (Art nicht bekannt)	1
Gattung: <i>Poicephalus</i>	
Art: <i>Poicephalus rufiventris</i> (Rotbauchpapagei)	1
<i>Poicephalus rueppellii</i> (Rüppell-Papagei)	1
<i>Poicephalus senegalus</i> (Mohrenkopfpapagei)	1
Gattung: <i>Tricharia</i>	
Art: <i>Tricharia malachitacea</i> (Blaubauchpapagei)	1
Gattung: <i>Psephotus</i>	
Art: <i>Psephotus haematonotus</i> (Singsittich)	1
Gattung: <i>Ara</i>	
Art: <i>Ara ararauna</i> (Gelbbrustara)	2

Taxonomie	Anzahl Tiere
<p>Unterfamilie: Nestorinae</p> <p>Gattung: <i>Nestor</i></p> <p>Art: <i>Nestor notabilis</i> (Kea)</p> <p>Unterfamilie: Loriinae</p> <p>Gattung: <i>Lorius</i></p> <p>Art: <i>Lorius lory</i> (Frauenlori)</p> <p>Unterfamilie: Cacatuinae</p> <p>Gattung: <i>Cacatua</i></p> <p>Art: <i>Cacatua ophthalmica</i> (Brillenkakadu)</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Cacatua goffini</i> (Goffinkakadu)</p> <p>Gattung: <i>Eolophus</i></p> <p>Art: <i>Eolophus roseicapilla</i> (Rosakakadu)</p> <p>Gattung: <i>Probosciger</i></p> <p>Art: <i>Probosciger aterrimus</i> (Palmkakadu)</p> <p>Gattung: <i>Nymphicus</i></p> <p>Art: <i>Nymphicus hollandicus</i> (Nymphensittich)</p>	<p style="text-align: center;">1</p> <p style="text-align: center;">22</p>
<p>Ordnung: Passeriformes</p> <p>Familie: Fringillidae</p> <p>Unterfamilie: Carduelinae</p> <p>Gattung: <i>Serinus</i></p> <p>Art: <i>Serinus canaria forma domestica</i> (Kanarienvogel)</p> <p>Gattung: <i>Pyrrhula</i></p>	<p style="text-align: center;">51</p> <p style="text-align: center;">21</p>

Taxonomie	Anzahl Tiere
Art: <i>Pyrrhula pyrrhula</i> (Gimpel/Dompfaff)	3
Gattung: <i>Carduelis</i>	
Art: <i>Carduelis xanthogastra</i> (Gelbbauchzeisig)	2
<i>Carduelis carduelis</i> (Stieglitz)	1
Gattung: <i>Loxia</i>	
Art: <i>Loxia leucoptera</i> (Bindenkreuzschnabel)	3
Familie: Estrildidae	
Unterfamilie: Estrildinae	
Gattung: <i>Mandingoa</i>	
Art: <i>Mandingoa nitidula</i> (Grüner Tropfenastrild)	1
Gattung: <i>Uraeginthus</i>	
Art: <i>Uraeginthus bengalus</i> (Schmetterlingsfink)	1
Unterfamilie: Poephilinae	
Gattung: <i>Taeniopygia</i>	
Art: <i>Taeniopygia guttata</i> (Zebrafink)	9
Unterfamilie: Lonchurinae	
Gattung: <i>Erythrura</i>	
Art: <i>Erythrura gouldiae</i> (Gouldamadine)	6
<i>Erythrura prasina</i> (Lauchgrüne Papageiamadine)	1
Gattung: <i>Lonchura</i>	
Art: <i>Lonchura atricapilla/malacca brunneiceps</i>	1
(Braunkopfnonne)	
<i>Lonchura striata</i> (Japanisches Mövchen)	1

Taxonomie	Anzahl Tiere
Familie: Cardinalidae Gattung: <i>Passerina</i> Art: <i>Passerina caerulea</i> (Hellblauer Bischof)	1

Tabelle 10: Ergebnisse der untersuchten Patienten (n=265) mittels Ziehl-Neelsen-Färbung, *M. avium* ssp. *avium/silvaticum*- (MAA/S-) und *M. genavense*-PCR. Positiv getestete Patienten sind fett markiert und im ersten Teil der Tabelle dargestellt.

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
4947	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	Darm: negativ Leber: + Milz: ++	k.W.	Darm: 28,11 Leber: 28,94 Milz: 28,17	Darm: k.W. Leber: 33,34 Milz: 36,14	Darm: 34,01 Leber: 34,80 Milz: 34,06
10392	Wellen- sittich	Darm, Leber, UV Gelenk	Darm: +++ Leber, Gelenk: negativ	k.W.	Darm: 28,88 Leber: 29,27 Gelenk: 29,27	Darm: 39,90 Leber: k.W. Gelenk: k.W.	Darm: 35,58 Leber: 34,78 Gelenk: 34,43
11736	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	32,35	38,99	34,15

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
16483	Wellen- sittich	Darm, Leber	Darm, Leber: +++	k.W.	Darm: 27,99 Leber: 29,09	Darm: 35,00 Leber: 36,70	Darm: 33,68 Leber: 34,41
16944	Wellen- sittich	Leber	+++	k.W.	32,80	32,83	34,03
17038	Wellen- sittich	Darm, Leber	Darm, Leber: +/-	k.W.	Darm: 28,02 Leber: 26,98	Darm: 39,18 Leber: 39,66	Darm: 34,67 Leber: 33,94
17074	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	Darm: negativ Leber, Milz: +/-	k.W.	Darm: 27,21 Leber: 27,70 Milz: 29,18	Darm: 36,78 Leber: k.W. Milz: k.W.	Darm: 34,15 Leber: 34,17 Milz: 34,20
17317	Wellen- sittich	Darm, Leber	Darm: negativ Leber: +	k.W.	Darm: 29,31 Leber: 32,00	Darm: k.W. Leber: 35,50	Darm: 33,80 Leber: 33,88
17330	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	Darm: negativ Leber: +/- Milz: ++	k.W.	Darm: 31,58 Leber: 30,00 Milz: 30,60	Darm: k.W. Leber: 39,33 Milz: 37,12	Darm: 34,03 Leber: 33,95 Milz: 34,14

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
17605	Wellen- sittich	Darm, Leber	Darm: ++ Leber: negativ	k.W.	Darm: 30,24 Leber: 28,89	k.W.	Darm: 34,94 Leber: 34,76
17910	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	Darm, Leber: negativ Mi: +++	k.W.	Darm: 29,14 Leber: 29,98 Milz: 29,69	Darm: k.W. Leber: k.W. Milz: 38,43	Darm: 33,66 Leber: 34,11 Milz: 33,45
18025	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz, UV Lid	Darm: negativ Leber: + Milz: +++ Lid: +++++	k.W.	Darm: 30,58 Leber: 30,82 Milz: 30,89 Lid: 30,68	Darm: 38,73 Leber: k.W. Milz: 32,79 Lid: 24,74	Darm: 34,29 Leber: 34,58 Milz: 34,15 Lid: 33,34
18158	Wellen- sittich	Darm, Leber	Darm: ++++ Leber: +++	k.W.	Darm: 28,06 Leber: 28,07	Darm: 29,68 Leber: 35,68	Darm: 34,17 Leber: 34,30

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
18692	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	Darm, Leber: ++ Milz: +	k.W.	Darm: 29,40 Leber: 29,42 Milz: 30,02	Darm: 39,81 Leber: k.W. Milz: k.W.	Darm: 33,53 Leber: 33,95 Milz: 33,67
19209	Wellen- sittich	Darm, Leber	Darm: + Leber: ++	k.W.	Darm: 28,85 Leber: 29,30	Darm: 39,80 Leber: k.W.	Darm: 34,55 Leber: 34,42
19339	Wellen- sittich	Darm, Leber	Darm: +++ Leber: ++++	k.W.	Darm: 30,67 Leber: 32,00	Darm: 33,71 Leber: 29,52	Darm: 34,21 Leber: 34,06
20160	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	Darm: +++ Leber, Milz: ++++	k.W.	Darm: 27,53 Leber: 27,48 Milz: 27,98	Darm: 34,74 Leber: 30,72 Milz: 29,93	Darm: 34,30 Leber: 33,72 Milz: 33,48
20837	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	Darm: negativ Leber: + Milz: ++	k.W.	Darm: 29,34 Leber: 29,33 Milz: 29,88	Darm: k.W. Leber: k.W. Milz: 39,41	Darm: 35,36 Leber: 35,20 Milz: 34,90

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
20910	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz, UV Niere	Darm: ++++ Leber: +++ Milz: ++ Niere: negativ	k.W.	Darm: 29,14 Leber: 29,03 Milz: 29,75 Niere: 29,92	Darm: 31,66 Leber: 34,41 Milz: 36,40 Niere: k.W.	Darm: 34,53 Leber: 34,67 Milz: 34,29 Niere: 35,32
21293	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	Darm: negativ Leber: +/- Milz: +++	k.W.	Darm: 29,08 Leber: 28,94 Milz: 28,82	Darm: k.W. Leber: k.W. Milz: 39,33	Darm: 35,47 Leber: 35,01 Milz: 34,80

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
8038	Blaustirn- amazone	Darm, Leber, Milz, Lunge, Hoden, Drüsen- magen (DM)	Darm, Leber, Milz, Lunge, Hoden: ++++ DM: ++	k.W.	Darm: 31,94 Leber: 32,46 Milz: 32,30 Lunge: 31,51 Hoden: 32,27 DM: 32,71	Darm: 31,00 Leber: 32,80 Milz: 28,51 Lunge: 32,61 Hoden: 25,11 DM: 40,00	Darm: 33,43 Leber: 33,91 Milz: 33,77 Lunge: 33,65 Hoden: 33,62 DM: 33,77
12370	Amazone	Darm, Leber	Darm, Leber: ++++	k.W.	Darm: 27,11 Leber: 27,89	Darm: 27,53 Leber: 26,30	Darm: 33,84 Leber: 33,60

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
20820	Gelb- wangens- amazone	Darm, Leber, Milz, Lunge, Drüsen- magen (DM)	Darm, Lunge: ++++ Leber, Milz: +++ DM: negativ	k.W.	Darm: 28,50 Leber: 29,00 Milz: 32,00 Lunge: 29,25 DM: 29,64	Darm: 30,50 Leber: 40,92 Milz: 36,35 Lunge: 39,46 DM: k.W.	Darm: 33,82 Leber: 33,97 Milz: 34,36 Lunge: 34,24 DM: 34,30
17684	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	Darm, Leber: negativ Mi: +	k.W.	Darm: 28,92 Leber: 29,85 Milz: 30,50	Darm: k.W. Leber: k.W. Milz: 38,90	Darm: 33,64 Leber: 33,51 Milz: 34,10
17769	Aga- pornide	Darm, Leber, Milz	Darm, Leber: ++ Milz: +	k.W.	Darm: 28,58 Leber: 28,45 Milz: 29,39	Darm: 36,14 Leber: 36,16 Milz: 39,21	Darm: 33,63 Leber: 33,55 Milz: 34,16
21329	Blau- bauch- papagei	Darm, Leber, Milz	Darm: +++ Leber: +/- Milz: ++	k.W.	Darm: 29,04 Leber: 29,08 Milz: 29,01	Darm: k.W. Leber: k.W. Milz: 38,89	Darm: 34,33 Leber: 34,10 Milz: 33,88

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
8454	Zebrafink	Darm, Leber, Lunge	Darm: +/- Leber: + Lunge: ++	k.W.	Darm: 33,99 Leber: 36,59 Lunge: 33,17	Darm: 37,66 Leber: 38,14 Lunge: 37,50	Darm: 35,03 Leber: 34,84 Lunge: 34,74
16484	Zebrafink	Darm, Leber, Lunge, Knochen- mark (KM), Bürzel- drüse (BD)	Darm, Leber, Lunge: negativ KM,BD: +++	k.W.	Darm: 30,51 Leber: 33,00 Lunge: 30,27 KM: 28,34 BD: 29,47	Darm: k.W. Leber: k.W. Lunge: 37,41 KM: 39,54 BD: 38,57	Darm: 34,95 Leber: 34,28 Lunge: 34,45 KM: 34,75 BD: 34,28
20759	Zebrafink	Darm, Leber, Milz, Bürzel- drüse (BD)	Darm: negativ Leber: + Milz: ++ BD: ++++	k.W.	Darm: 29,23 Leber: 29,54 Milz: 28,86 BD: 28,75	Darm: k.W. Leber: k.W. Milz: 38,52 BD: 35,04	Darm: 35,01 Leber: 34,84 Milz: 35,17 BD: 34,89
21217	Zebrafink	Darm, Leber	Darm: +/- Leber: ++	k.W.	Darm: 29,09 Leber: 28,59	Darm: negativ Leber: 40,37	Darm: 34,09 Leber: 34,32

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
17469	Kanarien- vogel	Darm, Leber, Milz, Niere, Luftsack (LS)	Darm, Milz, Niere: +++ Leber, LS: ++++	Darm: 28,46 Leber: 22,82 Milz: 31,53 Niere: 33,30 LS: 19,00	Darm: 27,68 Leber: 34,00 Milz: 28,24 Niere: 28,65 LS: k.W.	Darm: 27,82 Leber: 28,00 Milz: 24,44 Niere: 32,20 LS: 30,29	Darm: 34,09 Leber: 33,85 Milz: 33,36 Niere: 33,84 LS: 33,05
18872	Kanarien- vogel	Darm, Leber, Lid	Darm, Leber: ++ Lid: +	k.W.	Darm: 29,87 Leber: 30,48 Lid: 29,37	Darm: 36,09 Leber: 36,67 Lid: 38,13	Darm: 33,91 Leber: 34,19 Lid: 33,95
19341	Kanarien- vogel	Darm, Leber, Milz	Darm: + Leber: negativ Milz: ++	k.W.	Darm: 29,79 Leber: 30,60 Milz: 31,43	Darm: 40,26 Leber: k.W. Milz: 36,20	Darm: 33,52 Leber: 34,23 Milz: 34,10
17683	Gould- amadine	Darm, Leber, Milz	Darm: + Leber, Milz: ++	k.W.	Darm: 29,63 Leber: 29,65 Milz: 28,59	Darm: 34,48 Leber: k.W. Milz: 37,08	Darm: 33,37 Leber: 34,09 Milz: 33,94

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
18172	Gould- amadine	Darm, Leber	Darm: negativ Leber: ++	k.W.	Darm: 29,01 Leber: 29,45	Darm: negativ Leber: 40,12	Darm: 34,98 Leber: 35,03
18299	Gould- amadine	Darm, Leber	negativ	k.W.	28,60	38,82	34,77
17271	Schmet- terlings- fink	Darm, Leber	Darm: ++ Leber: negativ	k.W.	Darm: 25,35 Leber: 27,74	k.W.	Darm: 33,75 Leber: 33,67
17531	Hell- blauer Bischof	Darm, Leber	Darm: ++ Leber: negativ	k.W.	Darm: 27,98 Leber: 27,50	k.W.	Darm: 34,55 Leber: 34,32
17610 T2	Gelb- bauch- zeisig	Darm, Leber, Milz	Darm: negativ Leber: +/- Milz: ++	k.W.	Darm: 30,28 Leber: 30,02 Milz: 30,12	Darm: k.W. Leber: k.W. Milz: 38,63	Darm: 33,65 Leber: 33,57 Milz: 33,97
19597	Braun- kopf- nonne	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,82	40,05	34,46

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
20261	Gimpel	Darm, Leber, Milz	Darm: +/- Leber: + Milz: ++	k.W.	Darm: 27,53 Leber: 28,15 Milz: 27,78	Darm: k.W. Leber: k.W. Milz: 34,77	Darm: 33,77 Leber: 33,47 Milz: 34,03
unbe- kannt	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,97	k.W.	33,96
705	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,99	k.W.	34,32
3991	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,93	k.W.	34,85
4294	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,11	k.W.	34,56
7594	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,03	k.W.	34,06
9965	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,38	k.W.	33,35
9966	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	27,60	k.W.	35,14
10601	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,47	k.W.	34,00

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
11817	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,97	k.W.	34,18
12387	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,33	k.W.	33,88
13199	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,56	k.W.	34,21
13416	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,77	k.W.	34,66
14254	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,93	k.W.	34,04
14467	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,55	k.W.	34,11
14920	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz, UV Gelenk	negativ	k.W.	29,11	k.W.	34,32
15284	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	31,43	k.W.	34,04
15529	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,19	k.W.	33,78

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
15604	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,40	k.W.	34,15
16631	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,05	k.W.	33,94
16681	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,67	k.W.	34,38
17161	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,99	k.W.	33,72
17163	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	31,92	k.W.	34,05
17260	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	26,55	k.W.	34,13
17286	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,08	k.W.	34,04
17505	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,91	k.W.	35,09
17518	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	27,28	k.W.	34,02

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
17574	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	31,96	k.W.	34,33
17604	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,06	k.W.	34,19
17639	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	31,09	k.W.	33,88
17646	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,48	k.W.	34,28
17718	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,61	k.W.	33,80
17719	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,89	k.W.	33,84
17824	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,64	k.W.	34,26
17870	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,77	k.W.	35,07
17879	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,07	k.W.	34,36

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
17888	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,68	k.W.	34,51
17918	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	31,01	k.W.	34,61
17920	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	32,19	k.W.	34,74
18038	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,93	k.W.	34,21
18099	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,26	k.W.	34,03
18107	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,57	k.W.	34,35
18215	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	32,21	k.W.	34,20
18241	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,64	k.W.	34,50
18248	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	32,83	k.W.	35,25

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
18305	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,36	k.W.	33,97
18335	Wellen- sittich	Darm, Leber, Lid	negativ	k.W.	28,79	k.W.	34,84
18341	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,19	k.W.	35,07
18399	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	26,51	k.W.	34,17
18404	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,12	k.W.	33,95
18553	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,45	k.W.	34,20
18556	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,27	k.W.	34,03
18712	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,84	k.W.	34,52
18713	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,76	k.W.	34,51
18791	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,14	k.W.	35,33

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
18799	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,16	k.W.	34,05
18908	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,62	k.W.	34,15
18947	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,39	k.W.	33,96
18968	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,79	k.W.	34,09
19077	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	33,06	k.W.	34,33
19080	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	34,27	k.W.	33,81
19225	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,67	k.W.	34,43
19235	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	28,00	k.W.	33,86
19236	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	27,90	k.W.	33,80

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
19285	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,24	k.W.	34,33
19293	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,06	k.W.	33,91
19304	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,00	k.W.	34,52
19315	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,25	k.W.	33,93
19343	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,80	k.W.	34,19
19359	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,85	k.W.	33,87
19370	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,50	k.W.	33,43
19408	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,01	k.W.	33,87
19439	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,06	k.W.	34,14
19533	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	27,38	k.W.	34,74

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
19616	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	27,97	k.W.	33,72
19782	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,90	k.W.	33,94
19856	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,49	k.W.	34,14
19860	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,06	k.W.	34,29
19923	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,00	k.W.	33,78
19954	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz, Knochen- mark	negativ	k.W.	30,04	k.W.	34,11
19987	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,88	k.W.	34,15
20008	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,87	k.W.	33,45

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
20078	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz, subkutane UV Ohr	negativ	k.W.	28,52	k.W.	34,27
20129	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,18	k.W.	33,68
20297	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,23	k.W.	33,65
20373	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,91	k.W.	34,11
20487	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,36	k.W.	34,68
20537	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,79	k.W.	33,85
20557	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,91	k.W.	34,53
20828	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,70	k.W.	33,99

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
20908	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	28,92	k.W.	34,09
20917	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,34	k.W.	33,93
21028	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,88	k.W.	34,36
21039	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,20	k.W.	34,93
21119	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,61	k.W.	33,88
21208	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,55	k.W.	34,08
21307	Wellen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	28,98	k.W.	35,06
21316	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz, UV Gelenk	negativ	k.W.	Darm, Leber, Milz: 30,50 UV Gelenk: 29,76	k.W.	Darm, Leber, Milz: 34,40 UV Gelenk: 34,25

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
21354	Wellen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	32,69	k.W.	35,01
11082	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,21	k.W.	34,00
14925	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,77	k.W.	34,59
16431	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,10	k.W.	33,97
17352	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,49	k.W.	33,99
17598	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	31,38	k.W.	33,88
17778	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,92	k.W.	33,84
17807	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,00	k.W.	34,77
17874	Nymphen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,57	k.W.	34,76

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
17987	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,70	k.W.	34,30
18445	Nymphen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,15	k.W.	34,20
18521	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,49	k.W.	35,53
18565	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,87	k.W.	34,52
18646	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,82	k.W.	33,62
19447	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,01	k.W.	33,94
20066	Nymphen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,60	k.W.	34,46
20176	Nymphen- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	27,86	k.W.	33,73
20193	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,05	k.W.	33,93

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
20583	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,12	k.W.	34,81
20893	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,40	k.W.	35,31
21070	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,89	k.W.	34,47
21098	Nymphen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,70	k.W.	34,62
111	Kongo- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,06	k.W.	33,50
17299	Kongo- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,96	k.W.	33,91
17375	Kongo- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,46	k.W.	34,07
17422	Kongo- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,78	k.W.	34,25

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
17837	Kongo- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,08	k.W.	33,90
18199	Kongo- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz, Lunge	negativ	k.W.	27,76	k.W.	34,40
19164	Kongo- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,15	k.W.	33,91
19190	Kongo- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz, Lunge	negativ	k.W.	30,17	k.W.	34,31
19928	Kongo- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,06	k.W.	34,91
20049	Kongo- Grau- papagei	Darm, Leber, Lunge, Milz, UV Auge	negativ	k.W.	28,60	k.W.	34,12
20239	Kongo- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,38	k.W.	34,04

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
20885	Kongo- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz, Lunge, Pankreas (Pa)	negativ	k.W.	Darm, Leber, Milz: 29,27 Lunge, Pa: 29,17	k.W.	Darm, Leber, Milz: 34,32 Lunge, Pa: 34,05
20914	Kongo- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,62	k.W.	33,72
21003	Kongo- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,97	k.W.	34,49
21048	Kongo- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,07	k.W.	34,03
10097	Timneh- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,67	k.W.	33,97
17468	Timneh- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,12	k.W.	34,19
20884	Timneh- Grau- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,42	k.W.	33,68

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
3803	Blaustirn- amazone	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,46	k.W.	33,79
17248	Blaustirn- amazone	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,21	k.W.	33,79
17781	Blaustirn- amazone	Darm, Leber, Milz, Drüsen- magen (DM), UV Gelenk	negativ	Darm, Leber, Milz: 30,42 DM,UV Gelenk: 30,05	28,88	k.W.	Darm, Leber, Milz: 34,40 DM,UV Gelenk: 34,74
18101	Blaustirn- amazone	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,55	k.W.	33,87
17245	Vene- zuela- Amazone	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,34	k.W.	34,42
21010	Venezuela -Amazone	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,79	k.W.	34,66
19340	Gelb- nacken- amazone	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,32	k.W.	34,26

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
20792	Gelb- nacken- amazone	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	31,80	k.W.	35,35
17036	Gelb- scheiden- amazone	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	31,46	k.W.	34,62
17293	Doppel- gelbkopf- amazone	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	27,64	k.W.	35,07
17414	Gelb- wangen- amazone	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,70	k.W.	34,46
19717	Müller- amazone	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,57	k.W.	34,51
20913	Blaubart- amazone	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,87	k.W.	34,12
17525	Pfirsich- köpfchen	Darm, Leber	negativ	k.W.	28,02	k.W.	34,34
17958	Pfirsich- köpfchen	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,59	k.W.	33,98
20952	Rosen- köpfchen	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,47	k.W.	33,94

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
17700	Aga- pornide	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	32,37	k.W.	33,82
18200	Aga- pornide	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,05	k.W.	34,28
18650	Aga- pornide	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,17	k.W.	33,81
20560	Aga- pornide	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,64	k.W.	35,02
20607	Aga- pornide	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,55	k.W.	34,94
17702	Rosella- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,48	k.W.	33,82
19108	Rosella- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	33,96	k.W.	34,41
19681	Rosella- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,61	k.W.	33,85
19927	Rosella- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,46	k.W.	35,49

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
19004	Ziegen- sittich	Darm, Leber, Milz, Lunge, Hirn, UV Gelenk	negativ	k.W.	Darm, Leber, Milz: 28,14 Lunge, UV Gelenk, Hirn: 29,62	k.W.	Darm, Leber, Milz: 34,17 Lunge, UV Gelenk, Hirn: 33,65
20214	Ziegen- sittich	Darm, Leber, Milz, Lunge, UV Hals, Niere, Aorta	negativ	k.W.	Darm, Leber, Milz, Lunge: 30,10 UV, Niere, Aorta: 30,26	k.W.	Darm, Leber, Milz, Lunge: 34,37 UV, Niere, Aorta: 34,45
21212	Ziegen- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,73	k.W.	34,17
18874 Tier 1	Schön- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	31,70	k.W.	33,62
18874 Tier 2	Schön- sittich	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,87	k.W.	34,19

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
6006	Pennant- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,20	k.W.	34,41
18391	Schwal- bensittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,42	k.W.	34,21
19218	Singsittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,96	k.W.	35,11
19845	Schild- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,86	k.W.	33,56
20398	Bergsittich	Darm, Leber, Milz, Lunge, Luftsack	negativ	k.W.	30,96	k.W.	34,15
4280	Edel- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	33,00	k.W.	35,86
21190	Edel- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,54	k.W.	35,07
17318	Brillen- kakadu	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	31,04	k.W.	34,73

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
18279	Rosa- kakadu	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,70	k.W.	34,93
18294	Goffin- kakadu	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,07	k.W.	33,86
20288	Palm- kakadu	Darm, Leber, Milz, Lunge	negativ	k.W.	28,51	k.W.	33,67
18393	Blau- genick- Sperlings- papagei	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,80	k.W.	34,27
19393	Sperlings- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,31	k.W.	33,89
17346	Katharina- sittich	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,27	k.W.	34,33
18015	Gelbbrust- ara	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	32,27	k.W.	34,42
20883	Gelbbrust- ara	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,50	k.W.	35,80

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
18531	Rotbauch- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,45	k.W.	33,92
17219	Rüppel- Papagei	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,05	k.W.	33,32
21165	Mohren- kopf- papagei	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,72	k.W.	34,18
17332	Kea	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,15	k.W.	33,98
18917	Frauenlori	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,94	k.W.	34,33
3262	Kanarien- vogel	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,71	k.W.	34,73
9858	Kanarien- vogel	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,24	k.W.	34,39
12971	Kanarien- vogel	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,82	k.W.	33,96
17184	Kanarien- vogel	Darm, Leber	negativ	k.W.	32,55	k.W.	33,47
17382 T1	Kanarien- vogel	Darm, Leber	negativ	k.W.	34,08	k.W.	33,99

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
17382 T2	Kanarien- vogel	Darm, Leber	negativ	k.W.	33,62	k.W.	34,15
17382 T3	Kanarien- vogel	Darm, Leber	negativ	k.W.	33,29	k.W.	34,24
17382 T4	Kanarien- vogel	Darm, Leber	negativ	k.W.	33,51	k.W.	33,87
17724	Kanarien- vogel	Darm, Leber, Milz, UV Lid	negativ	k.W.	28,46	k.W.	34,80
17836	Kanarien- vogel	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,56	k.W.	34,06
18084	Kanarien- vogel	Darm, Leber	negativ	k.W.	31,81	k.W.	34,79
18183	Kanarien- vogel	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	28,35	k.W.	33,96
18587	Kanarien- vogel	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	31,72	k.W.	34,19
18984	Kanarien- vogel	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,81	k.W.	34,38

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
19371	Kanarien- vogel	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	31,34	k.W.	33,74
19446	Kanarien- vogel	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,79	k.W.	34,00
20293	Kanarien- vogel	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	30,72	k.W.	34,00
20488	Kanarien- vogel	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,54	k.W.	33,68
12972	Zebrafink	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	33,72	k.W.	34,57
19255	Zebrafink	Darm, Leber	negativ	k.W.	27,39	k.W.	34,38
19342	Zebrafink	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,62	k.W.	34,49
19385	Zebrafink	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,89	k.W.	33,83
20220	Zebrafink	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,33	k.W.	34,46
18821 T1	Gould- amadine	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,49	k.W.	34,63

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
18821 T2	Gould- amadine	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,56	k.W.	34,22
20100	Gould- amadine	Darm, Leber	negativ	k.W.	30,20	k.W.	34,16
18145 T1	Binden- kreuz- schnabel	Darm, Leber	negativ	k.W.	27,95	k.W.	33,95
18145 T2	Binden- kreuz- schnabel	Darm, Leber	negativ	k.W.	28,03	k.W.	34,32
18145 T3	Binden- kreuz- schnabel	Darm, Leber	negativ	k.W.	28,25	k.W.	34,78
19266	Gimpel	Darm, Leber, Milz	negativ	k.W.	29,82	k.W.	34,42
20460	Gimpel	Darm, Leber, Milz, Lunge	negativ	k.W.	29,57	k.W.	34,70
17610 T1	Gelb- bauch- zeisig	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,86	k.W.	33,56
21299	Stieglitz	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,00	k.W.	35,17

Tier- nummer	Vogel- spezies	Proben- material	Ergebnis Ziehl- Neelsen- Färbung	Ct- Wert MAA/ S-PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle	Ct- Wert M. gena- vense- PCR	Ct- Wert interne Kon- trolle
18392	Japan- isches Mövchen	Darm, Leber	negativ	k.W.	28,73	k.W.	35,63
19015	Grüner Tropfen- astrild	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,49	k.W.	34,26
20542	Lauch- grüne Papagei- amadine	Darm, Leber	negativ	k.W.	29,74	k.W.	33,92

k.W.: kein Ct-Wert messbar

10. Danksagung

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Korbelt möchte ich mich für die Überlassung dieses interessanten Themas bedanken.

Dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Zürich danke ich für die Überlassung der *M. genavense*-Referenzstämme und deren Anzucht. Ich danke dem LGL Oberschleißheim für die Überlassung der Referenzstämme.

Dr. Katrin Stein und PD Dr. Monika Rinder möchte ich für ihre große Hilfsbereitschaft und Unterstützung während meiner Dissertation und die sorgfältige Durchsicht meiner Arbeit danken. Dr. Katrin Stein und Anna Schmitz möchte ich für ihre Mithilfe bei der Sammlung meiner Proben in der Pathologie danken.

Ich danke den Mitarbeitern aus der bakteriologischen Abteilung der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische für ihre Hilfe. Insbesondere Daniela Wagner danke ich für ihre große Hilfe.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische bedanken, die zur Durchführung dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Annemarie und Helmut Hanika möchte ich von ganzem Herzen für ihre große Hilfsbereitschaft, sowie finanzielle und herzliche Unterstützung während meiner Dissertation danken. Das ist nicht selbstverständlich und ich schätze das wirklich sehr.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinem Partner Franz Ferdinand Hanika, der mir während der gesamten Zeit der Doktorarbeit zur Seite stand und mich unterstützte. Ganz besonders möchte ich meinen Eltern für ihre liebevolle und finanzielle Unterstützung während all der Zeit danken. Ohne Euch wäre all dies nicht möglich gewesen.