

Aus dem Institut für Bakteriologie und Mykologie  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Beiträge zur Verbesserung molekularbiologischer Untersuchungsmethoden  
zum Nachweis von Mykobakterien-Infektionen in tierischem Gewebe**

Inaugural Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Johanna Nieter  
aus Itaberá, Brasilien

Leipzig, 2016

*Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig*

*Dekan:* Prof. Dr. med. vet. Manfred Coenen

*Betreuer:* Prof. Dr. med. vet. Monika Krüger  
PD Dr. med. vet. Irmgard Moser

*Gutachter:* Prof. Dr. med. vet. Monika Krüger  
Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig  
PD Dr. med. vet. Irmgard Moser  
Friedrich-Loeffler-Institut Standort Jena, Institut für molekulare Pathogenese  
Prof. Dr. med. vet. Reinhard Konrad Straubinger  
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Institut  
für Infektionsmedizin und Zoonosen

*Tag der Verteidigung:* 15.03.2016.

## Inhalt

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	1
2.1	Die Rindertuberkulose	1
2.2	Vorschriften zur Bekämpfung der Rindertuberkulose in Deutschland	4
2.2.1	Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes	4
2.2.2	Molekulare Diagnostik im Rahmen der Tuberkulose-Verordnung	5
2.3	Taxonomie und Eigenschaften der Mykobakterien	6
2.3.1	Der <i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplex	8
2.3.2	Mykobakterien, die nicht zum <i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplex gehören	11
2.4	Diagnostikmethoden	13
2.4.1	Konventionelle Methoden	13
2.4.1.1	Kultureller Nachweis	13
2.4.1.2	Mikroskopie	14
2.4.2	Molekulare Methoden	14
2.4.2.1	Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	14
2.4.2.2	Real-Time PCR (Echtzeit-PCR)	15
2.4.2.3	DNA-Extraktion	17
2.4.2.4	Spoligotyping	18
3	Material und Methoden	22
3.1	Verwendete Materialien	22
3.2	Durchgeführte Methoden	33
3.2.1	Kultivierung von <i>M. bovis</i> BCG in Reinkultur	33
3.2.2	Gewinnung und Aufarbeitung von Gewebeproben von Tieren mit nachgewiesener Tuberkulose	34
3.2.2.1	Ansatz für die Kultur	35

3.2.2.2	Ansätze für die DNA-Extraktion	36
3.2.3	Molekularbiologische Methoden	36
3.2.3.1	DNA-Extraktion aus Reinkultur von <i>M. bovis</i> BCG	36
3.2.3.2	Real-Time PCR	38
3.2.3.3	Berechnung der DNA-Konzentration	42
3.2.4	Charakterisierung des <i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplexes mittels Spoligotyping	42
3.3	Statistische Auswertung	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Zelldichte der Standardsuspension	48
4.2	Optimierung der DNA-Extraktion aus Mykobakterien	48
4.2.1	Steigerung der Effizienz der Bakteriolyse bei Bakterien-Reinkultur: thermische Lyse, mechanische Lyse, enzymatische Lyse und thermo-enzymatische Lyse	50
4.2.2	Steigerung der Effizienz der Bakteriolyse bei Gewebe von Tieren mit nachgewiesener Tuberkulose	53
4.2.3	Berechnung der Anzahl an Genomeinheiten	56
4.3	Entwicklung einer genusspezifischen Real-Time PCR für Mykobakterien	60
4.3.1	16S rDNA rt-PCR	60
4.3.1.1	Untersuchung von Gewebeproben	65
4.3.2	<i>hsp65</i> rt-PCR	70
4.4	Untersuchungen mittels Spoligotyping	70
4.4.1	Konventionelles Spoligotyping (nach Kamerbeek et al. 1997)	71
4.4.2	Spoligotyping in ArrayStrip™-Format (nach Rüttger et al. 2012)	74
5	Diskussion	77
5.1	Optimierung der DNA-Freisetzung aus Mykobakterien	77
5.2	Varianten des Standardlyse-Protokolls, durchgeführt mit Reinkultur von <i>M. bovis</i> BCG	78

5.3	Korrelation zwischen Ct-Werten, Anzahl an Genomeinheiten und KbE bei Reinkultur von <i>M. bovis</i> BCG	79
5.4	Untersuchungen von Gewebeproben von Tieren mit nachgewiesener Tuberkulose	81
5.5	Entwicklung einer genusspezifischen rt-PCR	84
5.6	Vergleich der konventionellen Spoligotyping-Methode mit der Array-Strip™-Format Methode	85
6	Zusammenfassung	89
7	Summary	91
8	Literaturverzeichnis	93
9	Anhang	106

## Übersicht der verwendeten Abkürzungen und Einheiten

A	Adenin
A1-A6	Anhang 1-6
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BHQ-1	Black Hole Quencher
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
Ct	Cycle threshold
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DR	Direct Repeats
et al.	et alii (und Mitarbeiter)
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FAM	6-carboxy-Fluorescein
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
G	Guanin
h	Stunde
HEX	Hexachloro-6-carboxy- Fluorescein
HIV	Human immunodeficiency virus
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxyd
Hz	Hertz
IS	Insertionssequenz
IU	International Units
KbE	Kolonienbildende Einheit
LJ	Löwenstein-Jensen-Medium
M.	<i>Mycobacterium</i>
MAIC	<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> Komplex
MB	Bouillon nach Middlebrook
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MG	Molekulargewicht
Min	Minute
ml	Milliliter
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
MTC	<i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplex
Mol	Molekulargewicht in g/l
MOTT	Mycobacteria Other Than Tubercle Bacilli
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NALC	N-acetyl L-Cystein
n. b	Nicht bestimmt

NTM	Non Tuberculous Mycobacteria
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PK	Proteinase K
pmol	Pikomol
Qs	Quantifikationsstandards
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
rt-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SD	Standardabweichung
Sek	Sekunde
STBP	Stonebrink mit Pyruvat
subsp.	Subspecies
T	Thymin
TAMRA	Tetramethylrhodamine
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur (melting temperature)
Unbest.	Unbestimmbar
UpM	Umdrehungen pro Minute
z. B.	Zum Beispiel
YAK	Yakima yellow
°C	Grad Celsius
%	Prozent
®	geschütztes Warenzeichen (registered trade mark)
∅	Durchmesser
™	Trademark
α	Signifikanzniveau
§	Paragraph
&	Und

*Wie versprochen*

*für  
Oma aus Gleys  
und  
Oma aus Rodheim*

## **1 Einleitung**

Zu Anfang des 20. Jahrhunderts war in Europa ein großer Teil der Bevölkerung an Tuberkulose erkrankt, deren Übertragung vor allem von schlechten sozioökonomischen Lebensbedingungen begünstigt wurde. Etwa 500 Menschen pro 100 000 Einwohner starben zu dieser Zeit an Tuberkulose (MURRAY, 2007).

Noch heute infizieren sich circa 8,8 Millionen Menschen weltweit jedes Jahr neu mit Tuberkulose-Erregern, und es wird geschätzt, dass jährlich 1,5 Millionen Menschen an Tuberkulose sterben (ZIEGLER et al. 2012). Unzureichende sozioökonomische Bedingungen in Entwicklungsländern, z. B. Afrika, zusammen mit der Immunodepression durch HIV begünstigen die Zunahme von Tuberkulosefällen in diesen Ländern (MORR, 2003; MURRAY, 2007). In Deutschland wurden im Jahr 2012 beim Menschen 4 137 Neu-Infektionen mit Tuberkulose diagnostiziert (ROBERT KOCH INSTITUT, 2013).

Neben der von Mensch zu Mensch übertragbaren Tuberkulose, hervorgerufen durch *Mycobacterium (M.) tuberculosis*, ist auch eine Art der Erkrankung, hervorgerufen durch *M. bovis*, von Bedeutung, die vom Rind bzw. durch Milch auf den Menschen übertragen werden kann. Dies begründet die Einordnung der Tuberkulose als Zoonose. Im Jahr 1957 waren in Deutschland etwa 13 % der Tuberkulose-Fälle beim Menschen durch *M. bovis* hervorgerufen. Im Laufe der Zeit ging die Zahl der zoonotischen Tuberkuloseerkrankung aufgrund der Einführung der Pasteurisierung von Rohmilch und anderer Bekämpfungsmaßnahmen in Deutschland und anderen Ländern der nördlichen Hemisphäre zurück (KLEINSCHMIDT, 1964). Im Jahr 2009 waren nur noch etwa 2 % der Tuberkulose-Fälle beim Menschen in Deutschland durch den Erreger *M. bovis* hervorgerufen (ROBERT KOCH INSTITUT, 2011). Heute ist Deutschland seit mehr als 15 Jahren offiziell frei von Rindertuberkulose. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die Rindertuberkulose vollständig ausgerottet ist.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Die Rindertuberkulose – Pathogenese, Bedeutung in Deutschland**

Die Rindertuberkulose ist eine chronische Erkrankung, die von *M. bovis* und *M. caprae*, Mitgliedern des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTC), ausgelöst wird. Rinder gelten als Primärwirte dieser Erreger, die jedoch auch andere Tierarten, Wild und Haustiere, sowie auch den Menschen befallen können (BIET et al. 2005; SCHMIDTBAUER et al. 2011).

Bei der Rindertuberkulose handelt es sich um eine anzeigepflichtige Tierseuche (TIERGESUNDHEITSGESETZ, 2014; MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND

VACCINES FOR TERRESTRIAL ANIMALS, 2012). Die Erkrankung ist sowohl wirtschaftlich als auch unter dem Aspekt der öffentlichen Gesundheit (public health) für Rinderhaltungsbetriebe von Bedeutung (LIÉBANA et al. 1995).

Die Aufnahme des Erregers kann über den Respirationstrakt (aerogen) oder den Verdauungstrakt (oral) erfolgen. Die Übertragung geschieht meist durch Tröpfcheninfektion, so dass die Luftwege in der Regel die primären Manifestationsorgane darstellen. Bei Jungtieren ist auch der orale Infektionsweg über die Milch von Bedeutung. Zu Beginn der Infektion entsteht an der Eintrittsstelle der Erreger ein Entzündungsherd, der Primärherd genannt wird. Daran kann sich eine unregelmäßig lange (Wochen bis Monaten) symptomlose Phase anschließen. Durch Ausbreitung des Erregers in die regionären Lymphknoten kann der sogenannte Primärkomplex entstehen. Aus diesem kann sich im weiteren Verlauf der Erkrankung ein deutlich sichtbarer abgekapselter Infektionsherd entwickeln, der „Tuberkel“ (Knötchen; Granulom) genannt wird. Der Primärkomplex kann bei günstigem Verlauf für lange Zeit ruhen, ohne dass Krankheits-symptome sichtbar werden. Bei Belastung des Organismus können sich Erreger vom Primärkomplex in andere Organe ausbreiten. Es kann sowohl zu weiteren Infektionsherden in einzelnen Organen (z. B. Darm, Leber, Harnwege; Organtuberkulose) als auch im Zuge einer Generalisierung über die Blutbahn zur Bildung multipler kleiner Infektionsherde (Miliartuberkulose) in allen Körperregionen kommen (ROLLE und MAYR, 2002).

Wenn ein Granulom aufbricht und sein Inhalt sich in präformierte Kanalsysteme des Organismus (z. B. Bronchien, Darm, Milchgänge des Euters, Harnwege) entleert, kann dies zur Ausscheidung von Erregern über Lunge, Kot, Milch oder Urin führen (AYELE et al. 2004).

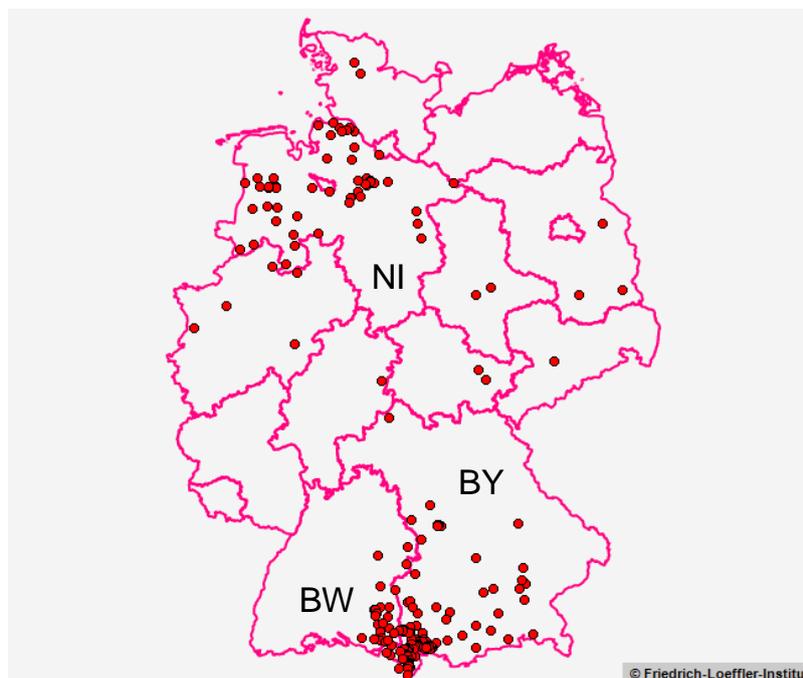
Die klinischen Veränderungen bei Tuberkulose erkrankten Rindern sind meist über einen längeren Zeitraum (Wochen oder Monaten) unspezifisch. Unerklärliche Leistungsminderungen oder chronische Atemwegsprobleme können auf die Erkrankung hinweisen. Häufig wird der Verdacht auf die Krankheit erst bei der Schlachtung geäußert, wenn granulomatöse Veränderungen an Organen sichtbar werden, ohne dass sich bei lebenden Tieren klinische Symptome gezeigt hätten (MOSER, 2009).

In den Jahren 1930 bis 1938 waren 36 % bis 40 % aller Schlachtrinder mit Tuberkulose infiziert, im Jahr 1949 waren es bereits 45 %. Durch den Zweiten Weltkrieg hat sich die Tuberkulose beim Rind stark verbreitet, so dass in den 1950er Jahren bis zu etwa 63 % der Rinderhaltungsbetriebe in Deutschland betroffen waren. Ende des Jahres 1961 waren 99,7 % aller Rinderhaltungsbetriebe in West-Deutschland frei von Rindertuberkulose (KLEINSCHMIDT, 1964). In Ost-Deutschland wurde dieser Status zum Ende der 1970er Jahre erreicht (SCHWEDLER, 1982).

Die Infektion wurde durch Identifizierung infizierter Tiere mittels Tuberkulin-Hauttest und Entfernung der positiven Reagenten aus dem Bestand in Verbindung mit der Pasteurisierung von Rohmilch fast vollständig ausgerottet (KLEINSCHMIDT, 1964; MOSER, 2012). Die heute zunehmende Tendenz von Verbrauchern, Rohmilch oder Rohmilch-Produkte zu verzehren, kann allerdings der Übertragung des Erregers auf den Menschen Vorschub leisten, da die Tuberkulose lange Zeit unerkannt in einem Bestand vorkommen kann.

Im Jahr 1995 wurde eine Zentrale Tierseuchendatenbank (TSN: Tierseuchennachrichtensystem) in Deutschland etabliert, zu der berechnigte Personen Zugriff haben. In diesem elektronischen System werden die Informationen über Tierseuchen gesammelt.

In der Zeit von Anfang Mai 1995 bis Ende Dezember 2013 wurden insgesamt 222 Ausbrüche in Deutschland registriert, davon 118 Ausbrüche in der Zeit von Anfang Mai 2008 bis Ende Dezember 2013, wobei die Bundesländer Bayern, Baden-Württemberg und Niedersachsen den größten Anteil an diesem Tuberkulose-Geschehen hatten (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1.** Anzahl der Ausbrüche der Rindertuberkulose in Deutschland von 1995 bis 31. Dezember 2013.

Die Rindertuberkulose-Fälle sind mit einem kleinen roten Kreis markiert. Die Bundesländer Bayern, Baden-Württemberg und Niedersachsen waren überwiegend betroffen.

In Bayern wurde die überwiegende Zahl der Ausbrüche im Landkreis Oberallgäu festgestellt (TSN), wobei der Kontakt zu Wildtieren, z. B. im Zusammenhang mit der Alpung, eine in Deutschland bisher noch wenig untersuchte Rolle zu spielen scheint. In Baden-Württemberg konzentrieren sich die Ausbrüche im Wesentlichen auf die Gebiete in Grenznähe zum Landkreis Oberallgäu.

Im Nachbarland Österreich wurde in den vergangenen Jahren bei Rotwild in bestimmten Regionen im Westen des Landes in erheblichem Maße Tuberkulose festgestellt (SCHOEPF et al. 2012) und eine Zunahme von Tuberkulose bei Rindern in diesen Regionen nachgewiesen (PRODINGER et al. 2003).

In Niedersachsen wurde im Jahr 2008 ein für Deutschland relativ umfangreicher Ausbruch der Rindertuberkulose mit insgesamt 12 involvierten Betrieben festgestellt. Insgesamt waren im Jahr 2008 in Deutschland 23 Betriebe von Rindertuberkulose betroffen (TSN, 2009). Dennoch war der Status „amtlich frei von Rindertuberkulose“ nicht gefährdet. Der Ausbruch im Jahr 2008 bot jedoch die Veranlassung, die bis dahin angewandten Kontroll- und Diagnostik-Vorschriften zu überdenken und zu ergänzen (MOSER, 2012).

## **2.2 Vorschriften zur Bekämpfung der Rindertuberkulose in Deutschland**

### **2.2.1 Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes**

In Deutschland Ost und West hatten konsequente Tuberkulose-Bekämpfungskampagnen in den Jahren 1952 – 1961 bzw. bis zum Ende der 1970er Jahre dazu geführt, dass die Rinderbestände nahezu vollständig frei wurden von Tuberkulose.

Um diesen Status dauerhaft zu gewährleisten, wurde in Westdeutschland im Jahr 1965 die „Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes“ (03. August 1965) erlassen, die in Deutschland seither zusammen mit den Richtlinien der EU die Richtlinien für die Bekämpfung der Rindertuberkulose vorgibt. In Ostdeutschland wurde im Jahr 1986 die „Weisung Nr. 7 zur Tierseuchenverordnung – Verhütung und Bekämpfung der Rindertuberkulose –, in Kraft gesetzt. Die Tuberkulose-Verordnung wurde seither wiederholt überarbeitet und neuen Situationen angepasst, zuletzt am 17.04.2014.

Nach der Vereinigung im Jahr 1990 wurde Deutschland mit der Entscheidung der Kommission der Europäischen Union vom 17. Dezember 1996 (97/76/EWG) als amtlich frei von Rindertuberkulose erklärt. Dies bedeutet, dass in mindestens 99,9% aller Rinderbestände seit zehn Jahren Tuberkulose nicht nachgewiesen worden war (RICHTILINIE DES RATES 64/432/EWG VOM 29.7.1964).

Nach Erreichen dieses Status wurde darauf verzichtet, den Tuberkulin-Hauttest weiterhin regelmäßig und flächendeckend zur Überwachung durchzuführen.

Der Status der Tuberkulosefreiheit wurde durch amtliche Fleischuntersuchung der Schlachtrinder am Schlachthof kontrolliert. Bei Verdacht wurde jedoch im Herkunftsbetrieb eines aufgefallenen Tieres der Tuberkulin-Hauttest weiterhin durchgeführt.

Nach dem Tuberkulose-Ausbruch im Jahr 2008 wurde die Verordnung in der damals noch gültigen Fassung von 13. März 1997 modifiziert und am 17. Juni 2009 in der veränderten Fassung veröffentlicht. Im Vorblatt zur Verordnung werden die Grundlagen für die Änderungen wie folgt formuliert:

Mit Entscheidung 97/76/EWG der Kommission vom 17. Dezember 1996 wurde Deutschland mit Wirkung vom 1. Juli 1996 als tuberkulosefrei anerkannt. Damit verknüpft war die Beendigung der jährlich durchgeführten Tuberkulinisierung ab 1997 (...). Jüngste Tuberkulosenachweise in verschiedenen Bundesländern deuten darauf hin, dass Rindertuberkulose möglicherweise weiter verbreitet ist.

Ziel der Änderung war es unter anderem, unter Einbeziehung neuer Diagnostik-Methoden die Diagnostik zu intensivieren und zu beschleunigen. Durch die Änderung der Verordnung wurden in § 1 b erstmals neben „bakteriologischen“ auch „molekularbiologische“ Methoden bei der amtlichen Diagnostik zugelassen. Die neuen Fälle in den Jahren 2012 / 2013 führten zur erneuten Überarbeitung der Bekämpfungsvorschriften.

In der neuen Fassung der Tuberkulose-Verordnung vom 12.7.2013 wurde dann unter anderem festgeschrieben, dass der Interferon-Gamma-Freisetzungstest zusätzlich zum Tuberkulin-Haut-Test eingesetzt werden kann. Bei beiden immunologischen Untersuchungsmethoden muss ein positives Ergebnis durch einen bakteriologischen oder molekularbiologischen Nachweis des Erregers bestätigt werden.

Bei einem zweifelhaften Ergebnis des Tuberkulin-Hauttests müssen Gewebeproben von insgesamt 11 Lokalisationen des Tierkörpers untersucht werden. Die Durchführung weiterer Maßnahmen wie Tuberkulin-Hauttests, Interferon-Gamma-Freisetzungstest, diagnostische Tötungen in Betrieben, in denen der Verdacht auf Tuberkulose vorliegt oder Tuberkulose festgestellt ist, sind genau festgelegt.

### **2.2.2 Molekulare Diagnostik im Rahmen der Tuberkulose-Verordnung**

Zur Präzisierung der in der Verordnung zur Änderung der Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose niedergelegten Bestimmungen waren am 14. April 2010 Ausführungshinweise erlassen worden. In § 1 der Tuberkulose Verordnung „Feststellung der Tuberkulose der Rinder“ wurde als molekularbiologische Nachweismethode der „PCR-Test“ genannt. Bei dieser Methode wird DNA des Erregers, die direkt aus Gewebe extrahiert wurde, per PCR nachgewiesen.

Zu diesem Zweck wurde am Friedrich-Loeffler-Institut in Zusammenarbeit mit dem Institut für molekulare Pathogenese und dem Institut für Virusdiagnostik (KÖHLER et al. 2009) eine MTC-spezifische Real-Time (Echtzeit) PCR entwickelt. Bei dieser PCR werden zwei Zielgene, eine hypothetische Helicase und die Insertionssequenz (IS) *1081*, nachgewiesen. Dabei handelt es sich um eine Methode, die in ihrer Sensitivität die konventionelle PCR übersteigt. Die Sensitivität des Nachweises ist von zwei Faktoren abhängig. Das PCR-System an sich muss eine ausreichende Sensitivität besitzen, um aus vorhandener DNA die spezifischen Ziel-Sequenzen zu amplifizieren (COLLINS, 2011). Auf der anderen Seite muss die Prozedur der DNA-Extraktion zu einer hohen Ausbeute unbeschädigter und damit amplifizierbarer DNA führen (KUMAR et al. 2010).

Der hohe Stellenwert den die molekularbiologische Diagnostik in der Tuberkulose-Verordnung erhalten hat, machte es notwendig die molekularbiologischen Methoden kritisch zu überprüfen. Das Ziel dieser Arbeit ist es Verbesserungen bei den molekularbiologischen Untersuchungsmethoden zu erzielen.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Optimierung der Prozedur der DNA-Extraktion, ein weiterer Teil mit Verbesserungen im Bereich der Speziesdifferenzierung bei Tuberkulose-Erregern (Spoligotyping). Da man die pathologischen Veränderungen bei Tuberkulose visuell nicht sicher von Veränderungen, die durch nicht tuberkulöse Mykobakterien oder durch andere Bakterien-Gattungen, wie z. B. *Corynebacterium*, *Rhodococcus* oder *Gordonia*, hervorgerufen werden, unterscheiden kann, befasst sich ein dritter Teil mit der Entwicklung einer gattungsspezifischen PCR für Mykobakterien, da diese auch nicht tuberkulösen Mykobakterien erfasst.

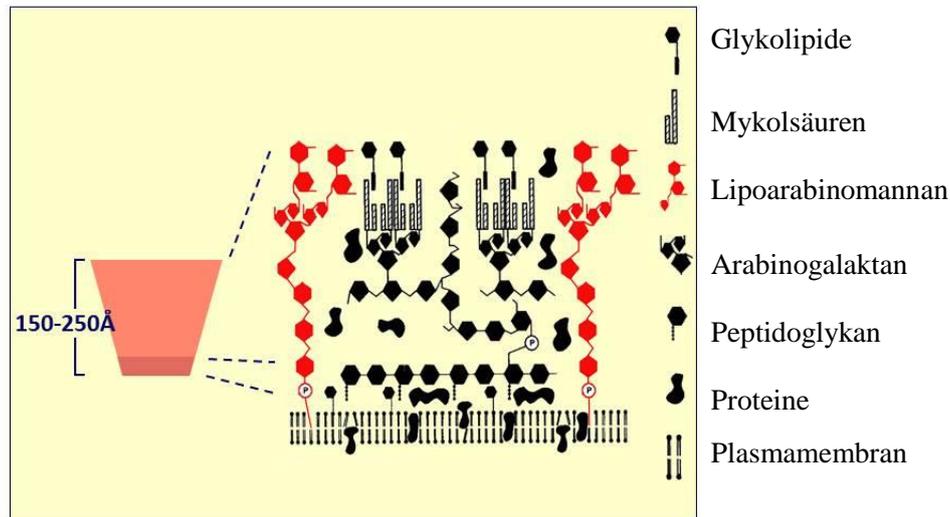
### **2.3 Taxonomie und Eigenschaften**

Die zur Gattung Mykobakterien gehörigen Spezies erscheinen als nicht bewegliche säure- und alkoholfeste stäbchenförmige grampositive Bakterien, die 0,2 - 0,6 x 1,0 - 10,0 µm groß sein können (RÜSCH-GERDES und RICHTER, 2006). Ihr Genom enthält zwischen 3,2 und 4,4 x 10<sup>6</sup> Basenpaaren und ist charakterisiert durch einen G+C Gehalt von 61 bis 71 mol % (SHINNICK und GOOD, 1994).

Die Mykobakterien sind von einer robusten Zellwand umgeben, die aus Mykolsäuren, die 60-90 C-Atome erhalten, Peptidoglykan und Arabinogalaktan (siehe Abbildung 2) besteht. Mehr als die Hälfte des Gewichtes dieser Zellwand besteht aus Lipiden. Der hohe Anteil von Mykolsäuren ist von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Struktur (WANG et al. 2000)

und ist maßgeblich für die sehr geringe Permeabilität der Zellwand verantwortlich (KARTMANN et al. 1999).

Auf Grund der Stabilität der Zellwand ist die Desintegration dieser Bakterienart und konsequenterweise die Freisetzung von DNA sehr schwierig (KUMAR et al. 2010).



**Abbildung 2.** Zusammensetzung der Zellwand von *Mycobacterium tuberculosis* (modifiziert nach FENTON und VERMEULEN, 1996).

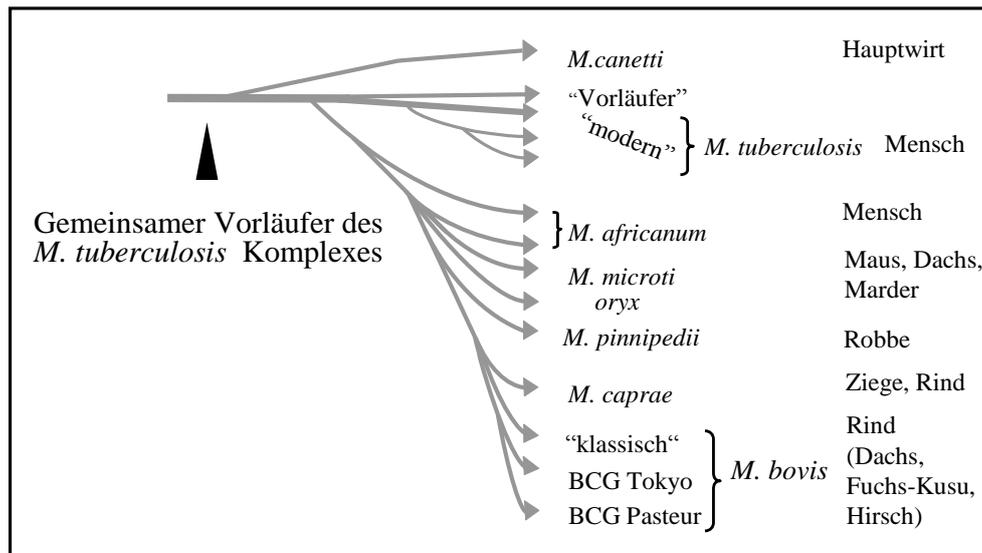
Schematische Darstellung der Zusammensetzung der Zellwand von *Mycobacterium tuberculosis*, die aus Glykolipiden, Mykolsäuren, Lipoarabinomannan, Arabinogalaktan, Peptidoglykan, Proteinen und der Plasmamembran besteht.

Die Mykobakterien sind widerstandsfähige Bakterien, die unter verschiedenen Umgebungsbedingungen mehrere Wochen bis Monate überleben können (AYELE et al. 2004). Diese Eigenschaften können erklärt werden durch die Fähigkeit von Mykobakterien, Dauerformen wie Sporen bzw. sporenlähnliche Strukturen zu bilden. Dafür wurden z. B. bei *M. marinum* und *M. bovis* BCG (GHOSH et al. 2009) ebenso wie bei *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (LAMONT et al. 2012) in neuerer Zeit Hinweise gefunden. Zur Bildung dieser Strukturen kommt es, wenn Faktoren wie Stress durch ungünstige Bedingungen in der Umgebung diese Bakterien belasten (GHOSH et al. 2009).

Andererseits sind sie hitzeempfindlich und können durch bestimmte Desinfektionsmittel (z. B. Formaldehyd-, Phenol-, Alkoholhaltige Mittel) abgetötet werden (DESINFEKTIONSMITTELLISTE RKI 2007; DESINFEKTIONSMITTELLISTE DVG, 2012).



(MOSTOWY et al. 2004), *M. suricattae* (PARSONS et al. 2013) und *M. orygis* (BROSCH et al. 2002), die ebenfalls entsprechende Charakteristika besitzen, wurden in den letzten Jahren bei Wildtiere (Zeboramanguste, Klippschliefer, Erdmännchen und Antilope) in Afrika beschrieben. Sie sind jedoch bisher nicht durch die oben genannten Autoritäten anerkannt. Die Mitglieder dieses Komplexes sind mit 99,9 % Identität in der Sequenz des 16S rRNA-Gens sehr eng mit einander verwandt, unterscheiden sich jedoch in Bezug auf Wirtsspezifität und Phänotyp deutlich voneinander (BROSCH et al. 2002).



**Abbildung 4.** Hypothetische Evolution des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTC). In der Abbildung ist die Diversifizierung des MTC aus einem gemeinsamen Vorläufer durch eine Vielzahl von Mutationen dargestellt.

Der wichtigste Erreger der Tuberkulose des Menschen, *Mycobacterium tuberculosis*, wurde am 24. März 1882 von Robert Koch erstmals beschrieben (KOCH, 1882). Noch heute infizieren sich jedes Jahr Millionen von Menschen sich mit Tuberkulose-Erregern (ZIEGLER et al. 2012). In Afrika wurde im Jahr 1960 der Erreger *Mycobacterium africanum* von einem tuberkulose-positiven Patienten isoliert (COLLINS, 2000). Der Erreger kommt hauptsächlich in bestimmten Regionen Afrikas vor. Er wird nach der regionalen Herkunft des Erregers, in West- oder Ost-Afrika, in Subtyp I und Subtyp II unterteilt (RICHTER et al. 2003).

*Mycobacterium canettii* wurde erstmals im Jahr 1993 von einem Patienten aus Somalia isoliert und ist neben den beiden oben genannten Erregern auch ein Verursacher der Erkrankung beim Menschen (SOOLINGEN et al. 1997), der jedoch selten vorkommt (BROSCH et al. 2002).

Die Spezies *Mycobacterium microti* wurde erstmals in wilden Mühlmäusen entdeckt (daher die Bezeichnung *microti*; HERDMAN und STEELE, 2004) und verursacht die Tuberkulose bei

kleinen Wildnagern und kleinen Raubtieren (z. B. Marder) sowie Allesfressern (z. B. Wildschweine, Waschbär). Viele andere Tierarten wie z. B. Lama (PATTYN et al. 1970) Katzen, Frettchen, Affen (HENRICH et al. 2007) sowie auch der Mensch können sich ebenfalls mit dem Erreger infizieren. (NIEMANN et al. 2000; HORSTKOTTE et al. 2001).

Im Jahr 1965 wurde erstmals in Deutschland Tuberkulose bei Robben diagnostiziert (EHLERS et al. 1965). Der Erreger *M. pinnipedii*, ein Mitglied des MTC, wurde seit 1986 von Robben aus verschiedenen Regionen der Welt isoliert (COUSINS et al. 2003) und wird als Verursacher der Tuberkulose bei dieser Tierart bezeichnet (MOSER et al. 2008). Die Infektion mit dem Erreger, in diesen Fall über das Arbeitsumfeld, kommt bei Menschen selten vor.

*Mycobacterium bovis* BCG ist die abgeschwächte Form des virulenten *M. bovis*, die beim Menschen als Impfstoff gegen die Tuberkulose eingesetzt wird (TALBOT et al. 1997). Für die Herstellung des Impfstoffes wurde der Erreger durch 230 Kulturpassagen über insgesamt 13 Jahre attenuiert (WANNER und SPRINGER, 2008). Die Abkürzung BCG weist auf die Namen der französischen Forscher Albert Calmette und Camille Guérin hin, die den Stamm als Impfstoff gezüchtet haben. Der erste Buchstabe steht für das französische Wort „Bacille“ (MURRAY, 2007). Die BCG-Impfung wurde nach häufigem Auftreten von Komplikationen und ungenügender Wirksamkeit in Deutschland aus dem Impfkonzept genommen. Seit 1998 wird die BCG-Impfung in Deutschland nicht mehr empfohlen (ROBERT KOCH INSTITUT, 2002).

Die Tuberkulose des Rindes wird durch *M. bovis* (KARLSON und LESSEL, 1970) oder *M. caprae* (ARANAZ et al. 1999) hervorgerufen. Die Bezeichnung *M. bovis* subsp. *bovis* kann neben dem Begriff *M. bovis* und die Bezeichnung *M. bovis* subsp. *caprae* neben *M. caprae* synonym verwendet werden (DSMZ, 2012).

*M. bovis* verfügt über ein bemerkenswert großes Wirtsspektrum. So können sich auch andere Haus-, Zoo- und Wildtierspezies (z. B. Ziege, Schwein, Katze, Rotwild, Wildschwein und Löwe) sowie auch der Mensch infizieren (ROCHA et al. 2011).

*M. caprae* wurde erstmals in Spanien aus Ziegen isoliert (ARANAZ et al. 1999; ARANAZ et al. 2003). Die Spezies wurde bisher vor allem in Mittel-, Süd- und Ost-Europa (z. B. Ukraine) nachgewiesen. In England und anderen Ländern Nord-Europas wurde *M. caprae* bisher noch nicht beschrieben (PRODINGER et al. 2005).

In Deutschland ist das Vorkommen von *M. bovis* bzw. *M. caprae* regional unterschiedlich verteilt. Im Süden Deutschlands, in Bayern und Baden-Württemberg, wird überwiegend *M. caprae*, im Norden überwiegend *M. bovis* nachgewiesen. Bei Nachweis von *M. caprae* bei Rin-

dern in anderen Bundesländern handelt es sich meist um Tiere aus Herkunftsbetrieben in Bayern und Baden-Württemberg. Ein eigenes *M. caprae* Geschehen hat sich dort jedoch bisher nicht etabliert (TSN, 2013).

Von KUBICA et al. (2003) wurde veröffentlicht, dass in den Jahren 1999 bis 2001 ein Drittel der untersuchten zoonotischen Tuberkulose-Fälle bei Menschen durch den Erreger *M. caprae* und zwei Drittel durch *M. bovis* hervorgerufen wurde. In dieser Veröffentlichung wurde berichtet, dass die Infektion mit *M. caprae* bei Menschen meist in südlichen Regionen Deutschlands nachgewiesen wurden.

### **2.3.2 Mykobakterien, die nicht zum *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex gehören**

Mykobakterien, die nicht zum MTC gehören, werden auch Non Tuberculous Mycobacteria (NTM) genannt. Mehr als 125 Spezies dieser Gruppe sind heute anerkannt und können in verschiedenen Nischen der Umwelt (z. B. Wasser und Erde) überleben (GRIFFITH et al. 2007).

Eine andere Bezeichnung, MOTT, die Abkürzung für „Mycobacteria Other Than Tubercle Bacilli“ kann an Stelle von NTM ebenfalls verwendet werden. Nach Runyon können diese Mykobakterien, beurteilt nach Morphologie und Wachstum, in vier größere Gruppen unterteilt werden. Die Gruppe I (z. B. *M. marinum* und *M. kansasii*) enthält langsam wachsende Mykobakterien (Koloniebildung innerhalb von circa zwei bis drei Wochen) mit der Fähigkeit zur Pigmentbildung unter Einfluss von Licht (photochromogen). Gruppe II (z. B. *M. gordonae* und *M. scrofulaceum*) enthält ebenfalls langsam wachsende Mykobakterien, allerdings mit dem Unterschied, dass diese in der Dunkelheit ihre Pigmente produzieren können (skotochromogen). Gruppe III (z. B. *M. avium* und *M. terrae*) wiederum bezeichnet langsam wachsende Mykobakterien, die kein Pigment bilden (nicht photochromogen). Die Gruppe IV (z. B. *M. fortuitum* und *M. chelonae*) enthält schnell wachsende Mykobakterien (ROLLE und MAYR, 2002; BIET et al. 2005). Diese letzte Gruppe kann Kolonien in einer Zeit von etwa sieben Tagen bilden (IMPERIALE et al. 2012).

Die NTM enthalten eine untergeordnete Gruppierung, den *Mycobacterium-avium-intracellulare*-Komplex (MAIC), der von zwei Spezies, *Mycobacterium avium* und *Mycobacterium intracellulare* gebildet wird (KUNZE et al. 1992). Die Spezies *Mycobacterium avium* wird wiederum in die vier Subspezies, *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (den Erreger der Geflügel-tuberkulose), *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MIJS et al. 2002), *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* (THOREL et al. 1990) und *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (den Erreger der Paratuberkulose; SCHMALTZ et al. 1906), unterteilt.

Einzelne Spezies der NTM können bei Mensch und Tier Krankheiten verursachen, die häufig mit einer Schwäche des Immunsystems assoziiert sind. Im Gegensatz zur Tuberkulose werden die Infektionen mit NTM als Mykobakteriosen bezeichnet (POROCA et al. 2009). Haut, Weichgewebe und andere Organe können davon betroffen sein (IMPERIALE et al. 2012). Andererseits geht die Anwesenheit dieser Mykobakterien in Patienten nicht immer mit einer Erkrankung einher (opportunistische Erreger). Eine Kontamination oder Kolonisation mit diesen Bakterien führt häufig nicht zu einer Infektion (POZNIAK und BULL, 1999).

Die zum MAIC gehörigen Mykobakterien sind die häufigsten NTM, die Erkrankungen bei Menschen mit supprimiertem Immunsystem verursachen (TAILLARD et al. 2003). Bei einer Generalisierung dieser Erreger können Durchfall, Fieber oder Anämie auftreten. Nach einer Studie von PETERS et al. (1995) ist der MAIC in 90 % der Fälle mit AIDS-Infektionen verbunden.

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ist der Erreger der Paratuberkulose des Rindes, auch „Johne´s disease“ genannt, die durch eine chronische Enteritis bei Rindern charakterisiert ist. Die Erkrankung wurde erstmals im Jahr 1895 als eine Form von Darmtuberkulose beschrieben (SCHMALTZ et al. 1906). Andere Wiederkäuer wie Schafe, Ziegen und Wildwiederkäuer (CASTELLANOS et al. 2009), aber auch Nicht-Wiederkäuer (DANIELS et al. 2003), können auf fäkal-oralem Wege durch Aufnahme von kontaminiertem Kot, Milch oder Kolostrum infiziert werden (BIET et al. 2005).

*Mycobacterium kansasii* ist nach den Mykobakterien des MAIC der häufigste Erreger der NTM, der Krankheiten bei Menschen mit supprimiertem Immunsystem verursacht. Der Erreger kann aus verschiedenen Quellen wie Leitungswasser, Seen und Bächen isoliert werden und kann bei Immunschwäche respiratorische oder generalisierten Erkrankungen auslösen (CAMPO und CAMPO, 1997; TAILLARD et al. 2003; GRIFFITH et al. 2007).

*Mycobacterium marinum* wurde erstmals im Jahr 1926 von einem Salzwasserfisch (LEWIS et al. 2003) und im Jahr 1954 von einem Schwimmbecken isoliert. *M. marinum* hat wie *M. kansasii* das Wasser als Habitat und wird meist in Schwimmbädern oder Aquarien gefunden. Der Erreger kann in kontaminiertem Salz- oder Süßwasser, das nicht mit Chlor vorbehandelt ist, überleben (STAUB et al. 2003). Als Eintrittspforte können Läsionen der Haut dienen, und meisten sind die Extremitäten wie Hände, Armgelenke und Knie betroffen (CASAL et al. 2001). Die Symptome können sich zwei bis vier Wochen nach dem Kontakt zeigen und sind von papulösen, nodulären, pustulösen oder ulzerierende Hautveränderungen gekennzeichnet. Daher sind diese Infektionen unter den populären Namen „Schwimmbad-Granulom“ oder „Fisch-

Tank-Granulom“ bekannt (STAUB et al. 2003). Zur Verhütung dieser Infektionen sollten Beschäftigte von Fischgeschäften oder Fischzuchtanlagen mit Hautverletzungen Handschuhe tragen. Bei der Durchführung der Dekontamination des Wassers in Schwimmbädern muss auf die richtige Dosierung von Chlor geachtet werden (LEWIS et al. 2003).

*Mycobacterium fortuitum* ist ein Erreger, welcher sich in Wasser aber auch in der Erde befinden kann. Der Erreger kann bei immunsuprimierten Menschen Lungenerkrankungen oder sogar generalisierte Erkrankungen verursachen. Die Infektion ist meist mit einem Perforationstrauma verbunden, wodurch auch verschiedene andere Organe infiziert sein können. Eine Studie von HOY et al. (1987) gibt den Hinweis, dass z. B. ein Venenkatheter für mehrere Tage als Eintrittsstelle für den Keim in Betracht kommen kann.

*Mycobacterium chelonae* kann in der gesamten Umwelt vorkommen. Auf Grund des breiten Lebensraums ist die Möglichkeit des Kontaktes für den Menschen sehr groß (HAY, 2009). Der Erreger wird häufig aus wechselwarmen Tieren (Reptilien) isoliert (RASTOGI et al. 2001) und dringt wie *Mycobacterium fortuitum* durch Hautverletzungen ein. Häufig entstehen diese Eintrittsstellen bei der Durchführung von medizinischen Eingriffen (COOPER et al. 1989).

## **2.4 Diagnostikmethoden**

### **2.4.1 Konventionelle Methoden**

Für den Nachweis einer Infektion mit Tuberkulose-Erregern, werden sowohl konventionelle als auch molekulare Untersuchungsmethoden durchgeführt. Die konventionellen Untersuchungen sind sehr zeitaufwendig, gelten aber als sehr zuverlässig (Goldstandard). Die molekularen Methoden beschleunigen den Nachweis von Mitgliedern des MTC erheblich.

#### **2.4.1.1 Kultureller Nachweis**

Die Kultur wird als Goldstandard der Methoden zur Diagnostik von Tuberkulose-Erregern bezeichnet. Mit verdächtigem Material werden mindestens drei Nährmedien (eine flüssiges, z. B. Middlebrook Bouillon, und zwei feste Nährmedien, z. B. Löwenstein-Jensen-Medium, Stonebrink-Medium) beimpft (DIN 58943-3).

Ein beimpftes Medium muss mindestens sechs (flüssiges Medium) bis acht Wochen (feste Medium) bzw. 12 Wochen (*M. microti*; MOSER, IRMGARD, JENA, 2012) inkubiert werden, um eine sicher negative Diagnose stellen zu können (DIN 58943-3). Von den gewachsenen Kulturen wird DNA extrahiert, um mit Hilfe von molekularen Methoden, z. B. PCR, die Spezies des Isolates zu identifizieren (RÜSCH-GERDES und HILLEMANN, 2008).

### **2.4.1.2 Mikroskopie**

Die Mikroskopie ermöglicht den Nachweis von säurefesten Stäbchen (nicht von Mykobakterien) im Untersuchungsmaterial. Die Methode hat den Vorteil, dass sie relativ schnell und günstig durchführbar ist. Der Nachteil des mikroskopischen Nachweises ist, dass zwischen NTM- und MTC-Erregern oder auch anderen Bakterien-Gattungen mit säurefester Zellwand, z. B. *Nocardia*, *Rhodococcus*, nicht sicher unterschieden werden kann (RODRIGUEZ et al. 2004; RÜSCH-GERDES und HILLEMANN, 2008). Es kann auch nicht festgestellt werden, ob die nachgewiesenen Bakterien lebend oder tot sind (RÜSCH-GERDES und RICHTER, 2006).

Der Nachweis von säurefesten Stäbchen kann daher nicht als Bestätigung der vorhandenen Infektion dienen, sondern lediglich den Verdacht unterstreichen. Bei geringer Erregerkonzentration (weniger als 5000 Bakterien pro Milliliter) kann die Nachweismethode zu negativen Ergebnissen führen (KALSDORF et al. 2008; SWAI et al. 2011), was jedoch nicht bedeutet, dass eine Tuberkulose ausgeschlossen ist (RÜSCH-GERDES und HILLEMANN, 2008).

## **2.4.2 Molekulare Methoden**

### **2.4.2.1 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird ein bestimmtes DNA-Fragment vervielfacht (amplifiziert). Dieser Prozess kann in drei Arbeitsschritte in folgender Reihenfolge unterteilt werden: Denaturierung, Primer Anlagerung (Annealing) und Verlängerung (Extention). Im ersten Schritt werden bei einer Temperatur von 90 bis 95°C die Doppelstränge der DNA getrennt (Denaturierung). Danach werden bei einer Temperatur von 55 bis 60°C je nach DNA-Sequenz die Primer an der entsprechenden komplementären Sequenz der DNA-Einzelstränge gebunden (Annealing). Im dritten Schritt werden nach Primer Anlagerung mit Hilfe des Enzyms Polymerase die neugebildeten DNA-Stränge durch Einbau von Nukleotiden bei einer Temperatur von 72°C verlängert (Extention). Diese Prozedur wird mehrmals (30-40 Zyklen) wiederholt, so dass bei jedem Zyklus aus einem DNA-Doppelstrang zwei identische DNA-Doppelstränge gebildet werden (HOLZAPFEL und WICKERT, 2007).

Das ursprüngliche Enzym Polymerase war durch eine optimale Aktivität bis 37°C charakterisiert, was bedeutete, dass diese Polymerase nicht hitzestabil war und deshalb bei jedem der Denaturierung Schritt zerstört wurde. Bei jedem Zyklus musste aus diesem Grund das Enzym erneut hinzugefügt werden, was zeit- und kostenaufwendig war. Die hitzelabilen Polymerasen wurden durch Polymerase aus dem Mikroorganismus *Thermus aquaticus* (Bezeichnung Taq-Polymerase) ersetzt, der in heißen Quellen (Temperaturen über 100°C) lebt.

Nach dem Ende des letzten Zyklus wird die Temperatur in der Regel für mehrere Minuten auf 72°C gehalten. Dabei können angefangene DNA-Stränge komplettiert werden. Nach der Amplifikation wird das PCR-Produkt über ein Agarose-Gel elektrophoretisch von den anderen Komponenten des PCR-Ansatzes getrennt und durch Einlagerung von fluoreszierenden Substanzen, z. B. Ethidium Bromid, unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die konventionelle PCR ist sehr zeitaufwendig und die entstehende Menge sowie die Molekulargewichtsgröße des PCR-Produkts kann nicht exakt bestimmt werden (PARASHAR et al. 2006).

Für Mykobakterien des MTC werden verschiedene Gene als Zielsequenzen (auch Target Region genannt) verwendet. Ein Beispiel ist die putative Helicase (RODRÍGUEZ et al. 1995), die Insertionssequenz (IS) *1081* (COLLINS und STEPHENS, 1991; SOOLINGEN et al. 1992; MAHILLON und CHANDLER, 1998) und bestimmte Regionen des *gyrB*-Gens (KASAI et al. 2000). Das Insertions-Element IS *6110* kann für die Identifizierung von MTC-Mitgliedern ebenfalls eingesetzt werden (KAY et al. 2011).

#### **2.4.2.2 Real-Time-PCR (Echtzeit-PCR)**

Für die Durchführung von molekularbiologischen Untersuchungen werden heute bevorzugt Real-Time-PCRs angewandt, da diese in Bereichen geringster Konzentration qualitative und quantitative Bestimmungen ermöglichen (HEID et al. 1996).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird „Real-Time-PCR“ durch „rt-PCR“ ersetzt. Ein Real-Time-PCR-System basiert auf den gleichen Gesetzmäßigkeiten wie eine konventionelle PCR. Die Target Region wird amplifiziert, aber anders als bei der konventionellen Methode wird während der Amplifikation (Echtzeit) eine Quantifizierung des PCR-Produkts ermöglicht. Dabei wird ein Fluoreszenzsignal gemessen, das proportional zur Zunahme des PCR-Produktes ansteigt. Zum rt-PCR-System wird neben den Primer ein Oligonukleotid benötigt, das als Gen-Sonde bezeichnet wird. Die Basen-Sequenz der Gen-Sonde (circa 20 bis 30 Nukleotide lang) ist komplementär zu einer innerhalb der Primerannealingstellen liegenden Sequenz des DNA-Stranges, der amplifiziert werden soll (HOLZAPFEL und WICKERT, 2007).

Im Vergleich zur konventionellen PCR hat die Real-Time PCR (rt-PCR) viele Vorteile, denn anhand von Standardkurven kann die genaue Anzahl der Genomeinheiten bestimmt werden (SWEENEY et al. 2007). Die Methode ist außerdem schnell und erreicht eine hohe Sensitivität und Spezifität. Die Gefahr der Kontamination des Ansatzes wird dadurch verringert, dass die Komponenten des Ansatzes in ein einziges Reaktionsgefäß pipettiert werden, das vor der Messung nicht mehr geöffnet werden muss. Die Gefahr der Kontamination der Umgebung wird damit ebenfalls deutlich reduziert gegenüber der Methode der konventionellen PCR.

Die Fluoreszenzmessung kann durch Farbstoffe, die sich in die DNA einlagern (z. B. SYBR Green), oder durch FRET Sonden ermöglicht werden. Bei FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) Sonden ist das System durch zwei Farbstoffe (Quencher und Reporter) charakterisiert. Ein Quencher ist ein Molekül, welches die Fluoreszenz von anderen Farbstoffen in der Nähe unterdrückt. Wird die Entfernung zwischen diesen Farbstoffen größer, wird Energie freigesetzt und kann gemessen werden (PARASHAR et al. 2006).

Beispiele für FRET Sonden sind die TaqMan Sonde und Molecular Beacons. Die TaqMan Sonde ist ein kleines Fragment einer DNA, das an beiden Enden einen Reporter- (z.B. FAM) und einen Quencher-Farbstoff (z.B. TAMRA) enthält. Diese Sonde wird mit dem mittleren Stück an die DNA-Matrize binden. Durch den Einsatz der Polymerase in der PCR wird die Sonde durch die Verdopplung der Matrize abgebaut. Der Reporter-Farbstoff wird freigesetzt und steht nicht mehr unter dem Einfluss des Quenchers. Daher wird Energie freigesetzt und kann gemessen werden (HEID et al. 1996; PARASHAR et al. 2006).

Die Molecular Beacons sind einzelne Oligonukleotid-Stränge, die wie die TaqMan Sonde einen Quencher- und Reporter-Farbstoff an den Enden enthalten. Diese sind sehr eng zusammen gelagert, so dass diese Sonde eine Sekundärstruktur bildet. Durch diese Struktur wird der Reporter durch den Einfluss des Quencher-Farbstoffs unterdrückt. Durch die Bindung der Sonde an die Matrize erhält die Sonde eine neue Form. Der Abstand zwischen Reporter und Quencher verlängert sich, so dass der Reporter nicht mehr durch den Quencher unterdrückt wird. Daher kann Energie freigesetzt und gemessen werden (TYAGI und KRAMER, 1996; BECKER-FOLLMANN und BAAS, 2004).

Die Durchführung einer rt-PCR dauert circa drei Stunden, und die Auswertung erfolgt automatisch per Computer-Programm. Der Nachteil dieser Methode besteht in der Anschaffung kostenaufwendiger Geräte (PARASHAR et al. 2006). Anders als bei der konventionellen PCR kann die Effizienz bei jeder rt-PCR berechnet werden. Bei einer Effizienz von 100 % würde sich die DNA-Menge nach jedem Zyklus verdoppeln, was jedoch nicht der Realität entspricht (PFAFFL, 2004). Durch die Formel  $E = 10^{[-1/m]} - 1$  (E: Effizienz; m: Steigung der Standardkurve) kann die Effizienz einer rt-PCR anhand der Steigung der Standardkurve berechnet werden (WIEDEMANN et al. 2004). Bei einer 100%igen Effizienz beträgt der Wert der Steigung der Standardkurve -3,32.

Zur Differenzierung von Bakterien-Gattungen wird häufig das 16S r-RNA-Gen verwendet. Aber auch andere Gene, z. B. das hsp65- und gyr B-Gen, können zu diesem Zweck herangezogen werden. Das 16S r-RNA-Gen enthält einen Sequenzteil, der für die Gattung Mykobakterien

spezifisch ist, innerhalb dessen wiederum hypervariable Regionen vorhanden sind, die für bestimmte Spezies stehen, so dass einzelne Mykobakterien-Spezies per Sequenzierung unterschieden werden können (KIRCHNER und BÖTTGER, 1998). Allerdings lassen sich einige nahe Verwandte Gattungen auf Grund der Identität der 16S rRNA-Gensequenz nicht von Mykobakterien voneinander unterscheiden (SHINNICK und GOOD, 1994).

Im Gegensatz zur MTC-spezifischen Real-Time-PCR ist bisher nur wenige PCR-Detektionssysteme bzw. gattungsspezifische rt-PCR für Mykobakterien beschrieben.

### **2.4.2.3 DNA-Extraktion**

Der Grad der Sensitivität bei einer PCR ist neben der PCR an sich von der Qualität der durch Extraktion gewonnenen DNA abhängig. Die Extraktionsprozedur soll einfach durchführbar sein, möglichst viele Zellen lysieren, um so möglichst viel unbeschädigte und somit amplifizierbare DNA freisetzen, und die Anreicherung von inhibitorischen Komponenten im DNA-Extrakt vermeiden (OKWUMABUA, et al. 2010).

Die Lyse der Mykobakterien und damit auch die Freisetzung von DNA ist auf Grund ihrer speziellen Zellwandstruktur im Vergleich zu anderen Bakteriengattungen erschwert. Außerdem ist bei der DNA-Extraktion aus Kulturoisolationen auf Grund der oft langen Generationszeit der Mykobakterien die lange Kultivierungszeit von mehreren Wochen zu berücksichtigen, die benötigt wird, um eine ausreichend hohe Erregerdichte für die DNA-Extraktion zu erhalten (KÄSER et al. 2008).

Bei Gewinnung von DNA direkt aus infiziertem Gewebe ist zu beachten, dass zumindest in geringgradig veränderten Geweben häufig nur eine geringe Erregerzahl vorliegt (KUMAR et al. 2010).

Die Isolierung von DNA aus Bakterienzellen und Gewebe basierte ursprünglich auf der Lyse der Zellwand mittels Phenol-Chloroform mit nachfolgender Präzipitation der DNA durch Äthanol (SOMMERVILLE et al. 2005). Diese Methode der Isolierung dauert zwei Tage, ist also sehr zeitaufwendig, und auf Grund der benötigten Chemikalien können gesundheitliche Schäden beim Laborpersonal auftreten. Daher wird die Methode heutzutage kaum mehr eingesetzt (HILLEBRAND et al. 1999).

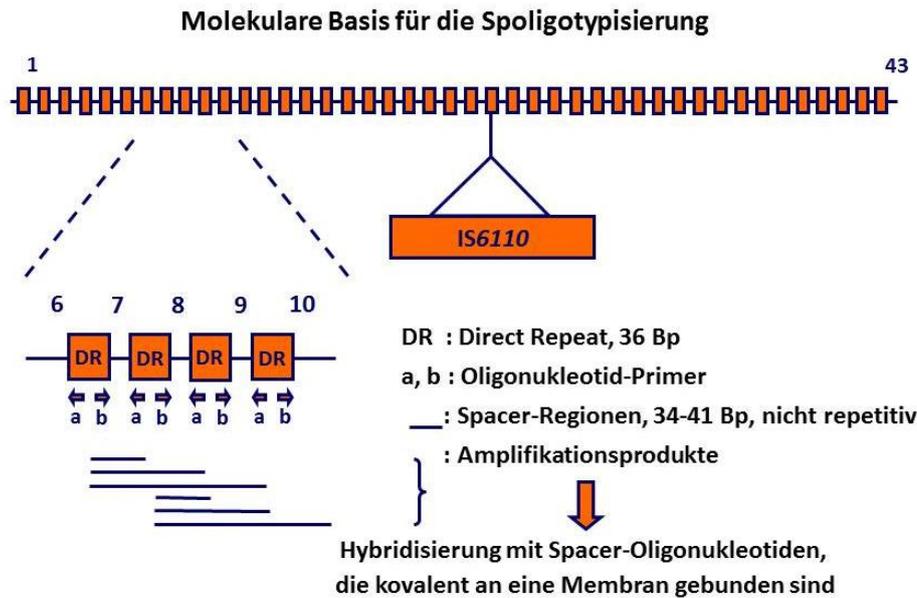
Eine einfache Methode der Isolierung von DNA aus Koloniematerial besteht darin, eine Bakteriensuspension in Wasser zu erhitzen und durch Einsatz von Enzymen die Zellwand zu lysieren, um die so freigesetzte DNA zu gewinnen (SOMMERVILLE et al. 2005).

Zusätzliche Schritte können zu dem Protokoll hinzugefügt werden. Die Arbeitsanweisung der Arbeitsgruppe Mykobakterien des FLI-Jena (LA220\_M34) für die DNA-Extraktion aus Koloniematerial von Mykobakterien schreibt z. B. die Ultrabeschallung der suspendierten Bakterien in Wasser als zusätzlichen Schritt vor, um die Zellwand effektiver zu zerstören. Alternativ können kommerzielle Kits verwendet werden. Diese sind zwar kostenaufwendig, die DNA-Extraktion kann aber in wenigen Stunden durchgeführt werden. Außerdem ist die durch diese Kits extrahierte DNA immer von gleichbleibender Qualität.

Zusammen mit oder vor der DNA-Extraktion an sich, kann das Aufbrechen der Zellwand durch verschiedene Methoden erleichtert werden. Dazu können mechanische, enzymatische, chemische oder eine Kombination von mehreren Methoden eingesetzt werden (AMARO et al. 2008).

#### **2.4.2.4 Spoligotyping**

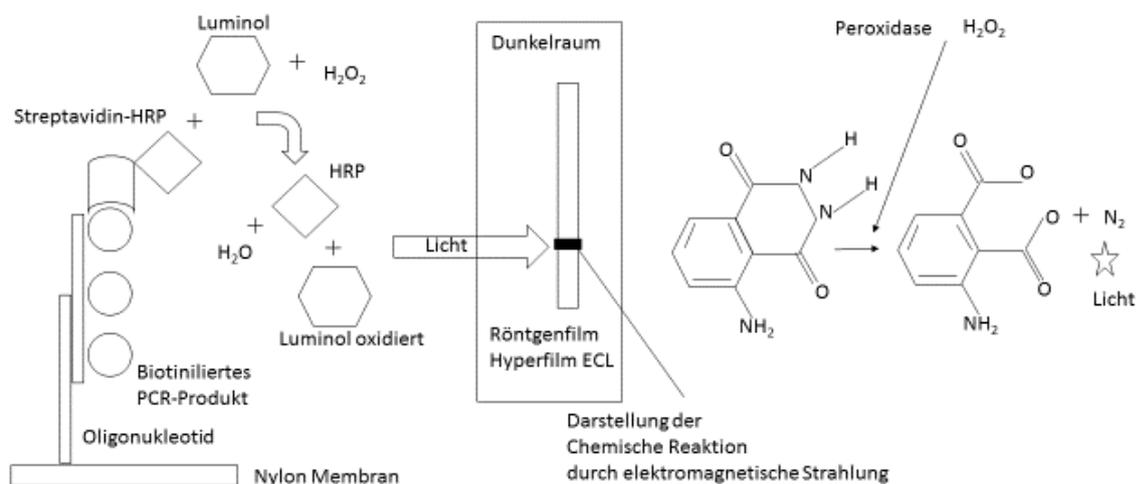
Für die Differenzierung von MTC-Erregern per PCR werden meist komplexere Ansätze, bzw. verschiedene Zielgene eingesetzt. Eine Differenzierung unterhalb der Speziesebene in epidemiologisch relevante Subtypen ist per PCR bisher nicht möglich. Das Genom der Mitglieder des MTC enthält eine spezielle Region, die Direct Repeat (DR)-Region, mit deren Hilfe sie von NTM unterschieden werden können. Die Analyse der polymorphen DR-Region ermöglicht die Differenzierung der Spezies des MTC und die Subtypisierung der Spezies des MTC unterhalb der Spezies-Ebene. Dies wird mit der Methode „Spoligotyping“ ermöglicht. Das Spoligotyping (Spacers und oligotyping) wurde im Jahr 1997 von Kamerbeek et al., beschrieben. Die Direct Repeat (DR)-Sequenzen sind identische DNA-Sequenzen, die durch eine Länge von 36 Basenpaaren charakterisiert sind. Sie sind durch nicht identische Spacer-Sequenzen, die zwischen 35 und 41 Basenpaare lang sind, getrennt (MILIAN-SUAZO et al. 2008). Mit einem einzigen Primerpaar (DRa und DRb), dessen Sequenzen auf der Sequenz der DRs basieren, kann somit die gesamte DR-Region amplifiziert werden. Insgesamt kommen im Genom der MTC-Mitglieder 94 Spacer-Sequenzen vor (EMBDEN et al. 2000; ZANDEN et al. 2002; JAVED et al. 2007). Bei der überwiegend gebräuchlichen Spoligotyping-Methode werden jedoch nur 43 Spacer für die Identifizierung der MTC-Mitglieder verwendet (Abbildung 5).



**Abbildung 5.** Prinzip der konventionellen Spoligotyping Methode (modifiziert nach KAMERBEEK et al. 1997).

Die Primer DRa und DRb basieren auf der DR-Sequenz. Somit kann die gesamte DR-Region mit einem einzigen Primerpaar amplifiziert und die Spacer zwischen den DR-Sequenzen nachgewiesen werden. Die Hybridisierung erfolgt an einer modifizierten Membran und die Signale werden mittels Chemilumineszenz-Reaktion auf einem Röntgenfilm dokumentiert.

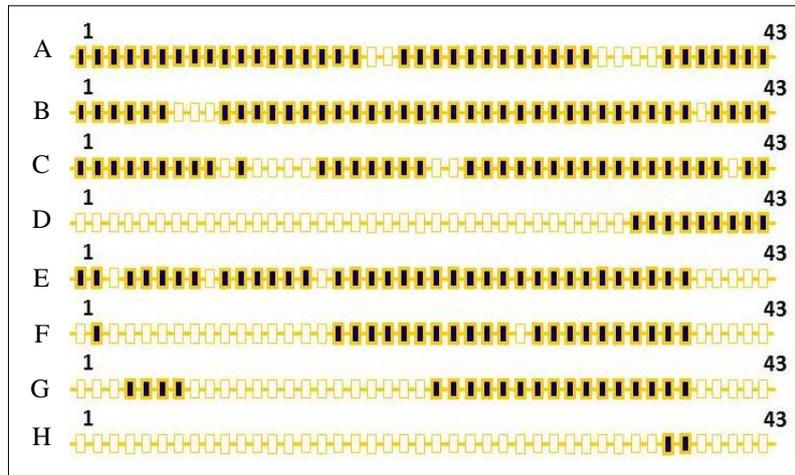
Die Spoligotyping-Methode erfolgt in drei Etappen. Bei der ersten Etappe wird die DNA der DR-Region mit Hilfe von DR-Primer (DRa und DRb) amplifiziert, von welchen der Primer DRa biotinyliert ist. Die PCR-Produkte sind auf Grund dieser Eigenschaft des Primers DRa Biotin-markiert. Die zweite Etappe besteht aus einer Hybridisierung. Die PCR-Produkte werden auf einer Nylonmembran, auf der 43 Spacer-Oligonukleotide in Reihe fixiert sind, hybridisiert. Die dritte Etappe beinhaltet die Markierung der hybridisierten Moleküle mit Hilfe eines Streptavidin-HRP- (Meerrettichperoxidase) Konjugates und der Detektion der Signale mittels Chemilumineszenz-Reaktion auf einem Röntgenfilm (KAMERBEEK et al. 1997). Das Enzym HRP katalysiert die Oxidation von Luminol. Luminol befindet sich als Substrat in der ECL-Lösungen. HRP spaltet  $H_2O_2$  und wird dadurch oxidiert. Dieses oxidierte Enzym reagiert mit Luminol. Nach der Oxidation befindet sich das Luminol in einem angeregten Zustand (instabiles Produkt), in dem es Lichtenergie generiert und zerfällt (Abbildung 6).



**Abbildung 6.** Schematische Darstellung einer Chemilumineszenz-Reaktion wie sie bei der konventionellen Spoligotyping-Methode zur Anwendung kommt (modifiziert nach GE Healthcare, entnommen Produktinformationsblatt ECL-Lösung GE Healthcare).

Durch chemische Reaktionen wird das Luminol in ein instabiles Produkt verwandelt, das Lichtenergie generiert. Diese Reaktion wird auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Das entstehende Licht wird als Nachweis der chemischen Reaktion auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Für jeden Spacer wird so die Anwesenheit (schwarzes Signal) oder Abwesenheit (fehlendes Signal) des Signals dokumentiert (Abbildung 7).



**Abbildung 7.** Repräsentative Spoligotyping-Muster verschiedener Spezies des MTC.

Die Anwesenheit (hervorgehoben durch schwarze Signale) und Abwesenheit der Spacer 1-43 (farblose Lücke) bilden das Spoligotyping-Muster, das jeweils einer Spezies entspricht (modifiziert nach ZANDEN et al. 2002).

A: *M. tuberculosis*, B: *M. africanum*, C: *M. tbc Manila*, D: *M. tbc Beijing*, E: *M. bovis*, F: *M. caprae*, G: *M. pinnipedii*, H: *M. microti* (Wühlmaus).

Die Signalmuster werden als binärer Code (0;1) dargestellt und aus diesem fortlaufende Dreiergruppen geformt. Daraus ergibt sich der „Octal Code“, der als Resultat wiederum eine 15-stellige Zahl ergibt. Die Auswertung wird manuell durchgeführt mit der Eingabe des binären Musters oder von „Octal Codes“ in die Datenbank m.bovis.org. Von dort wird eine SB-Nummer vergeben.

Eine neue Entwicklung des Spoligotyping in Microarray-Format wurde von RÜTTGER et al. (2012) vor Kurzem publiziert. Bei der vorliegenden Arbeit wurde ein Vergleich der Sensitivität der neu entwickelten Methode zur Sensitivität der konventionellen Spoligotyping-Methode durchgeführt. Dabei wurden sowohl Kulturisolate von *M. bovis* BCG als auch Gewebe von tuberkulosepositive Tieren verwendet. Bei der ArrayStrip-Methode werden die PCR-Produkte nicht auf einer Nylonmembran, sondern auf einen Chip hybridisiert, auf dem die Spacer-Oligonukleotide fixiert sind.

Die Hybridisierung erfolgt unter Verwendung eines Hybridisierungskits. Die gebundene Peroxidase setzt das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine um. Daraus resultiert ein blauschwarz gefärbtes Präzipitat für jeden vorhandenen Spacer. Das Auslesen erfolgt über eine spezielle Computer-Software (IconoClust™). Die Ergebnisse werden wie bei der konventionellen Methode durch Bindung von Streptavidin an die Peroxidase des markierten Konjugates sichtbar gemacht (RÜTTGER et al. 2012).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Materialien

**Tabelle 1.** Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller, Ort (Land)</b>
Agilent technologies Stratagene Mx3000P	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG Waldbronn, (Deutschland)
Analysenwaage Typ PT120	Sartorius portable, Göttingen (Deutschland)
ArrayMate™	Alere Technologies, Jena (Deutschland)
Cycler Mastercycler Personal	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Cycler Thermocycler	Biometra, Göttingen (Deutschland)
Elektrophoresekammer für Flachgele mit Gel-träger und Kamm	Comphor Midi, Bioplastics BV (Niederlande)
Grant Boekel Thermoblock BBA	Grant Instruments, Cambridge (UK)
Hybridisierungssofen	PeqLab Biotechnologie, Erlangen (Deutschland)
Miniblotter MN 45	Isogen Bioscience BV, Maarssen (Niederlande)
Nanodrop ND 1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen (Deutschland)
Röntgenentwickler T93 Substanz	Calbe Fotochemie GmbH, Calbe (Deutschland)
Schüttelgerät KS250-basic	IKA-Labortechnik, Staufen (Deutschland)
Spektral-Photometer Cadas 30	DR Lange GmbH Berlin, Berlin (Deutschland)
Taqman ABI-Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt (Deutschland)
Thermoblock Unitek HB-130	SEL Laboratory Products (England)
Thermoschüttler Bioshake	Q. Instruments, Jena (Deutschland)
TissueLyser	Qiagen, Hilden (Deutschland)
Universal-Schnellfixierer-Konzentrat UNIFIX classic Substanz	Calbe Fotochemie GmbH, Calbe (Deutschland)
UV-Transilluminator	VWR, Darmstadt (Deutschland)
Vortex – Gerät Vortex-Genie 2,	Scientific Industries, New York (USA)
Zentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Zentrifuge Galaxy Mini	Merck Eurolab, Darmstadt (Deutschland)
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Karlsruhe (Deutschland)
Zentrifuge Minispin Eppendorf	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Zentrifuge Real Time PCR Plattenzentrifuge	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau (Deutschland)
Walkmischgerät Lab Blenders (Stomacher)	Interscience MiniMix®, Prag (Tschechische Republik)
Werkbank Captair bio	Erlab, Köln (Deutschland)
Werkbank Karl Bleymehl	Bleymehl Reinraumtechnik, Inden – Pier (Deutschland)
Werkbank Tamer Template Quantum	Appligene, Heidelberg (Deutschland)

**Tabelle 2.** Verbrauchsmaterialien und Instrumente

<b>Verbrauchsmaterialien und Instrumente</b>	<b>Hersteller, Ort (Land)</b>
ArrayStrip™	Alere Technologies, Jena (Deutschland)
Cell Culture Tube 12 ml	Greiner Bio-one Cellstar®, Frickenhausen (Deutschland)
Edelstahlkugeln, Stainless Steel Beads, 5mm, Einweg Armstulpen PE Weiss 40x20 cm	Qiagen, Hilden (Deutschland) VWR® Supplier Partnerships for Customer Solutions Ct., Leuven (Belgien)
Einweg Impföse	Greiner Bio-one, Frickenhausen (Deutschland)
Einweg Transfer-Pipette 3,5ml	Sartedt AG & Co., Nümbrecht (Deutschland)
Eppendorf Safe-Look Gefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Falcon-Röhrchen Tube 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (Deutschland)
Glasperlen, groß 2,85-3,45 mm	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Hybridisierungsflaschen	Biometra, Göttingen (Deutschland)
Hyperfilm™ ECL™	Amersham pharmacia biotech, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg (Deutschland)
Hyperkassette™	Amersham pharmacia biotech, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg (Deutschland)
Küvetten Q-Vettes	Ratiolab®, Dreieich (Deutschland)
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt (Deutschland)
Pinzette Edelstahl	Aesculap, Tuttlingen (Deutschland)
Pipetten: Pipette Research 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl, 1 – 5 ml µl	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Plastikfolie Dow-wrap	Dow Chemical Company, Ahlen (Deutschland)
Pipettenspitzen: Filter Tips 1 – 5 ml , Tip-One Filter Tips 0,1 – 10 µl, Tip-One Filter Tips 1 – 200 µl, Tip-One Filter Tips 101 – 1000 µl	Starlab, Ahrensburg (Deutschland)
rt-PCR Platte Applied Biosystems, MicroAmp™, Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt (Deutschland)
Schere	Aesculap, Tuttlingen (Deutschland)
Stomacherbeutel ST 80, Sterile GRADE Blender Bags, 400 ml (Standard 80)	Technolab GmbH, Herne (Deutschland)
Unterlagekissen Foam cushions PC200	Isogen Bioscience BV, Maarssen (Niederlande)
Universal Glass Bottles Clear 28 ml Alu Cap/Rubber Wad (Universal Glasröhrchen)	The Labwarehouse, London (England)

**Tabelle 3.** Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller, Ort (Land)</b>
Agarose (PeqGold)	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen (Deutschland)
ECL™ Detektionsreagenzien 1 und 2	Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland
EDTA	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Essigsäure (konzentriert)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Ethidiumbromid, 1%ig	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, (Deutschland)
Glycerin	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Lipase aus <i>Candida rugosa</i> , ≥40,000 units/mg protein	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Middlebrook-Bouillon 7H9	Difco, Heidelberg (Deutschland)
Middlebrook OADC (Oleic Acid Albumin Dextrose Catalase) -Supplement	BD, Heidelberg (Deutschland)
N-Acetyl-L-Cystein	MP Biomedicals,
Na-Citrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) x H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Na-Dodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml)	Boehringer, Ingelheim am Rhein (Deutschland)
Tris-Base	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege (Deutschland)

**Tabelle 4.** Nährmedien

<b>Nährmedien</b>	<b>Hersteller, Ort (Land)</b>
Löwenstein-Jensen Medium (LJ) mit Glycerin	Bioservice Waldenburg, Waldenburg (Deutschland)
Stonebrink (STB) mit Pyruvat	Bioservice Waldenburg, Waldenburg (Deutschland)

**Tabelle 5.** Lösungen und Puffer

<b>Lösungen und Puffer</b>	<b>Hersteller, Ort (Land)</b>
Bouillon nach Middlebrook (MB)	Middlebrook 7H9 4,7 g Glycerin 2,0 ml Aqua dest. ad 900 ml pH: 6,6 ± 0,2; autoklavieren (121°C) für 20 Minuten; unter sterilen Bedingungen Middlebrook OADC-Supplement 100 ml Dazugeben
ECL™ Detektionslösung	Reagenz 1 50,0 ml Reagenz 2 50,0 ml Mischen
EDTA-Lösung (20 mM)	EDTA 5,84 g Aqua dest. ad 1000 ml Eingestellt auf pH 8,0 mit NaOH
EDTA-Lösung (0,5 M)	EDTA 186,0 g Aqua dest. ad 1000 ml Eingestellt auf pH 8,0 mit NaOH
N-acetyl L-Cystein-Lösung (NALC-NaOH)	4 % NaOH 50,0 ml 2,9% Na-Citrat-Dihydrat 50,0 ml NALC 0,5 g Homogenisieren, haltbar 24 Stunden bei 4°C
Phosphatpuffer nach Sörensen (PBS)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4,84 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 5,53 g Aqua dest. ad 1000 ml Lösen und bei 121°C 15 Minuten autoklavieren; pH 6,8
TAE-Puffer, 10x konzentriert	2 M Tris-Base 48,40 g 0,5 M EDTA-Lösung 20,00 ml Essigsäure (konzentriert) 11,42 ml Aqua dest. ad 1000 ml pH 8,3
Verdünnungspuffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg (Deutschland)
Wasser für die Molekularbiologie, Nuclease-Free-Water	Firma Qiagen, Hilden (Deutschland)
10 % SDS-Lösungen	Na-Dodecylsulfat (SDS) 10,0 g Aqua dest. ad 100 ml
20 x SSPE-Puffer	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 35,60 g 3,6 M NaCl 210,24 g 20 nM EDTA 7,40 g Aqua dest. ad 1000 ml pH 7,4; autoklavieren
2 x SSPE / 0,1% SDS	20 x SSPE 100,0 ml 10 % SDS 10,0 ml Aqua dest. ad 890 ml
2 x SSPE / 0,5% SDS	20 x SSPE 100,0 ml 10% SDS 10,0 ml Aqua dest. ad 850 ml
0,2 N NaOH / 0,1% SDS	NaOH 8,0 g Na-Dodecylsulfat (SDS) 1,0 g Aqua dest. ad 100 ml

**Tabelle 6.** Kommerzielle Kits

<b>Kommerzielle Kits</b>	<b>Hersteller, Ort (Land)</b>
Artus® M. tuberculosis TM PCR Kit	Qiagen, Hilden (Deutschland)
PeqGold Range Mix DNA-Leiter	PeqLab Biotechnologie, Erlangen (Deutschland)
DNA-Polymerase-Kit	Boehringer, Ingelheim am Rhein (Deutschland)
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden (Deutschland)
Hybridisierungskit	Alere Technologies, Jena (Deutschland)
Qiagen® Multiplex Mastermix	Qiagen, Hilden (Deutschland)
Spoligotyping Membran*	EU-Gemeinschaftsreferenzlabor für bovine Tuberkulose, Madrid (Spanien)
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt (Deutschland)

\* Nicht kommerziell

**Tabelle 7.** Software

<b>Softwares</b>	<b>Hersteller, Ort (Land)</b>
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems, San Jose (USA)
BLAST	United States National Library of Medicine, Bethesda (USA)
NanoDrop® 3.6.0	Peqlab Biotechnologie, Erlangen (Deutschland)
Geneious Pro 5.6.2	Syngene, Cambridge (UK)
IconoClust™	Alere Technologies, Jena (Deutschland)
Microsoft Office Professional Plus 2010	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Mx Pro QPCR Software	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG Life Sciences & Chemical Analysis, Waldbronn (Deutschland)
PubMed	United States National Library of Medicine, Bethesda (USA)
SigmaPlot 11	Systat Software GmbH, Erkrath
IBM SPSS Statistics	IBM Deutschland GmbH, Ehningen
700 System SDS Software (V.1.2.3)	Applied Biosystems, Darmstadt (Deutschland)
Vector NTI® Software	Life Technologies GmbH, Darmstadt (Deutschland)

**Tabelle 8.** Liste der Primer für die konventionelle PCR

<b>Primer-bezeichnung</b>	<b>Zielgen</b>	<b>Sequenz (von 5' nach 3')</b>	<b>Literatur</b>
jb21neu	Hypothetische Helicase (MTC)	GAA CCC GCT GAT GCA AGT GC	Rodriguez et al. 1999; Mosser et al. 2008
jb22neu		ACG CCG CTG ACC TCA AGA AG	
IS 901-F	IS <i>901</i> (MAC)	GCA ACG GTT GCT TGA AA	Kunze et al. 1992
IS 901-R		TGA TAC GGC CGG AAT CGC GT	
IS 1245-P1	IS <i>1245</i> (MAC)	GCC GAA ACG ATC TAC	Guerrero et al. 1995
IS 1245-P2		AGG TGG CGT CGA GGA AGA C	
DRa*	DR Region	GGT TTT GGG TCT GAC	Kamerbeek et al. 1997
DRb		CCG AGA GGG GAC GGA AAC	
DRa*	DR Region	GGT TTT GGG TCT GAC	Rüttger et al. 2012
DRb*		CCG AGA GGG GAC GGA AAC	

\*Biotin-markiert

**Tabelle 9.** Liste der Primer für die MTC-Spezifische Real-Time PCR und Interne Kontrollen

<b>Primer-bezeichnung</b>	<b>Zielgen</b>	<b>Sequenz (von 5' nach 3')</b>	<b>Literatur</b>
MTC-FLI-rt-PCR			
Heli-4F	Hypothetische Helicase	TTG ATC AGG TCG ACG ATG TAG	Köhler et al. 2009
Heli-4R		TCA CCA CCG ACA AAG GGT C	
Heli-4FAM		TAC ACG ACC CCA ACG ACT GGT GC- BHQ1	
IS1081-5Fn	IS <i>1081</i>	TGT GCG GGG CGC GCT AC	Köhler et al. 2009
IS1081-5R		GCA CGG GTG TCG AAA TCA CG	
IS10815FAM		ATT GGA CCG CTC ATC GCT GCG TTC-BHQ1	
Act-1030-F	β-Aktin	AGC GCS SGT SCT CCG TGT G	Toussaint et al. 2007
Act-1135-R		CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T	
Act-1081-1105-Yak		TCG CTG TCC ACC TTC CAG ATG T-BHQ1	
Alternative Interne Kontrolle			
EGFP-1-F	EGFP	GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC	Hofmann et al., 2006
EGFP-10-R		CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	
EGFP-HEX		AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A- BHQ1	

**Tabelle 10.** Liste der getesteten Primer zur Entwicklung einer genussspezifische Real-Time PCR für Mykobakterien

Bezeichnung der Oligonukleotide	Zielgen	Sequenz (von 5' nach 3')
Mycobac16S_fw1 Mycobac16S_fw2 Mycobac16S_fw3	16S rRNA	TWG CGG TGT GGG ATG RGC CCG CG GCC CGT ATC GCC CGC ACG CTC ACA TGC GGG CGA TAC GGG CAG
Mycobac16S_rw1 Mycobac16S_rw2 Mycobac16S_rw3		CCA CAC CTA GTW CCC ACC GTT TAC GTC CTG YGC ATG TCA AAC CCA GG TGC ACR CAG RCC MMA ARG GA
Mycobac16S_F Mycobac16S_R Mycobac16S_S		TGC GGG CGA TAC GGG CAG RCT CCA CAC CTA GTW CCC ACC GTT TAC FAM-TGG CGA AGG CGG GTC TCT GGG CAG TA-BHQ1
Mychsp65_F299 <sup>1</sup> Mychsp65_R416 <sup>2</sup> Mychsp65_S349 <sup>3</sup>	<i>hsp65</i>	CAA CGT CGC GGC CGG CGC CAA CCC G ATC TGC TCC TTG GTC TCG ACC TCC TTG GC Yak-AGG CCG TCG AGA AGG TCA CCG AGA CCC TGC-BHQ1
Mychsp65_F311 <sup>1</sup> Mychsp65_R412 <sup>2</sup> Mychsp65_S358 <sup>3</sup>		CGG CGC CAC TCG GTC TCA A TGC TCC TTG GTC TCS ACC TCC TT Yak-AGA AGG TCA CCG AGA CCC TGC TCA AG-BHQ1

<sup>1</sup>: Position 299-324, Tm:  $\geq 75^\circ\text{C}$

<sup>1</sup>: Position 311-330, Tm:  $63,1^\circ\text{C}$

<sup>2</sup>: Position 416-445 Tm:  $70,9^\circ\text{C}$

<sup>2</sup>: Position 412-435, Tm:  $64,2^\circ\text{C}$

<sup>3</sup>: Position 349-379, Tm:  $75^\circ\text{C}$

<sup>3</sup>: Position 358-384, Tm:  $68^\circ\text{C}$

**Tabelle 11.** Liste der verwendeten Mykobakterien – Stämme

Spezies	FLI – Interne Labornummer	DSMZ - Nummer	ATCC - Nummer	Herkunft
<b>Referenz- und Feldstämme</b>				
<i>M. abscessus</i>	M127	44196/434	19977	
<i>M. agri</i>	02A 0227	44515	27406	DMSZ Braunschweig
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	M128	44156	-	
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	09MA 0782			
<i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i>	09MA 1289	Feldstamm		FLI Jena
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	03A 2388	44133	19698	
<i>M. avium</i> ssp. <i>silvaticum</i>	04A 0607	44175	49884	DMSZ Braunschweig
<i>M. aurum</i>	02A 0225	43999	23366	
<i>M. celatum</i>	01A 0497	44243	51131	
<i>M. chelonae</i> ssp. <i>chelonae</i>	04A 0605	43804	35752	
<i>M. conspicuum</i>	01A 0493	44136	-	
<i>M. diernhoferi</i>	M132	43524	19340	DMSZ Braunschweig
<i>M. flavescens</i>	M133	43991	14474	
<i>M. fortuitum</i> ssp. <i>fortuitum</i>	M134	46621	6841	
<i>M. gastri</i>	04A 0604	43505	15754/159	
<i>M. genavense</i>	09MA 0502	Feldstamm		FLI Jena
<i>M. gordonae</i>	M135 SB	43212	35756	
<i>M. gordonae</i>	M135 LJ	43212	35756	
<i>M. intermedium</i>	01A 0490	44049	-	
<i>M. intracellulare</i>	M136 rau Kolonie	43223	13950/159	DSMZ Braunschweig
<i>M. intracellulare</i>	M136 glatt Kolonie	43223	13950/159	
<i>M. kansasii</i>	M137	43224	-	
<i>M. lentiflavum</i>	01A 0498	44418	51985	
<i>M. malmoense</i>	99A 1123	44163	29571	
<i>M. marinum</i>	04A 0609	44344	927	DSMZ Braunschweig
<i>M. mucogenicum</i>	01A 0492	44124	49649	
<i>M. nonchromogenicum</i>	M433	-	-	Nationales Referenz- zentrum für My- kobakterien Borstel
<i>M. palustre</i>	04A 0610	44572	BAA – 377	
<i>M. peregrinum</i>	01A 0488	43271	14467	
<i>M. phlei</i>	M139	43239	11758/192	
<i>M. porcinum</i>	01A 0496	44242	33776	
<i>M. scrofulaceum</i>	M140	43992	19981	DSMZ
<i>M. shimoidei</i>	01A 0494	44152	27962	Braunschweig
<i>M. smegmatis</i>	M141	43756	19420	
<i>M. szulgai</i>	99A 1125	44166	35799	
<i>M. terrae</i>	M142	43227	15755	
<i>M. thermoresistibile</i>	99A 1126	44167	19527	
<i>M. triviale</i>	99A 1122	44153	23292	

**Fortsetzung Tabelle 11.** Liste der verwendeten Mykobakterien – Stämme

<b>Spezies</b>	<b>FLI – Interne Labornummer</b>	<b>DSMZ - Nummer</b>	<b>ATCC - Nummer</b>	<b>Herkunft</b>
<b>Referenz- und Feldstämme</b>				
<i>M. vaccae</i>	02A 0224	43292	15483	
<i>M. vaccae</i>	M143	43292	15483	DMSZ Braunschweig
<i>M. bovis</i> BCG	99A 1119	43990	27289	
<i>M. bovis</i>	10MA 1646	}	Feldstamm	FLI Jena
<i>M. bovis</i>	09MA 0260			
<i>M. bovis</i>	09MA 0322			
<i>M. bovis</i>	11MA 0783			
<i>M. bovis</i>	10MA 1631			
<i>M. bovis</i>	10MA 1632			
<i>M. bovis</i>	10MA 1960			
<i>M. bovis</i>	10MA 1843			
<i>M. bovis</i>	10MA 1846			
<i>M. caprae</i>	06MA 1368			
<i>M. microti</i>	10MA 1633			
<i>M. microti</i>	10MA 1992			
<i>M. microti</i>	11MA 0803			
<i>M. microti</i>	10MA 1633			
<i>M. microti</i>	10MA 1634			
<i>M. microti</i>	10MA 1635			
<i>M. microti</i>	10MA 1636			
<i>M. microti</i>	10MA 1637			
<i>M. microti</i>	10MA 1639			
<i>M. microti</i>	10MA 1640			
<i>M. pinnipedii</i>	05A 2342			
<i>M. tuberculosis</i>	06A 1379			

**Tabelle 12.** Liste der verwendeten nicht zur Gattung Mykobakterien gehörenden Bakterien-Stämme

Spezies	FLI – Interne Labornummer	DSM - Nummer	ATCC - Nummer	Herkunft
<i>Actinomyces</i> sp.	08MA 1094	}	Feldstamm	FLI Jena
<i>Bacillus</i> sp.	09MA 0004			
<i>Bacillus</i> sp.	09MA 0004			
<i>Bacillus</i> sp.	09MA 0553			
<i>Brucella abortus</i> .	544			
<i>Corynebacterium</i> sp.	08MA 1098			
<i>Gordonia</i> sp.	09MA 1018			
<i>Gordonia</i> sp.	09MA 1019			
<i>Gordonia</i> sp.	11MA 1512			
<i>Nocardia</i> sp.	08MA 1358			
<i>Nocardia nova</i>	11MA 0136			
<i>Rhodococcus</i> sp.	09MA 1817			
<i>Rhodococcus</i> sp.	09MA 0501			
<i>Rhodococcus</i> sp.	09MA 0674			
<i>Saccharopolyspora</i>	08MA 1059			
<i>Saccharopolyspora</i>	08MA 1063			
<i>Saccharopolyspora</i>	08MA 1069			
<i>Saccharopolyspora</i>	08MA 1071			
<i>Salmonella Enteritidis</i>	147N			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	130303RR0118			

**Tabelle 13.** Gewebeproben von tuberkuloseinfizierten Tieren

Tier	FLI – Interne Bezeichnung	Nachgewiesene Spezies	Organ	Herkunft
Rind	10MA 1432	<i>M. bovis</i>	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	10MA 1433	<i>M. bovis</i>	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	10MA 1631	<i>M. caprae</i>	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	10MA 1646	<i>M. bovis</i>	Lymphknoten	Stuttgart
Rind	10MA 1960	<i>M. bovis</i>	Lymphknoten	Heidelberg
Rind	10MA 1963	<i>M. bovis</i>	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	10MA 1991	<i>M. bovis</i>	Lymphknoten	Oldenburg
Luchs	10MA 1992	<i>M. microti</i>	Lunge	Freiburg
Lama	10MA 2829	<i>M. microti</i>	Leber	Arnsberg
Rind	10MA 2339	<i>M. bovis</i>	Lymphknoten	Oldenburg

**Tabelle 14.** DNA-Material, extrahiert aus Gewebe von tuberkuloseinfizierten Tieren (untersucht mittels Spoligotyping)

<b>Tier</b>	<b>FLI – Interne Bezeichnung</b>	<b>Organ</b>	<b>Herkunft</b>
Rind	10MA 1631	Lymphknoten	Oldenburg
Waschbär	10MA 1632	Gehirn	Bad Langensalza
Waschbär	10MA 1633	Lunge	Bad Langensalza
Waschbär	10MA 1634	Milz	Bad Langensalza
Waschbär	10MA 1635	Niere	Bad Langensalza
Waschbär	10MA 1636	Leber	Bad Langensalza
Waschbär	10MA 1637	Blase	Bad Langensalza
Waschbär	10MA 1638	Gehirn	Bad Langensalza
Waschbär	10MA 1639	Lunge*	Bad Langensalza
Waschbär	10MA 1640	Milz*	Bad Langensalza
Rind	10MA 1843	Lymphknoten	Oldenburg
Schwein	10MA 1846	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	10MA 1960	Lunge	Heidelberg
Luchs	10MA 1992	Lunge	Freiburg
Schwein	10MA 2684	Organanreihung	Stendal
Rind	11MA 0783	Lymphknoten	Aulendorf
Tapir	11MA 0803	Lymphknoten	Rostock

\* DNA-Extrakt hergestellt vom Einsender

**Tabelle 15.** DNA-Material, extrahiert aus Gewebe von tuberkuloseinfizierten Tieren (untersucht mittels 16S-rt-PCR)

<b>Tier</b>	<b>FLI – Interne Bezeichnung</b>	<b>Organ</b>	<b>Herkunft</b>
Rind	11MA 3654	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3655	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3656	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3657	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3658	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3659	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3660	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3661	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3662	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3663	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3664	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3665	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3666	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3667	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3668	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3669	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3670	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3671	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3672	Lymphknoten	Oldenburg
Rind	11MA 3673	Lymphknoten	Oldenburg
Katze	12MA 0820	Haut	Saarbrücken
Frettchen	12MA 0704	Lymphknoten	Hannover

## 3.2 Durchgeführte Methoden

### 3.2.1 Kultivierung von *M. bovis* BCG in Reinkultur

Aus einer Kryokonserven des Stammes *M. bovis* BCG (siehe Tabelle 11), die bei  $-80\text{ °C}$  gelagert wurde, wurden 20 mit Löwenstein-Jensen-Medium (LJ) befüllte Kulturröhrchen beimpft. Diese wurden im Brut Raum bei  $37\text{ °C}$  ( $\pm 3\text{ °C}$ ) für mindestens sechs bis acht Wochen (bis zur Rasenbildung) inkubiert. Die Spezifität der gewachsenen Kultur wurde mit Hilfe der konventionellen MTC-PCR und MAC-PCR überprüft (Tabelle 8, Anhang Tabelle A1 und A2, siehe Seite 107). Zur Herstellung einer standardisierten Bakteriensuspension von *M. bovis* BCG wurde Kulturmaterial von *M. bovis* BCG (siehe Tabelle 11) aus drei LJ Röhrchen mit Hilfe einer Öse abgeerntet und in ein 12 ml Röhrchen mit fünf ml PBS gegeben. Die Bakteriensuspension wurde für 20 Sekunden gevortext und in einem Spektral-Photometer bei einer Wellenlänge von 580 nm gemessen. Die Suspension wurde auf eine optische Dichte von 0,30 bis 0,37 eingestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wird diese Bakteriensuspension als Standardsuspension bezeichnet.

Für die Bestimmung der Anzahl der Bakterien in der Standardsuspension wurde eine dezimale Verdünnungsreihe hergestellt. Zwölf Röhrchen (12 ml) wurden mit Nummern von 1 bis 12 beschriftet und jedes mit 900  $\mu\text{l}$  PBS befüllt. Zur Standardsuspension wurden zwei sterile Glasperlen ( $\varnothing$  2,85 - 3,3 mm) hinzugegeben und die Suspension anschließend für fünf Minuten gevortext. Die Funktion der Glasperlen besteht darin, die Mykobakterien zu trennen und die Aggregatbildung zu reduzieren. Dadurch soll eine homogene Bakteriensuspension entstehen, um die Zählung von koloniebildenden Einheiten (KbE) zu ermöglichen. Die so erhaltene Suspension (Original-Suspension) wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Von der Original-Suspension wurden 100  $\mu\text{l}$  in Röhrchen Nummer 1 überführt. Dieses wurde gevortext und 100  $\mu\text{l}$  von dieser Suspension in das Röhrchen 2 über pipettiert. Dieser Prozess wurde bis zum Röhrchen Nummer 12 weitergeführt. Von jedem Röhrchen der Verdünnungsreihe wurden 100  $\mu\text{l}$  in „Universal-Glasröhrchen“ mit Aluminium Schraubverschluss mit 10 ml Festmedium Stonebrink mit Pyruvat (STBP) in Form von Schräg-Agar (siehe Abbildung 8) gegeben. Die verwendeten Glasröhrchen („Universal-Glasröhrchen“) die eine breitere Schrägfläche als die üblichen Kulturröhrchen zur Verfügung stellen, wurden auf Grund ihres Durchmessers von 2,5 cm für die Auszählung der gebildeten Kolonien benutzt. Diese mit STBP befüllten Universal-Glasröhrchen waren zuvor für mindestens zwei Wochen im Brut Raum bei  $37\text{ °C}$  ( $\pm 3\text{ °C}$ ) bebrütet worden, um das vorhandene Kondenswasser zu eliminieren. Die beimpften Röhrchen wurden für eine Woche waagrecht und in den nächsten Wochen senkrecht bei  $37\text{ °C}$  ( $\pm 3\text{ °C}$ ) inkubiert. Die Kulturgefäße wurden wöchentlich kontrolliert, und nach acht Wochen wurde die

Kultivierung abgeschlossen. In den Verdünnungsstufen mit weniger als 30 Kolonien pro Röhrchen, wurde die genaue Koloniezahl bestimmt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde die Zahl der KbE pro Milliliter errechnet. Die Verdünnungsreihen wurden sechs Mal wiederholt. Aus der Gesamtzahl der ausgezählten Kolonien wurde einen Mittelwert (KbE / ml) gebildet.



**Abbildung 8.** Kolonien von *M. bovis* BCG auf Festmedium Stonebrink mit Pyruvat (STBP) in „Universal Glasröhrchen“.

Die Abbildung zeigt typische cremfarbene Kolonien von *M. bovis* BCG auf der Schrägfläche des Festmediums.

### **3.2.2 Gewinnung und Aufarbeitung von Gewebeproben von Tieren mit nachgewiesener Tuberkulose**

Die Gewebeproben waren in den Jahren 2010 / 2011 als tuberkuloseverdächtige Proben zum Friedrich-Loeffler-Institut (Standort Jena) eingeschickt worden waren. Sie stammten von acht Rindern, einem Luchs und einem Lama und wurden in den Bundesländer Niedersachsen, Baden-Württemberg und Hessen entnommen. Bis zur Verwendung wurden sie bei -20 °C gelagert. Detaillierte Informationen zu diesen Proben sind der Tabelle 13 zu entnehmen.

Unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (Schutzstufe 2) wurde ein erbsengroßes Stück (circa 500 mg) einer Gewebeprobe mit Hilfe einer sterilen Schere und einer sterilen Pinzette klein geschnitten. Die Gewebepartikel wurden in einen Stomacher-Beutel gegeben und zehn ml PBS dazu pipettiert. Der Beutel wurde im Stomacher für sechs Minuten (Min) gewalkt, anschließend der Inhalt in ein Falcon-Röhrchen überführt und mit 10 ml NALC-NaOH gemischt. NALC-NaOH dient als Dekontaminationslösung, die das Wachstum von unerwünschten schnell wachsenden Mikroorganismen, die als Kontaminanten vorkommen können, verhindern soll. Das Röhrchen wurde im Anschluss für 25 Min auf einem Schüttler in Schräglage bei 250 Schüttelbewegungen pro Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden erneut 20 ml PBS in das Röhrchen pipettiert und dieses für 20 Min bei 4000 UpM (2772 g) zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Erneut wurden zehn ml PBS dazu gegeben und wieder bei 4000 UpM für 20 Min zentrifugiert. Auch in diesen Fall wurde der Überstand verworfen. Das Sediment wurde unter Benutzung eines Vortex-Schüttlers mit zwei ml PBS resuspendiert und die Gewebesuspension in vier Portionen à 500 µl (125 mg Gewebe) aufgeteilt:

- a) für die Kultivierung
- b) für die DNA-Extraktion „Standardlyse“
- c) für die DNA-Extraktion „thermische Lyse“
- d) für die DNA-Extraktion „mechanische Lyse“

### **3.2.2.1 Ansatz für die Kultur**

Die Gewebesuspension (3.2.2.a; 500 µl) wurde auf ein festes und ein flüssiges Medium aufgeteilt. Für die Beimpfung des Festmediums wurde eine Verdünnungsreihe in Zehnerstufen in einem Gesamtvolumen von je ein ml mit PBS hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 100 µl (entspricht 25 mg Gewebe) der Gewebesuspension auf die Schrägfläche des Universal-Glasröhrchen mit STBP aufgebracht.

Die restlichen 400 µl der Gewebesuspension wurden in das flüssige Medium (MB 7H9) gegeben. Beide Medien wurden bei 37 °C ( $\pm 3$  °C) in einem Brut Raum inkubiert, wobei das STBP-Röhrchen für eine Woche waagrecht und die nächsten Wochen senkrecht stehend inkubiert wurde. Die beimpften MB 7H9 wurden als Rückstellprobe gelagert und nach 12 Wochen entsorgt. Die STBP-Röhrchen wurden im Abstand von einer Woche abgelesen und nach zwölf Wochen abschließend bewertet. Die Ergebnisse wurden in K<sub>B</sub>E / 25 mg Gewebe dokumentiert.

### **3.2.2.2 Ansätze für die DNA-Extraktion**

Die Portionen für die DNA-Extraktion, siehe Abschnitt 3.2.2b, c und d, wurden für zehn Minuten bei 11 000 UpM (11 200 g) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Gewebesedimente wurden für die DNA-Extraktion verwendet. Die DNA-Isolierung wurde in einen separaten Raum durchgeführt.

### **3.2.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.3.1 DNA-Extraktion aus Reinkultur von *M. bovis* BCG**

##### **- Standardlyse**

Für die Extraktion der DNA aus Bakterien (*M. bovis* BCG) wurde von der Standardsuspension pro Ansatz je 500 µl (siehe 3.2.1) in ein Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden diese bei 11 000 UpM (11 200 g) für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, so dass im Gefäß nur ein Bakteriensediment zurückblieb. Das Sediment wurde mit 180 µl ATL Puffer (DNeasy Blood & Tissue Kit) resuspendiert und unter Anwendung von zwei Modifikationen nach Herstellerangaben (Qiagen) weiter behandelt. Folgende Modifikationen wurden in das Extraktionsprotokoll des Herstellers eingefügt:

- a) die Inkubation der Proteinase K (PK; 20 mg/ml; Endkonzentration 2 mg PK /µl; 30 U/mg nach Herstellerangaben) für exakt 24 Stunden an der Stelle von drei Stunden oder „über Nacht“,
- b) Inaktivierung der Bakterien bei 95°C für 10 Minuten nach Zugabe von AL Puffer.

Dieses modifizierte Protokoll wird im Folgenden Standardlyse genannt. Bei den im Folgenden beschriebenen DNA-Extraktionsvarianten wurden verschiedene Schritte zusätzlich vor (thermische und thermo-enzymatische) und gleichzeitig (mechanische, enzymatische und thermo-enzymatische) zur Standardlyse angewandt. Danach wurde die DNA jeweils nach den Vorgaben des Kit-Herstellers (DNeasy Blood & Tissue) mit den Modifikationen a und b extrahiert.

##### **- Thermische Lyse**

Bevor die Bakterien dem Extraktionsprozess unterworfen wurden, wurden sie einem Temperaturschock ausgesetzt. Die Reaktionsgefäße mit den Bakteriensedimenten wurden abwechselnd für fünf Minuten in flüssigen Stickstoff (-196°C) getaucht und danach für fünf Minuten in kochendes Wasser (100°C) gegeben. Zwei Varianten der thermischen Lyse wurden ausgetestet:

- a) die Dauer der Inkubationszeit der PK (eine Stunde versus 24 Stunden)
- b) Einfluss der Anzahl an Wiederholungen des Temperaturschocks (einmalig versus fünfmalig).

Die Sedimente wurden nach den Varianten a und b behandelt und im Anschluss die DNA extrahiert. Die beschriebenen Varianten (siehe Tabelle 16) wurden jeweils mindestens zehnmal wiederholt.

**Tabelle 16.** Varianten der thermischen Lyse (T1-T4) und ihre Bedingungen

<b>Variante</b>	<b>Bedingungen</b>	<b>Variante</b>	<b>Bedingungen</b>
T1	5x Temperaturschock PK für 24 Stunden	T3	5x Temperaturschock PK für 1 Stunde
T2	1x Temperaturschock PK für 24 Stunden	T4	1x Temperaturschock PK für 1 Stunde

### - Mechanische Lyse

Die mechanische Behandlung ist als ein vorbereitender Prozess einzustufen. Sie wurde mit einem TissueLyser (Qiagen) unter Verwendung von Edelstahlkugeln ( $\varnothing$  5 mm) durchgeführt. Dabei wurden die Anzahl der Kugeln (1 oder 2 Edelstahlkugeln), die Zeit (5, 10, 30, 50 Minuten / 20 Sekunden) und die Schüttelfrequenz (30 und 15 Hertz pro Sekunde) variiert. Zum Bakteriensediment wurden 180  $\mu$ l ATL Puffer pipettiert und anschließend die unten beschriebenen Varianten der mechanischen Lyse (siehe Tabelle 17) durchgeführt. Die Varianten mit zwei Kugeln, die Schüttelzeiten von 5, 10, 30 und 50 Minuten und die Frequenz von 30 Hz wurden mindestens zehnmal wiederholt. Als weitere Varianten wurden eine Kugel für 20 Sekunden bei 15 Hz sowie eine Kugel für fünf Minuten bei 30 Hz ausgetestet. Diese beiden letztgenannten Varianten wurden nur fünf Mal wiederholt.

**Tabelle 17.** Varianten der mechanischen Lyse (M1-M6) und ihre Bedingungen

<b>Variante</b>	<b>Bedingungen</b>	<b>Variante</b>	<b>Bedingungen</b>
M1	2 Kugeln mit 30 Hertz für 5 Minuten PK für 24 Stunden	M4	2 Kugeln mit 30 Hertz für 50 Minuten PK für 24 Stunden
M2	2 Kugeln mit 30 Hertz für 10 Minuten PK für 24 Stunden	M5	1 Kugeln mit 15 Hertz für 20 Sekunden PK für 24 Stunden
M3	2 Kugeln mit 30 Hertz für 30 Minuten PK für 24 Stunden	M6	1 Kugeln mit 30 Hertz für 5 Minuten PK für 24 Stunden

### - Enzymatische Lyse

Bei der enzymatischen Lyse wurde das Enzym Lipase als ein zusätzliches Enzym verwendet. Das lyophilisierte Enzym wurde in ATL Puffer zu einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ $\mu$ l gelöst. Es wurden zwei Varianten durchgeführt:

- a) zum Bakteriensediment wurden zwei Enzyme hinzugegeben: 175 µl ATL Puffer mit 5µl Lipase (LIP; 100 µg/µl) und 20 µl PK (20 mg/ml)
- b) zum Bakteriensediment wurde nur ein Enzym hinzugegeben: 175 µl ATL Puffer mit 5µl Lipase (LIP; 100 µg/µl).

Bei beiden Varianten wurden die Ansätze für eine bzw. 24 Stunden bei 56°C inkubiert. Jede Variante (siehe Tabelle 18) wurde zehnmal wiederholt.

**Tabelle 18.** Varianten der enzymatischen Lyse (E1-E4) und ihre Bedingungen

<b>Variante</b>	<b>Bedingungen</b>	<b>Variante</b>	<b>Bedingungen</b>
E1	PK + Lipase für 24 Stunden	E3	Lipase für 24 Stunden
E2	PK + Lipase für 1 Stunde	E4	Lipase für 1 Stunde

### - Thermo-enzymatische Lyse

Die thermo-enzymatische Lyse ist eine Kombination aus beiden oben beschriebenen Strategien. Im Anschluss an den Temperaturschock (einmalig und fünfmalig) folgte die Inkubation mit Lipase (100 µg/µl) und PK (20 mg/ml). Diese Varianten (siehe Tabelle 19) wurden ebenfalls mindestens zehnmal wiederholt.

**Tabelle 19.** Varianten der thermo-enzymatischen Lyse (TE1-TE4) und ihre Bedingungen

<b>Variante</b>	<b>Bedingungen</b>	<b>Variante</b>	<b>Bedingungen</b>
TE1	5x Temperaturschock PK+ Lipase für 24 Stunden	TE3	1x Temperaturschock PK+ Lipase für 24 Stunden
TE2	5x Temperaturschock PK+ Lipase für 1 Stunde	TE4	1x Temperaturschock PK+ Lipase für 1 Stunde

### 3.2.3.2 Real-Time-PCR

Der Nachweis der bakteriellen DNA von *M. bovis* BCG aus Reinkultur und Gewebeproben erfolgte mittels Artus- und MTC-FLI-Real-Time PCR (rt-PCR).

#### - Artus-rt-PCR

Der kommerzielle MTC-spezifische rt-PCR Kit Artus<sup>®</sup> M. tuberculosis TM PCR (Qiagen), enthält neben anderen PCR-Reagenzien vier Quantifikationsstandards (QSS; QS1-QS4). Diese enthalten jeweils in Abständen einer Zehnerpotenz, zwischen 30 und 3 x 10<sup>4</sup> DNA Kopien /µl. Mit

ihrer Hilfe kann eine Aussage über die Korrelation zwischen Ct-Wert und Anzahl der vorhandenen Genomeinheiten in der Probe gemacht werden. Diese Aussage wird auf der Basis der Ct-Werte von QS1-QS4 nach Beendigung der Amplifikation durch die automatische Erstellung einer Standardkurve ermöglicht. Anhand dieser Standardkurve wurde durch Vergleich der Ct-Werte der DNA-Extrakte aus der *M. bovis* BCG Bakteriensuspension und ihren Verdünnungsstufen die durchschnittliche Anzahl der Genomeinheiten pro µl Bakteriensuspension ermittelt.

#### - MTC Real-Time PCR des Friedrich-Loeffler-Instituts (MTC-FLI-rt-PCR)

Die für die Mitglieder des MTC am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) entwickelte spezifische Real Time PCR wird im Folgenden als MTC-FLI-rt-PCR bezeichnet. Die beschriebene Duplex rt-PCR (MTC-FLI-rt-PCR) wurde auf Grundlage von zwei Publikationen (Rodriguez et al. 1995 und Taylor et al. 2007) entwickelt und basiert auf zwei Zielgenen, der hypothetischen Helicase und dem IS *1081*. Für beide Gensequenzen wurde eine spezifische Primer-Sonden-Kombination (siehe Tabelle 9) eingesetzt. Bei dieser Arbeit wurde nur das IS *1081* als Zielgen verwendet. Als interne Kontrolle wurde das β-Aktin-Gen gewählt. Der Reaktionsansatz wurde in eine Optical 96-Well rt-PCR-Platte pipettiert, die mit einer durchsichtigen Folie zugedeckt wurde. Die Platte wurde danach vorsichtig gevortext und zentrifugiert. Die Amplifikation erfolgte in eines Taqman ABI Prism 7000 Sequence Detection System Gerätes. Die Aufnahme der Fluoreszenzdaten erfolgte durch die Kanäle FAM und HEX in der Annealing-Phase der PCR. Im Falle der Abwesenheit eines Amplifikationssignals in wurde für die weiteren Berechnungen ein fiktiver Wert von 45 PCR-Zyklen eingesetzt. Die nachfolgende Tabelle beschreibt den Reaktionsansatz detailliert.

**Tabelle 20.** Reaktionsansatz und Temperaturprofil der MTC-FLI-rt-PCR

Volumen je Probe	Zusammensetzung	Funktion	Temperaturprofil	
12,5 µl	TaqMan Gene Expression MasterMix	Aktivierung Taq	15 Min	95°C
2,0 µl	Primer-Sonde-Mix Aktin-DNA	45 Zyklen		
3,5 µl	Wasser	Denaturierung	60 Sek	95°C
2,0 µl	Primer-Sonde-Mix IS <i>1081</i>	Annealing	30 Sek	60°C
5,0 µl	DNA-Lösung	Elongation	30 Sek	72°C
25,0 µl	Gesamtvolumen			

Von dem DNA-Extrakt aus der *M. bovis* BCG Standardsuspension wurden vier dezimale Verdünnungen hergestellt. Diese wurden mittels Artus-rt-PCR amplifiziert, die Genomeinheiten anhand der Standardgeraden berechnet und die Verdünnungen dann als Standardreihe bei der MTC-FLI-rt-PCR mitgeführt.

Für die Entwicklung einer Genus-spezifischen rt-PCR für Mykobakterien wurden zwei Ziel Gene, das 16S rRNA-Gen und das hsp65-Gen, ausgewählt.

### - 16S rDNA-rt-PCR

Die 16S rRNA Sequenzen der in Tabelle A3 (siehe Anhang, Seite 108 und 109) aufgelisteten Mykobakterien-Spezies wurden aus der Datenbank [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) entnommen und durch „Alignment“ (Vector NTI) analysiert. Die möglichen Zielsequenzen für die Primer wurden nachfolgenden Kriterien ausgewählt:

- a) G+C Anteil sollte zwischen 30-80% liegen,
- b) die Primer sollten circa 18 bis 30 Basenpaare besitzen,
- c) am 3'-Ende sollten ein oder zwei G oder C platziert sein,
- d) es sollten keine vier identischen Basen nebeneinander vorkommen.

Die ausgewählten Primer sind in Tabelle 10 aufgeführt. Sie wurden von der Firma Jena Bioscience hergestellt. Die Funktionalität der Primer wurde vor Verwendung in der rt-PCR mittels konventioneller PCR überprüft. Die Angaben zum Reaktionsansatz sowie zum Temperaturprofil sind in Tabelle 21 enthalten.

**Tabelle 21.** Reaktionsansatz und Temperaturprofil der konventionellen Genus-spezifischen PCR für Mykobakterien

Volume je Probe	Zusammensetzung	Funktion	Temperaturprofil	
10 µl	Qiagen® Multiplex Mastermix	Aktivierung Taq	95°C	15 Min
1 µl	Primer Vorwärts (10 pmol)	40 Zyklen		
1 µl	Primer Rückwärts (10 pmol)	Denaturierung	94°C	30 Sek
7 µl	Wasser	Annealing	55°C	90 Sek
1 µl	DNA-Lösung	Extension	72°C	90 Sek
20 µl	Gesamtvolumen	Final Extension	72°C	10 Min

Die Austestung der Primer erfolgte immer mit folgenden DNA-Proben: *M. bovis* BCG, *M. avium* subsp. *avium*, *M. flavescens*, eine nicht zur Gattung Mykobakterien gehörende Probe (*Saccharopolyspora hirsuta*) sowie eine Negativkontrolle (DNA-freies Wasser). Nach der Amplifikation der Proben in einem Eppendorf Mastercycler Personal wurden die PCR-Produkte durch Elektrophorese in einem 1,5%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Das Primerpaar, das die besten Ergebnisse lieferte (siehe Tabelle 10, Primer Mycobac16S\_fw und Primer Mycobac16S\_rw) wurde für die rt-PCR leicht modifiziert:

Primer Mycobac16S\_fw: TGC GGG CGA TAC GGG CAG zu Primer Mycobac16S\_fw: TGC GGG CGA TAC GGG CAG **RCT**. Bei Primer Mycobac 16S\_rw wurde keine Umformung

durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Gen-Sonde für die Entwicklung einer rt-PCR hergestellt. Diese wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) erworben und gemäß den Angaben des Herstellers mit einem qPCR Verdünnungspuffer (Eurofins MWG Operon) verdünnt. Für den Reaktionsansatz wurde der TaqMan Gene Expression Master Mix von Applied Biosystems (2x uMMix; Darmstadt) eingesetzt. Die PCR wurde unter den Temperaturbedingungen, die in Tabelle 22 aufgeführt sind, in einer PCR-Platte Applied Biosystems, MicroAmp™, Optical 96-Well rt-PCR-Platte pipettiert und in einem Agilent Technologies Stratagene Mx3000P Gerät durchgeführt. Die Aufnahme der Fluoreszenzdaten erfolgte in der Annealing-Phase der rt-PCR durch den Kanal FAM. Diese rt-PCR wird im Folgenden als 16S-rt-PCR bezeichnet.

**Tabelle 22.** Temperaturprofil bei der 16S-rt-PCR

<b>Funktion</b>	<b>Temperaturprofil</b>	
Aktivierung Taq 40 Zyklen	95°C	10 Min
Denaturierung	95°C	15 Sek
Annealing	60°C	60 Sek
Extension	72°C	30 Sek
Final Extension	72°C	10 Min

### **- hsp65-rt-PCR**

Die hsp65-Gen-Sequenzen der verwendeten Mykobakterien-Spezies und der nicht zur Gattung Mykobakterien gehörenden Spezies (Tabelle A4, siehe Seite 109) wurden aus der Datenbank [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) entnommen und durch „Alignment“ (Vector NTI) analysiert.

Die Vorwärts und Rückwärts Primer und die Gen-Sonden (Tabelle 10) wurden bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) hergestellt und zu einer Gebrauchsverdünnung jeweils von 5 pmol/µl (Endkonzentration) verdünnt. Die Primer und Gen-Sonden wurden analog zu den Kriterien, die für die 16S-rt-PCR beschrieben wurden, ausgewählt (siehe 3.2.3.2, 16S rDNA-rt-PCR) und in einer rt-PCR, im Folgenden als hsp65-rt-PCR bezeichnet, getestet. Diese wurde ebenfalls unter den in Tabelle 22 beschriebenen Bedingungen mit einem Agilent Technologies Stratagene Mx3000P Gerät durchgeführt. Die Aufnahme der Fluoreszenzdaten erfolgte durch den Kanal YY in der Annealing-Phase der rt-PCR. Die Austestung der Primer erfolgte mit folgenden DNA-Proben: *Saccharopolyspora*, *Corynebacterium*, *M. bovis* BCG, *M. pinnipedii*, *M. peregrinum*, *M. terrae*, sowie eine Negativkontrolle (Wasser).

### 3.2.3.3 Berechnung der DNA-Konzentration

#### - Spektrometrische DNA-Messung

Die Konzentration der DNA wurde anhand der Absorption bei 260 nm im Spektrophotometer NanoDrop bestimmt. Die Messung wurde mit einem Volumen von einem Mikroliter DNA durchgeführt. Die Konzentration der DNA wurde aus der gemessenen Absorption nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt, nach welchem die Absorption einer DNA-Konzentration von 50 mg/ml nach folgender Gleichung berechnet wird:  $A = c \times d \times \epsilon$  (A: Absorption, c: DNA-Konzentration, d: Schichtdicke (1 cm),  $\epsilon$ : Extinktionskoeffizient von doppelsträngiger DNA bei 260 nm). Das Ergebnis wurde durch die Gerätesoftware automatisch ermittelt und gespeichert.

#### - Berechnung mittels Loschmidt'scher Zahl

Die Loschmidt'sche Zahl ( $6,023 \times 10^{23}$ ) gibt die Anzahl von Molekülen in einem Mol an. Das Mol kann ausgedrückt werden als das Molekulargewicht einer Substanz in Gramm pro Liter. Ausgehend von der Voraussetzung, dass ein Genom ein Makromolekül darstellt, das Molekulargewicht eines Basenpaares circa 650 Dalton beträgt und ein *M. bovis* BCG Genom  $4,3 \times 10^6$  Basenpaare enthält, wurde für ein *M. bovis* BCG Genom aus der spektrometrisch gemessenen Menge an DNA (ng/ $\mu$ l) die Anzahl der Genomeinheiten in der DNA-Lösung errechnet ( $6,023 \times 10^{23} = 650 \times 4,3 \times 10^6 \text{ DNA/l}$ ).

### 3.2.4 Charakterisierung des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes mittels Spoligotyping

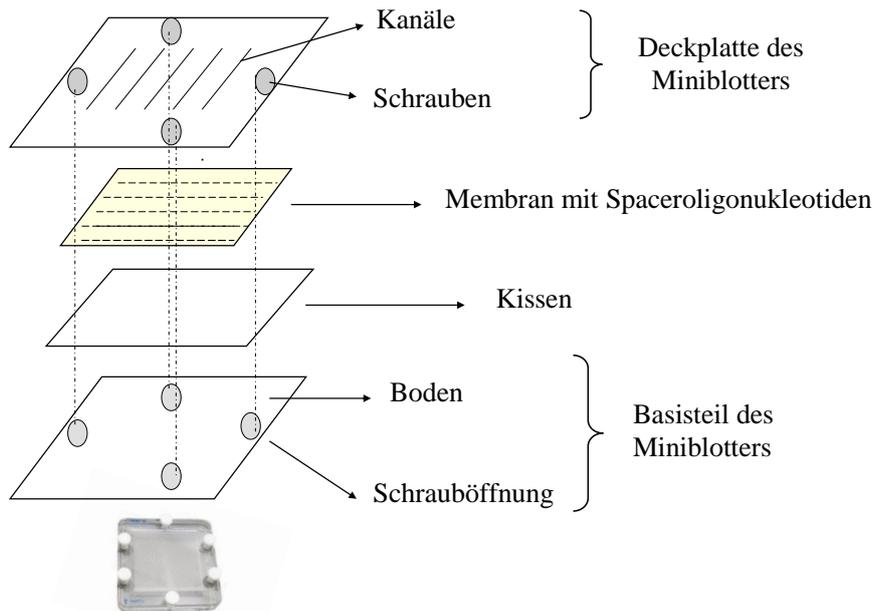
#### - Konventionelles Spoligotyping (nach Kamerbeek et al., 1997)

Die Methode des Spoligotyping ermöglicht die Differenzierung von Erregern des MTC. Dazu wird DNA der Direct Repeat-Regionen (DR) mittels konventioneller PCR unter Verwendung eines biontinmarkierten Primers (DRa) und eines nicht biontinmarkierten Primers (DRb; siehe Tabelle 8) amplifiziert. Je PCR-Ansatz werden 20 ng DNA eingesetzt. Die Angaben zum Reaktionsansatz und Temperaturprofil sind in Tabelle 23 aufgeführt. Die PCR-Produkte werden auf einer Nylonmembran, auf der 43 Spacer-Oligonukleotide der DR-Region in Reihe aufgetragen und fixiert sind, hybridisiert.

**Tabelle 23.** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für das Spoligotyping nach Kamerbeek et al. 1997

<b>Volume je Probe</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Funktion</b>	<b>Temperaturprofil</b>	
5 $\mu$ l	10x Taq-Puffer (1,5 mmol MgCl <sub>2</sub> )	Aktivierung Taq	96°C	3 Min
4 $\mu$ l	Primer DRa (biotinyliert; 20 pmol/ $\mu$ l)	45 Zyklen		
4 $\mu$ l	Primer DRb (20 pmol/ $\mu$ l)	Denaturierung	96°C	60 Sek
4 $\mu$ l	dNTP – Mix (10 mM)	Annealing	55°C	60 Sek
1 $\mu$ l	Taq-Polymerase (2 units/ $\mu$ l)	Extension	72°C	30 Sek
y $\mu$ l	Wasser (y = 32 $\mu$ l – x)	Final Extension	72°C	5 Min
x $\mu$ l	DNA-Lösung (20 ng)		4°C	20 Min
50 $\mu$ l	Gesamtvolumen			

Die Hybridisierung wurde auf einem Miniblotter (siehe Abbildung 9) durchgeführt. Dies ist ein Gerät, das aus zwei Teilen besteht. Der Basisteil besteht aus einem flachen Gestell und das Oberteil aus einer Deckplatte mit schmalen Kanälen, in welche die DNA-Proben hinein pipettiert werden. Die Membran wird auf einem trockenen Unterlagekissen auf dem Basisteil des Miniblotters positioniert, so dass die Kanäle der Deckplatte senkrecht zu den Linien der auf der Membran fixierten Oligonukleotide verlaufen. Die Deckplatte wird an dem Basisteil durch Schrauben fixiert, die sich an den Rändern von Basisteil und Deckplatte befinden. Der Miniblotter wird zugeschraubt und die Membran somit fixiert. Dadurch wird ein Vermischen und Auslaufen der zugegebenen DNA-Proben verhindert.



**Abbildung 9.** Aufbau des Miniblotters.

Der Miniblatter besteht aus einem Basisteil und einer Deckplatte mit schmalen Kanälen. Die mit Spaceroligonukleotiden modifizierte Membran wird auf dem Basisteil des Miniblotters positioniert, so dass die Kanäle der Deckplatte senkrecht zu den Linien der fixierten Oligonukleotide verlaufen.

Die mit Puffer 2x SSPE / 0,1% SDS verdünnten PCR-Produkte (siehe Tabelle 24) werden unter Vermeidung von Luftblasen-Bildung in die einzelnen Kanäle pipettiert und für eine Stunde bei 60°C in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Nach der Hybridisierung wird die Membran mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugat und anschließend mit ECL-Lösung inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe des Peroxidase-Substrats. Die Detektion der Substratumsetzung erfolgt mittels Röntgenfilm. Der Film dokumentiert somit die Informationen, die auf der Membran unsichtbar als Chemilumineszenz-Reaktion enthalten sind. Diese führt zu schwarz gefärbten Signalen auf dem Film an den Stellen der Hybridisierung. Die Signalmuster werden visuell ausgewertet. Jedes zu erwartende Signal wird nach Anwesenheit (schwarzer Punkt) bzw. Abwesenheit (kein Signal) beurteilt. Das Resultat der Hybridisierung (Signalmuster) wird durch eine binäre Zahlenreihe (1 für Signal und 0 für kein Signal) dargestellt. Die Werte werden in Dreierblocks geordnet und jede Dreierzahlenkombination durch eine festgelegte Zahl zwischen 0 und 7 charakterisiert. Diese Zahlenreihenfolge ergibt den „Octal Code“, der als Resultat wiederum eine 15-stellige Zahl ergibt. Das binäre Muster oder die „Octal Codes“ werden manuell in die Datenbank mbovis.org eingegeben, und von dort wird eine SB-Nummer vergeben. Die einzelnen Schritte der Durchführung der konventionellen Spoligotyping-Methode sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

**Tabelle 24.** Einzelne Schritte bei den Durchführungen der konventionellen Spoligotyping-Methode

<b>Arbeitsschritte</b>	<b>Beschreibung der Durchführung des Spoligotyping auf konventionelle Methode</b>
Denaturierung PCR-Produkt	Vom jeweiligen PCR-Produkt werden 20 µl mit 150 µl Puffer 2x SSPE / 0,1% SDS gemischt und für fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Danach wird die Probe für zwei Minuten auf Eis gelagert.
Vorbereitung Membran	Vor der Hybridisierung wird die Membran in eine Schale mit flachem Boden gelegt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 250 ml Puffer 2x SSPE / 0,1% SDS benetzt.
Hybridisierung	Die Membran wird auf dem Basisteil des Miniblotters positioniert und die verdünnten und denaturierten PCR-Produkte einzeln in die Kanäle der Deckplatte pipettiert. Dort werden diese für eine Stunde bei 60°C in einem Hybridisierungssofen inkubiert.
Waschen	Die PCR-Produkte werden aus den Kanälen abgesaugt und die Membran in eine Rollflasche überführt. Diese wird zweimal zehn Minuten bei 60°C mit 250 ml Puffer 2x SSPE / 0,5 % SDS gewaschen. Der Puffer wird verworfen und die Flasche mit der Membran auf Raumtemperatur abgekühlt.
Inkubation mit Konjugat	Die Membran wird in der Rollflasche belassen und mit 5 µl Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 Units/ml) verdünnt in 20 ml Puffer 2x SSPE / 0,5% SDS für eine Stunde bei 42°C unter Rollbewegungen im Hybridisierungssofen inkubiert.
Waschen	Die Membran wird in der Rollflasche zweimal mit 250 ml Puffer 2x SSPE / 0,5% SDS bei Raumtemperatur gewaschen und danach in eine Glasschale überführt. Erneut wird die Membran mit 250 ml Puffer 2x SSPE gewaschen.
Inkubation mit Substrat	Die ECL-Lösung wird aus 50 ml Detektionslösung 1 und 50 ml Detektionslösung 2 hergestellt. Die Membran wird mit 20 ml ECL-Lösung überschichtet und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert.
Fixierung und Entwicklung des Films	Die Membran wird in eine transparente Plastikfolie eingeschlagen und für 20 Minuten im Dunkeln auf einen lichtempfindlichen Film (Hyperfilm ECL, nur bei Dunkelheit hantieren) in eine Röntgenfilmkassette gelegt. Der Film wird entwickelt und fixiert.
Datenanalyse	Die Auswertung erfolgt manuell durch die Umsetzung des Signalmusters in eine binäre Zahlenreihe.

### **-Spoligotyping Array**

Die von Kamerbeek et al. (1997) beschriebene Methode beruht auf der Hybridisierung auf einer Membran. Zur technischen Vereinfachung wurde diese Methode in das ArrayStrip™-Format konvertiert. Dabei handelt es sich um Reaktionsstreifen („Strips“), auf welchen die Microarray-Chips auf geordnet sind. Es handelt sich dabei um eine Adaptation der konventionellen Methode mit den entsprechenden notwendigen Anpassungen (Änderungen bei der Länge der verwendeten Oligonukleotide). Nach der PCR-Amplifikation mit 5'-biotinylierten Primern (siehe Tabelle 25) folgt die Hybridisierung.

**Tabelle 25.** Zusammensetzung des MasterMix und Temperaturprofil für die PCR

Volume je Probe	Zusammensetzung	Funktion	Temperaturprofil	
5 µl	10x Taq-Puffer	Aktivierung Taq	96°C	3 Min
4 µl	Primer DRa*	20 Zyklen		
4 µl	Primer DRb*	Denaturierung	96°C	60 Sek
4 µl	dNTP – Mix	Annealing	55°C	60 Sek
0,2 µl	Taq-Polymerase	Extension	72°C	30 Sek
1,0 µl	MgCl <sub>2</sub>	Final Extension	4°C	10 Min
29,8 µl	Wasser			
48,0 µl	Gesamtvolumen			

\* 5'-biotinylierte Primer

Diese erfolgt unter Nutzung des ArrayStrip und des „Hybridisation Kit“ nach den Angaben des Herstellers (Alere Technologies GmbH, Jena, Deutschland). Zu diesem Kit gehören fünf Puffer: C1, C2, C3, C4, C5 und die Lösung D1. Bei den Puffern C2 und C5 handelt es sich um einen Waschpuffer, beim Puffer C1 um den Hybridisierungspuffer, C3 enthält das Konjugat und C4 den zugehörigen Verdünnungspuffer. Die Lösung D1 (Seramun) enthält das Substrat für das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP). Die Lösung D1 und der Puffer C3 werden bei 4°C, die restlichen vier Puffer bei Raumtemperatur gelagert. Für das Hybridisierungsprotokoll wird ein Thermoblock mit Schwenkfunktion, der BioShake (Q. Instruments, Jena), verwendet. Eine Abdeckung der Kammer, in welche die Strips eingepasst werden, hat die Funktion, die eingestellte Temperatur konstant zu halten und beim Schwenken den Eintrag von unerwünschten Partikeln zu verhindern. Bei der Auswertung wird die Bindung der bakteriellen DNA an die Spacer-Oligonukleotide auf dem ArrayStrip™ dokumentiert und analysiert. Im Gegensatz zum konventionellen Spoligotyping erfolgt dies nicht manuell, sondern automatisch unter Nutzung der Software IconoClust™. Dabei wird die Intensität der Signale bewertet. Ab einer Signalstärke von 0,3 (Erfahrungswert) wird ein Signal als positiv gewertet. Die einzelnen Arbeitsschritte bei der Anwendung des Spoligotyping Arrays sind in der Tabelle 26 detailliert aufgeführt.

**Tabelle 26.** Einzelne Schritte und Durchführung des Spoligotyping auf Array-Format

Arbeitsschritte	Beschreibung der Durchführung des Spoligotyping auf Array-Format
Denaturierung PCR-Produkt	Vom jeweiligen PCR-Produkt werden 10 µl für die Hybridisierung verwendet. Vor der Denaturierung (fünf Min, 95°C) wird das PCR-Produkt mit 90 µl C1 versetzt. Danach wird die Probe für zwei Min auf Eis gelagert.
Vorbereitung Array	Vor der Hybridisierung werden 100 µl Aqua dest. in die Kavitäten des ArrayStrip pipettiert und sofort wieder ab pipettiert. Dieser Vorgang wird mit 100 µl C1 wiederholt. Jedoch verbleibt der C1 Puffer für fünf Minuten in den Kavitäten und der ArrayStrip wird im Bioshake inkubiert (60°C, 550 UpM).
Hybridisierung	Das denaturierte PCR-Produkt (100 µl) wird in eine Kavität pipettiert und verbleibt dort für eine Stunde (60°C, 550 UpM).
Waschen	Der Strip wird zweimal mit 200 µl Puffer C2 bei 55°C mit 550 UpM für zehn Minuten unter Nutzung des Bioshake inkubiert.
Inkubation mit Konjugat	Aus 792 µl Puffer C4 und 8 µl Puffer C3 wird die Gebrauchsverdünnung des Konjugates (HRP) hergestellt. In die Kavität werden 100 µl der Gebrauchsverdünnung des Konjugates gegeben und der Strip bei 30°C mit 550 UpM im BioShake für zehn Minuten inkubiert.
Waschen	Bei Raumtemperatur werden 200 µl Puffer C5 in die Kavität gegeben und dieser gründlich mit einer Pipette abgesaugt.
Inkubation mit Substrat	Jede Kavität wird mit 100 µl der Lösung D1 (Seramun) überschichtet und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird die Lösung abgesaugt.
Datenanalyse	Am Boden des ArrayStrips™ ist ein blauschwarzes Präzipitat zu erkennen. Zur Datenanalyse wird der ArrayStrips™ in dem ArrayMate™ (Auslesegerät) gestellt. Das Gerät nimmt ein Bild jeder Kavität auf und wertet die Daten automatisch aus.

### 3.3 Statistische Auswertung

Die Veränderungen bei der Lyse der mykobakteriellen Zellwand wurden statistisch ausgewertet. Dabei wurde die Software IBM SPSS Statistics (Version 17.0) angewandt. Die Bewertung der statistischen Unterschiede der Kenngrößen der verschiedenen Methoden im Vergleich zum Standardlyse-Protokoll (Abschnitt 3.2.3.1) wurde aus dem Modul Exact Tests der Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben gewählt. Da es sich dabei um einen parameterfreien Test handelte, mussten keine einschränkenden Voraussetzungen an die Verteilung der Stichproben gestellt werden. Die besten Werte der Methoden zeigten dabei signifikante Unterschiede zum Standardlyse-Protokoll mit einem exakten zweiseitigen Signifikanz-Niveau ( $\alpha$ ), das sich im Bereich von  $\leq 1\%$  bis  $\leq 5\%$  einordnen ließ, was gleichzeitig auch einer Irrtumswahrscheinlichkeit in dieser Größenordnung entspricht. Die grafischen Darstellungen wurden mit der Software PASW Statistics 17.0 Version 17.02 angefertigt.

## **4 Ergebnisse**

Als Voruntersuchung für das Hauptziel, die Quantifizierung der Freisetzung bakterieller DNA aus infizierten Gewebeproben, wurde die Bakteriolyse mit *M. bovis* BCG-Reinkultur durchgeführt, da die Bakteriolyse zunächst ohne interferierende Einflüsse von Enzymen des Gewebes analysiert werden sollte.

### **4.1 Zelldichten der Standardsuspension**

Auf Grund ihres speziellen Zellwandaufbaus neigen Mykobakterien zur Aggregatbildung. Daher wurde zum Zweck der Quantifizierung in dieser Arbeit die Zahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) und nicht die Zellzahl ermittelt.

Eine standardisierte Bakteriensuspension von *M. bovis* BCG (optische Dichte von 0,3 bei 580 nm), mit einer mittleren Anzahl von  $1,1 \times 10^6$  KbE / ml, (Schwankungsbreite von  $0,1 \times 10^6$  bis  $3,1 \times 10^6$  KbE / ml), diente als Ausgangssuspension für die DNA-Extraktion aus bakterieller Reinkultur. Für die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Experimente wurde ein Volumen von 500  $\mu$ l der standardisierten Bakteriensuspension verwendet. Das zentrifugierte Sediment, das für die Untersuchungen verwendet wurde, enthielt eine mittlere Anzahl von insgesamt  $5,5 \times 10^5$  KbE.

### **4.2 Optimierung der DNA-Extraktion aus Mykobakterien**

#### **- Variationen des Einsatzes der Proteinase K für die Durchführung eines Standardlyse-Protokolls**

Das Enzym Proteinase K (PK) ist integraler Bestandteil des DNeasy Blood & Tissue Kit und wesentlich an der Lyse von Bakterienzellen beteiligt. Die Untersuchungen zur Steigerung der Effizienz der Bakteriolyse mit dem Ziel der erhöhten Freisetzung von DNA wurden durch Versuche zur Bestimmung der Auswirkung der PK-Aktivität auf die Bakterienzellen unter verschiedenen Inkubationsbedingungen im Rahmen des Extraktionsprotokolls eingeleitet. Tabelle 27 zeigt die angewandten Variationen an Einwirkungszeit, Zugabe Zeitpunkt und Dosierung des Enzyms. Die Auswirkung auf die Verfügbarkeit von DNA ist in Tabelle 28 dargestellt. Zum Vergleich wurde einmalig das Sediment einer Bakteriensuspension von *M. bovis* BCG-Reinkultur mit einer optischen Dichte von 0,06 bei 580 nm für die DNA-Extraktion verwendet. Die exakte Anzahl der KbE / ml wurde für diese Suspension nicht bestimmt. Diese wurde durch die Höhe der Ct-Werte nach Amplifikation der freigesetzten DNA in der MTC-FLI-rt-PCR gemessen. So wurden Bakteriensedimente aus Suspensionen sowohl mit einer optischen Dichte von 0,31 als auch mit einer optischen Dichte von 0,06 hergestellt. Zu diesen wurden 180  $\mu$ l ATL

Puffer und 20 µl PK in unterschiedliche Dosierung von 20 mg/ml bzw. 10 mg/ml zugegeben und die Suspension danach für fünf und 24 Stunden bei 56 °C inkubiert. Die PK-Zugabe erfolgte wie in Tabelle 28 beschrieben.

**Tabelle 27.** Zugabe der Proteinase K zur *M. bovis* BCG der Reinkultur bei einer optische Dichte von 0,31 und 0,06 zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation und in verschiedenen Dosierungen

Inkubationsdauer	Dosierung der Proteinase K
	1 x 20 mg / ml
5 Stunden	20 µl zum Zeitpunkt 0 Stunde (Ansatz 1)
24 Stunden	20 µl zum Zeitpunkt 0 Stunde (Ansatz 2)
	2 x 10 mg / ml
5 Stunden	10 µl zum Zeitpunkt 0 Stunde
	10 µl zum Zeitpunkt 2,5 Stunde (Ansatz 3)
24 Stunden	10 µl zum Zeitpunkt 0 Stunde
	10 µl zum Zeitpunkt 5 Stunden (Ansatz 4)
	10 µl zum Zeitpunkt 0 Stunde
	10 µl zum Zeitpunkt 10 Stunden (Ansatz 5)
	10 µl zum Zeitpunkt 0 Stunde
	10 µl zum Zeitpunkt 15 Stunden (Ansatz 6)

Die Zugabe zu Beginn einer 24h Inkubation lieferte DNA-Extrakte, die mit Ct-Werten von 16,98 (Bakteriensuspension OD: 0,31) bzw. Ct-Wert 18,54 (Bakteriensuspension OD: 0,06) gering-gradig niedrigere Ct-Werte erbrachten, als alle anderen Ansätze, die angewandt wurden. Diese Feststellung gilt sowohl für die Standardsuspension (OD: 0,31) wie auch für die 1:5 verdünnte Suspension (OD 0,06). Dieser Ansatz ist in Tabelle 28 durch Markierung hervorgehoben. Die einzelnen Parameter der anderen Varianten der PK-Zugabe (Ansätze 1-6) sind ebenfalls in Tabelle 28 aufgeführt. Eine Unregelmäßigkeit ist bei Ansatz fünf zu sehen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der optischen Dichte von 0,06, präsentierte der Ansatz mit der optischen Dichte von 0,31 einen fast identischen Ct-Wert (16,97) wie bei Ansatz 2. Im Hinblick auf den Arbeitsaufwand verbunden mit den erhaltenen Ergebnissen wurde der Ansatz 2 als Standardlyse-Protokoll der PK-Behandlung für die folgenden Untersuchungen ausgewählt. Auf Grund der besseren Reproduzierbarkeit des OD-Wertes von 0,3 im Vergleich zu OD 0,06 der Bakteriensuspension wurde in allen weiteren Versuchen nur noch mit der Standardsuspension (OD 0,3) gearbeitet.

**Tabelle 28.** Einflüsse der Einwirkungszeit von PK auf die Freisetzung von DNA von *M. bovis* BCG-Reinkultur hergestellt aus Bakteriensuspension mit zwei unterschiedlichen optischen Dichten gemessen mit MTC-FLI-rt-PCR

Ansatz	Proteinase K			Ct-Werte	
	Einwirkungszeit	Zeitpunkt der PK-Zugabe	Dosierung	OD: 0,06*	OD:0,31*
1	5 Stunden	0h	1x 20 mg/ml	19,05	18,08
2	24 Stunden	0h	1x 20 mg/ml	18,54	16,98
3	5 Stunden	0h 2,5h	2x 10 mg/ml	18,85	17,23
4	24 Stunden	0h 5,0h	2x 10 mg/ml	18,65	17,29
5	24 Stunden	0h 10,0h	2x 10 mg/ml	18,67	16,97
6	24 Stunden	0h 15,0h	2x 10 mg/ml	19,23	17,45

\*Optische Dichte der eingesetzten Bakteriensuspension gemessen bei 580 nm

#### 4.2.1 Steigerung der Effizienz der Bakteriolyse bei Bakterien-Reinkultur: thermische Lyse, mechanische Lyse, enzymatische Lyse und thermo-enzymatische Lyse

Im folgenden Abschnitt wird die Auswirkung von vier verschiedenen Extraktionsvarianten (Lyse), der thermischen, mechanischen, enzymatischen und der thermo-enzymatischen Lyse, zur Desintegration der Zellwand von *M. bovis* BCG beschrieben. Die Auswirkung wurde wiederum durch Ergebnisse der MTC-FLI-rt-PCR angegeben in Ct-Werten sichtbar gemacht, die nach Lyse der Bakterien mit den erhaltenen DNA-Extrakten durchgeführt wurde.

Die Abbildung 10 enthält vier Diagramme (A bis D), welche die Ergebnisse der Standardlyse und der vier angewandten Lyse-Varianten darstellen. In jedem Diagramm zeigt die y-Achse die Ct-Werte, auf der x-Achse sind die einzelnen Varianten der vier Strategien aufgeführt. Die Standardlyse ergab einen mittleren Ct-Wert von 16,67.

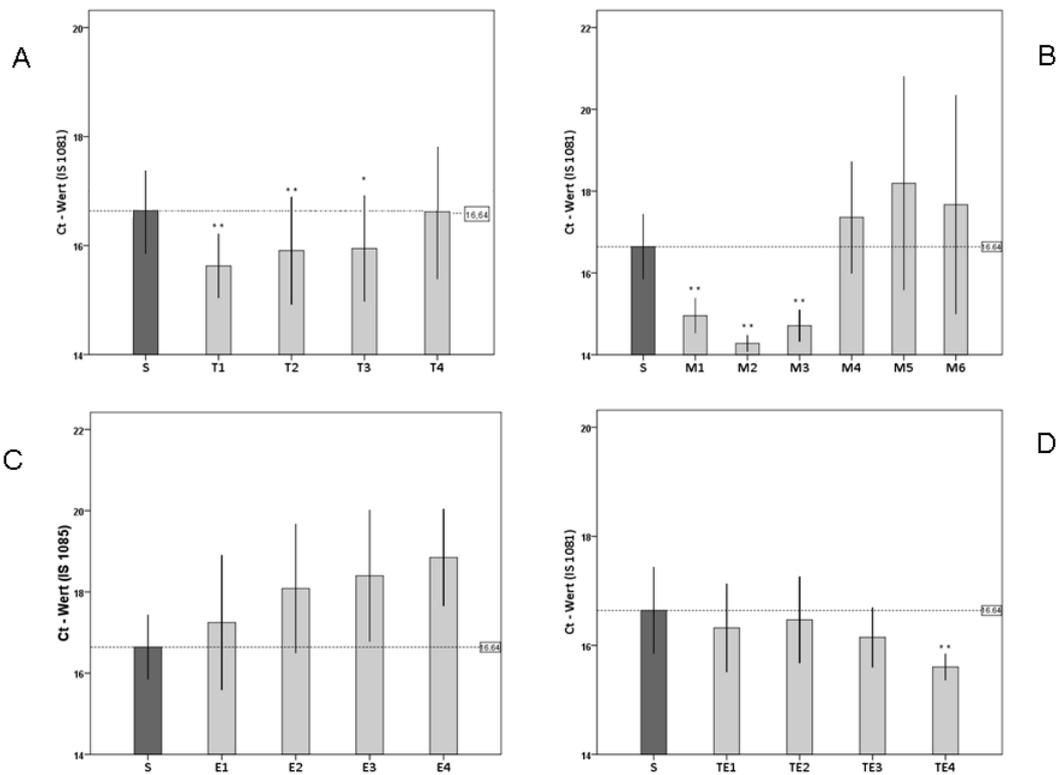
Das Diagramm A zeigt die Ergebnisse nach thermischer Lyse in vier Varianten (T1-T4). Die mittleren Ct-Werte variierten von 15,62 bis 16,61. Die Variante T1 ergab einen mittleren Ct-Wert von 15,62, T2 lag bei 15,90, T3 bei 15,94 und T4 ergab einen Wert von 16,61. Variante T1 war somit die erfolgreichste Variante. Die Varianten T1 und T2 unterschieden sich von der Standardlyse signifikant auf einem Niveau von  $\alpha = 1\%$ , der Unterschied der Variante T3 zum Ergebnis der Standardlyse liegt auf einem Signifikanz-Niveau von  $\alpha = 5\%$ . Die Variante T1 (Optimal-Variante) zeigt im jeweiligen Vergleich mit den Varianten T2 und T3 keine signifikanten Unterschiede ( $\alpha = 0,501$  bzw.  $\alpha = 0,429$ ).

Das Diagramm B zeigt die Ergebnisse der MTC-FLI-rt-PCR, die nach mechanischer Lyse der Bakterien in sechs Varianten (M1-M6), gewonnen wurden. Die Varianten der mechanische Lyse zeigten mittlere Ct-Werte im Bereich von 14,28 bis 18,19. Variante M1 ergab einen Wert von 14,95, M2 einen Wert von 14,28, M3 mit 14,71 einen etwas höheren Wert, Variante M4

ergab einen Ct-Wert von 17,35, bei M5 wurde mit 18,19 der höchste Ct-Wert der mechanische Lyse erreicht, und bei M6 wurde einen Wert von 17,67 ermittelt. Als erfolgreichste Variante der mechanischen Lyse zeigte sich also Variante M2. Die Varianten M1, M2 und M3 unterschieden sich im Vergleich zur Standardlyse auf einem Signifikanz-Niveau von  $\alpha = 1\%$ . Aber auch der Vergleich der Optimal-Variante M2 mit den beiden Varianten M1 und M3 zeigte signifikante Unterschiede auf einem Niveau von  $\alpha = 1\%$ .

Das Diagramm C zeigt die Ergebnisse der MTC-FLI-rt-PCR nach enzymatischer Lyse (E1-E4) von *M. bovis* BCG. In diesen Fall wurde die Lyse durch PK durch die Zugabe des Enzyms Lipase (gleichzeitige Zugabe; E1 und E2) unterstützt bzw. die Bakteriolyse ausschließlich durch das Enzym Lipase (E3 und E4) herbeigeführt. Variante E1 erzielte einen mittleren Ct-Wert von 17,24. E2 lag mit 18,08 etwas höher. Variante E3 erzielte einen Ct-Wert von 18,39 und E4 ergab mit 18,84 den höchsten Wert. Im Vergleich zur Standardlyse (mittlerer Ct-Wert von 16,64) war mit Ct-Werten zwischen 17,24 und 18,84 in keinem Fall eine Verbesserung zu erzielen.

Das Diagramm D zeigt die Auswirkung der thermo-enzymatischen Lyse (TE1-TE4) auf die Ct-Werte, die bei der MTC-FLI-rt-PCR mit den erhaltenen DNA-Extrakten erreicht wurden. Variante TE1 ergab einen mittleren Ct-Wert von 16,31, TE2 lag bei 16,46. Mit T3 wurde ein Wert von 16,14 erzielt, TE4 lag mit einem Wert von 15,60 etwas niedriger. Die letzte Variante erbrachte also den niedrigsten mittleren Ct-Wert im Vergleich zu den übrigen Varianten. In diesen Fall wurde zwischen TE4 und der Standardlyse wie auch der Varianten TE1, TE2 und TE3 ein statistisch signifikanter Unterschied auf einem Niveau von  $\alpha = 1\%$  festgestellt.



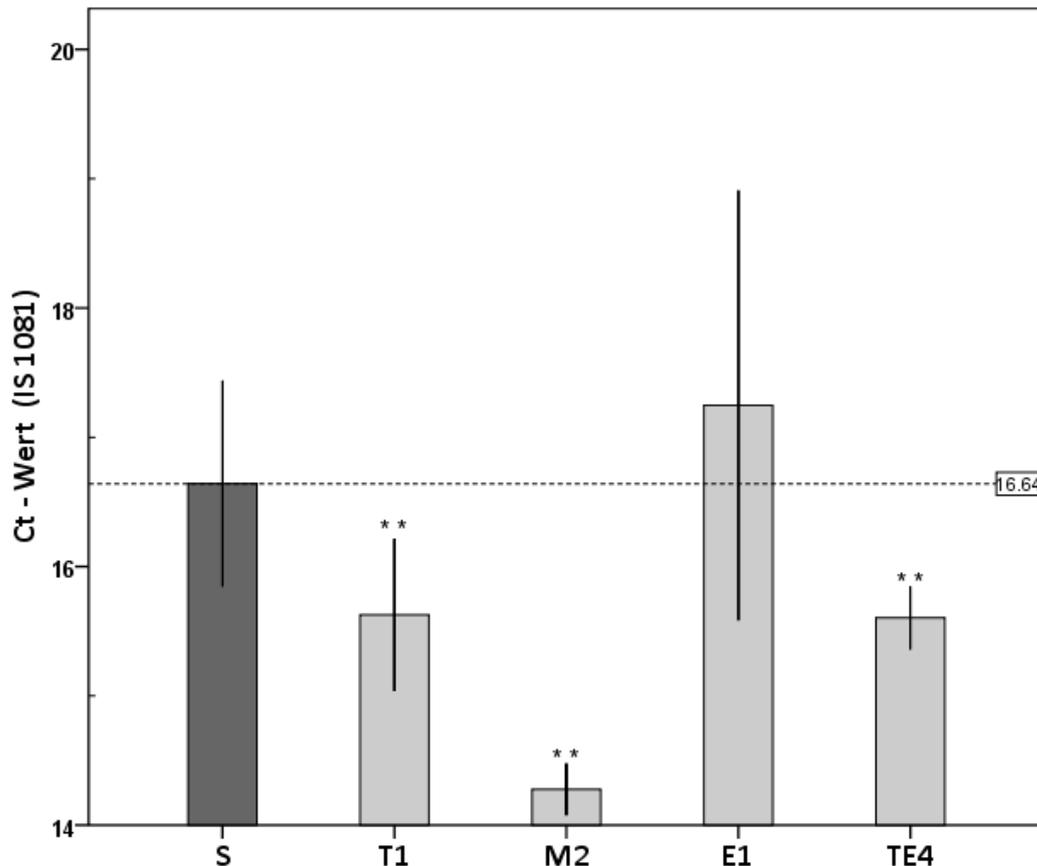
\*  $\alpha \leq 5\%$

\*\*  $\alpha \leq 1\%$

**Abbildung 10.** Vier Varianten der Bakteriolyse (A-D) im Vergleich zur Standardlyse, durchgeführt bei Reinkultur von *M. bovis* BCG.

Diagramm A, thermische Lyse mit vier Varianten (T1-T4); Diagramm B, mechanische Lyse mit sechs Varianten (M1-M6); Diagramm C, enzymatische Lyse mit vier Varianten (E1-E4); Diagramm D, thermo-enzymatische Lyse mit vier Varianten (TE1-TE4).

Die besten Ergebnisse (niedrigsten Ct-Werte) einer jeden Behandlung sind in Abbildung 11 zusammengefasst. Bei T1, M2 und TE4 wurde eine statistische Signifikanz auf einem Niveau von  $\alpha = 1\%$  im Vergleich zur Standardlyse errechnet. Auf Grund der Ergebnisse dieser Untersuchungen mit bakterieller Reinkultur wurden die Standardlyse, die thermische Lyse nach Variante T1 und die erfolgreichste Behandlung, die mechanische Lyse nach Variante M2, bei Gewebeproben durchgeführt.



\*\*  $\alpha \leq 1\%$

**Abbildung 11.** Die effizienteste Variante jeder Lyse-Strategie (Bakteriolyse) bei Reinkultur von *M. bovis* BCG im Vergleich zur Standardlyse mit den gewonnenen DNA-Extrakten ermittelt durch MTC-FLI-rt-PCR in Ct-Werte.

#### 4.2.2 Steigerung der Effizienz der Bakteriolyse bei Gewebe von Tieren mit nachgewiesener Tuberkulose

Zwei Strategien, die mechanische Lyse (Variante M2) und die thermische Lyse (Variante T1), wurden im Vergleich zur Standardlyse für die Behandlung von Gewebeproben eingesetzt. Für die Diagnostik der Tuberkulose wird die Kultur nach wie vor als Gold-Standard angesehen. Deshalb wurden die Gewebeproben parallel zur molekularen Untersuchung auch kulturell untersucht.

##### - Kultivierungsergebnisse

Bei zehn Gewebeproben wurde ein Erregernachweises durchgeführt. Von je 125 mg Gewebematerial wurden 25 mg kulturell untersucht. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien in KBE / 25 mg ist für die jeweilige Gewebeprobe in Tabelle 29 aufgeführt.

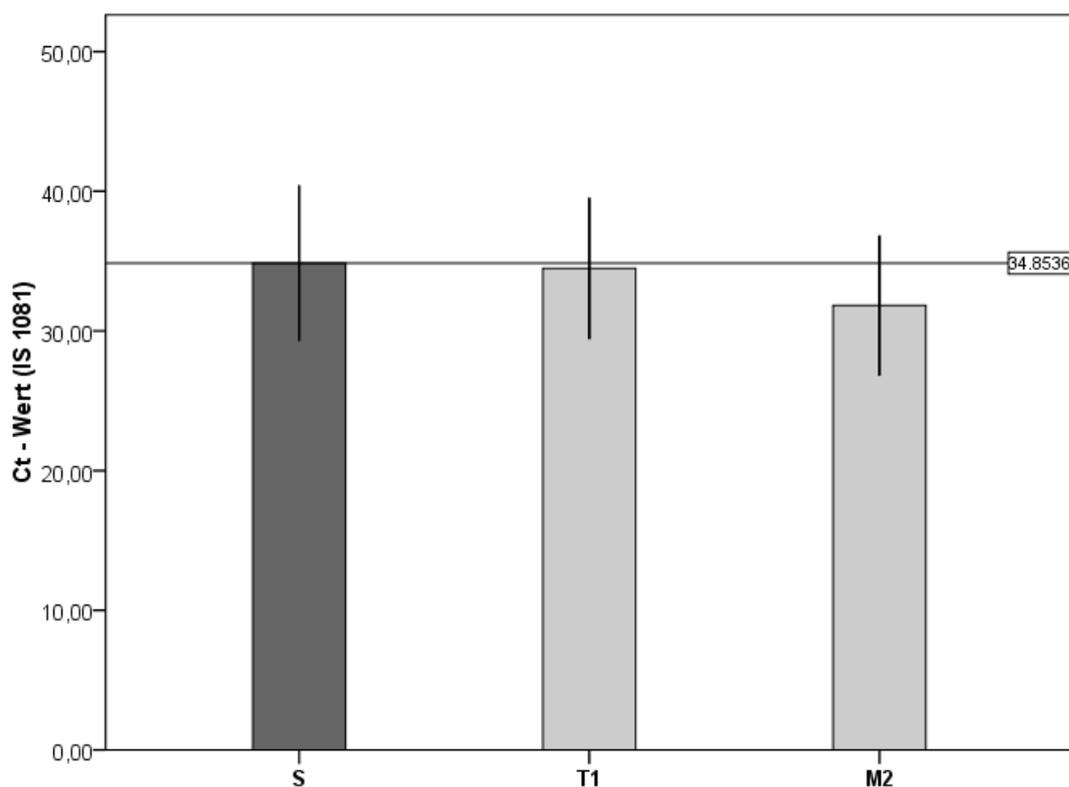
**Tabelle 29.** Ergebnisse der Kultivierung von zehn Gewebeproben von tuberkuloseinfizierten Tieren in KbE / 25 mg Gewebe

<b>Gewebeprobe FLI – Interne Bezeichnung</b>	<b>Anzahl der KbE / 25 mg eingesetztes Gewebe</b>
10MA1432	90
10MA1433	10
10MA1631	260
10MA1646	0
10MA1960	10
10MA1963	10
10MA1991	70
10MA1992	0
10MA2829	0
11MA2339	60

Von den zehn angelegten Gewebeproben zeigten sieben bakterielles Wachstum. Die Anzahl der KbE / 25 mg Gewebe variierte zwischen 10 und 260. Bei drei der angelegten Gewebeproben war kein Wachstum nachweisbar, obwohl in einer vorangegangenen Untersuchung auch in diesen drei Gewebeproben Erreger des MTC in der Kultur nachgewiesen worden waren.

**- Standardlyse, thermische (T1) und mechanische Lyse (M2) bei der DNA-Extraktion aus Gewebeproben von tuberkuloseinfizierten Tieren**

Insgesamt wurden zehn Gewebeproben von tuberkuloseinfizierten Tieren (siehe Tabelle 29) aufgearbeitet. Da ausreichend Material vorhanden war, wurden die Probe 10MA1433 dreimal und die Proben 11MA2339 und 10MA1646 je zweimal aufgearbeitet. Insgesamt wurden somit 14 Gewebeproben untersucht, die von zehn verschiedenen Tieren stammten. Wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, wurden von jeder Probe insgesamt 500 mg Gewebe aufgearbeitet und in vier Portionen à 125 mg aufgeteilt, von welchen drei Portionen für die DNA-Extraktion aufbereitet wurden. Die Portionen für die Extraktion wurden zentrifugiert, sodass ein Gewebesediment zurückblieb, mit welchem die Extraktion durchgeführt wurde. Die vierte und letzte Portion wurde, wie in Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben, für Kultivierung verwendet. Bei der DNA-Extraktion wurden die Standardlyse (S) sowie die thermische Lyse (T1) und die mechanische Lyse (M2) angewandt. Die Effizienz der Bakteriolyse in den Gewebeproben wurde unter den beschriebenen Lyse-Bedingungen wiederum nach Amplifikation mittels MTC-FLI-rt-PCR (IS *1081*) anhand der Ct-Werte ermittelt. Zwischen der Variante M2 und der Standardlyse ( $\alpha = 0,103$ ) sowie zwischen der Variante T1 und der Standardlyse ( $\alpha = 0,946$ ) wurden keine statistischen signifikanten Unterschiede festgestellt (Abbildung 12).



**Abbildung 12.** Ergebnisse der DNA-Extraktion nach Bakteriolyse-Varianten T1 und M2 im Vergleich zur Standardlyse, durchgeführt bei Gewebeproben von tuberkuloseinfizierten Tieren.

Sieben Gewebeproben erbrachten ein Signal in der MTC-FLI-rt-PCR. In Tabelle 30 ist bei den Proben, die kein Amplifikationssignal in der PCR erbracht hatten, ein fiktiver Ct-Wert von 45 eingesetzt, der für die rechnerische Analyse der Ct-Werte verwendet wurde. Bei der Gewebeprobe 10MA1646 wurde bei der ersten Aufarbeitung nach Standardlyse und Variante M2 kein PCR-Signal nachgewiesen. Bei der zweiten Aufarbeitung wurde nach Standardlyse und Variante T1 kein PCR-Signal nachgewiesen.

Insgesamt lagen die mittleren Ct-Werte nach Standard-Lyse bei 34,85, nach thermischer Lyse bei einem mittleren Wert von 34,47, bei der mechanischen Lyse wurde ein Wert von 31,82 ermittelt.

**Tabelle 30.** Ergebnisse der MTC-FLI-rt-PCR (Ct-Werte) mit DNA-Extrakten aus Gewebeproben nach Standardlyse, thermischer Lyse Variante T1 und mechanischer Lyse Variante M2

Gewebeprobe Interne Labor-Nr.	Ct-Werte nach MTC-FLI-rt-PCR		
	S*	T1**	M2***
10MA1432	31,07	30,11	28,08
<b>10MA1433</b>	37,69	37,16	27,15
<b>10MA1433</b>	35,63	35,64	31,85
<b>10MA1433</b>	35,69	36,72	33,26
10MA1631	26,93	27,89	24,87
<b>10MA1646</b>	45,00	39,66	45,00
<b>10MA1646</b>	45,00	45,00	36,44
10MA1960	28,40	28,54	26,77
10MA1963	36,28	36,74	32,54
10MA1991	32,48	36,75	31,53
10MA1992	32,28	31,29	30,10
10MA2829	27,90	26,59	29,97
<b>11MA2339</b>	37,10	35,17	35,54
<b>11MA2339</b>	36,50	35,39	32,41
Mittlerer Ct-Wert	34,85	34,47	31,82
SD	5,57	5,06	5,02

\* Standardlyse

\*\* Thermische Lyse nach Variante T1

\*\*\* Mechanische Lyse nach Variante M2

SD Standardabweichung

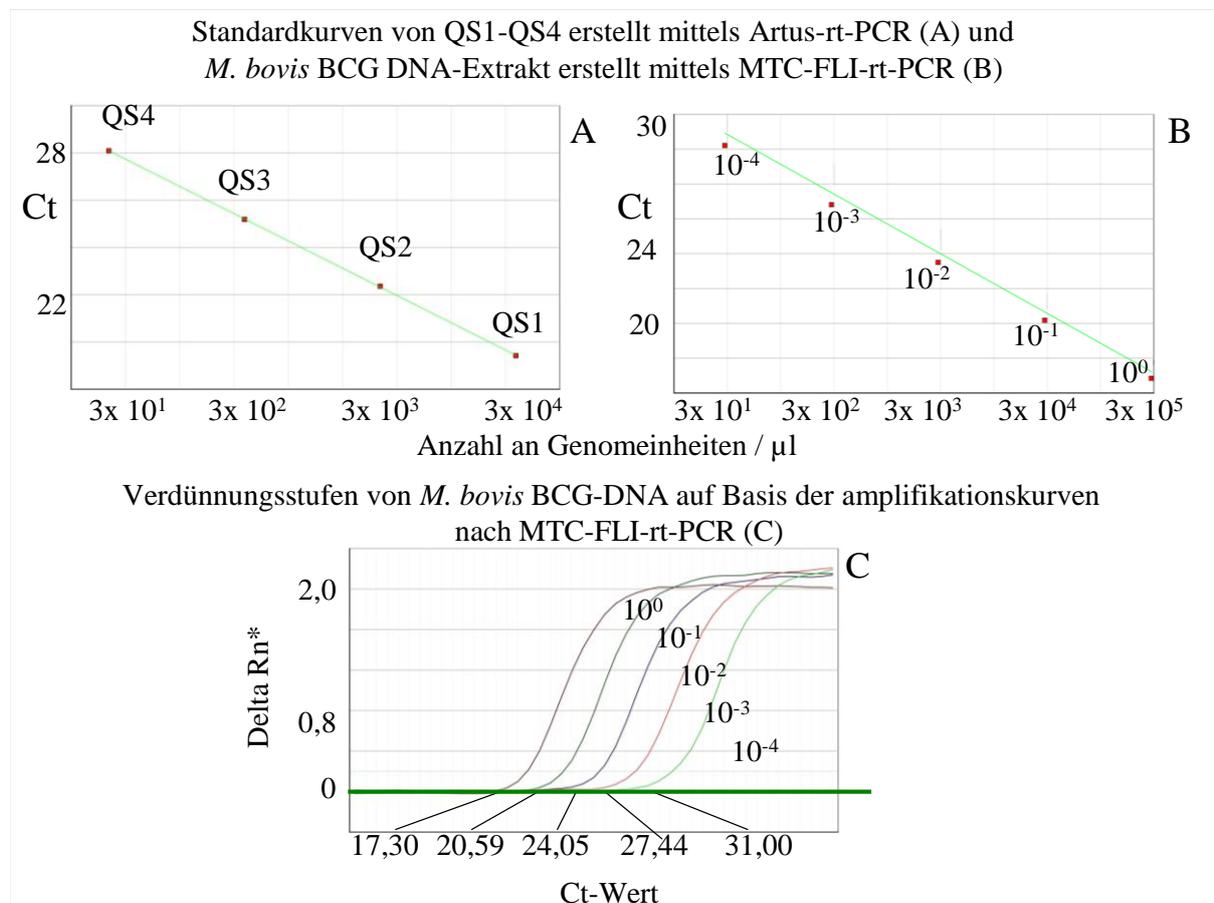
#### 4.2.3 Berechnung der Anzahl an Genomeinheiten

##### - Genomeinheiten pro $\mu\text{l}$ der Standardsuspension von *M. bovis* BCG (MTC-FLI-rt-PCR)

Von  $5,5 \times 10^5$  KbE von *M. bovis* BCG (siehe Abschnitt 4.1) wurde DNA nach Standardlyse isoliert und von diesem DNA-Extrakt dezimale Verdünnungsstufen bis zum Exponenten minus vier hergestellt. Die DNA-Extrakte zusammen mit den Quantifikationsstandard-Lösungen QS1-QS4 (Artus® *M. tuberculosis* TM PCR Kit; Qiagen) wurden mittels Artus-rt-PCR amplifiziert und auf der Basis der Standardkurve nach Ct-Werten der Lösungen QS1-QS4 die Anzahl der Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$  errechnet. Für den unverdünnten DNA-Extrakt wurde anhand der Standardkurve eine mittlere Anzahl von  $3 \times 10^5$  Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$  errechnet (Tabelle 31). Die Werte des DNA-Extraktes und seiner Verdünnungsstufen wurden als Standards für die Erstellung einer selbst erstellten Standardkurve bei der MTC-FLI-rt-PCR eingesetzt (Abbildung 13).

**Tabelle 31.** Korrelation der Ct-Werte, erhalten mittels MTC-FLI-rt-PCR und Artus-rt-PCR zur Abschätzung der mittleren Anzahl der Genomeinheiten in DNA-Extrakten von *M. bovis* BCG ( $3 \times 10^5$  Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$  Original-Suspension) auf der Basis der Standardkurve

Verdünnungsstufen	Ct-Wert (rt-PCR)		Mittlere Anzahl GE/ $\mu\text{l}$	Quantifikationsstandards QS (GE/ $\mu\text{l}$ )	Ct-Wert (rt-PCR)	
	MTC-FLI	Artus			Artus	Artus
$10^0$	16,85	16,05	$3 \times 10^5$			
$10^{-1}$	20,18	18,48	$3 \times 10^4$	QS1 ( $3 \times 10^4$ )		19,43
$10^{-2}$	23,50	22,42	$3 \times 10^3$	QS2 ( $3 \times 10^3$ )		22,36
$10^{-3}$	26,82	25,08	$3 \times 10^2$	QS3 ( $3 \times 10^2$ )		25,19
$10^{-4}$	30,21	29,26	$3 \times 10^1$	QS4 ( $3 \times 10^1$ )		28,09



**Abbildung 13.** Bestimmung der Anzahl der Genomeinheiten in DNA-Extrakten aus der Standardsuspension von *M. bovis* BCG, hergestellt mittels Standardlyse

\* Delta Rn: Rn – Baseline. Rn wird berechnet nach dem Quotienten der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes und der Fluoreszenz des Referenzfarbstoffes

(A) Anzahl der Genomeinheiten in den Quantifikationsstandards (QS1-QS4), nachgewiesen mittels Artus-rt-PCR (B) Anzahl der Genomeinheiten in der Standardsuspension von *M. bovis* BCG-Reinkultur und dezimalen Verdünnungsstufen ( $10^0$ - $10^{-4}$ ), nachgewiesen mittels MTC-FLI-rt-PCR. (C) Amplifikationskurven der *M. bovis* BCG-Standardsuspension und der Verdünnungen, generiert mittels selbst erstellter Standardkurve der MTC-FLI-rt-PCR (Basis für die Abbildung 13B). Der Zwischenschritt, die Bestimmung der Anzahl der Genomeinheiten der *M. bovis* BCG Standardsuspension mittels Artus-rt-PCR, ist nicht dargestellt.

**- Genomeinheiten pro  $\mu\text{l}$  der Standardsuspension von *M. bovis* BCG (spektrometrische Messung)**

Zusätzlich zur Bestimmung der Anzahl der Genomeinheiten mittels rt-PCR wurde der *M. bovis* BCG DNA-Extrakt spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm einmalig gemessen. Der Extrakt enthielt 6 ng DNA /  $\mu\text{l}$ . Unter Einbeziehung von Molekulargewichtparametern wurde für ein *M. bovis* BCG Genom ein Gesamt-molekulargewicht von 5 fg DNA errechnet. Für die gemessene DNA-Menge (6 ng /  $\mu\text{l}$ ) wurde eine Anzahl von  $1,2 \times 10^6$  Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$  berechnet.

**- Genomeinheiten pro 25 mg Gewebe von tuberkuloseinfizierten Tieren**

Die Anzahl der nachgewiesenen Genomeinheiten in Gewebeproben (nach S und M2 Lyse-Varianten) wurde sowohl anhand der Standardkurve der Artus-rt-PCR als auch auf der Basis der selbst erstellten MTC-FLI-rt-PCR Standardkurve bestimmt. Die Resultate sind in den Tabellen 32 A und B aufgeführt. Die Werte für die Gewebeproben waren bei beiden rt-PCRs vergleichbar.

**Tabelle 32 A.** Anzahl der Genomeinheiten von MTC-Erregern in Gewebeproben pro  $\mu\text{l}$  eingesetzter DNA nach Standardlyse (S) und mechanischer Lyse (M2), bestimmt mittels Artus-rt-PCR und MTC-FLI-rt-PCR

Gewebeprobe FLI-Interne Bezeichnung	Genomeinheiten / $\mu\text{l}$			
	Artus-rt-PCR S*	MTC-FLI-rt-PCR S	Artus-rt-PCR M2**	MTC-FLI-rt-PCR M2
10MA1432	$5,7 \times 10^1$	$1,6 \times 10^1$	$1,1 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$
10MA1433	$0,4 \times 10^0$	$0,2 \times 10^0$	$9,5 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$
10MA1631	$1,0 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
10MA1646	Unbest.	Unbest.	$0,3 \times 10^1$	$0,4 \times 10^0$
10MA1960	$9,3 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$
10MA1963	$0,3 \times 10^0$	$0,4 \times 10^0$	$0,2 \times 10^1$	$5,9 \times 10^0$
10MA1991	$0,7 \times 10^0$	$6,1 \times 10^0$	$1,4 \times 10^1$	$1,1 \times 10^1$
10MA1992	$1,8 \times 10^1$	$7,0 \times 10^0$	$2,1 \times 10^2$	$3,1 \times 10^1$
10MA2829	$4,0 \times 10^1$	$1,4 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	$3,7 \times 10^1$
11MA2339	$0,2 \times 10^0$	$0,4 \times 10^0$	$0,2 \times 10^1$	$6,4 \times 10^0$

\* Standardlyse

\*\* Variante M2 der mechanische Lyse

Unbest. unbestimmbar, kein Amplifikationsignal, unter der Nachweisgrenze

**Tabelle 32 B.** Anzahl der Genomeinheiten von MTC-Erregern pro 25 mg Gewebe nach Standardlyse (S) und mechanischer Lyse (M2), bestimmt mittels Artus-rt-PCR und MTC-FLI-rt-PCR

Gewebeprobe FLI-Interne Bezeichnung	Artus-rt-PCR S*	Genomeinheiten / 25 mg Gewebe		
		MTC-FLI-rt-PCR S	Artus-rt-PCR M2**	MTC-FLI-rt-PCR M2
10MA1432	$4,5 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	$9,0 \times 10^2$	$9,6 \times 10^2$
10MA1433	$0,3 \times 10^1$	$0,1 \times 10^1$	$7,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$
10MA1631	$8,0 \times 10^2$	$2,2 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$	$8,8 \times 10^3$
10MA1646	Unbest.	Unbest.	$2,3 \times 10^1$	$3,2 \times 10^0$
10MA1960	$7,4 \times 10^2$	$8,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$
10MA1963	$0,2 \times 10^1$	$3,2 \times 10^0$	$1,4 \times 10^1$	$5,0 \times 10^1$
10MA1991	$0,6 \times 10^1$	$5,0 \times 10^1$	$1,1 \times 10^2$	$8,8 \times 10^1$
10MA1992	$1,5 \times 10^2$	$5,6 \times 10^1$	$1,0 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$
10MA2829	$3,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$
11MA2339	$0,2 \times 10^1$	$3,2 \times 10^0$	$2,0 \times 10^1$	$5,1 \times 10^1$

\* Standardlyse

\*\* Variante M2 der mechanische Lyse

Unbest.: Unbestimmbar, kein Amplifikationsignal, unter der Nachweisgrenze

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Gewebeprobe ist in Tabelle 33 dargestellt. Die Anzahl der Erreger der Gewebeprobe wurde sowohl als KbE als auch als Genomeinheiten pro 25 mg eingesetztes Gewebe ermittelt.

**Tabelle 33.** Anzahl an MTC-Erregern in 25 mg eingesetztem Gewebe, ermittelt als KbE und als Genomeinheiten

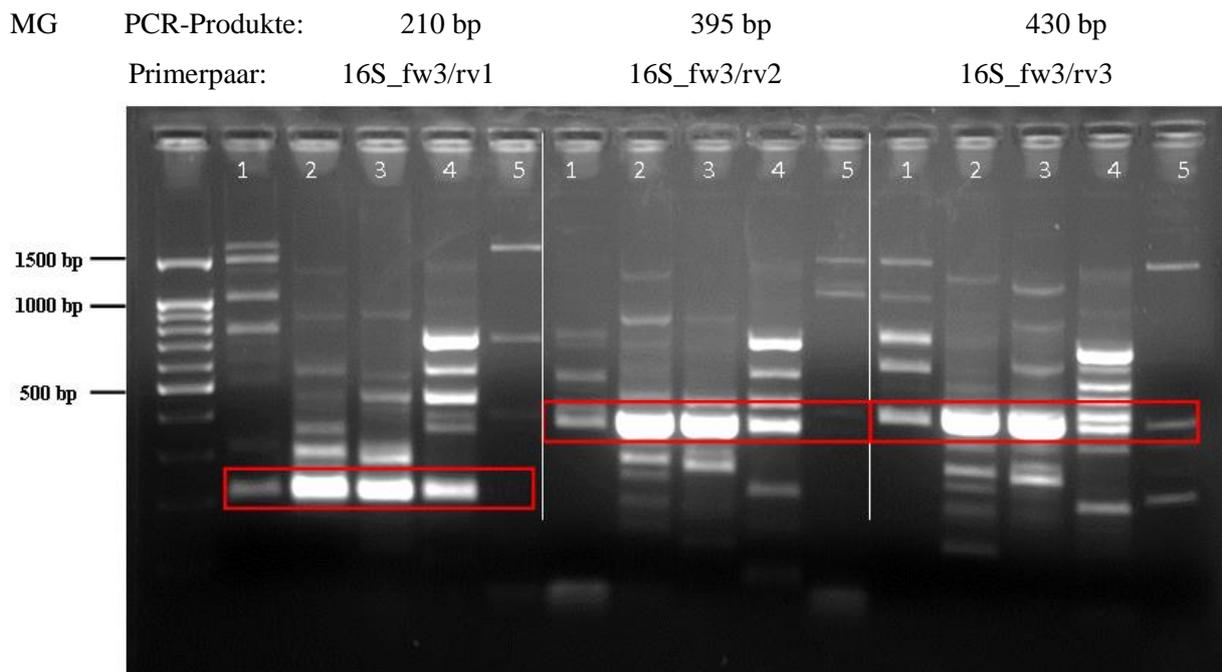
FLI-Interne Bezeichnung	Kultivierung	Genomeinheiten pro 25 mg Gewebe	
	KbE	S	M2
10MA1432	90	$1,2 \times 10^2$	$9,6 \times 10^2$
10MA1433	10	$0,1 \times 10^1$	$2,0 \times 10^3$
10MA1631	260	$2,2 \times 10^3$	$8,8 \times 10^3$
10MA1646	---	unbest	$3,2 \times 10^0$
10MA1960	10	$8,0 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$
10MA1963	10	$3,2 \times 10^0$	$5,0 \times 10^1$
10MA1991	70	$5,0 \times 10^1$	$8,8 \times 10^1$
10MA1992	---	$5,6 \times 10^1$	$2,4 \times 10^2$
10MA2829	---	$1,1 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$
11MA2339	60	$3,2 \times 10^0$	$5,1 \times 10^1$

### 4.3 Entwicklung einer genusspezifischen Real-Time PCR für Mykobakterien

#### 4.3.1 16S rRNA Gen

##### - Konventionelle PCR des 16S r-RNA Gens (16S-rt-PCR)

Für die Entwicklung einer rt-PCR wurden drei Primerpaare (siehe Tabelle 10) vorab in einer konventionellen PCR getestet. Wie in Tabelle 21 beschrieben, wurden die DNA-Proben amplifiziert und die PCR-Produkte durch Elektrophorese im Agarose-Gel sichtbar gemacht. Ein Beispiel der Ergebnisse ist in Abbildung 14 dargestellt.

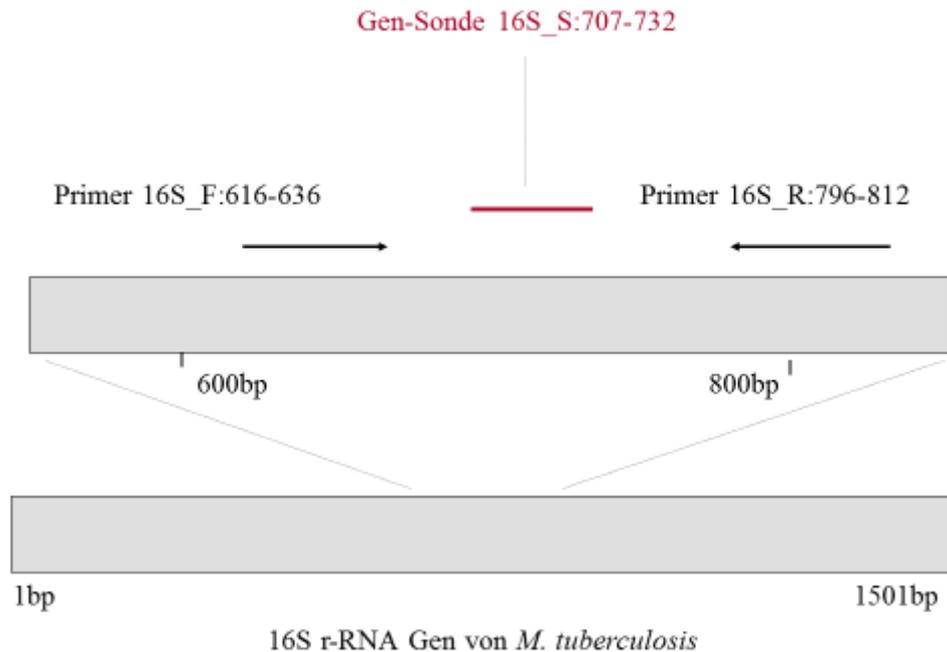


**Abbildung 14.** PCR-Ergebnisse für das 16S r-RNA Gen mit den Primerpaaren 16S\_fw3/rv1: 210bp; 16S\_fw3/rv2: 395 bp; 16S\_fw3/rv3: 430 bp.

Spur 1: *Mycobacterium bovis* BCG, Spur 2: *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, Spur 3: *Mycobacterium flavescens*, Spur 4: *Saccharopolyspora* und Spur 5: DNA-freies Wasser

##### -Real-Time-PCR für das 16S r-RNA Gen (16S-rt-PCR)

Für die Überführung der konventionellen PCR in eine rt-PCR wurde das Primerpaar Mycobac16S\_fw3 (Position 616-636 Schmelztemperatur Tm: 60°C) und Mycobac16S\_rv1 (Position 796-819 Tm: 59°C) in leicht modifizierter Form und ein zusätzliches Oligonukleotid, die Gen-Sonde Mycobact-S (Position 707-732 Tm: 66°C), hergestellt (Tabelle 10). Die Position der Primer (Vorwärts 16S\_F und Rückwärts 16S\_R) und der Gen-Sonde (16S\_S) sind in Abbildung 15 dargestellt. Die Gen-Sonde (siehe Tabelle 10) wurde anhand der Position des Primerpaares ausgesucht.



**Abbildung 15.** Position der Primer und der Gen-Sonde auf dem 16S r-RNA-Gen von *M. tuberculosis*. Für die Entwicklung einer genuspezifischen rt-PCR für Mykobakterien wurden die Primer 16S\_F (Position 616-636 und Schmelztemperatur bei 60°C), Primer 16S\_R (Position 796-819 und Schmelztemperatur bei 59°C) und die Gen-Sonde 16S\_S (Position 707-732 und Schmelztemperatur bei 66°C) verwendet.

Das Primerpaar und die Gen-Sonde wurden in acht Ansätzen (A-H) getestet. Die Ansätze unterschieden sich durch die Verwendung von verschiedenen Primer-Konzentrationen (50, 200, 300 und 600 nM; siehe Tabelle 34). Dafür wurden acht DNA-Proben, vier zur Gattung Mykobakterien gehörende Proben, drei nicht zur Gattung Mykobakterien gehörende Proben und eine Negativkontrolle (Wasser), amplifiziert.

Zu jeweils 24 µl MasterMix wurde 1µl DNA Probe (*M. bovis subsp. bovis*, *M. microti*, *M. vaccae*, *M. triviale*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Corynebacterium* und Wasser) in eine rt-PCR Platte pipettiert. Die Ergebnisse zeigten, dass der Ansatz B im Vergleich zu den anderen Ansätzen die besten Amplifikationssignale lieferte. Ansatz B wurde daher für die folgenden Untersuchungen übernommen. Eine Interne Kontrolle (IC; siehe Tabelle 9) wurde für die Überprüfung der rt-PCR modifiziert nach Hoffmann et al. (2006) eingesetzt. Der Reaktionsansatz und das Temperaturprofil für die angewandte Kontrolle sind in Tabelle 35 angegeben. Die Kontrolle führte nicht zu Störungen bei den Ergebnissen.

**Tabelle 34.** Konzentrationen von Primern, Gen-Sonde und Reaktionsansätze (Gesamtvolumen von 200 µl für alle acht DNA-Proben) für die 16S-rt-PCR

Mix	16S_Myc F [nM]*	16S_Myc F [µl]	16S_Myc R [nM]*	16S_Myc R [µl]	16S_Myc S [µl; 200nM]*	2x uMMix [µl]	W <sup>1</sup> [µl]
A	50	2	50	2	8	100	80
B	50	2	300	12	8	100	70
C	50	2	600	24	8	100	58
D	300	12	50	2	8	100	70
E	300	12	300	12	8	100	60
F	300	12	600	24	8	100	48
G	600	24	50	2	8	100	58
H	600	24	300	12	8	100	48

\* Bei der Gebrauchsverdünnung der Primer von 5 pmol/µl entspricht eine Verdünnung von 1:100 einer Endkonzentration von 50 nM, eine Verdünnung von 1:25 einer Endkonzentration von 200 nM, eine Verdünnung von 1:16,66 einer Endkonzentration von 300 nM und eine Verdünnung von 1:8,33 einer Endkonzentration von 600 nM. <sup>1</sup>Wasser

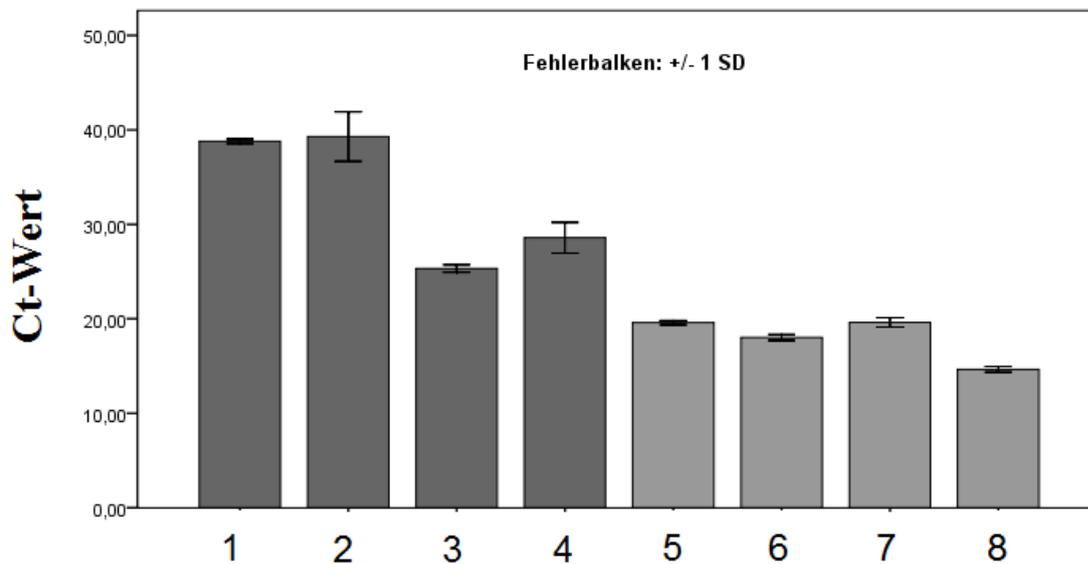
**Tabelle 35.** Angaben zum Reaktionsansatz und zum Temperaturprofil für die Interne Kontrolle modifiziert nach Hoffmann et al. (2006)

Volumen je Probe	Zusammensetzung	Funktion	Temperaturprofil	
12,50 µl	2x uMM-Puffer	Aktivierung Taq	10 Min	95°C
0,25 µl	Mycobac 16S_F			
1,50 µl	Mycobac 16S_R	45 Zyklen		
1,00 µl	Mycobac 16S_S	Denaturierung	15 Sek	95°C
2,00 µl	IC-Primer + Sonde	Annealing	60 Sek	60°C
0,25 µl	Template IC	Elongation	30 Sek	72°C
1,00 µl	Template Probe			
6,50 µl	Wasser			
25,00 µl	Gesamtvolumen			

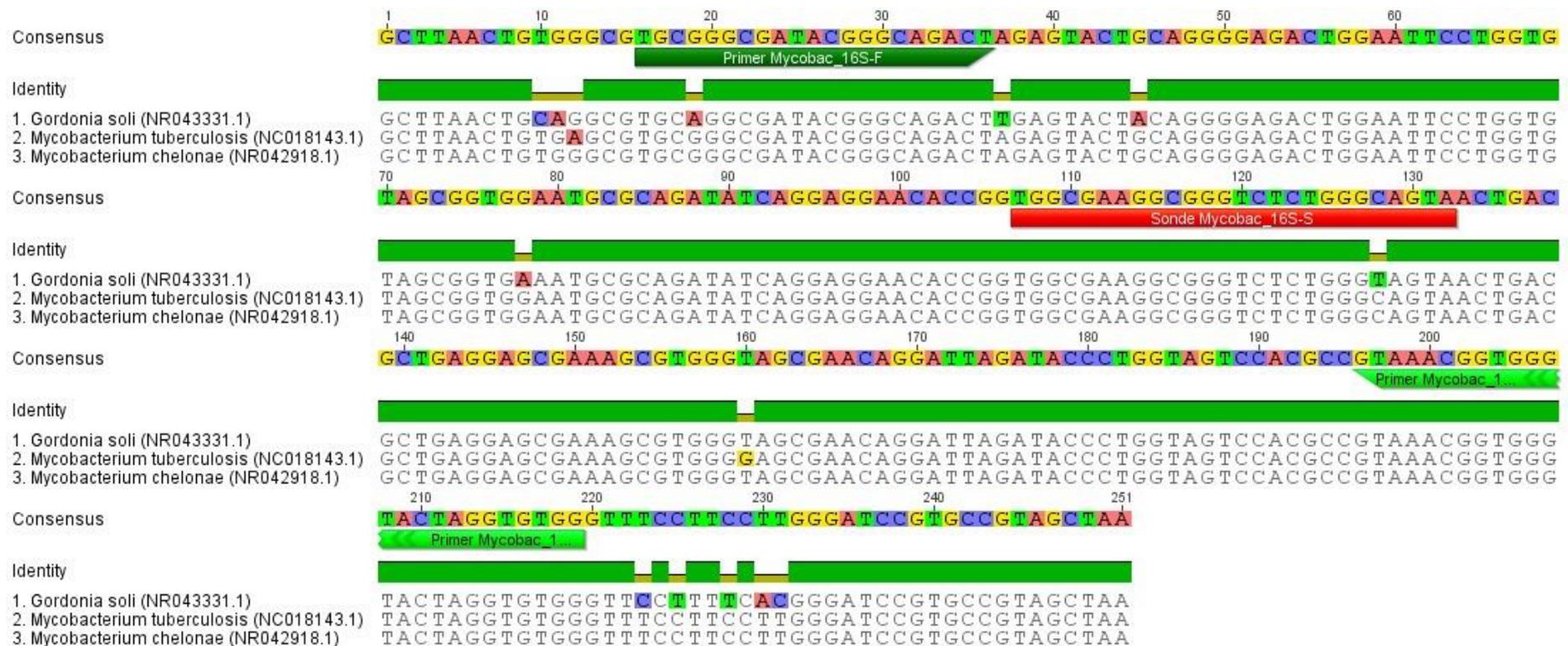
Fünfundsechzig DNA-Extrakte der in Tabelle 11 aufgelisteten Mykobakterien-Spezies wurden mittels 16S-rt-PCR amplifiziert. Bei allen Proben wurde ein Amplifikationssignal mit Ct-Werten zwischen 17,21 und 25,56 generiert. Von 18 nicht zur Gattung Mykobakterien gehörenden Spezies reagierten zwei, ein Vertreter der Gattung *Rhodococcus* und ein Vertreter der Gattung *Gordonia*, mit einem positiven Signal in der rt-PCR. Ein Teil der Sequenz des 16S r-RNA Gens von *M. tuberculosis* und *M. chelonae* wurde im Vergleich zu der 16S r-RNA Gen-Sequenz einer nicht zur Gattung Mykobakterien gehörenden Spezies beispielhaft in Abbildung 17 dargestellt. Für das Alignment wurde das Programm Geneious Version 5.6.2 verwendet.

DNA-Extrakte von sieben Bakterienspezies wurden mittels 16S-rt-PCR amplifiziert. Mit jedem Extrakt wurde die rt-PCR mehrfach durchgeführt. Bei Abwesenheit des Amplifikationssignals wurde ein fiktiver Wert von 45 PCR-Zyklen eingesetzt. Als Nachweisgrenze für ein positives Ergebnis wurden 39 PCR-Zyklen festgelegt. Vier DNA-Extrakte von Spezies der Gattung Mykobakterien (siehe Abbildung 15, 5 bis 8), *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. bovis* subsp. *caprae*

und *M. pinnipedii*, und Extrakte von Vertretern der Gattungen *Saccharopolyspora*, *Nocardia*, *Gordonia* und *Rhodococcus* wurden für die ersten Versuche ausgewählt. In Abbildung 16 sind die mittleren Ct-Werte für jeden DNA-Extrakt dargestellt. Die Werte der Mykobakterien-Extrakte liegen zwischen 19,14 und 21,17. Für die Vertreter der Gattungen *Saccharopolyspora* und *Nocardia* wurden Werte (39,51 bzw. 41,05) erzielt, die jenseits der gesetzten Nachweisgrenze lagen. Daher wurden die Ergebnisse als negativ bewertet. Die Ct-Werte der DNA-Extrakte der *Gordonia* sp.- und der *Rhodococcus* sp. waren deutlich niedriger als die Werte der zwei oben erwähnten Spezies. Im Vergleich zu den Mykobakterien-Extrakten erbrachten diese Bakterien-Spezies mittlere Ct-Werte von 25,33 bzw. 28,58.



**Abbildung 16.** Mittlere Ct-Werte von DNA-Extrakte von vier Mykobakterien-Spezies und DNA-Extrakten von vier Bakterien-Spezies, die nicht zur Gattung Mykobakterien gehören, amplifiziert mittels 16S-rt-PCR. Die Nachweisgrenze wurde bei Ct-Wert 39 festgelegt. Für die Abwesenheit des Amplifikationssignals wurde ein fiktiver Wert von 45 PCR-Zyklen eingesetzt.



**Abbildung 17.** Teil eines Alignments des 16S r-RNA Gens eines Vertreters der Spezies *Gordonia soli*, *M. tuberculosis* und *M. chelonae*. Die Position 1 entspricht Position 600 im 16S r-RNA-Gen von *M. tuberculosis*. Die Codes in Klammern nach dem Spezies-Namen zeigen die GenBank Accession Number der jeweiligen Sequenz.

#### 4.3.1.1 Untersuchung von Gewebeproben

##### - Nachweis von mykobakterieller DNA in Gewebeproben mittels 16S-rt-PCR

Die zehn verwendeten MTC-positiven DNA-Extrakte aus Gewebeproben, aufgeführt in Tabelle 13, aufgearbeitet nach Standardlyse (S) und mechanischer Lyse (M2), wurden mittels 16S-rt-PCR amplifiziert und quantifiziert. Mit einem DNA-Extrakt einer mit *M. microti* infizierten Gewebeprobe, der  $1 \times 10^4$  mykobakterielle Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$  enthielt, wurde ein Standard für eine Standardkurve erstellt (Tabelle 37). Die Ergebnisse in Ct-Werten und Genom-Einheiten /  $\mu\text{l}$  sind in Tabelle 36 dargestellt.

**Tabelle 36.** Berechnung der Anzahl von Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$  in DNA-Extrakten von Gewebeproben von tuberkuloseinfizierten Tieren anhand von Ct-Werten mittels 16S-rt-PCR

Gewebeprobe FLI-Interne Be- zeichnung	S*	Ct-Werte (SD)		Genomeinheiten / $\mu\text{l}$		
		M2**		S	M2	
10MA1432	35,55	(0,81)	34,10	(0,71)	$2,60 \times 10^1$	$7,50 \times 10^1$
10MA1433	39,12	(0,67)	32,65	(0,90)	$2,24 \times 10^0$	$1,84 \times 10^2$
10MA1631	33,89	(3,18)	31,82	(0,84)	$7,60 \times 10^1$	$3,01 \times 10^2$
10MA1646	42,68	(0,38)	41,22	(0,19)	$0,02 \times 10^0$	$0,88 \times 10^0$
10MA1960	33,66	(2,28)	31,6	(0,45)	$7,38 \times 10^1$	$3,63 \times 10^2$
10MA1963	40,59	(0,32)	37,74	(0,41)	$0,78 \times 10^0$	$5,84 \times 10^0$
10MA1991	39,37	(1,19)	37,46	(2,37)	$2,56 \times 10^0$	$1,12 \times 10^1$
10MA1992	37,19	(1,10)	34,55	(0,26)	$9,80 \times 10^0$	$4,80 \times 10^1$
10MA2829	34,62	(0,17)	31,62	(0,38)	$4,58 \times 10^1$	$3,53 \times 10^2$
11MA2339	41,11	(1,33)	39,21	(0,70)	$0,77 \times 10^0$	$2,30 \times 10^0$

\* Standardlyse

\*\* Mechanische Lyse

SD Standardabweichung

**Tabelle 37.** Ergebnisse in Ct-Werten, erhalten mittels 16S-rt-PCR zur Berechnung der mittleren Anzahl der Genomeinheiten in DNA-Extrakten von *M. microti* infizierten Gewebeproben

Verdünnungsstufe	Ct-Wert 16S-rt-PCR	Mittlere Anzahl der Genomeinheiten / $\mu\text{l}$
$10^0$	26,07	$1 \times 10^4$
$10^{-1}$	29,95	$1 \times 10^3$
$10^{-2}$	33,74	$1 \times 10^2$
$10^{-3}$	38,14	$1 \times 10^1$
$10^{-4}$	39,71	$1 \times 10^0$

Die Ergebnisse der 16S-rt-PCR mit DNA-Extrakten aus Gewebeproben, die nach Standardlyse (Tabelle 38) und mechanischer Lyse (Tabelle 39) aufgearbeitet worden waren, wurden mit den Ergebnissen der Artus-rt-PCR und MTC-FLI-rt-PCR verglichen.

**Tabelle 38.** Nachweis von Genomeinheiten in MTC-positiven DNA-Extrakten aus Gewebeproben von tuberkuloseinfizierten Tieren, die nach Standardlyse (S) aufgearbeitet wurden und mittels Artus-rt-PCR, MTC-FLI-rt-PCR und 16S-rt-PCR amplifiziert wurden

Gewebeprobe FLI- Interne Bezeichnung	Anzahl der Genomeinheiten / $\mu$ l		
	Artus-rt-PCR S*	MTC-FLI-rt-PCR S	16S-rt-PCR S
10MA1432	$5,7 \times 10^1$	$1,6 \times 10^1$	$2,6 \times 10^1$
10MA1433	$0,4 \times 10^0$	$0,2 \times 10^0$	$2,2 \times 10^0$
10MA1631	$1,0 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$	$7,6 \times 10^1$
10MA1646	Unbest.	Unbest.	$0,2 \times 10^0$
10MA1960	$9,3 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	$7,3 \times 10^1$
10MA1963	$0,3 \times 10^0$	$0,4 \times 10^0$	$0,7 \times 10^0$
10MA1991	$0,7 \times 10^0$	$6,1 \times 10^0$	$2,5 \times 10^0$
10MA1992	$1,8 \times 10^1$	$7,0 \times 10^0$	$9,8 \times 10^0$
10MA2829	$4,0 \times 10^1$	$1,4 \times 10^2$	$4,5 \times 10^1$
11MA2339	$0,2 \times 10^0$	$0,4 \times 10^0$	$0,7 \times 10^0$

\* Standardlyse

Unbest. Unbestimmbar, unter der Nachweisgrenze

**Tabelle 39.** Nachweis von Genomeinheiten in MTC-positiven DNA-Extrakten aus Gewebeproben von tuberkuloseinfizierten Tieren, die nach mechanischer Lyse (M2) aufgearbeitet wurden und mittels Artus-rt-PCR, MTC-FLI-rt-PCR und 16S-rt-PCR amplifiziert wurden

Gewebeprobe FLI- Interne Bezeichnung	Anzahl der Genomeinheiten / $\mu$ l		
	Artus-rt-PCR M2**	MTC-FLI-rt-PCR M2	16S-rt-PCR M2
10MA1432	$1,1 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	$7,5 \times 10^1$
10MA1433	$9,5 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$
10MA1631	$1,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$
10MA1646	$0,3 \times 10^1$	$0,4 \times 10^0$	$0,8 \times 10^0$
10MA1960	$2,4 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	$3,6 \times 10^2$
10MA1963	$0,2 \times 10^1$	$5,9 \times 10^0$	$5,8 \times 10^0$
10MA1991	$1,4 \times 10^1$	$1,1 \times 10^1$	$1,1 \times 10^1$
10MA1992	$2,1 \times 10^2$	$3,1 \times 10^1$	$4,8 \times 10^1$
10MA2829	$4,0 \times 10^2$	$3,7 \times 10^1$	$3,5 \times 10^2$
11MA2339	$0,2 \times 10^1$	$6,4 \times 10^0$	$2,3 \times 10^0$

\*\* Variante M2 der mechanische Lyse

Die Bestimmung der Anzahl der Genomeinheiten /  $\mu$ l von Gewebeproben mit der MTC-spezifischen rt-PCR (MTC-FLI-rt-PCR) und der gattungsspezifischen rt-PCR (16S-rt-PCR) im Vergleich zu der kommerziellen MTC-spezifischen rt-PCR (Artus-rt-PCR) zeigte, dass die drei rt-PCR-Systeme eine vergleichbare Sensitivität aufwiesen.

### **-Weitere Gewebeproben mit Verdacht auf Infektion mit Mykobakterien bzw. MTC-Erreger**

Von Gewebeproben, die in den Jahren 2011 und 2012 mit Verdacht auf Mykobakterien-Infektion an das Referenzlabor für Tuberkulose (FLI-Standort Jena) eingesandt worden waren, wurden 22 Proben (Tabelle 15) ausgewählt. Die DNA-Extrakte waren mit den DNeasy Blood and Tissue Kit nach Anweisung des Herstellers (Qiagen), mit Einwirkung der PK über Nacht (vergleichbar zur Standardlyse), extrahiert worden. Mit einer positiven (*M. bovis* BCG) und einer negativen Kontrolle (Wasser) wurde die Extrakte mittels MTC-FLI-rt-PCR und 16S-rt-PCR amplifiziert. Nur bei diesen Versuchen wurde beide Zielgene der MTC-FLI-rt-PCR, die hypothetische Helicase und das IS *1081*, untersucht. Die Ergebnisse der MTC-FLI-rt-PCR werden als positiv bewertet, wenn beide Zielgene einen Ct-Wert kleiner als 39 ergeben. Ist dies nicht der Fall, werden die Ergebnisse der MTC-FLI-rt-PCR als negativ beurteilt. Bei jedem Reaktionsansatz wurde für die MTC-FLI-rt-PCR und die 16S-rt-PCR die gleiche Menge an DNA (5 µl) eingesetzt. Für die Interpretation der Ergebnisse wurden vier Kategorien gebildet. Diese sind in Tabelle 40 aufgeführt.

**Tabelle 40.** Kategorien der Bewertung von 22 Gewebeproben auf Basis der Ergebnisse von MTC-FLI-rt-PCR und 16S-rt-PCR

<b>rt-PCR</b>	<b>Ergebnis</b>	<b>Kategorien</b>
16S MTC-FLI	positiv positiv	MTC-positiv (MTC)
16S MTC-FLI	negativ negativ	nicht mit Mykobakterien infiziert (KM)
16S MTC-FLI	positiv negativ	mit Mykobakterien infiziert (M)
16S MTC-FLI	negativ positiv	fraglich

Die Tabelle 41 beinhaltet die Ergebnisse der Untersuchungen der beide rt-PCRs in Ct-Werten. Bei den Proben, die bei beiden rt-PCRs kein Amplifikationssignal zeigten wurde jeweils ein fiktiver Ct-Wert von 45 eingesetzt. Als Grenze zwischen Anwesenheit und Abwesenheit eines Signals, wurde der Zyklus 39 festgelegt.

**Tabelle 41.** Ergebnisse der Untersuchung (Ct-Werte) von 22 Gewebeproben von Tieren mit Verdacht auf Infektion mit MTC-Erregern mittels MTC-FLI-rt-PCR und 16S-rt-PCR und die entsprechende Interpretation

Molekularer Nachweis (Ct-Werte)							
FLI-Interne	MTC-FLI-rt-PCR*				16S-rt-PCR**		Interpretation
Bezeichnung	Helicase		IS 1081		16S		
11MA3654	42,52	-	38,62	+	41,74	-	?
11MA3655	36,97	+	35,74	+	33,96	+	MTC
11MA3656	32,96	+	32,55	+	34,84	+	MTC
11MA3657	45,00	-	38,52	+	35,29	+	?
11MA3658	35,29	+	34,22	+	35,57	+	MTC
11MA3659	38,78	+	36,70	+	37,82	+	MTC
11MA3660	45,00	-	45,00	-	40,53	-	KM
11MA3661	38,99	+	37,82	+	42,54	-	?
11MA3662	33,70	+	33,05	+	35,09	+	MTC
11MA3663	45,00	-	40,15	-	38,51	+	M
11MA3664	34,18	+	33,32	+	34,95	+	MTC
11MA3665	36,64	+	35,30	+	35,24	+	MTC
11MA3666	45,00	-	45,00	-	39,21	-	KM
11MA3667	36,57	+	35,72	+	37,50	+	MTC
11MA3668	45,00	-	45,00	-	38,25	+	M
11MA3669	35,61	+	34,51	+	38,12	+	MTC
11MA3670	45,00	-	42,39	-	37,18	+	M
11MA3671	38,85	+	37,07	+	37,96	+	MTC
11MA3672	39,17	-	37,08	+	38,21	+	?
11MA3673	42,81	-	42,12	-	40,61	-	KM
12MA0820	33,77	+	33,57	+	33,67	+	MTC
12MA0704	30,96	+	30,91	+	30,93	+	MTC

+ Positiv  
 - Negativ  
 MTC *Mycobacterium tuberculosis* Komplex  
 KM Keine Mykobakterien  
 M Mykobakterien  
 \* Doppelbestimmung  
 \*\* Einfachbestimmung  
 ? Fraglich

Von den 22 Gewebeproben konnten 18 nach Definition der in Tabelle 40 aufgelisteten Kategorien interpretiert werden. Weitere vier Proben (11MA3654, 11MA3657, 11MA3661 und 11MA3672) wurden als fraglich bewertet. Von den 18 Gewebeproben wurden 15 (83%) in beiden PCRs übereinstimmend als mit Mykobakterien infiziert bewertet. Davon wurden 12 (66%) als MTC-infiziert und weitere drei (11MA3663, 11MA3668, 11MA3670) als infiziert mit nicht tuberkulösen Mykobakterien (M) klassifiziert. Weitere drei Proben (17%; 11MA3660, 11MA3666 und 11MA3673) wurden als nicht mit Mykobakterien infiziert klassifiziert (KM).

Die Ergebnisse der parallelen Durchführung der Kultivierung und der Spezies-Bestimmung sind in Tabelle 42 dargestellt.

**Tabelle 42.** Kultureller Erreger-Nachweis in 22 tuberkuloseverdächtigen Gewebeproben im Vergleich zum molekularen (MTC-FLI-rt-PCR und 16S-rt-PCR) Nachweis

FLI-Interne Bezeichnung	Interpretation nach rt-PCRs	Kultureller Erreger Nachweis
11MA3654	?	MTC
11MA3655	MTC	MTC
11MA3656	MTC	MTC
11MA3657	?	MTC
11MA3658	MTC	MTC
11MA3659	MTC	KM
11MA3660	KM	KM
11MA3661	?	MTC
11MA3662	MTC	MTC
11MA3663	M	KM
11MA3664	MTC	MTC
11MA3665	MTC	MTC
11MA3666	KM	KM
11MA3667	MTC	MTC
11MA3668	M	KM
11MA3669	MTC	MTC
11MA3670	M	MTC
11MA3671	MTC	MTC
11MA3672	?	MTC
11MA3673	KM	MTC
12MA0820	MTC	MTC
12MA0704	MTC	KM

MTC Mitglieder des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex

KM Keine Mykobakterien

M Mykobakterien

? Fraglich

Bei 12 (66%) von 18 Proben stimmen die Ergebnisse der molekularen Diagnostik mit den Ergebnissen der Kultivierung überein. Davon wurden 10 Proben (83%) als MTC-infiziert und zwei (17%) als infiziert mit Bakterien, die nicht zur Gattung Mykobakterien gehören, erkannt. Bei sechs der 18 Proben (33%) wurden widersprüchliche Ergebnisse erzielt. Diese wurden folgendermaßen aufgeschlüsselt:

- a) Bei der Probe 11MA3673 wurden anhand der Ergebnisse von beiden rt-PCRs keine Mykobakterien (KM) und nach den Ergebnissen der Kultur MTC-Erreger nachgewiesen,
- b) Bei den Proben 11MA3659 und 12MA0704 wurden anhand der Ergebnisse von beiden rt-PCRs MTC-Erreger und nach den Ergebnissen der Kultur keine Mykobakterien (KM) nachgewiesen,

- c) Bei die Probe 11MA3670 wurden anhand der Ergebnisse der rt-PCRs Erreger der Gattung Mykobakterien, nicht aber MTC, und anhand der Ergebnisse der Kultivierung MTC-Erreger nachgewiesen,
- d) Bei den Proben 11MA3663 und 11MA3668 wurden anhand der Ergebnisse der rt-PCRs Erreger der Gattung Mykobakterien und anhand der Ergebnisse der Kultivierung keine Mykobakterien nachgewiesen.

### 4.3.2 *hsp65* Gen

#### - Real-Time-PCR für das *hsp65* Gen (*hsp65*-rt-PCR)

Die Vorwärts und Rückwärts Primer und die Gen-Sonden (Tabelle 10) wurden nach Amplifikationsbedingungen, aufgeführt in Tabelle 22, unter Anwendung von zwei verschiedenen Annealing Temperaturen, 60°C und 55°C, getestet. Diese rt-PCR wurde *hsp65*-rt-PCR genannt. Die Durchführung der acht Ansätze (A bis H), die sich durch verschiedene Primer-Konzentrationen (50, 200, 300 und 600 nM; siehe Tabelle 34) unterschieden, erfolgte wie bei der Durchführung der 16S-rt-PCR (siehe Abschnitt 4.3.1).

Weil nur sehr schwache Amplifikationssignale generiert wurden, wurden vier weitere Kombinationen (Ansatz 1-4, siehe Tabelle 43) von Primern und Gen-Sonden (siehe Tabelle 10) getestet. Die DNA-Proben, die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Temperaturprofil (Annealing Temperatur von 60°C) wurden vom Vorversuch übernommen. Auch mit diesen Modifikationen wurden keine auswertbaren Signale generiert. Nach diesen Experimenten wurde die *hsp65*-rt-PCR nicht für weitere Untersuchungen eingesetzt.

**Tabelle 43.** Kombinationen von Primerpaaren und Gen-Sonden für die *hsp65*-rt-PCR

Ansätze	Kombinationen		
	Primerpaar		Gen-Sonde
Ansatz 1	MycHsp65_299-F	+ MycHsp65_416-R	+ MycHsp65_358-S
Ansatz 2	MycHsp65_299-F	+ MycHsp65_412-R	+ MycHsp65_349-S
Ansatz 3	MycHsp65_311-F	+ MycHsp65_416-R	+ MycHsp65_349-S
Ansatz 4	MycHsp65_311-F	+ MycHsp65_412-R	+ MycHsp65_349-S

### 4.4 Untersuchungen mittels Spoligotyping Methoden

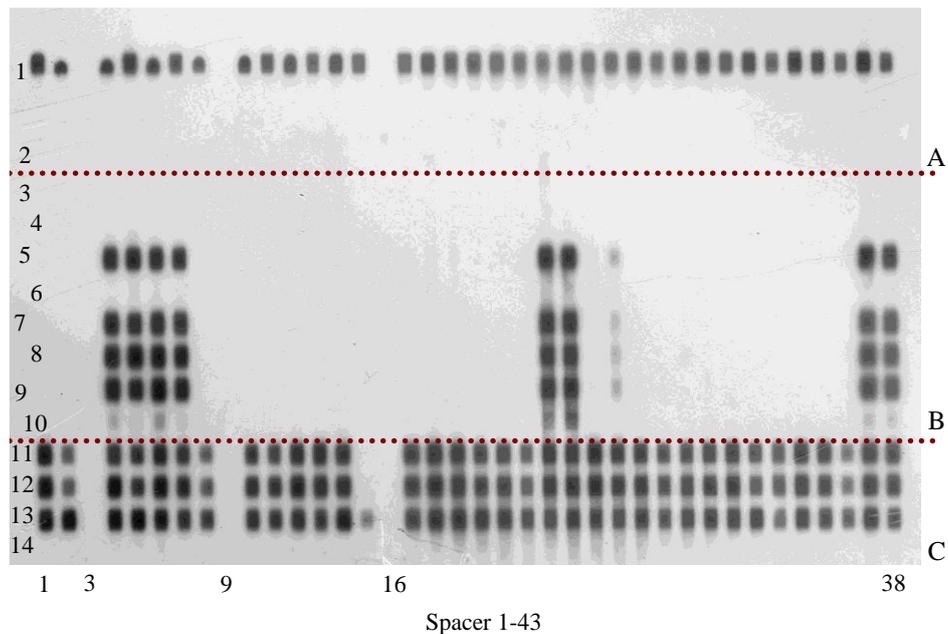
Die MTC-FLI-rt-PCR wird für den Nachweis von MTC-Erregern verwendet. Eine Differenzierung einzelner MTC-Spezies ist mit dieser rt-PCR jedoch nicht möglich. Die Differenzierung von MTC-Erregern wird z. B. durch die Spoligotyping-Methode ermöglicht. Diese wird bisher mittels einer konventionellen Methode (Kamerbeek et al., 1997), die eine hohe Konzentration an DNA benötigt, durchgeführt. Die Sensitivität der Methode wurde bisher nach unseren

Kenntnissen noch nicht ermittelt und wurde in den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen geprüft.

#### **4.4.1 Konventionelles Spoligotyping (nach Kamerbeek et al. 1997)**

##### **- Überprüfung der Sensitivität der konventionellen Spoligotyping-Methode mit DNA-Extrakten von *M. bovis* BCG-Reinkultur und DNA-Extrakten aus Gewebeproben**

Die Sensitivität der konventionellen Spoligotyping-Methode wurde anhand von DNA-Extrakten aus *M. bovis* BCG-Reinkultur und Gewebeproben überprüft. Dafür wurden dezimale Verdünnungen von DNA-Extrakten von Reinkultur von *M. bovis* BCG (Standardsuspension; Bakteriensuspension eingestellt bei einer optischen Dichte von 0,3) hergestellt und entsprechend in die Untersuchungen eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 (C) aufgeführt. Teil A der Abbildung zeigt die positive und die negative Kontrolle der konventionellen Spoligotyping-Methode. Abbildung 18 C zeigt die Ergebnisse der Durchführung mit Standardsuspension und ihren dezimalen Verdünnungen, so dass jeweils 20 ng, 2 ng, 0,2 ng, 0,02 ng DNA eingesetzt wurden. In Abbildung 18C 11-14 wird das typische Spoligotyping-Muster für *M. bovis* bei den Extrakten und ihre Verdünnungen (unverdünnt, 1:10 und 1:100) gezeigt. Das übliche Muster von *M. bovis* ist durch die Abwesenheit von Spacer 3, 9, 15 und 39 bis 43 charakterisiert. Ein positives Ergebnis wurde bis zur Verdünnung 1:100 (entsprechend 0,2 ng eingesetzte DNA; Nummer 13) generiert. Die Verdünnung 1:1000 (Zeile 14) erbrachte ein negatives Ergebnis. Abweichend von typischen *M. bovis*-Muster (siehe bei der positiven Kontrolle, Abbildung 18A) ist bei der Standardsuspension und ihren Verdünnungen zu erkennen, dass der Spacer 15 kein oder nur ein schwaches Signal zeigt.



**Abbildung 18.** Ergebnisse von *M. bovis* BCG-Standardsuspension und dezimalen Verdünnungen und DNA-Extrakten von Gewebeproben eines tuberkuloseinfizierten Tieres, untersucht mit der konventionellen Spoligotyping-Methode.

1: Positive Kontrolle *M. bovis* BCG (11A1119), 2: negative Kontrolle (DNA-freies Wasser), 3-10 DNA-Extrakte von Gewebeproben, 3: 10MA1631, 4: 10MA1632, 5: 10MA1633, 6: 10MA1634, 7: 10MA1636, 8: 10MA1637, 9: 10MA1639, 10: 10MA1640; 11: *M. bovis* BCG (Ss) unverdünnt, 12: *M. bovis* BCG (Ss) 1:10 verdünnt, 13: *M. bovis* BCG (Ss) 1:100 verdünnt und 14: *M. bovis* BCG (Ss) 1:1000 verdünnt.

Eine mittlere Anzahl von  $3 \times 10^5$  Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$  in der Standardsuspension (siehe 4.2.3) und vier weitere dezimale Verdünnungen wurden untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass mit dem unverdünnten, dem 1:10 und dem 1:100 verdünnten DNA-Extrakt von *M. bovis* BCG-Reinkultur mit der konventionellen Spoligotyping-Methode ein Signal-Muster bzw. einem positiven Ergebnis generiert werden konnte. Die Ct-Werte der positiven Proben lagen zwischen 16,85 und 23,50 (MTC-FLI-rt-PCR) bzw. 16,05 und 22,42 (Artus-rt-PCR; siehe Tabelle 44). Somit wurde eine Nachweisgrenze für *M. bovis* BCG-Reinkultur mit dem konventionellen Spoligotyping bei circa  $3 \times 10^3$  Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$  ermittelt.

**Tabelle 44.** Nachweisgrenze der konventionellen Spoligotyping Methode bei Reinkultur von *M. bovis* BCG-Standardsuspension ( $3 \times 10^5$  Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$ ) und dezimale Verdünnungen, bestimmt auf der Basis von Ct-Werten nach MTC-FLI-rt-PCR und Artus-rt-PCR

Verdünnungsstufe	MTC-FLI-rt-PCR	Artus-rt-PCR	Genomeinheiten / $\mu\text{l}$	Konventionelles Spoligotyping
Unverdünnt	16,85	16,05	$3 \times 10^5$	positiv
$10^{-1}$	20,18	18,48	$3 \times 10^4$	positiv
$10^{-2}$	23,50	22,42	$3 \times 10^3$	positiv
$10^{-3}$	26,82	25,08	$3 \times 10^2$	negativ

Nach Berechnung der spektrophotometrisch gemessener DNA von *M. bovis* BCG-Extrakt (siehe 4.2.3) enthalten 20 ng/ µl DNA circa  $4 \times 10^6$  Genomeinheiten / µl.

### - Durchführung der konventionellen Spoligotyping-Methode mit DNA-Extrakten von Gewebeproben

Von den 17 DNA-Extrakten aus Gewebeproben (siehe Tabelle 14; die DNA der Proben 10MA3639 und 10MA3640 wurden vom Einsender hergestellt) wurden acht Proben (alle Proben stammten aus verschiedenen Organen von einem Waschbären) mit der konventionellen Spoligotyping-Methode untersucht (siehe Abbildung 17 B; Tabelle 45). Die DNA-Extrakte wurden als *M. microti* Typ Lama typisiert. Das übliche Muster von *M. microti* Typ Lama wird durch die Anwesenheit von Spacer vier bis sieben, 23, 24, 37 und 38 charakterisiert. Die positiven Extrakte waren mittels MTC-FLI-rt-PCR durch Ct-Werte von 17,19 bis 26,15 charakterisiert. Eine Unregelmäßigkeit wurde bei der Probe 10MA1634 festgestellt, die bei der MTC-FLI-rt-PCR ein Ct-Wert von 20,40 erbrachte und bei der Spoligotyping-Methode ein negatives Ergebnis erzielte. Nach einer Wiederholung der Untersuchung wurde ein positives Ergebnis erzielt. Die Proben, die nach den Ergebnissen der MTC-FLI-rt-PCR über einem Ct-Wert von 26,15 lagen, erzielten ein negatives Ergebnis.

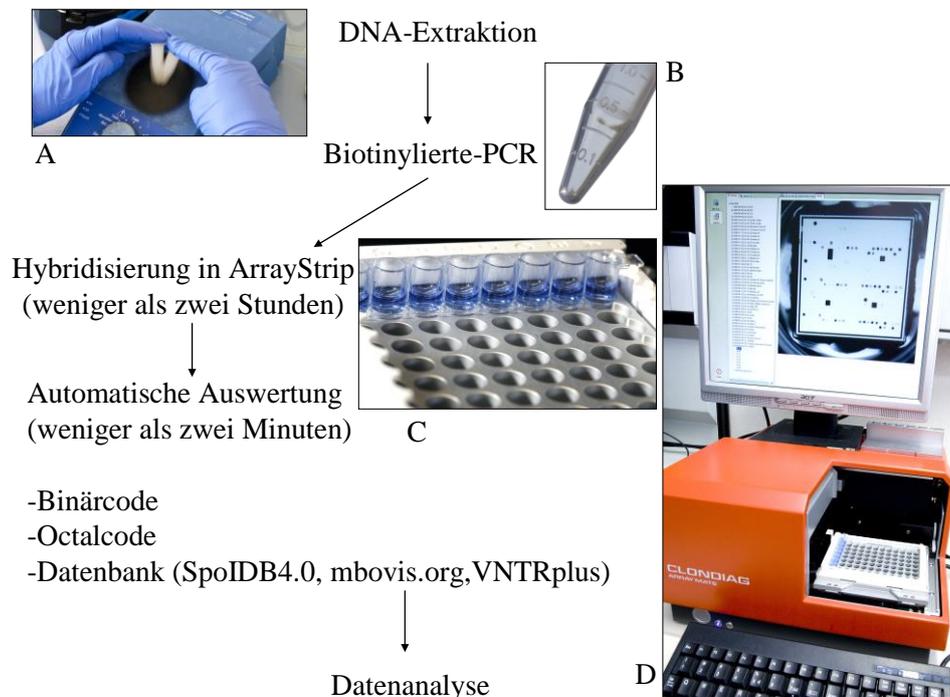
Die Nachweisgrenze des Spoligotyping lag für DNA-Extrakt von *M. bovis* BCG-Reinkultur bei einer DNA-Konzentration, die in der MTC-FLI-rt-PCR einem Ct-Wert von 23,50 ergab. Bei DNA-Extrakten aus Gewebeproben lag die Nachweisgrenze bei einer erregerspezifischen DNA-Konzentration, die in der MTC-FLI-rt-PCR einen Ct-Wert von 26,15 ergab. Bei Gewebe ergibt sich daraus eine Nachweisgrenze zwischen  $3 \times 10^2$  und  $3 \times 10^3$  Genomeinheiten / µl.

**Tabelle 45.** Nachweisgrenze der konventionellen Spoligotyping-Methode bei DNA-Extrakten aus Gewebeproben von Tieren mit nachgewiesener Tuberkuloseinfektion, bestimmt auf der Basis von Ct-Werten nach MTC-FLI-rt-PCR

Gewebeprobe FLI-Interne Bezeichnung	MTC-FLI-rt-PCR Ct-Wert	Ergebnisse Spoligotyping Bewertung
10MA1636	17,19	positiv
10MA1637	19,33	positiv
10MA1634	20,40	negativ
10MA1633	21,24	Positiv
10MA1639	21,63	Positiv
10MA1640	26,15	fraglich (schwach)
10MA1631	29,81	negativ
10MA1632	27,09	negativ

#### 4.4.2 Spoligotyping im ArrayStrip™-Format (nach Rüttger et al. 2012)

Die in Abschnitt 4.4.1 aufgeführten DNA-Extrakte (Reinkultur von *M. bovis* BCG Standardsuspension und Gewebeproben) wurden vergleichend mittels Spoligotyping im ArrayStrip™-Format untersucht. Die Abbildung 19 zeigt die Abfolge der einzelnen Schritte und den Aufwand bei der Durchführung der ArrayStrip-Methode.



**Abbildung 19.** Abfolge der einzelnen Schritte und Aufwand des Spoligotypings mit der ArrayStrip™-Methode (modifiziert nach Rüttger et al. 2012).

Nach der DNA-Extraktion (A), wird eine Biotin markierte PCR durchgeführt (B), die generierten PCR-Produkte werden auf dem ArrayStrip™ hybridisiert (C). Die Daten werden im Gerät ArrayMate™ mittels Software IconoClust™ ausgewertet. Vom PCR-Ansatz bis zur Auswertung beträgt der Zeitaufwand weniger als acht Stunden.

#### - Überprüfung der Sensitivität der Spoligotyping-Methode im ArrayStrip™-Format

Die DNA-Extrakte aus der Standardsuspension (siehe 3.2.1) und ihre Verdünnungsstufen bis zum Exponent minus vier mit einer mittleren Anzahl von  $3 \times 10^5$  Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$  in der Standardsuspension wurden mit der ArrayStrip™-Format Methode untersucht. Von der Verdünnungsstufe minus vier wurden weitere Verdünnungen (1:10, 1:100) hergestellt. Für die insgesamt sieben DNA-Extrakte wurden bis zum Exponenten minus vier auswertbare Ergebnisse erzielt (Tabelle A5, siehe Seite 110). Die weiteren Verdünnungen erbrachten ein negatives Ergebnis. Dies bedeutet, dass bei der ArrayStrip™-Format Methode die Sensitivitätsgrenze bei

einem Ct-Wert von 30,21 in der MTC-FLI-rt-PCR, bzw. 29,26 in der Artus-rt-PCR (Tabelle 46) bzw. bei 30 Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$  lag.

**Tabelle 46.** Nachweisgrenze der ArrayStrip™-Format Methode bei Reinkultur von *M. bovis* BCG-Standardsuspension ( $3 \times 10^5$  Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$ ) und dezimalen Verdünnungen, bestimmt auf der Basis von Ct-Werten nach MTC-FLI-rt-PCR und Artus-rt-PCR

<b>Verdünnungsstufe</b>	<b>MTC-FLI-rt-PCR</b>	<b>Artus-rt-PCR</b>	<b>ArrayStrip™</b>
Unverdünnt	16,85	16,05	positiv
$10^{-1}$	20,18	18,48	positiv
$10^{-2}$	23,50	22,42	positiv
$10^{-3}$	26,82	25,08	positiv
$10^{-4}$	30,21	29,26	positiv
$10^{-5}$	n.b	n.b	negativ
$10^{-6}$	n.b	n.b	negativ

n.b nicht bestimmt

#### **- Spoligotyping von DNA-Extrakten aus Gewebeproben von infizierten Tieren mit ArrayStrips**

Siebzehn DNA-Proben aus Gewebeproben von Tieren, die auf Grund von Voruntersuchungen als tuberkuloseinfiziert galten (siehe Tabelle 14), wurden mit der Methode des Spoligotyping mit ArrayStrips™ untersucht und ausgewertet. Diese Proben wurden nach dem DNA-Extraktions-Protokoll DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) mit einer PK-Inkubation „über Nacht“ angefertigt. Von den 17 DNA-Extrakten zeigten sieben im ArrayStrip ein Ergebnis. Bei diesen Proben lagen die Ct-Werte bei der MTC-FLI-rt-PCR zwischen 17,68 und 26,15. Die positiven Proben sind in Tabelle 47 durch eine Markierung hervorgehoben. Die Proben, die kein Ergebnis erbracht hatten, waren durch höhere Ct-Werte (27,09 bis 35,77) charakterisiert. Die Sensitivitätsgrenze der neuer ArrayStrip-Methode lag zwischen  $3 \times 10^2$  und  $3 \times 10^1$  Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$ .

**Tabelle 47.** Nachweisgrenze der ArrayStrip™-Format Methode bei DNA-Extrakten aus Gewebeproben von Tieren mit nachgewiesener Tuberkuloseinfektion, bestimmt auf der Basis von Ct-Werten nach MTC-FLI-rt-PCR

Gewebeprobe FLI-Interne Bezeichnung	MTC-FLI-rt-PCR Ct-Wert	Gewebeprobe FLI-Interne Bezeichnung	MTC-FLI-rt-PCR Ct-Wert
10MA1636	17,19	10MA1638	29,89
10MA1637	19,33	10MA1631	29,81
10MA1634	20,40	10MA1992	30,44
10MA1633	21,24	10MA1843	31,62
10MA1639	21,63	10MA1846	32,72
10MA1635	22,39	10MA1960	33,05
10MA1640	26,15	11MA0803	33,65
10MA1632	27,09	10MA2684	35,77
11MA0783	29,23		

Die sieben DNA-Proben, die mit der Methode auf ArrayStrip™-Format identifiziert wurden, wurden als *M. microti* Typ Lama typisiert (Tabelle A6, siehe Seite 111). Die Typisierung nach dem Octal Code und die SB Nummern (Daten Bank Mbovis.org) sind in Tabelle 48 aufgelistet. Die Übereinstimmung der Anzahl der Signale mit dem SB-Muster ist ebenfalls dargestellt. Bei zwei der sieben Proben stimmen die Signale mit den SB-Mustern überein (28,57 %).

Bei der DNA-Probe 10MA1634 wurde das Signal für den Spacer 24 mit einem Wert von 0,28 als fehlendes Signal bewertet. Bei den Proben 10MA1633 und 10MA1640 fehlten die Signale für die Spacer 7, 24 und 38, bei der Probe 10MA1633 fehlten die Signale für die Spacer 7, 24 und 38. Bei den Proben 10MA1635 und 10MA1639 fehlten die Signale für die Spacer 7, 23, 24 und 38 für die Übereinstimmung mit den Informationen der Datenbank.

**Tabelle 48.** Octal Code und SB Nummer von sieben DNA-Proben mit positivem Ergebnis in der ArrayStrip™-Format Methode

Gewebeprobe FLI-Interne Bezeichnung	Octal Code	Auswertung nach ArrayMate™	
		SB Nummer	Übereinstimmung*
10MA1636	074000030000600	SB0423	43/43
10MA1637	074000030000600	SB0423	43/43
10MA1634	074000030000600	SB0423	41/43
10MA1633	074000030000600	SB0423	40/43
10MA1635	040000000000600	SB0654	40/43
10MA1639	040000000000600	SB0654	40/43
10MA1640	040000000000600	SB0654	40/43

\*Anzahl der Übereinstimmungen der Signale zwischen ArrayStrip™ und Datenbank Mbovis.org

## 5. Diskussion

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, die DNA-Extraktion aus Gewebeproben zu verbessern und als Konsequenz daraus die Sensitivität des DNA-Nachweises von potenziell vorhandenen Tuberkulose-Erregern zu steigern. Der Erregernachweis aus Gewebeproben von infizierten oder verdächtigen Tieren ist nach Tuberkulose-Verordnung eine vordringliche Aufgabe für veterinärmedizinische Untersuchungseinrichtungen bei der Überwachung des Tuberkulosegeschehens beim Rind. Der Nachweis von Tuberkulose-Erregern aus Umweltproben stand nicht im Fokus dieser Arbeit. Auch die Validierung des molekularen Nachweises mittels Kultur, ein unabdingbarer Bestandteil dieser Prozedur, wäre auf Grund der zu erwartenden hohen Kontaminationsrate dieser Materialien problematisch, so dass die Matrix „Umweltprobe“ nicht bearbeitet wurde. Daher wird im Folgenden auf die Frage der Aufarbeitung von Umweltproben nicht weiter eingegangen. Um die Verbesserung durch die modifizierten Lyseprotokolle im Vergleich zum Standardlyse-Protokoll zu messen, wurde der DNA-Nachweis mittels rt-PCR gewählt. Damit wurde nicht die absolute Menge an extrahierter DNA, sondern die Zunahme von PCR-Produkt als Indikator für die Zunahme an amplifizierbarer DNA nachgewiesen. Die Veränderungen bzw. eine Zunahme von PCR-Produkt, gemessen anhand der Ct-Werte der MTC-FLI-rt-PCR, zeigte daher eine Veränderung bzw. Optimierung der Effizienz der Extraktion an.

### 5.1 Optimierung der DNA-Freisetzung aus Mykobakterien

Für die Quantifizierung der Freisetzung bakterieller DNA aus infizierten Gewebeproben wurden Voruntersuchungen mit Reinkultur aus *M. bovis* BCG durchgeführt. Der Ausgangspunkt der DNA-Extraktion aus Reinkultur war die Extraktion mit dem kommerziellen DNeasy Blood & Tissue Kit nach den Angaben des Herstellers (Qiagen) mit zwei Modifikationen. Eine der Modifikationen, die Inaktivierung der Mykobakterien bei 95°C, wird auch von anderen Autoren als ein notwendiger Schritt zur sicheren Abtötung von Mykobakterien gefordert (WARREN et al. 2006). Die zweite Modifikation betrifft die Einwirkungszeit und Dosierung der PK, die nach Herstellerangaben mit einer einmaligen Zugabe der PK und einer Einwirkungszeit von drei Stunden oder „über Nacht“ empfohlen wird. In Annäherung an die Bedingungen des Herstellers wurde das Enzym zu Beginn des Versuches mit einer Einwirkungszeit der PK für 5 Stunden im Vergleich zu einer Einwirkungszeit von 24 Stunden zugegeben. Auf Grund der etwas besseren Ergebnisse, Zunahme an PCR-Produkt um 2,6 % bis 6,1 %, wurde die Variante mit einer Einwirkungszeit der PK von 24 Stunden zusammen mit der Hitzeinaktivierung bei 95°C für die weiteren Versuche übernommen und als Standardlyse-Protokoll bezeichnet. Weitere Varianten

mit gestaffelter Zugabe des Enzyms und verschiedenen Einwirkungszeiten zeigten keine Verbesserung im Vergleich zur Standardlyse. Mit dem Ziel, die DNA-Extraktion aus Mykobakterien weiter zu verbessern, wurden zusätzliche Schritte an thermischen, enzymatischen und / oder mechanischen Einwirkungen auf die Mykobakterien, die vor dem und gleichzeitig zum Lyseprotokoll eingebaut wurden, durchgetestet und die so erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen der Standardlyse verglichen.

## **5.2 Varianten des Standardlyse-Protokolls, durchgeführt mit Reinkultur von *M. bovis* BCG**

Die Anwendung der thermischen Lyse mit dem Einsatz eines Temperaturschocks (flüssiger Stickstoff vs. 100°C) wurde durch die Studie von TAYLOR et al. (2007) inspiriert, der die Behandlung mit flüssigem Stickstoff als vorteilhaft beschrieben hat. REISCHL und Mitarbeiter (1994) verwendeten ebenfalls einen Temperaturschock (flüssigen Stickstoff vs. 100°C) für die Lyse der Zellwand der Mykobakterien. Bei der vorliegenden Arbeit erzielte eine fünfmalige Wiederholung des Temperaturschocks, angewandt vor der Prozedur der Standardlyse, eine geringe, aber reproduzierbare Verbesserung. Dabei wurde eine Zunahme an generiertem PCR-Produkt von etwa 6 % festgestellt. Unter Berücksichtigung der Gefährlichkeit der Durchführung dieses Protokolls, muss die erzielte Verbesserung von weniger als 10 % als unbefriedigend bewertet werden.

Die Zugabe eines zusätzlichen Enzyms, der Lipase, wurde von CASTELLANOS et al. (1995), die dieses Enzym ebenfalls angewandt haben, beschrieben. Da die PK ausschließlich Proteine der Zellwand spaltet, wurde die Lipase mit dem Ziel, zusätzlich Lipide der Zellwand zu spalten, eingesetzt. Der Zusatz des Enzyms Lipase erbrachte jedoch im Vergleich zur Standardlyse keine Verbesserung.

Überraschenderweise bewirkte bei einer Kombination der thermischen und enzymatischen Lyse, der thermo-enzymatischen Lyse, die Einwirkung eines einmaligen Temperaturschocks in Kombination mit der Inkubation der Proben mit beiden Enzymen, PK und Lipase, für nur eine Stunde (Variante TE4) eine Verbesserung um etwa 6 % im Vergleich zur Standardlyse gemessen anhand der Ct-Werte. Im Gegensatz zur enzymatischen Lyse allein wurde also eine Verbesserung erzielt, und die Behandlung war ebenso erfolgreich wie die Anwendung der fünfmaligen Wiederholung des Temperaturschocks mit Einwirkungszeit der PK für 24 Stunden. In Bezug zum größeren finanziellen Aufwand der Durchführung dieses Protokolls wurde die Verbesserung von weniger als 10 % jedoch trotzdem als unbefriedigend bewertet. Die mechanische Zerstörung der bakteriellen Zellwand mit Hilfe von zwei hochfrequent hin und her bewegten

Stahlkugeln (TissueLyser) für zehn Minuten führte zu einer Zunahme der DNA-Freisetzung, bzw. des PCR-Produkts gegenüber den Ergebnissen nach Standardlyse um 14 %. Diese schnelle und einfache mechanische Einwirkung auf die Bakterien zu Beginn der Standardlyse-Prozedur erzielte als einzige Zusatzseinwirkungen eine Verbesserung von mehr als 10 %. Die Varianten der mechanischen Lyse mit derselben Anzahl von Kugeln und derselben Frequenz mit anderer Inkubationsdauer sowie die Varianten mit Einsatz von nur einer Kugel erbrachten schlechtere Ergebnisse. Der Einsatz der mechanischen Lyse war einfach, schnell und ungefährlich. In der vorliegenden Arbeit wurde diese mechanische Lyse in Form von Variante M2 bei Reinkultur von *M. bovis* BCG daher als gut bewertet. Die Ergebnisse zeigten eine reproduzierbare Verbesserung im Vergleich zu den anderen Lyse-Varianten, die mit 6 % (thermischen Lyse und thermo-enzymatischen Lyse) bzw. mit keinerlei Verbesserung (enzymatische Lyse) weniger erfolgreich waren. Der Erfolg der Lyse der Zellwand von Mykobakterien mittels mechanischer Lyse wurde von anderen Autoren ebenfalls beschrieben. Bei der schon erwähnten Studie von TAYLOR et al. (2007) wurde die Extraktion bakterieller DNA bei mehr als hundert Proben mit dem NucliSens™ Kit (bioMérieux) in Verbindung mit dem Einsatz des Gerätes Ribolyser (Hybaid) als erfolgreich bewertet. AMARO et al. (2008) zeigten, dass sich die mechanische Lyse durch den Einsatz des Gerätes FastPrep 120 (Savant Instruments, Holbrook, NY) in Verbindung mit einer enzymatischen Behandlung (Inkubation mit SDS-EDTA-PK Puffer über Nacht bei 37 °C) als erfolgreicher erwiesen hatte als die Anwendung einer enzymatischen Lyse (Inkubation über Nacht mit Lysozym bei 37 °C und folgende Inkubation mit PK für drei Stunden bei 55 °C) allein. Bei beiden Methoden dieser Studie wurde im Anschluss an die Anwendung der mechanischen und enzymatischen Lyse eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Präzipitation mittels Ethanol der DNA durchgeführt. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Anwendungen wurden durch spektrophotometrische Messung der DNA ermittelt.

Um den Erfolg der DNA-Extraktion bei der vorliegenden Arbeit genauer bewerten zu können, wurde die Korrelation zwischen Ct-Werten, Genomeinheiten und KbE analysiert.

### **5.3 Korrelation zwischen Ct-Werten, Anzahl an Genomeinheiten und KbE bei Reinkultur von *M. bovis* BCG**

Um diese Korrelation darzustellen, wurden vier kommerzielle Quantifikationsstandards (Qs), Bestandteile des Artus® *M. tuberculosis*™ PCR Kits, die jeweils eine bekannte Anzahl der Genomeinheiten / µl enthalten, zu Hilfe herangezogen. Die direkte Amplifikation der Qs mittels MTC-FLI-rt-PCR war nicht möglich, da das Zielgen der Artus-rt-PCR nicht mit den Zielsequenzen der MTC-spezifischen MTC-FLI-rt-PCR übereinstimmt. Die Analyse teilte sich daher

in drei Etappen. Als erstes wurden die QSs mittels Artus-rt-PCR amplifiziert. Anhand der Ct-Werte eines jeden QS und der bekannten zugehörigen Anzahl an Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$  wurde eine Standardkurve erstellt. Als zweites wurde ein DNA-Extrakt von *M. bovis* BCG Reinkultur (Standardsuspension) und vier weitere dezimale DNA-Verdünnungen der Standardsuspension mittels Artus-rt-PCR amplifiziert. Diese DNA-Extrakte wurden anhand der Ct-Werte der Standardkurve der QSs quantifiziert bzw. die Anzahl der Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$  eines jeden DNA-Extraktes bestimmt. Als drittes wurden dieselben DNA-Extrakte mittels MTC-FLI-rt-PCR amplifiziert. Die nun schon bekannte Anzahl der Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$  eines jeden DNA-Extraktes wurde anhand der Standardkurve wiederum mit den generierten Ct-Werten korreliert und diese als QSs für eine selbst erstellte Standardkurve für die MTC-FLI-rt-PCR verwendet. Für beide rt-PCRs wurde anhand der Steigung der Standardkurven (Artus-rt-PCR: - 3,3363; (MTC-FLI-rt-PCR: - 3,6163) eine Effizienz von 99 % bzw. 89 % errechnet. Beide rt-PCRs zeigten somit ähnliche Ergebnisse in Bezug auf ihre Kapazität, DNA-Stränge zu verdoppeln. Daher kann von den Ct-Werten der Standardkurven auf eine vergleichbare Anzahl von Genomeinheiten geschlossen werden.

Auf diese Weise wurde für die Standardsuspension von *M. bovis* BCG-Reinkultur von einer optischen Dichte von 0,3 bei 580 nm im DNA-Extrakt eine mittlere Anzahl von  $3 \times 10^5$  Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$  ermittelt. Für dieselbe Standardsuspension wurde mittels Kultivierung eine Anzahl von  $1,1 \times 10^3$  KbE *M. bovis* BCG /  $\mu\text{l}$  gezählt. Die Anzahl von circa 272 Genomeinheiten bzw. Einzelbakterien steht also für eine KbE. Anhand der spektrometrisch gemessenen DNA-Menge wurde dagegen eine Anzahl von circa  $1,2 \times 10^6$  Genomeinheiten bzw. Einzelbakterien /  $\mu\text{l}$  errechnet. Dazu wurde ein errechnetes Gesamtgewicht einer Genomeinheit von etwa 5 fg DNA zu Grunde gelegt. Auf spektrometrischer Basis wurde also eine Anzahl von circa  $1 \times 10^3$  Genomeinheiten bzw. Einzelbakterien als eine KbE ermittelt. Dies bedeutet, dass die Anzahl der in einer KbE enthaltenen Genomeinheiten bzw. Einzelbakterien, ermittelt durch Berechnung der spektrometrisch gemessenen DNA, circa 3,6 Mal höher war als die auf Basis der MTC-FLI-rt-PCR ermittelte Anzahl. Diese Diskrepanz könnte dadurch erklärt werden, dass bei der spektrometrischen Messung die gesamte und nicht die amplifizierbare bzw. amplifizierte DNA gemessen wurde. Es ist daher davon auszugehen, dass bei der ermittelten Anzahl der Genomeinheiten bzw. Einzelbakterien bei der MTC-FLI-rt-PCR nicht jedes verfügbare Molekül amplifiziert wurde.

Die Optimierung der DNA-Extraktion aus Reinkultur von *M. bovis* BCG wurde als Vorversuch bzw. Zwischenziel gewertet. Als dieses Ziel erreicht worden war, wurde mit der Bearbeitung

des Hauptziels, der Verbesserung der DNA-Extraktion aus Gewebe mit nachgewiesener Tuberkulose, begonnen. Die verwendeten Gewebeproben waren größtenteils mit einer sehr geringen Anzahl an Erregern infiziert, und der Erfolg des Protokolls bestand darin, diese nachzuweisen.

#### **5.4 Untersuchungen von Gewebeproben mit nachgewiesener Tuberkulose**

##### **- DNA-Extraktion**

Die Varianten T1 der thermischen Lyse und M2 der mechanischen Lyse (14 % Zunahme an PCR-Produkt bei Reinkultur) wurden für die Bearbeitung bei Gewebeproben von Tieren mit nachgewiesener Tuberkulose von den Vorversuchen übernommen. Da bei den Versuchen mit Reinkultur nach thermischer Lyse (T1) und nach thermo-enzymatischer Lyse (TE4) sehr ähnliche Verbesserung erzielt worden waren, beide zeigten eine Verbesserung um 6 % im Vergleich zur Standardlyse, wurde für die Untersuchungen an Gewebeproben auf Grund der leichteren Durchführbarkeit die Variante T1 der thermischen Lyse neben der Variante M2 der mechanischen Lyse eingesetzt. Bei den Gewebeproben waren die Ergebnisse, gemessen in Ct-Werte, nach mechanischer Lyse (M2) um etwa 9 % besser als die Ergebnisse der Standardlyse. Somit war die mechanische Lyse wie im Vorversuch als effizienter zu bewerten als das vorher angewandte Standardlyse-Protokoll. Die Übertragung des Extraktionsprotokolls der mechanischen Lyse (M2) von Reinkultur von *M. bovis* BCG auf Gewebeproben kann somit als gelungen bezeichnet werden. Im Vergleich zur Standardlyse zeigten die Ergebnisse der thermischen Lyse (T1) um nur 1,1 % bessere Werte. Die im Vergleich zu den Ergebnissen mit Reinkultur geringeren Verbesserungen bei Gewebe können durch möglicherweise störende Einflüsse, ausgehend von entzündlich veränderten Gewebekomponenten sowie auch von der extrahierten Gewebe-DNA, erklärt werden. Im Unterschied zur Extraktion aus der Reinkultur ist bei der Extraktion aus Gewebe nicht nur die bakterielle Zellwand, sondern auch die des infizierten Gewebes zu lysieren. Darüber hinaus enthält dieselbe in unterschiedlichem Umfang diverse Enzyme, Zellwandbestandteile aber auch Nukleinsäure die die Lyse und Extraktion der Ziel DNA negativ beeinflussen können. Die mechanische Lyse (M2) hat sich als einfach, schnell, ungefährlich und routinetauglich erwiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine um circa 9 % höhere Menge an amplifizierbarer DNA freigesetzt worden war als durch andere Lyseprotokolle inklusive der Standardlyse. Es wäre wünschenswert, die Eigenschaften und Fähigkeiten des TissueLyser und des Stomachers, die beiden hier verwendeten Geräte, in einem einzigen Gerät zu kombinieren.

### **- Analyse der rt-PCR Ergebnisse bzw. von Genomeinheiten und K<sub>b</sub>E**

Bei der Kultivierung zeigten sieben (70 %) von zehn Gewebeproben Wachstum von Tuberkulose-Erregern, wobei zwischen 10 und 260 Kolonien / 25 mg eingesetztes Gewebe gezählt wurden. Bei drei Proben (30 %) wurde kein Wachstum festgestellt, obwohl in vorherigen Versuchen, auch bei diesen Proben Wachstum nachgewiesen worden war. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Vermehrungsfähigkeit bei den gefroren gelagerten Proben beeinträchtigt worden sein könnte. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die stark veränderten Teile der Gewebeproben schon bei den vorher durchgeführten diagnostisch Untersuchungen verwendet worden waren und in dieser Arbeit somit nur noch schwach veränderte Gewebeteile untersucht werden konnten, die entsprechend mit einer sehr geringen Anzahl von Bakterien belastet waren. Mit diesen zehn Gewebeproben wurden insgesamt 14 Untersuchungsansätze durchgeführt. Diese Anzahl der Untersuchungen ist mit der Durchführung von mehreren Wiederholungen bei einzelnen Proben zu erklären. Jede der 14 Untersuchungen wurde nach drei Aufarbeitungsmethoden (Standardlyse, T1 und M2) durchgeführt. Daher wurden letztlich insgesamt 42 Proben mittels MTC-FLI-rt-PCR amplifiziert. Die Ergebnisse der mittels MTC-FLI-rt-PCR selbst erstellten Standardkurve wurden für die Berechnung der Anzahl der Genomeinheiten in den DNA-Extrakten aus den Gewebeproben zu Grunde gelegt. Von den 14 Ansätzen, bearbeitet nach Standardlyse, zeigten 85,7 % (12 Ansätze) ein Amplifikationssignal in der MTC-FLI-rt-PCR. Nach thermischer Lyse T1 und mechanischer Lyse M2 wurde hingegen jeweils in 92,8 % der Fälle (13 Ansätze) ein Amplifikationssignal erzielt. Bei einer Probe (10MA1646), die zweimal untersucht wurde, wurde nach der Aufarbeitung mittels Standardlyse in beiden Fällen kein Amplifikationssignal nachgewiesen. Hingegen wurde in jeweils einem Durchgang nach thermischer bzw. mechanischer Lyse ein Amplifikationssignal nachgewiesen. Die Abwesenheit eines Amplifikationssignals nach mechanischer Lyse (erster Durchgang) und die Anwesenheit des Signals nach thermischer Lyse (zweiter Durchgang) werden nach der Erfahrung zur Reproduzierbarkeit der Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit angefertigt wurden, jedoch als Artefakt (Verwechslung von Proben) bewertet. Es wäre zu erwarten gewesen, dass bei beiden Untersuchungen der Probe 10MA1646 nach Aufarbeitungsmethode M2 ein Amplifikationssignal nachweisbar gewesen wäre. Es ist allerdings zu betonen, dass die Amplifikationssignale mit den verbesserten Lyseprotokollen generiert wurden, während bei Verwendung der einfachen Standardlyse kein Signal generiert wurde. Dies zeigt, dass auch in diesen Fall die Effizienz der DNA-Extraktion bei den modifizierten Protokollen höher war als bei dem Standardlyse-Protokoll. Der Nachweis der Infektion durch Kultivierung war also weniger sensitiv (70 % der Pro-

ben) als der Nachweis mittels rt-PCR (85,7 % bzw. 92,8 %) wobei, wie oben erwähnt, in vorausgegangenen Untersuchungen bei 100 % der Proben Wachstum von MTC-Erregern nachweisbar gewesen war. Um die Korrelation zwischen der Anzahl der KbE und der Anzahl der Genomeinheiten in den Gewebeproben darzustellen, wurden beide Parameter bezogen auf die gleiche Menge an Gewebe berechnet und nebeneinander dargestellt (siehe Tabelle 33). Es konnte keine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der KbE und der ermittelten Anzahl an Genomeinheiten pro 25 mg eingesetztes Gewebe festgestellt werden.

Um die Nachweisgrenze bei Gewebeproben zu ermitteln, wurden zwei Gewebeproben, 10MA1646 und 10MA1963, genauer analysiert. Die Nachweisgrenze wurde anhand der Probe 10MA1646, aufgearbeitet mittels mechanischer Lyse (M2), mit 0,4 Genomeinheiten /  $\mu$ l DNA-Extrakt ermittelt. Umgerechnet auf eine Masse von 25 mg eingesetzten Gewebes wurden 3,2 Genomeinheiten mittels MTC-FLI-rt-PCR nachgewiesen, während nach Aufarbeitung mittels einfacher Standardlyse bei dieser Probe keine DNA von MTC-Erregern nachgewiesen werden konnte. Dies bedeutet, dass die Nachweisgrenze bei dieser Gewebeprobe nach Aufarbeitung mittels einfacher Standardlyse bei bis zu 3,2 Genomeinheiten / 25 mg eingesetztem Gewebe lag. Im Vergleich zum Ergebnis der molekularen Diagnostik wurde bei dieser Probe ein negatives Kulturergebnis erzielt, obwohl bei einer vorherigen Untersuchung (siehe oben) Wachstum nachgewiesen worden war, die Probe also als infiziert gelten konnte. Dies zeigt, dass unter den Bedingungen des früheren Extraktionsprotokolls (Standardlyse) diese Probe sowohl in der molekularen als auch in der konventionellen Methode (anhand der Abwesenheit vom bakteriellen Wachstum) als negativ beurteilt worden wäre, obwohl sie infiziert war.

Die Probe 10MA1963 zeigte bei der Kultur eine Anzahl von 10 KbE pro 25 mg eingesetztes Gewebe. Nach Aufarbeitung mittels Standardlyse wurde ein sehr niedriges aber positives Signal bzw. eine Anzahl von 3,2 Genomeinheiten / 25 mg eingesetztes Gewebe ermittelt. Dies stellte sich bei allen 14 durchgeführten Untersuchungen nach Standardlyse als untere Nachweisgrenze heraus. Bei der mechanischen Lyse (M2) derselben Probe wurden allerdings 50 Genomeinheiten / 25 mg eingesetztes Gewebe nachgewiesen. Das heißt, dass auch bei dieser Gewebeprobe die mechanische Lyse (M2) im Vergleich zur Standardlyse ein deutlich besseres Ergebnis erbrachte.

In der Arbeit von TAYLOR et al. (2007) lag die Nachweisgrenze in Genomeinheiten /  $\mu$ l bei Gewebeproben bei einem Minimum von 0,1. Allerdings wurden bei dieser Arbeit keine Angaben zur Menge des eingesetzten Gewebes gemacht. Daher kann kein exakter Vergleich zu der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Nachweisgrenze gezogen werden.

## **5.5 Entwicklung einer genusspezifischen Real-Time-PCR (rt-PCR)**

Granulomatöse Veränderung in Gewebe weisen auf den Verdacht auf Tuberkulose hin. Diese Veränderungen können allerdings auch von anderen Erregern, z. B. Mykobakterien, die nicht zum MTC gehören, hervorgerufen werden (MILIAN-SUAZO et al. 2008). Mit dem Ziel, eine genuspezifische rt-PCR für Mykobakterien zu entwickeln, wurden das 16S rRNA-Gen und das hsp65-Gen als zwei Zielgene ausgewählt. Der Versuch mit dem hsp65-Gen wurde wegen mangelnden Erfolgs (aus unbekanntem Gründen) frühzeitig abgebrochen, und dementsprechend wurde die so genannte 16S-rt-PCR entwickelt.

### **- 16S rRNA-Gen als Zielgen für eine genuspezifische rt-PCR (16S-rt-PCR)**

Die für die 16S-rt-PCR verwendeten Primer und Gen-Sonde wurden so gewählt, dass sie innerhalb des konservierten Teils der 16S-rRNA-Gensequenz (zwischen 496 bp und 1543 bp) lagen (KIRSCHNER und BÖTTGER, 1998; DVORSKÁ et al. 2001). Zusätzlich zu 65 DNA-Extrakten von Vertretern von 43 Spezies des MTC und der NTM wurden DNA-Extrakte von zehn nicht zur Gattung Mykobakterien gehörenden Spezies getestet. Diese letzteren Spezies waren auf Grund der Erfahrungen des Nationalen Veterinärmedizinischen Referenzlabor für Tuberkulose, Institut für molekulare Pathogenese, Friedrich-Loeffler-Institut Standort Jena ausgewählt worden, dass sie durch die konventionelle 16S rRNA-PCR nach KIRSCHNER und BÖTTGER (1998), miterfasst werden. Bei den Ergebnissen wurden Ct-Werte über 39 PCR-Zyklen als negativ beurteilt. Alle 65 DNA-Extrakte der Vertreter von MTC und NTM wurden mit der 16S-rt-PCR erfasst. Die DNA-Extrakte eines Vertreters der Gattung *Gordonia* und eines Vertreters der Gattung *Rhodococcus* erbrachten allerdings ebenfalls positive Ergebnisse mit Ct-Werten niedriger als 39, so dass diese Erreger mit dieser rt-PCR nicht von Mykobakterien unterschieden werden konnten. Diese falsch-positiven (3,7 %) Ergebnisse kommen durch einen besonders engen Verwandtschaftsgrad zwischen Mykobakterien und diesen beiden Bakterien-Gattung zustande (SHINNICK und GOOD, 1994). Der Vergleich der 16S-rt-PCR mit MTC-FLI-rt-PCR und Artus-rt-PCR zeigte, dass die drei rt-PCR-Systeme eine vergleichbare Effizienz und Sensitivität aufwiesen. In der Folge wurden 22 DNA-Extrakte aus tuberkuloseverdächtigen Gewebeproben amplifiziert, die mittels Kultivierung außerhalb dieser Arbeit untersucht worden waren. Auf Grund der fraglichen Ergebnisse von vier DNA-Extrakten, wurde die Anzahl der beurteilbaren Proben auf 18 reduziert. Bei 13 der 18 Proben stimmten die Ergebnisse der 16S-rt-PCR mit den Ergebnissen der Kultivierung überein. Damit lag die Übereinstimmung (positive Korrelation) der 16S-rt-PCR und der Kultur bei 72 % der Proben. Der gleiche Grad

der Übereinstimmung wurde auch zwischen MTC-FLI-rt-PCR und Kultur erzielt. Die Übereinstimmung zwischen beiden rt-PCRs, MTC-FLI-rt-PCR und 16S-rt-PCR, lag bei 83 %. Die zwischen 16S-rt-PCR und Kultur nicht übereinstimmenden fünf Proben reagierten wie im Folgenden beschrieben.

Bei drei Proben (11MA3663, 11MA3668 und 12MA0704) wurden mit der 16S-rt-PCR positive Ergebnisse erzielt, während nach den Ergebnissen der Kultur keine Mykobakterien nachweisbar waren. Die epidemiologischen bzw. pathologisch-anatomischen Daten der drei Tiere gaben jedoch den Hinweis auf eine Infektion, so dass das PCR-Ergebnis als richtig angesehen werden kann. Die Proben 11MA3654 und 11MA3673 erbrachten negative 16S-rt-PCR Ergebnisse, während sie positive Kulturergebnisse erbracht hatten. Nimmt man alle 16S-rt-PCR-positiven Proben zusammen, steigt die Sensitivität dieser rt-PCR somit auf 89 %.

Zu berücksichtigen ist, dass die früheren Untersuchungen der DNA-Extrakte mit der MTC-FLI-rt-PCR unmittelbar nach der DNA-Isolierung durchgeführt wurden. Im Vergleich dazu wurden die Untersuchungen mittels 16S-rt-PCR bei den Proben durchgeführt, nachdem sie bei -20°C gelagert worden waren, was zu den falsch negativen PCR-Ergebnissen beigetragen haben könnte. Als fragliche waren in dieser Arbeit drei Proben bewertet worden, die innerhalb der MTC-FLI-rt-PCR für die beiden dort verwendeten Ziel Gene (hypothetische Helicase und IS *1081*) nach der vorher aufgestellten Definition (Ct-Wert kleiner als 39) diskrepante, also fragliche Ergebnisse lieferten. Eine weitere Probe (11MA3661) hatte in der MTC-FLI-rt-PCR ein eindeutig positives Ergebnis geliefert, in der 16S-rt-PCR jedoch ein negatives Ergebnis. Alle diese als fragliche bewerteten Proben hatten jedoch ein positives Kulturergebnis (MTC) erzielt. Durch Anwendung von Mehrfachbestimmungen für jedes verwendete Zielgen könnte die Anzahl der fraglichen Ergebnisse vermutlich reduziert werden.

Die 16S-rt-PCR zeigte sich somit insgesamt als brauchbare Methode für den Nachweis von Mykobakterien allgemein. Für eine abschließende Beurteilung war die Anzahl der untersuchten Proben jedoch zu gering.

## **5.6 Vergleich der konventionellen Spoligotyping-Methode mit der ArrayStrip™-Format Methode**

Die MTC-FLI-rt-PCR wurde für den Nachweis von MTC-Erregern in Gewebeproben, jedoch nicht für die Differenzierung der Spezies von Erregern dieser Gruppe entwickelt. Diese Differenzierung wird mittels Spoligotyping, einer weltweit angewandten Methode in der Tuberkulose-Diagnostik, durchgeführt (KAMERBEEK et al. 1997; ZANDEN et al. 2002). Sie dient als

wichtiges epidemiologisches Werkzeug für die Identifizierung der in bestimmten Regionen auftretenden Spezies des MTC bzw. der Detektion bestimmter Erregern-Typen (MILIAN-SUAZO et al. 2008).

Die Komplexität der Durchführung der Methode und der benötigte Zeitaufwand stellen eine Herausforderung dar. Je nach individueller Beurteilung kann die Qualität der Auswertung bei der konventionellen Methode subjektiven Variationen unterliegen, das heißt, schwache Signale können nach individueller Beurteilung als positiv oder negativ bewertet werden. Daher ist die Transformation der Methode in ein ArrayStrip™-Format als Verbesserung zu bewerten. Bei der Auswertung der ArrayStrip™-Format Methode werden die Daten schnell und automatisch analysiert. Die Methode ist wesentlich weniger zeitaufwendig als die konventionelle Methode. Bei der ArrayStrip™-Format Methode wird die Intensität der Farbreaktion für jeden einzelnen Spacer einer jeden Probe spektrophotometrisch auf einer Werteskala von 0 bis 1 gemessen, und ein Wert kleiner als 0,3 (Erfahrungswert) wird als Abwesenheit eines Signals bzw. fehlender Spacer gewertet.

Bei der Studie von RÜTTGER et al. (2012) wurden neben humanen Isolaten auch insgesamt 65 MTC-Isolate von Tieren durch die neue ArrayStrip™-Format Methode überprüft. Diese gehörten mehrheitlich zu den Spezies *M. bovis* (56,92 %) und *M. caprae* (33,84 %). Weiterhin wurden fünf *M. pinnipedii*-Isolate und ein *M. microti*-Isolat typisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sensitivität der konventionellen gegenüber der neuen, MicroArray-basierten Methode, überprüft. Anhand der Ergebnisse wurde die Sensitivitätsgrenze der konventionellen Methode bei Reinkultur von *M. bovis* BCG bei einem Wert von  $3 \times 10^3$  Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$  (entsprechend 0,2 ng eingesetzter DNA) ermittelt. Im Vergleich dazu lag die Sensitivitätsgrenze bei der ArrayStrip™-Format Methode bei 30 Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$ . Das bedeutet, dass die ArrayStrip™-Format Methode bei Reinkultur von *M. bovis* BCG im Vergleich zur konventionellen Methode um den Faktor 100 sensitiver war. Sieben DNA-Extrakte von Gewebeproben mit nachgewiesener *M. microti* Typ Lama Infektion, wurden mit beiden Spoligotyping Methoden untersucht. Die DNA-Extrakte stammten aus verschiedene Organen dieses Tieres, so dass die Extrakte in allen Fällen dasselbe Muster zeigen sollten. Die Proben waren in Voruntersuchungen (außerhalb dieser Arbeit) mittels MTC-FLI-rt-PCR als MTC-infiziert bewertet und als kulturell positiv gefunden worden. Bei der konventionellen Methode zeigten fünf der sieben Extrakte ein Signal-Muster (71 %), wobei eine Probe (10MA1640) als schwach positiv bewertet wurde. Alle Proben zeigten dasselbe *M. microti* Muster. Bei einer Probe (10MA1634), die in den Voruntersuchungen ein positives Ergebnis erbracht hatte (nicht Teil dieser Arbeit), wurde jedoch in dieser Arbeit ein negatives Ergebnis erzielt. Ein weiterer Extrakt, 10MA1632, zeigte

ebenfalls ein negatives Ergebnis. Die mit den sieben DNA-Extrakten durchgeführte MTC-FLI-rt-PCR zeigte, dass die Nachweisgrenze der konventionellen Spoligotyping Methode mit einem Ct-Wert von etwa 26,15 korreliert war. Die Sensitivitätsgrenze lag damit bei DNA-Extrakten aus Gewebeproben zwischen  $3 \times 10^2$  und  $3 \times 10^3$  Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$ . Bei der ArrayStrip™-Format Methode zeigten sechs (85 %) der sieben DNA-Extrakte ein positives Ergebnis. Eine Probe (10MA1632) wurde als negativ bewertet. Bei zwei der positiven Proben wurde eine Übereinstimmung des Signal-Musters mit den Einträgen der Datenbank, welche auf den Ergebnissen der konventionellen Spoligotyping Methode basiert, festgestellt. Bei den übrigen fünf Proben konnte zwar jeweils ein *M. microti* anzeigendes Signal-Musters detektiert werden, diese waren jedoch durch Fehlstellen im Spacermuster charakterisiert. Bei der Probe 10MA1634 fehlte der Spacer 24 für die Übereinstimmung des Signal-Musters mit den Einträgen der Datenbank. Bei vier Proben fehlten jeweils drei oder vier Spacer an definierten Positionen (Spacer 7, 23, 24 und 38). Diese Ergebnisse sind schwierig zu bewerten, da die Proben aus einem einzigen Tier stammten. Die Diskrepanz zwischen den vollständigen und den fehlerhaften Signal-Mustern könnte auf die Unterschiede in der vorhandenen DNA-Konzentration der einzelnen Extrakte zurückzuführen sein. Während die Proben mit den vollständigen Signal-Mustern in der MTC-FLI-rt-PCR Ct-Werte zwischen 17,19 und 20,40 aufwiesen, waren bei den Proben mit den fehlerhaften Mustern Ct-Werte von 21,24 bis 26,15 zu erzielen. Das heißt, dass die Proben mit höherer MTC-DNA-Konzentration vollständige Muster erbrachten, während bei Proben mit geringerem MTC-DNA-Gehalt fehlerhafte Muster entstanden. Unpublizierten Untersuchungen außer dieser Arbeit zeigte, dass bei der Erhöhung des MTC-DNA-Volumens bzw. Konzentration einer Probe bei der Spoligotyping Methode deutlich die Nachweisgrenze beeinflussen kann.

Eine andere Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, dass bei einigen der 43 Spacer-Oligonukleotide (in diesen Fall Spacer 7, 23, 24 und 38) für die Formatierung der konventionellen in die ArrayStrip™-Format Methode molekulare Veränderungen eingefügt wurden.

Zur Bestimmung der Sensitivitätsgrenze wurden die Ergebnisse für die Probe 10MA1640 herangezogen. Diese erbrachte mittels konventioneller Methode ein schwach positives und mittels ArrayStrip™-Format Methode ein deutliches positives Ergebnis. Anhand des Ct-Wertes der MTC-FLI-rt-PCR für diese Probe (Ct-Wert von 26,15) ergab sich eine Sensitivitätsgrenze der neuer Spoligotyping-Methode bei DNA-Extrakten aus Gewebeproben bei  $3 \times 10^2$  und  $3 \times 10^1$  Genomeinheiten /  $\mu\text{l}$ . Damit war die Sensitivität der ArrayStrip™-Format Methode bei DNA-Extrakten aus Gewebeproben 10-fach höher als bei der konventionellen Methode.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die ArrayStrip™-Format Methode eine deutlich sensitivere, schnellere, einfachere, mit niedrigeren Kosten belastete Methode ist als die konventionelle Spoligotyping Methode. Außerdem ermöglicht die automatische Auswertung Ergebnisse von größerer Objektivität. Für eine weitergehende Evaluierung sollte die Anzahl der untersuchten Proben insbesondere mit dem seltener nachgewiesenen MTC-Spezies (*M. pinnipedii* und *M. microti*) erhöht werden.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, an verschiedenen Ansatzpunkten der molekularen Tuberkulose-Diagnostik Verbesserung zu erarbeiten. Bei allen drei bearbeiteten Themen, der Verbesserung der DNA-Extraktion, der Entwicklung einer genusspezifischen rt-PCR für Mykobakterien und den Untersuchungen der Sensitivität der neuen auf ArrayStrip™-Format basierten Spoligotyping Methode, wurden die gesetzten Ziele erreicht und ein Beitrag zur Verbesserung der molekularen Diagnostik der Tuberkulose geleistet.

## 6 Zusammenfassung

Johanna Nieter

Beiträge zur Verbesserung molekularbiologischer Untersuchungsmethoden zum Nachweis von Mykobakterien-Infektionen in tierischem Gewebe

Aus dem Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im NOVEMBER 2015

92 Seiten, 19 Abbildungen, 48 Tabellen, 122 Literaturzitate, 1 Anhang mit 6 Tabellen

Schlüsselwörter: DNA-Extraktion, Mykobakterien, *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTC), Molekulare Diagnostik, Real-Time PCR, Spoligotyping, Microarray.

Die Rindertuberkulose ist eine chronische Erkrankung, die von *Mycobacterium (M.) bovis* und *M. caprae*, Mitgliedern des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTC), ausgelöst wird. Tuberkulose-Erregern werden sowohl mittels kultureller als auch molekulare Untersuchungsmethoden nachgewiesen. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Sensitivität des DNA-Nachweises von Tuberkulose-Erregern zu steigern.

Dafür wurden drei Fragestellung im Bereich der molekularen Mykobakterien-Diagnostik bearbeitet. I) Zur Verbesserung der Lyse der mykobakteriellen Zellwand als Voraussetzung für eine Zunahme der Freisetzung von DNA wurden im Vergleich zu einer standardisierten DNA-Isolierungsmethode vier verschiedene Lyseprotokolle (thermische, enzymatische, thermo-enzymatische und mechanische Lyse) entwickelt und mit *M. bovis* BCG durchgeführt. Die Verbesserung wurde anhand der *cycle threshold* (Ct)-Werte einer MTC-spezifischen Real-Time (rt) Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geprüft. Zwei Lyseprotokolle (thermische und mechanische Lyse) wurden bei zehn Gewebeproben (Lymphknoten, Leber und Lunge) von zehn Tieren (acht Rinder, ein Lama und ein Luchs) mit nachgewiesener Tuberkulose angewendet. II) Ausserdem, wurde eine rt-PCR mit dem 16S rRNA Gen als Zielgen (16S-rt-PCR) für den direkten Nachweis von Erregern der Gattung *Mycobacterium* im Gewebe entwickelt. III) Ein neu entwickelter Spoligotyping-Microarray wurde mit der konventionellen Spoligotyping-Methode verglichen, um die neue Methode in Bezug die Sensitivität des Nachweises und des

diskriminatorischen Potenzials direkt bei infizierten Gewebeprobe n zu analysieren. Bei der konventionellen Methode erfolgt die Hybridisierung des PCR-Produktes auf einer Nylon Membran, auf der spezifische Oligonukleotide fixiert sind. Bei der Microarray-Methode sind diese auf einem Microarray-Chip fixiert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen (I) zur Lyse der Zellwand bei *M. bovis* BCG zeigten, dass bei der mechanischen Lyse eine Zunahme um 14 % und bei der thermischen Lyse eine Zunahme an PCR-Produkt von 6 % im Vergleich zur Standardlyse erbrachte. Bei beiden Lyseprotokollen wurde eine statistische Signifikanz von  $\alpha = 1 \%$  (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zur Standardlyse errechnet. Bei den tuberkulösen Gewebeprobe n wurde bei der mechanischen Lyse eine durchschnittliche Zunahme an PCR-Produkt um circa 9 % im Vergleich zur Standardlyse erzielt. Dieser Unterschied war jedoch auf Grund der geringen Probeanzahl nicht statistisch signifikant. II) Bei der Untersuchung von 43 Mykobakterien-Spezies, sechs Mitgliedern des MTC (unter anderen *M. bovis* BCG) und 37 Non Tuberculous Mycobacteria (NTM) Spezies, konnten alle mit der entwickelten Real-Time PCR (16S-rt-PCR) nachgewiesen werden. DNA-Extrakte von acht nicht zur Gattung *Mycobacterium* gehörenden Spezies wurden mit der 16S-rt-PCR nicht erfasst. Ein Erreger der Gattung *Gordonia* und einer der Gattung *Rhodococcus* wurden auf Grund ihres engen Verwandtschaftsgrades jedoch ebenfalls mit der 16S-rt-PCR detektiert. Die oben erwähnten mittels MTC-spezifischer rt-PCR (Zielgen IS 1081) als infiziert identifizierten zehn Gewebeprobe n, wurden mittels 16S-rt-PCR untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass beiden rt-PCR Systeme eine vergleichbare Sensitivität aufwiesen. III) Bei dem Vergleich zwischen den Spoligotyping-Methoden zeigte sich die neue Methode um einen Faktor von 100 bei der *M. bovis* BCG-Reinkultur und um einen Faktor von 10 bei DNA-Extrakten aus tuberkulösen Gewebeprobe n sensitiver als die konventionelle Methode.

Im Rahmen dieser Arbeit hat sich der Einsatz der mechanischen Lyse für die Verbesserung der Freisetzung von mykobakterieller DNA als routinefähig erwiesen. Die entwickelte 16S-rt-PCR erwies sich als brauchbare Methode für den Nachweis von Erregern der Gattung *Mycobacterium*. Die Microarray-Methode stellte sich wesentlich einfacher, sensitiver und schneller dar als die konventionelle Methode.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle drei Ansätze dieser Arbeit einen Beitrag zur Verbesserung der molekularen Labordiagnostik der Tuberkulose leisten.

## 7 Summary

Johanna Nieter

Contributions to the improvement of molecular diagnostic methods for the detection of mycobacterial infections in animal tissue

Institute of Bacteriology and Mycology of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in NOVEMBER 2015

92 Pages, 19 Pictures, 48 Tables, 122 References, 1 Appendix with 6 Tables

Keywords: DNA-Extraction, mycobacteria, *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), molecular diagnosis, Real Time PCR, Spoligotyping, Microarray.

Bovine tuberculosis is a chronic disease, that results from infection of *Mycobacterium (M.) bovis* and *M. caprae*, members of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), respectively. The laboratory diagnosis of bovine tuberculosis is possible with culture as well as considerate fast molecular methods. The aim of this study was to improve the sensitivity of DNA detection of tuberculosis-causing pathogens.

Therefore, three different issues were addressed in the complex molecular procedure targeted. I) four different lytic protocols (thermal, enzymatic, thermo-enzymatic and mechanical lysis) were developed and compared to a standardized DNA isolation protocol that was performed on pure culture of *Mycobacterium (M.) bovis* BCG in order to improve the mycobacterial cell wall lysis leading to an increase of DNA release. The efficiencies of the lysis protocols were assessed by the resulting cycle threshold (Ct) values of a MTC-specific real time (rt) Polymerase Chain Reaction (PCR). Two lysis protocols (thermal and mechanical) were selected to further testing of ten tuberculosis-infected tissue samples (lymph nodes, liver and lungs) from ten animals (eight cattle, one lama and one lynx). II) In addition, a real time PCR using the 16S rRNA gene as target sequence was developed, which is also suitable to detect pathogens of Genus *Mycobacterium* on tissue samples. III) A comparison of a newly developed microarray and the conventional spoligotyping method was realised, to analyse the applicability of the microarray in relation of the sensitivity of the method and to analyse discriminatory potential directly from

infected tissue samples. During the conventional spoligotyping method, the PCR product is hybridized with specific oligonucleotides, fixed on a nylon membrane. Using the newly developed method these oligonucleotides are fixed on a microarray-chip.

The results I) of the mycobacterial cell wall lysis experiment with pure culture of *M. bovis* BCG showed an increase of 14 % by using mechanical lysis and an increase by 6 % of the PCR product by using thermal lysis compared to the standard protocol. Using the mechanical lysis as well as the thermal lysis a statistically significant ( $\alpha = 1\%$  (Mann-Whitney-Test)) improvement compared to the standard lysis was achieved. Mechanical lysis was performed on tuberculous tissue samples and the results of the lysis were improved by 9 % compared to the standard lysis. However, the difference between mechanical and standard lysis was not statistically significant due the small sample number. II) Forty-three different mycobacterial species, six members of MTC (among them *M. bovis* BCG) and 37 Non Tuberculous Mycobacteria (NTM), were detected using the newly developed real time PCR (16S-rt-PCR). Eight non-mycobacterial species were not detected using this rt-PCR, whereas one of genus *Rhodococcus* and one of genus *Gordonia* were detected by the 16S-rt-PCR due to their close genetic similarity to the genus *Mycobacterium*. The ten tuberculosis-infected tissue samples (see above) testing positive using a MTC-specific real time rt-PCR (target gene IS *1081*) were subjected to the 16S-rt-PCR. Both rt-PCR systems showed a comparable sensitivity. III) By comparing the two spoligotyping-methods, the ArrayStrip™-format method was more sensitive than the conventional method by a factor of 100 applied to pure culture and by a factor of 10 when applied to DNA extracts from infected tissue samples.

In conclusion, the mechanical lysis proved to be a practical method to liberate mycobacterial DNA. The newly developed rt-PCR was suitable to detect members of the genus *Mycobacterium*. The spoligotyping ArrayStrip™-format method appeared to be substantially easier to perform, more sensitive, and less time-consuming than the conventional method.

The three methods described were suitable to improve the molecular laboratory diagnosis of tuberculosis.

## 8 Literaturverzeichnis

Anon. Richtlinie 64/432/EWG des Rates vom 26. Juni 1964 zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen.

Anon. Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz – TierGesG). Tiergesundheitsgesetz vom 22. Mai 2013. Tiergesundheitsgesetz vom 22. Mai 2013 (BGBl. I S. 1324), das zuletzt durch Artikel 8 Absatz 12 des Gesetzes vom 3. Dezember 2015 (BGBl. I S. 2178) geändert worden ist.

Anon. Verordnung zur Änderung der Tuberkulose-Verordnung und sonstiger tierseuchenrechtlicher Verordnungen (RindTbVuaÄndV k.a.Abk.). RindTbVuaÄndV k.a.Abk vom 17. Juni 2009 (BGBl. I S. 1337 Nr. 32).

Anon. Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes (Tuberkulose-Verordnung). Tuberkulose-Verordnung vom 16. Juni 1972. Tuberkulose-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Juli 2013 (BGBl. I S. 2445, 2014 I S. 47), die durch Artikel 16 der Verordnung vom 17. April 2014 (BGBl. I S. 388) geändert worden ist.

Amaro A, Duarte E, Amado A, Ferronha H, Botelho A. Comparison of three DNA extraction for *Mycobacterium bovis*, *Mycobakterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. Lett Appl Microbiol. 2008; 47: 8-11.

Aranaz A, Liébana E, Gómez-Mampaso E, Galán JC, Cousins D, Ortega A, Blásquez J, Baquero F, Mateos A, Suárez G, Domínguez L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from goats in Spain. Int J Syst Bacteriol. 1999;49:1263-1273.

Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2003;53:1785-1789.

Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. Int J Tuberc Lung Dis 2004;8:924-937.

Ausführungshinweise zur Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes. 14. April 2010. Nach Abstimmung mit den für das Veterinärwesen zuständigen obersten Landesbehörden werden zur Ausführung der Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes in der Fassung der Bekanntmachung vom 13. März 1997 (BGBl. I S. 462), geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 17. Juni 2009 (BGBl. I S. 1337)

Becker-Follmann J und Baas D. PCR- Eine Methode, drei Schritte. Biospektrum. 2004;1:86-90.

Biet F, Boschioli ML, Thorel MF, Guilloteau LA. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). Vet. Res. 2005;36: 411-436.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PNAS. 2002;99:3684-3689.

Campo RE und Campo CE. *Mycobacterium kansasii* Disease in Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. Clin Infect Dis. 1997;24:1233-1238.

Casal M und Casal M del M. Multicenter study of incidence of *Mycobacterium marinum* in humans in Spain. Int J Tuberc Lung Dis. 2001;5:197-199.

Castellanos E, Aranaz A, Gould KA, Linedale R, Stevenson K, Alvarez J, Dominguez L, de Juan L, Hinds J, Bull TJ. Discovery of Stable and Variable Differences in the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Type I, II, and III Genomes by Pan-Genome Microarray Analysis. Appl Environ Microbiol. 2009;75:676-86.

Collins DM und Stephens DM. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. FEMS Microbiol Lett. 1991;83:11-16.

Collins CH. The bovine tubercle bacillus. Brit J Biomed Sci. 2000;57:234-240.

Collins DM. Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. Vet Microbiol. 2011;151: 2-7.

Cooper JF, Lichtenstein MJ, Graham BS, Schaffner W. *Mycobacterium chelonae*: A Cause of Nodular Skin Lesions with a Proclivity for Renal Transplant Recipients. Am J Med. 1989;86:173-177.

Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodríguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2003;53:1305-1314.

Daniels MJ, Henderson D, Greig A, Stevenson K, Sharp JM, Hutchings MR. The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. Epidemiol Infec. 2003;130:553-559.

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG), Desinfektionsmittelliste der DVG, Liste der nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für die Tierhaltung (Handelspräparate). 2012. (zitiert vom 13.12.2012): [http://www.desinfektion-dvg.de/fileadmin/FG\\_Desinfektion/Dokumente/Listen/Tierhaltungsbereich/DVG-Desinfektionsmittelliste\\_TH.pdf](http://www.desinfektion-dvg.de/fileadmin/FG_Desinfektion/Dokumente/Listen/Tierhaltungsbereich/DVG-Desinfektionsmittelliste_TH.pdf) >

Desinfektionsmittelliste der RKI, Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren. Stand vom 31.5.2007. Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz. 2007;50:1335-1356.

DIN 58943-3 Dezember 1996. Taschenbuch 222. Medizinische Mikrobiologie und Immunologie Diagnostische Verfahren. Beuth. 4. Aufl. 2004.

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ), Prokaryotic Nomenclature up-to-date. 2013. (zitiert vom 4.1.2013): [http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial\\_nomenclature](http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature)>

Dvorská L, Bartos M, Martin G, Erler W, Pavlík I. Strategies for differentiation, identification and typing of medically important species of mycobacteria by molecular methods. *Vet Med-Czech*. 2001;46:309-328.

Ehlers K. Records of the hooded seal, *Cystophora cristata* Erxl, and others animals at Bremerhaven zoo. *Int Zoo Yearbook*. 1965;5:148-149.

Embden van JDA, Gorkom van T, Kremer K, Jansen R, Zeijst van der BAM, Schouls LM. Genetic Variation and Evolutionary Origin of the Direct Repeat Locus of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Bacteria. *J Bacteriol*. 2000;182:2393-2401.

Fenton MJ und Vermeulen MW. Immunopathology of Tuberculosis: Roles of Macrophages and Monocytes. *Infect Immun*. 1996;64:683-690.

Ghosh J, Larsson P, Singh B, Pettersson BM, Islam NM, Sarkar SN, Dasgupta S, Kirsebom LA. Sporulation in mycobacteria. *PNAS Early Edition*. 2009 Apr 17;1-6. doi: 10.1073/pnas.0904104106.

Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott A, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ jr, Winthrop K. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Non-tuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175: 367-416.

Hay RJ. *Mycobacterium chelonae* – a growing problem in soft tissue infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2009;22:99-101.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real Time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-994.

Henrich M, Moser I, Weiss A, Reinacher M. Multiple Granulomas in Three Squirrel Monkeys (*Saimiri sciureus*) Caused by *Mycobacterium microti*. *J Comp Path*. 2007;137:245-248.

Hermand AV und Steele JC Jr. The new mycobacterial species-emerging or newly distinguished pathogens. *Clin Lab Med*. 2004;24:651-690.

Hillebrand T, Bendzko P, Peters L-E. Universelles Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus extrem geringen Mengen sowie sehr stark Verunreinigten unterschiedlichsten Ausgangsmaterialien. Europäische Patentamt. EP 0765335B1. 1999;1-20.

Hoffmann B, Depner K, Schiermeier H, Beer M. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. J Virol Methods. 2006;136:200-209.

Horstkotte MA, Sobottka I, Schewe CK, Schäfer P, Laufs R, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. *Mycobacterium microti* Llama-Type Infection Presenting as Pulmonary Tuberculosis in a Human Immunodeficiency Virus-Positive Patient. J Clin Microbiol. 2001;39:406-407.

Holzappel B und Wickert L. Methoden und Anwendungsgebiete : Die quantitative Real-Time-PCR (q-RT-PCR). Biol Unserer Zeit. 2007;37:120-126.

Hoy JF, Ralston KVI, Hopfer RL, Bodey GP. *Mycobacterium fortuitum* Bacteremia in Patients with Cancer and Long-Term Venous Catheters. Am J Med. 1987;83:213-217.

Imperiale B, Zumárraga M, Gioffre A, Giulio di B, Cataldi A, Morcillo N. Disease caused by non-tuberculous mycobacteria: diagnostic procedures and treatment evaluation in the North of Buenos Aires Province. Revista Argentina de Microbiología. 2012;44:3-9.

Javed MT, Aranaz A, Juan de L, Bezos J, Romero B, Álvarez J, Lozano C, Mateos A, Domínguez L. Improvement of spoligotyping with additional spacer sequences for characterization of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* isolates from Spain. Tuberculosis. 2007;87:437-445.

Karlsdorf B, Strassburg A, Greinert U, Lotz J, Lange C. Klinik und Diagnose der Tuberkulose. Pneumonie. 2008;62:284-294.

Karlson AG und Lessel EF. *Mycobacterium bovis* nom. nov. Int J Syst Bacteriol. 1970;20:273-282.

Kartmann B, Stengler S, Niederweis M. Porins of the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 1999;181:6543-6546.

Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differentiation of Phylogenetically related Slowly Growing Mycobacteria by Their *gyrB* Sequences. J Clin Microbiol. 2000;38:301-308.

Käser M, Ruf MT, Hauser J, Marsollier L, Pluschke G. Optimized Method for Preparation of DNA from Pathogenic and Environmental Mycobacteria. Appl Environ Microbiol. 2008;75:414-418.

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, Embden van J. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. J Clin Microbiol. 1997;35:907-914.

Kay MK, Linke L, Triantis J, Salman MD, Larsen RS. Evaluation of DNA Extraction Techniques for Detecting *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms in Asian Elephant Trunk Wash Samples. J Clin Microbiol. 2011;49:618-623.

Kirschner P und Böttger EC. Species Identification of Mycobacteria Using rDNA Sequencing. In: Parish T und Stoker NG. Methods in Molecular Biology. Totowa: Humana; 1998. p.349-361.

Kleinschmidt H. Die Tilgung der Rindertuberkulose in ihrer Auswirkung auf die Erkrankung des Menschen an Tuberkulose. Der Landarzt. 1964; 40:319-322.

Koch R. Die Ätiologie der Tuberkulose. 1882. (zitiert vom 27.8.2012): <http://edoc.rki.de/documents/rk/508-428-445/PDF/428-445.pdf>

Köhler H, Hoffmann B, Moser I, Möbius P. Entwicklung eines qReal-Time-PCR-Systems zum Nachweis von Mykobakterien des *Mykobakterium-tuberculosis*-komplexes (MTC) in Organproben von Rindern. 4. Arbeitstagung des nationales Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabor für Paratuberkulose. Mykobakterieninfektionen. 2009 Mai 13-14; Jena, Deutschland.

Kubica T, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* Caused One-Third of Human *M. bovis*-Associated Tuberculosis Cases Reported in Germany between 1999 and 2001. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3070-3077.

Kumar M, Sharma S, Ram AB, Khan IA. Efficient mycobacterial DNA extraction from clinical samples for early diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010;14:847-851.

Kunze ZM, Portaels F, McFadden JJ. Biologically Distinct Subtypes of *Mycobacterium avium* Differ in Possession of Insertion Sequence IS901. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2366-2372.

Lamont EA, Bannantine JP, Armien A, Ariyakumar DS, Sreevatsan S. Identification and Characterization of a Spore-Like Morphotype in Chronically Starved *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* Cultures. *PloS One.* 2012 Jan 24;7:1-9.

Lewis FMT, Marsh BJ, Reyn von CF. Fish Tank exposure and Cutaneous Infections Due to *Mycobacterium marinum*: Tuberculin Skin Testing, Treatment, and Prevention. *Clin Infect Dis.* 2003;37:390-397.

Liebana E, Aranz A, Mateos A, Vilafranca M, Gomez-Mampaso E, Tercero JC, Alemany J, Suarez G, Domingo M, Dominguez L. Simple and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms in Bovine Tissue Sample by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33:33-36.

Mahillon J und Chandler M. Insertion Sequences. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62:725-774.

Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. 2012 (zitiert vom 15.01.2013): 1-17, <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/aces-online/>.

Mijs W, Haas de P, Rossau R, Laan TVD, Rigouts L, Portaels F, Soolingen van D. 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.* 2002;52:1505-1518.

Milian-Suazo F, Harris Beth, Díaz CA, Torres CR, Stuber T, Ojeda GA, Loredó AM, Soria MP, Payeur JB. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: Usefulness in international trade. *Prev Vet Med.* 2008;87:261-271.

Morr, H. Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland. *Der Internist.* 2003;44:1356-1362.

Moser I, Prodinger WM, Hotzel H, Greenwald R, Lyashchenko KP, Bakker D, Gomis D, Seidler T, Ellenberger C, Hetzel U, Wuennemann K, Moisson P. *Mycobacterium pinnipedii*: Transmission from Sea American sea lion (*Otaria byronia*) and Malayan tapirs (*Tapirus indicus*). *Vet Microbiol.* 2008;127:399-406.

Moser I. Tuberkulose beim Rind- eine neue alte Gefahr? Aktueller Stand. *RFL.* 2009;2:68-72.

Moser I. Tuberkulose der Rinder – Bovine tuberculosis. *Tiergesundheitsjahresbericht, Friedrich-Loeffler-Institut;* 2010:93-96.

Moser I. Tuberkulose bei Nutz- und Wildtieren und ihre Bedeutung in Deutschland. In: Robert Koch Institut. Robert Koch, was wüsste der Entdecker der Tuberkulose-Bakterien heute? *Epidemiologisches Bulletin.* 19 März 2012;12.

Murray JF. Die historische Entwicklung der Tuberkulose seit Robert Kochs Entdeckung des Tuberkelbazillus 1882. *Pneumologie.* 2007;61:764-770.

Niemann S, Richter E, Dalügge-Tamm H, Schlesinger H, Graupner D, Königstein B, Gurath G, Greinert U, Rüscher-Gerdes S. Two Cases of *Mycobacterium microti* – Derived Tuberculosis in HIV-Negative Immunocompetent Patients. *Emerg Infect Dis.* 2000;6:539-542.

Okwumabua O, Shull E, O'Connor m, Moua TV, Danz T, Strelow K. Comparison of three methods for extraction of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* DNA for polymerase chain reaction from broth-based culture systems. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22:67-69.

Parashar D, Chauhan DS, Scharma VD, Katoch VM. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. *Indian J Med Res.* 2006;124:385-398.

Pattyn SR, Antoine-Portaels F, Kageruka P, Gigase P. *Mycobacterium microti* infection in a zoo-llama: *Lama vicugna* (Molina). Acta Zoologica Et Pathologica Antverpiensa. 1970;51:17-24.

Peters M, Müller C, Rüsç-Gerdes S, Seidel C, Göbel U, Pohle HD, Ruf B. Isolation of Atypical Mycobacteria from Tap Water in Hospitals and Homes: In this a Possible Source of Disseminated MAC Infection in AIDS Patients? J Infect. 1995;31:39-44.

Pfaffl MW. Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. Bio Spektrum. 2004;1:92-95.

Poroca DR, Lima AS, Lima JFA, da Cruz HLA, Montenegro RA, de Melo FL, Schindler HC, Montenegro LML. Diferenciação de micobactérias por PCR multiplex. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42:716-722.

Pozniak A und Bull T. Recently Recognized Mycobacteria of Clinical Significance. J Infect. 1999;38:157-161.

Prodinger W, Allerberger F, Schönbauer M, Glawischnig W. Molekulare Epidemiologie von Infektionen durch *Mycobacterium bovis* subspecies *caprae* in Westösterreich. 2. Arbeitstagung des nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabor für Paratuberkulose. Mykobakterieninfektionen. 2003 Mai 13-14; Jena, Deutschland.

Prodinger WM, Brandstätter A, Naumann L, Pacciarini M, Kubica T, Boschioli ML, Aranaz A, Nagy G, Cvetnic Z, Ocepek M, Skrypnik A, Erler W, Niemann S, Pavlik I, Moser I. Characterization of *Mycobacterium caprae* Isolates from Europe by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Genotyping. J Clin Microbiol. 2005;43:4984-4992.

Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Mycobacterial infections in domestic and wild animals. Rev sci tech Off int Epiz. 2001;20:21-54.

Reischl U, Pulz M, Ehret W, Wolf H. PCR-Based Detection of Mycobacteria in Sputum Samples Using a Simple and Reliable DNA Extraction Protocol. BioTechniques. 1994;17:844-845.

Richter E, Weizenegger M, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of Genotype MTBC Assay for Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. J Clin Microbiol. 2003;41: 2672-2675.

Robert Koch Institut. Zum Welttuberkulosestag 2002. Epidemiologisches Bulletin. 15 März 2002;11.

Robert Koch Institut. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2009. 2011;1-89.

Robert Koch Institut. RKI-Ratgeber für Ärzte. Epidemiologisches Bulletin. 14 Januar 2013;2.

Rocha VCM, Correa SHR, Oliveira EMD, Rodriguez CAR, Fedullo JD, Matrone M, Setzer A, Ikuta CY, Vejarano MP, Figueiredo SM, Ferreira Neto JS. Tuberculosis determined by *Mycobacterium bovis* in captive waterbucks (*Kobus ellipsiprymnus*) in Sao Paulo, Brazil. Braz J Microbiol. 2011;42:726-728.

Rodriguez CAR, Zumárraga MJ, Oliveira EM de D, Cataldi AA, Romano MI, Otto HH, Bonafé VL, Ferreira Neto JS. Caracterizacao molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do estado de Sao Paulo Brasil, utilizando a técnica de Spoligotyping. Arq Inst Biol. 2004;71: 277-282.

Rodriguez JG, Mejia GA, Portillo P del, Patarroyo ME, Murillo LA. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. Microbiology. 1995;141:2131-2138.

Rolle M und Mayr A. Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Rolle M. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Auf. Stuttgart: Enke; 2002. p. 555-565.

Rüscher-Gerdes S und Hillemann D. Moderne mykobakteriologische Labordiagnostik. Pneumologie. 2008;62:533-540.

Rüscher-Gerdes S und Richter E. Mikrobiologie und Labordiagnostik bei Tuberkulose. Der Pneumologe. 2006;4: 273-276.

Rüttger A, Nieter J, Skrypnyk A, Engelmann I, Ziegler A, Moser I, Monecke S, Ehrlich R, Sachse K. Rapid spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using a microarray system with automatic data processing and assignment. J Clin Microbiol. 2012;50:2492-2495.

Schmaltz R. Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rinde. Berl Tierarztl. 1906;42:759-763.

Schmidbauer S-M, Wohlsein P, Kirpal G, Beineke A, Müller H, Moser I, Baumgartner W. Outbreak of *Mycobacterium bovis* infektion in a wild animal park. Vet Rec. 2007;161:304-307.

Schoepf K, Prodinger WM, Glawischnig W, Hofer E, Revilla-Fernandez S, Hofrichter J, Fritz J, Köfer J, Schmoll F. A Two-Years`Survey on the Prevalence of Tuberculosis Caused by *Mycobacterium caprae* in Red Deer (*Cervus elaphus*) in the Tyrol, Austria. ISRN Veterinary Science. 2012 Aug 8;1-7.

Schwedler H. Zur Entwicklung der Tuberkulosebekämpfung und Tilgung der Rindertuberkulose in de DDR. Z. Erkrank. Atm. -Org. 1982;158:110-116.

Shinnick TM und Good RC. Mycobacterial Taxonomy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994;13:884-901.

Soolingen van D, Hermans PWM, Haas PEW de, Embden van JDA. Insertion Element IS1081-Associated Restriction Fragment Length Polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Species: a Reliable Tool for Recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. J Clin Microbiol. 1992;30:1772-1777.

Soolingen van D, Hoogenboezem T, Haas PEW de, Hermans PWM, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaels F, Top J, Schouls LM, Embden van JDA. A Novel Pathogenic Taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, Canetti: Characterization of an Exceptional Isolate from Africa. Int J Syst Bacteriol. 1997;47:1236-1245.

Staub A, Itin P, Bregenzer T, Bock HA. *Mycobacterium marinum*: Ein seltener Fall von sporotrichoider Haut- und Gelenksinfektion bei einem nierentransplantierten Patienten. Schweiz Med Forum. 2003;34:797-800.

Swai HF, Mugusi FM, Mbwambo JK. Sputum smear negative pulmonary tuberculosis: sensitivity and specificity of diagnostic algorithm. BMC Research Notes. 2011;4:475-485.

Sweeney FP, Courtenay O, Hibberd V, Hewinson RG, Reilly LA, Gaze WH, Wellington MH. Environmental Monitoring of *Mycobacterium bovis* in Badger Feces and badger Sett Soil by real Time PCR, as Confirmed by Immunofluorescence, Immunocapture, and Cultivation. Appl Environ Microbiol. 2007;73:7471-7473.

Sommerville W, Thibert L, Schwartzman K, Behr MA. Extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA: a Question of Containment. J Clin Microbiol. 2005;43:2996-2997.

Taillard C, Greub G, Weber R, Pfyffer GE, Bodmer T, Zimmerli S, Frei R, Bassetti S, Rohner P, Piffaretti J-C, Bernasconi E, Bille J, Telenti A, Prod'homme G. Clinical Implications of *Mycobacterium kansasii* Species Heterogeneity: Swiss National Survey. J Clin Microbiol. 2003;41:1240-1244.

Talbot EA, Williams DL, Frothingham R. PCR Identification of *Mycobacterium bovis* BCG. J Clin Microbiol. 1997;35:566-569.

Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. BMC Vet Res. 2007;3:1-11.

Thorel M-F, Krichevsky M, Lévy-Frèbault VV. 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. 1990;40:254-260.

Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCR targeting two different genomic segments. *J Virol Methods*. 2007;140:115-123.

Tyagi S und Kramer FR. Molecular Beacons: Probest hat Fluoresce upon Hybridization. *Nat Biotechnol*. 1996;14:303-308.

Zanden van der AGM, Kremer K, Schouls LM, Caimi K, Cataldi A, Hulleman A, Nagelkerke NJD, Soolingen van D. Improvement of Differentiation and Interpretability of Spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by Introduction of New Spacer Oligonucleotides. *J Clin Microbiol*. 2002;40:4628-4639.

Ziegler R, Just H-M, Castell S, Diel R, Gastmeier P, Haas W, Hauer B, Loytved G, Mielke M, Moser I, Nienhaus A, Richter E, Rüden H, Rüschi-Gerdes S, Schaberg T, Wischniewski N, Lodenkemper R. Infektionsprävention bei Tuberkulose – Empfehlung des DZK. *Pneumologie*. 2012;66:269-282.

Wang L, Slayden RA, Barry CE, Liu J. Cell Wall Structure of a Mutant of *Mycobacterium smegmatis* Detective in the Biosynthesis of Mycolic Acids. *J Biol Chem*. 2000;275:7224-7229.

Wanner RM und Springer B. Die Tuberkulose, vom Altertum in die Neuzeit. *Schweiz Ärztsztg*. 2008;89:1602-1605.

Warren R, Koch de M, Engelke E, Myburgh R, Pittius van NG, Victor T, Helden van P. Safe *Mycobacterium tuberculosis* DNA Extraction Method That Does Not Compromise Integrity. *J Clin Microbiol*. 2006;44:254-256.

Wiedmann C, Schulz HL, Weber BHF. Quantitative Real-Time PCR – Eine Frage der Normalisierung. *Biospektrum*. 2004;1:99-102.

## 9 Anhang

**Tabelle A1.** Reaktionsansatz und Temperaturprofil für die konventionelle MTC-PCR

Volume je Probe	Zusammensetzung	Funktion	Temperaturprofil	
2 µl	10x Puffer	Aktivierung Taq	96°C	1 Min
0,1 µl	jb21neu (100 pmol/µl)	30 Zyklen		
0,1 µl	jb22neu (100 pmol/µl)	Denaturierung	96°C	15 Sek
0,2 µl	Taq Polymerase	Annealing	67°C	60 Sek
4 µl	Q Solution	Extension	72°C	60 Sek
0,4 µl	dNTP-Mix (10 mM)			
0,4 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Final Extension	72°C	5 Min
11,8 µl	Wasser			
1 µl	DNA-Probe			
20 µl	Gesamtvolumen			

**Tabelle A2.** Reaktionsansatz und Temperaturprofil für die IS 901 / IS 1245 Duplex MAC-PCR

Volume je Probe	Zusammensetzung	Funktion	Temperaturprofil	
2 µl	10x Puffer	Aktivierung Taq	96°C	1 Min
0,1 µl	IS 901-F	30 Zyklen		
0,1 µl	IS 901-R	Denaturierung	96°C	15 Sek
0,1 µl	IS 1245-F	Annealing	60°C	60 Sek
0,1 µl	IS 1245-R	Extension	72°C	60 Sek
0,2 µl	Taq Polymerase			
4 µl	Q Solution	Final Extension	72°C	5 Min
0,4 µl	dNTP-Mix (10 mM)			
0,4 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)			
11,6 µl	Wasser			
1 µl	DNA-Probe			
20 µl	Gesamtvolumen			

**Tabelle A3.** Verwendete Bakterien-Spezies für das „Alignment“ des 16S r-RNA-Gens

<b>Spezies</b>	<b>Spezies</b>
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>
<i>Mycobacterium abcessus</i>	<i>Mycobacterium acapulcensis</i>
<i>Mycobacterium aemonae</i>	<i>Mycobacterium africanum</i>
<i>Mycobacterium agri</i>	<i>Mycobacterium aichiense</i>
<i>Mycobacterium alsiensis</i>	<i>Mycobacterium alvei</i>
<i>Mycobacterium angelicum</i>	<i>Mycobacterium anthracenicum</i>
<i>Mycobacterium aromaticivorans</i>	<i>Mycobacterium arosiense</i>
<i>Mycobacterium arupense</i>	<i>Mycobacterium asiaticum</i>
<i>Mycobacterium aubagnense</i>	<i>Mycobacterium aurum</i>
<i>Mycobacterium austro africanum</i>	<i>Mycobacterium bacteremicum</i>
<i>Mycobacterium barrassiae</i>	<i>Mycobacterium bohemicum</i>
<i>Mycobacterium bolletii</i>	<i>Mycobacterium bonickei</i>
<i>Mycobacterium botniense</i>	<i>Mycobacterium bouchedurhonense</i>
<i>Mycobacterium branderi</i>	<i>Mycobacterium brasiliensis</i>
<i>Mycobacterium brisbanense</i>	<i>Mycobacterium brumae</i>
<i>Mycobacterium buckleii</i>	<i>Mycobacterium canariasense</i>
<i>Mycobacterium caprae</i>	<i>Mycobacterium celatum</i>
<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium chesapeakei</i>
<i>Mycobacterium hassiacum</i>	<i>Mycobacterium heckeshornense</i>
<i>Mycobacterium heidelbergense</i>	<i>Mycobacterium hiberniae</i>
<i>Mycobacterium hodleri</i>	<i>Mycobacterium holsaticum</i>
<i>Mycobacterium immunogenum</i>	<i>Mycobacterium insubricum</i>
<i>Mycobacterium interjectum</i>	<i>Mycobacterium intermedium</i>
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Mycobacterium isoniacini</i>
<i>Mycobacterium jacuzzi</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>
<i>Mycobacterium komossense</i>	<i>Mycobacterium kubicae</i>
<i>Mycobacterium kumamotoense</i>	<i>Mycobacterium kuopiense</i>
<i>Mycobacterium kyorinense</i>	<i>Mycobacterium lacticola</i>
<i>Mycobacterium lacus</i>	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
<i>Mycobacterium lepromatosis</i>	<i>Mycobacterium llutzerense</i>
<i>Mycobacterium madagascariense</i>	<i>Mycobacterium mageritense</i>
<i>Mycobacterium malmoense</i>	<i>Mycobacterium manitobense</i>
<i>Mycobacterium mantenii</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>
<i>Mycobacterium marseillense</i>	<i>Mycobacterium microti</i>
<i>Mycobacterium monacense</i>	<i>Mycobacterium montefiorensis</i>
<i>Mycobacterium moriokaense</i>	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>
<i>Mycobacterium murale</i>	<i>Mycobacterium nebraskense</i>
<i>Mycobacterium neglectum</i>	<i>Mycobacterium neoaurum</i>
<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	<i>Mycobacterium noviomagense</i>
<i>Mycobacterium novocastrense</i>	<i>Mycobacterium obuense</i>
<i>Mycobacterium pallens</i>	<i>Mycobacterium palustre</i>
<i>Mycobacterium paraffinicum</i>	<i>Mycobacterium parafortuitum</i>
<i>Mycobacterium parascrofulaceum</i>	<i>Mycobacterium parmense</i>
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	<i>Mycobacterium petroleiphilum</i>
<i>Mycobacterium phlei</i>	<i>Mycobacterium phocaicum</i>
<i>Mycobacterium pinnipedii</i>	<i>Mycobacterium porcinum</i>
<i>Mycobacterium poriferae</i>	<i>Mycobacterium pseudoshottsii</i>
<i>Mycobacterium psychrotolerant</i>	<i>Mycobacterium pulveris</i>
<i>Mycobacterium pyrenivorans</i>	<i>Mycobacterium ratisbonense</i>

**Vortsetzung Tabelle A3.** Verwendete Bakterien-Spezies für das „Alignment“ des 16S r-RNA-Gens

<b>Spezies</b>	<b>Spezies</b>
<i>Mycobacterium riyadhense</i>	<i>Mycobacterium rufum</i>
<i>Mycobacterium rutilum</i>	<i>Mycobacterium sacrum</i>
<i>Mycobacterium salmoniphilum</i>	<i>Mycobacterium saskatchewanense</i>
<i>Mycobacterium savoniae</i>	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
<i>Mycobacterium senegalense</i>	<i>Mycobacterium senuense</i>
<i>Mycobacterium seoulense</i>	<i>Mycobacterium septicum</i>
<i>Mycobacterium setense</i>	<i>Mycobacterium sherrisii</i>
<i>Mycobacterium shimoidei</i>	<i>Mycobacterium shinjukuense</i>
<i>Mycobacterium shottsii</i>	<i>Mycobacterium simiae</i>
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Mycobacterium stomatepiae</i>
<i>Mycobacterium sydneyiensis</i>	<i>Mycobacterium szulgai</i>
<i>Mycobacterium terrae</i>	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>
<i>Mycobacterium tilburgii</i>	<i>Mycobacterium tokaiense</i>
<i>Mycobacterium triplex</i>	<i>Mycobacterium triviaacclae</i>
<i>Mycobacterium tusciae</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	<i>Mycobacterium vaccae</i>
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	<i>Mycobacterium vulneris</i>
<i>Mycobacterium xenopi</i>	<i>Mycobacterium wolinskyi</i>
<i>Actinomyces</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
<i>Brucella abortus</i>	<i>Corynebacterium</i> sp.
<i>Gordonia</i> sp.	<i>Nocardia</i> sp.
<i>Rhodococcus</i> sp.	<i>Saccharopolyspora hirsuta</i>
<i>Salmonella Enteritidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

**Tabelle A4.** Verwendete Bakterien-Spezies für das „Alignment“ des hsp65-Gens

<b>Spezies</b>	<b>Spezies</b>
<i>Mycobacterium africanum</i>	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>Mycobacterium canettii</i>	<i>Mycobacterium caprae</i>
<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>Mycobacterium kansasii</i>	<i>Mycobacterium malmoense</i>
<i>Mycobacterium microti</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>
<i>Mycobacterium porcinum</i>	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Mycobacterium vaccae</i>	<i>Gordonia bronchialis</i>
<i>Gordonia rubripertincta</i>	<i>Gordonia sputi</i>
<i>Gordonia terrae</i>	<i>Rhodococcus</i> sp.

**Tabelle A5.** Spoligotyping ArrayStrip™-Format Methode: Messwerte (Signalintensität) der Standardsuspension und Verdünnungen von DNA-Extrakten aus *M. bovis* BCG Reinkultur

Spacer	<i>M. bovis</i> BCG Verdünnungen (Messwerte)				
	Unverdünnt	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	0,80	0,78	0,79	0,77	0,79
2	0,81	0,80	0,80	0,77	0,79
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,80	0,77	0,77	0,68	0,72
5	0,82	0,81	0,79	0,74	0,76
6	0,77	0,73	0,72	0,64	0,70
7	0,82	0,82	0,81	0,82	0,82
8	0,84	0,83	0,82	0,82	0,82
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,81	0,80	0,78	0,77	0,76
11	0,84	0,83	0,82	0,83	0,83
12	0,83	0,82	0,81	0,80	0,81
13	0,81	0,80	0,80	0,76	0,78
14	0,83	0,83	0,82	0,81	0,81
15	0,83	0,83	0,82	0,80	0,71
16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,83	0,83	0,81	0,82	0,81
18	0,82	0,82	0,81	0,80	0,80
19	0,83	0,82	0,82	0,80	0,81
20	0,67	0,57	0,57	0,46	0,53
21	0,81	0,80	0,78	0,71	0,75
22	0,83	0,83	0,82	0,82	0,82
23	0,84	0,83	0,83	0,83	0,83
24	0,83	0,83	0,82	0,82	0,81
25	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
26	0,84	0,83	0,82	0,82	0,83
27	0,77	0,76	0,76	0,73	0,73
28	0,83	0,82	0,81	0,81	0,82
29	0,83	0,82	0,82	0,82	0,83
30	0,54	0,54	0,53	0,52	0,53
31	0,83	0,83	0,82	0,82	0,82
32	0,80	0,78	0,77	0,70	0,73
33	0,83	0,84	0,83	0,82	0,81
34	0,83	0,83	0,82	0,83	0,83
35	0,81	0,80	0,80	0,80	0,77
36	0,83	0,83	0,82	0,82	0,78
37	0,84	0,83	0,83	0,83	0,83
38	0,84	0,83	0,82	0,82	0,83
39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

**Tabelle A6.** Spoligotyping ArrayStrip™-Format Methode: Messwerte (Signalintensität) der DNA-Extrakte aus Gewebeproben von Tieren mit nachgewiesener Infektion mit *M. microti*

Spacer	Gewebeproben 10MA (Messwerte: Signalintensität)						
	1633	1634	1635	1636	1637	1639	1640
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,01	0,00	0,04	0,02	0,00	0,00
4	0,57	0,72	0,53	0,84	0,78	0,38	0,59
5	0,79	0,82	0,75	0,86	0,84	0,70	0,77
6	0,61	0,68	0,59	0,80	0,75	0,51	0,64
7	0,15	0,30	0,05	0,79	0,44	0,10	0,14
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	0,41	0,49	0,09	0,85	0,74	0,19	0,30
24	0,08	0,28	0,05	0,81	0,59	0,05	0,11
25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00
29	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
37	0,79	0,84	0,79	0,86	0,84	0,72	0,81
38	0,23	0,31	0,05	0,82	0,68	0,10	0,16
39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
41	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
42	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

## Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben:

Frau Professor Dr. Monika Krüger für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herr Professor Dr. Christian Menge, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Arbeit am FLI Standort Jena, Institut für Molekulare Pathogenese, anzufertigen.

Weiterhin bedanke ich mich auch bei Frau Dr. Heike Köhler für das Vertrauen und die Möglichkeit, den praktischen Teil meiner Arbeit in der Arbeitsgruppe Mykobakterien durchzuführen.

Frau Dr. Irmgard Moser für die Erlaubnis meine praktischen Arbeiten im Referenzlabor für Tuberkulose durchzuführen, für das kontinuierliche Heranführen an das faszinierendem Forschungsthema Mykobakterien sowie für ihre Geduld in den zahlreichen Korrektur-Stunden.

Weiter danke ich allen Mitarbeitern und Freunden der Arbeitsgruppe 220 Mykobakterien, unter anderem Uta Brommer, Sandy Werner, Danny Michel, Gesine Kauth und Lukas Uhlig, für die Geduld, für das Anlernen von Methoden, das angenehme Arbeitsklima und die gebildeten Freundschaften.

Ohne die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe 210, insbesondere Herr Dr. Konrad Sachse und Frau Dr. Anke Rüttger, wäre ein großer Teil meiner Arbeit nicht möglich gewesen. Daher an dieser Stelle ein Dankeschön für die ständige Hilfsbereitschaft, die angenehme Atmosphäre und die fachliche Unterstützung.

Ein großes Dankeschön hat Frau Annemarie Rohde für die Literaturhilfe sowie auch für die konstante Hilfsbereitschaft verdient. Herr Diller und Herr Maginot verdienen ebenfalls ein riesiges Lob für die Hilfe bei der Anfertigung der statistischen Kommentare und die schönen Fotos, die in dieser Doktorarbeit verwendet werden konnten.

Neben allen Doktoranden und Diplomanden geht ein besonderer Dank an Anneka Soschinka, Beate Appelt, Markus Vaas, Katharina Kerner, Steffi Wilsky, Katharina Sobotta, Carola Ostermann und Gudrun Walter für die Motivation und Hilfestellung während dieser Arbeit.

Frau Dr. Annerose Fischer, Herr Dr. Hans Koll und Herr Roland Halblaub von der Besamungsstation Baden-Württemberg, Herr Dr. Hans-Petter Nohner vom Besamungsverein Neustadt an der Aisch und Herr Dr. Hugo Hauschulte von der Embryotransfereinrichtung Rinder-Union-West für die Kooperation und Freundschaft.

Weiter möchte ich mich beim Förderverein für Biotechnologieforschung e.V. für die Gewährung eines Stipendiums sowie auch bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG Nummer TA668/1-1) für die Bereitstellung der Sachmittel bedanken.

Zum Schluss möchte ich noch dem gesamten Team der Kleintierpraxis Dr. Anke Horn für das Verständnis danken, dass ich während meiner Praxistätigkeit Zeit und Aufmerksamkeit für die Fertigstellung meiner Arbeit benötigt habe.

Meinen Eltern, Beate und Detlef Nieter und meinen Schwestern Anna und Kerstin, die mich trotz weiter Entfernungen kräftig unterstützt haben. Noch mal Danke für die Aufmunterung von Anfang an bis zum Ende dieser Arbeit sowie das Verständnis für die seltenen Familientreffen.

Familie Richter aus Watzdorf, die mir auf diesen langen Weg ständig geholfen und mich ermutigt hat. Ein gewaltiges Dankeschön hat hauptsächlich Toni Richter verdient, der blind an meine Ziele geglaubt hat und in jeder Situation neben mir stand. Ohne ihn wäre vieles schwerer und manches unmöglich gewesen.