

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. M. Frosch

Molekulare Differenzierung von Mykobakterien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Stefan Dostal
aus Regensburg

Würzburg, Dezember 2001

Referent: Prof. Dr. med. M. Frosch

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. J. Hacker

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2002

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	6
2.1	Material	6
2.1.1	Laboreinrichtungen und Geräte	6
2.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	6
2.1.3	Enzyme	7
2.1.4	Synthetische Oligonukleotide	7
2.1.5	Nährmedien	8
2.1.6	Bakterienstämme	9
2.1.7	Software	9
2.2	Methoden	13
2.2.1	Konventionelle Methoden	13
2.2.1.1	Anzucht von Mykobakterien	13
2.2.1.2	Ziehl-Neelsen-Färbung	13
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	13
2.2.2.1	DNA-Extraktion, 16S-rDNA- und ITS-PCR und Sequenzierung	13
2.2.2.1.1	DNA-Extraktion	13
2.2.2.1.2	5'-16S-rDNA PCR	14
2.2.2.1.3	„Internal Transcribed Spacer“ Region (ITS) PCR	14
2.2.2.1.4	Subklonierung von PCR-Produkten	15
2.2.2.1.5	Automatisierte Sequenzierung mit ABI Prism™ 377 Sequencer	16
2.2.2.2	<i>GyraseB</i> -Gen-, Insertionselement-PCRs und RFLP-Analysen	17
2.2.2.2.1	<i>M. tuberculosis</i> complex <i>gyrB</i> PCR	17
2.2.2.2.2	<i>M. tuberculosis gyrB</i> PCR	17
2.2.2.2.3	<i>M. tuberculosis</i> complex <i>gyrB</i> PCR <i>RsaI</i> und <i>SacII</i> Verdau	18
2.2.2.2.4	<i>M. bovis</i> BCG RD1 multiplex PCR	18
2.2.2.2.5	<i>M. ulcerans</i> IS 2404 PCR	19
2.2.2.2.6	<i>M. avium</i> ssp <i>paratuberculosis</i> IS 900 PCR	19
2.2.3	Auswertung der Sequenzdaten	20
2.2.4	GenBank-Sequenzevaluierung	20
2.2.5	Datensammlung für das RIDOM-Projekt	21
2.2.6	Literaturrecherche	22

3	Ergebnisse	23
3.1	Vergleichende Sequenzanalyse	23
3.1.1	Analyse der 5'-16S-rDNA	23
3.1.2	Analyse der „Internal Transcribed Spacer“ Region (ITS)	27
3.1.3	GenBank-Sequenzevaluierung	29
3.2	GyraseB-Gen-, Insertionselement-PCRs und RFLP-Analysen	30
3.2.1	<i>M. tuberculosis</i> complex <i>gyrB</i> PCR	30
3.2.2	<i>M. tuberculosis</i> <i>gyrB</i> PCR	31
3.2.3	<i>M. tuberculosis</i> complex <i>gyrB</i> PCR <i>RsaI</i> und <i>SacII</i> Verdau	32
3.2.4	<i>M. bovis</i> BCG RD1 multiplex PCR	32
3.2.5	<i>M. ulcerans</i> IS 2404 PCR	34
3.2.6	<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> IS 900 PCR	34
4	Diskussion	36
5	Zusammenfassung	51
6	Literaturverzeichnis	52
7	Abkürzungsverzeichnis	60
8	Index	62

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabellen

Tab. 2.1. Untersuchte Isolate, 5'-16S-rDNA und ITS-Sequenz.....	10
Tab. 3.1. Spezies des Genus <i>Mycobacterium</i> mit Thermotoleranz	26
Tab. 4.1. Gruppen von Taxa mit identischer 5'-16S-rDNA-Sequenz	49

Abbildungen

Abb. 1.1. Von der unbekannt Probe zum identifizierten Erreger mittels vergleichender 5'-16S-rDNA- oder ITS-Sequenzanalyse.....	4
Abb. 3.1. 5'-16S rDNA-Phylogenie des Genus <i>Mycobacterium</i>	24
Abb. 3.2. Sekundärstruktur der Helix 18 der ribosomalen 16S-Untereinheit.....	24
Abb. 3.3. „Internal Transcribed Spacer“ Region (ITS) - Phylogenie.....	28
Abb. 3.4. GenBank-Sequenzevaluierung (1989 – 2000).....	29
Abb. 3.5. <i>M. tuberculosis</i> complex <i>gyrB</i> PCR.....	31
Abb. 3.6. <i>M. tuberculosis</i> <i>gyrB</i> PCR.....	32
Abb. 3.7. <i>M. bovis</i> BCG RD1 multiplex PCR.....	33
Abb. 3.8. <i>M. ulcerans</i> IS 2404 PCR	34
Abb. 3.9. <i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> IS 900 PCR	35
Abb. 4.1 Algorithmus zur molekularen Differenzierung des Genus <i>Mycobacterium</i>	44
Abb. 4.2. Algorithmus zur molekularen Differenzierung von <i>M. bovis</i>	46
Abb. 4.3. Algorithmus zur molekularen Differenzierung von MOTT und <i>M. leprae</i>	46

1 Einleitung

Am 24. März 1882 gab Robert Koch vor der Berliner Physiologischen Gesellschaft bekannt, den Erreger der „Schwindsucht“ entdeckt zu haben (27). Koch konnte durch Färbung, Züchtung in Reinkultur und Tierversuch den „*Tuberclebacillus*“ als infektiöses Agens der Tuberkulose nachweisen. Vierzehn Jahre später beschrieben Karl Lehmann, Begründer des Würzburger hygienischen Instituts, und sein Assistent Rudolf Neumann erstmalig die Bakteriengattung *Mycobacterium* (29).

Mykobakterien sind säurefeste aerobe Stäbchenbakterien, die mikroskopisch nur mit besonderen Färbeverfahren, wie der Ziehl-Neelsen-Färbung, darstellbar sind. Die Anzüchtung der Stäbchenbakterien gelingt auf Spezialnährböden – wie dem Löwenstein-Jensen-Medium. Bis zum Erscheinen makroskopisch sichtbarer Kolonien können wenige Tage, aber auch mehrere Wochen vergehen. Bei Wachstum innerhalb von 7 Tagen spricht man von schnellwachsenden, ab einer Wachstumsdauer von mehr als einer Woche von langsamwachsenden Mykobakterien – „Fast“ und „Slow Growers“ (33).

Während 1896 erst vier verschiedene Mykobakterien-Arten bekannt waren, hat sich die Zahl der Spezies und Subspezies des Genus im Laufe des 20. Jahrhunderts stark erhöht und umfasst im Jahr 2000 89 verschiedene Arten und Unterarten. Davon klinisch relevant sind ungefähr 40 Spezies mit obligat oder fakultativ pathogenen Eigenschaften (12).

Eine besondere Stellung nimmt dabei *M. tuberculosis* ein. Nach den Erhebungen der WHO aus dem Jahr 1998 erkrankten in den Entwicklungsländern im Durchschnitt jährlich über 200 von 100 000 Menschen neu an Tuberkulose (68). Im Vergleich dazu liegt die Inzidenz in den wohlhabenden Ländern nur bei 23 Neuerkrankungen bezogen auf 100 000 Einwohner – in der Bundesrepublik Deutschland sind es sogar nur etwa 14. Bei einer weltweiten Neuerkrankungsrate von 8 Millionen sterben jedes Jahr ungefähr 2 Millionen an dieser Erkrankung, die damit auch die häufigste mikrobielle Todesursache darstellt. Trotz prophylaktischer Maßnahmen wie der BCG-Impfung und trotz der Möglichkeiten, die eine effektive Chemotherapie bietet, muss global mit einer stärkeren Ausbreitung der Tuberkulose gerechnet werden. Dies steht in Zusammenhang

sowohl mit der AIDS-Pandemie im südlichen Afrika und in Teilen Asiens, als auch mit dem verstärkten Auftreten therapieresistenter Stämme. Weitere Ursachen stellen zunehmende Verelendung breiter Bevölkerungsschichten, als auch Flucht und Vertreibung dar (18).

Tuberkulose können auch die dem *M. tuberculosis* nah verwandten Spezies *M. africanum*, *M. bovis* und *M. microti* verursachen. Sie alle werden zum *M. tuberculosis* complex zusammengefasst, denn eine phänotypische Differenzierung dieser vier Arten ist häufig nicht oder nur sehr schwer möglich.

Der Erreger des Aussatzes, *M. leprae*, ist die einzige Spezies des Genus, die nicht kultiviert werden kann. Beschränkt v.a. auf den indischen Subkontinent, Teilen Asiens und Lateinamerikas, trat die Lepra 1998 noch mit einer Häufigkeit von 7 bis 83 pro 100 000 Einwohner auf (69). Die Prävalenz lag 1996 bei einer Million und ist rückläufig. Nach Infektion kommt es meist zu schweren Verstümmelungen der Gliedmaßen, chronischen Geschwürbildungen und Anästhesien.

Neben den oben genannten Gruppen finden in den letzten Dekaden die „atypischen“ Mykobakterien oder „Mycobacteria other than tubercle bacilli (MOTT)“ stärkere Beachtung. Die teilweise fakultativ pathogenen Spezies verursachen immer häufiger oft schwer therapierbare - da therapierefraktäre - nosokomiale Infektionen v.a. in den Industrienationen. Wichtige Vertreter der MOTT sind z.B. die Spezies und Subspezies des *M. avium-intracellulare* complex (MAC) . Die Organismen des MAC sind ubiquitär in der Natur anzutreffen und verursachen Infektionen bei Vögeln (*M. avium*), Rind und Schwein (*M. intracellulare*). Bei immunkompromittierten Patienten können sie generalisierte Krankheitsbilder hervorrufen. Mit wachsender Ausbreitung der Immunschwächekrankheit AIDS war folglich auch eine Zunahme an MAC-Infektionen zu beobachten (13).

Das Gefährdungspotential mykobakterieller Erkrankungen für Gesellschaft und den Einzelnen macht deutlich, dass es einer schnellen und exakten Diagnosestellung bedarf. Wegen der großen Anzahl an Taxa kann gerade nur die Diagnose auf Spezies- und Subspeziesebene eine gezielte und effektive Therapie gewährleisten. Klassische phänotypische Testverfahren, die das biochemische und physiologische Verhalten eines Mikroorganismus beurteilen, besit-

zen häufig aber eine zu geringe diskriminatorische Schärfe.

Ein weiterer Nachteil dieser Verfahren ist, dass sie erst nach vorhergehender Subkultivierung des Keims zur Anwendung kommen können. Dieser Prozess dauert bei Mykobakterien mitunter Wochen. Spezies, deren Anzucht nicht möglich ist, wie z.B. *M. leprae*, können auf diese Weise gar nicht nachgewiesen werden.

Aus den genannten Gründen sind molekularbiologische Wege der Diagnostik effektiver, da sie eine schnellere und oft genauere Identifizierung mikrobieller Erreger ermöglichen (14). Eines dieser Verfahren ist die vergleichende Sequenzanalyse. Bei dieser Technik wird ein genau festgelegter Sequenzbereich des Genoms des unbekanntes Mikroorganismus sequenziert und mit einer ausreichend großen Anzahl von Referenzsequenzen verglichen. Die Referenzsequenz, die die größte Übereinstimmung mit der untersuchten Sequenz zeigt, weist auf das zutreffende Taxon hin.

Als Zielregion der Sequenzanalyse eignen sich besonders gut die ribosomale 16S „Desoxiribonucleid Acid“ (16S-rDNA) und die „Internal Transcribed Spacer“ Region (ITS), die sich zwischen der 16S- und 23S-ribosomalen DNA befindet. Beide Abschnitte besitzen Bereiche unterschiedlicher Variabilität, die spezifische Diagnosen auf allen taxonomischen Ebenen der Mikroorganismen zulassen. Aufgrund dieser Überlegungen wurde an der Universität Würzburg am Institut für Hygiene und Mikrobiologie gemeinsam mit dem Lehrstuhl für Informatik II ein Projekt zur „Ribosomal Differentiation of Medical Micro-organisms“ (RIDOM) initiiert. Kernstück des Projekts ist eine Datenbank für ribosomale DNA-Sequenzen medizinisch relevanter Mikroorganismen.

Abb. 1.1 illustriert den Ablauf der molekularen Diagnostik anhand der vergleichenden partiellen rDNA-Sequenzanalyse. Der unbekanntes Erreger wird isoliert, die DNA extrahiert und ein genau definierter rDNA-Sequenzabschnitt vervielfältigt. Das Produkt der „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) ist Substrat für die automatisierte *Taq-Cycle-Sequenzierung*, mit der die Sequenz des Abschnitts bestimmt wird. Diese kann nun über eine „World Wide Web“ (WWW)-Schnittstelle mit den Datensätzen der RIDOM-Datenbank verglichen werden.

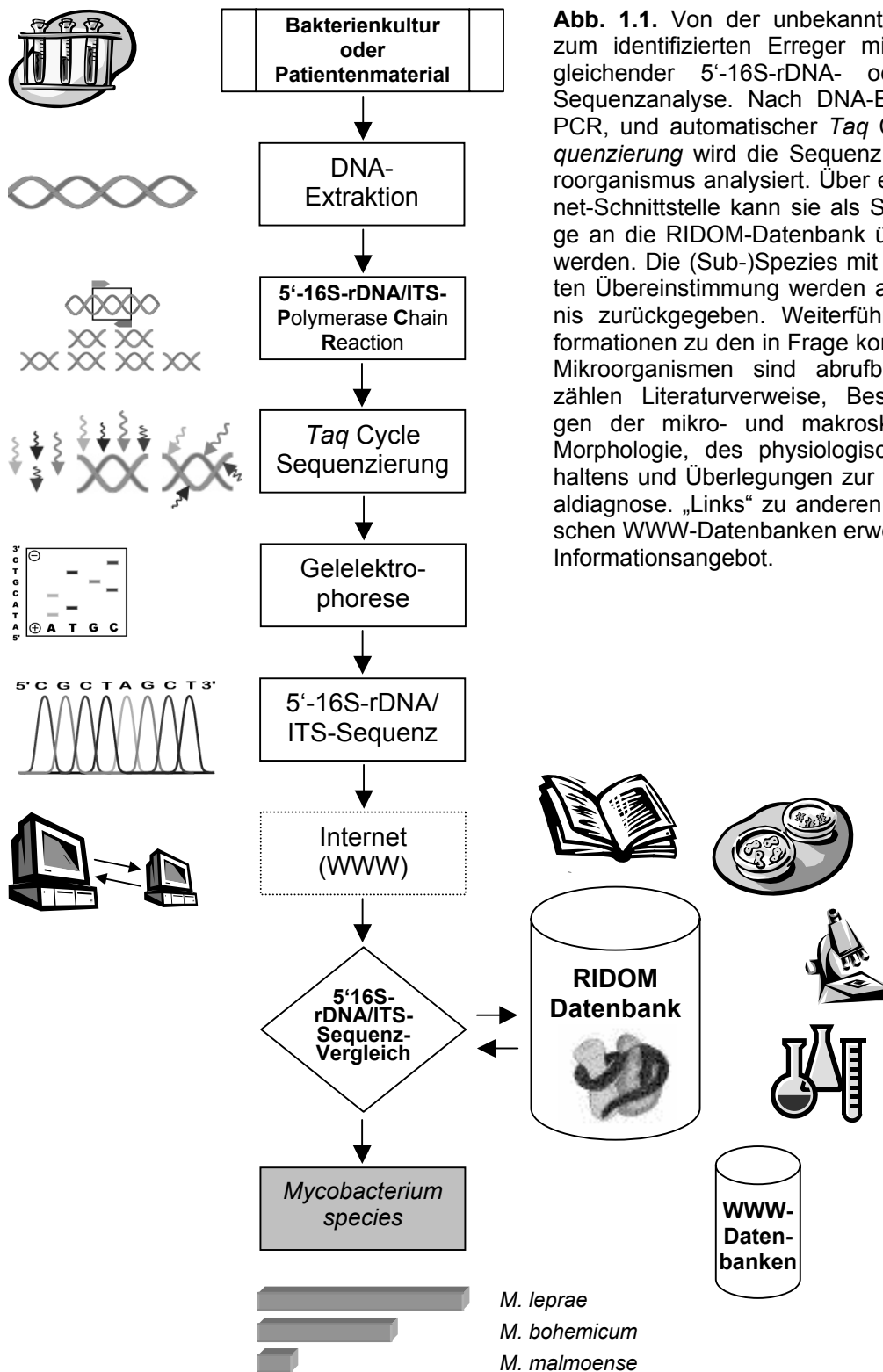


Abb. 1.1. Von der unbekanntem Probe zum identifizierten Erreger mittels vergleichender 5'-16S-rDNA- oder ITS-Sequenzanalyse. Nach DNA-Extraktion, PCR, und automatischer Taq Cycle Sequenzierung wird die Sequenz des Mikroorganismus analysiert. Über eine Internet-Schnittstelle kann sie als Suchanfrage an die RIDOM-Datenbank übermittelt werden. Die (Sub-)Spezies mit der größten Übereinstimmung werden als Ergebnis zurückgegeben. Weiterführende Informationen zu den in Frage kommenden Mikroorganismen sind abrufbar. Dazu zählen Literaturverweise, Beschreibungen der mikro- und makroskopischen Morphologie, des physiologischen Verhaltens und Überlegungen zur Differentialdiagnose. „Links“ zu anderen medizinischen WWW-Datenbanken erweitern das Informationsangebot.

Die Datenbank präsentiert als Ergebnis des Sequenzvergleichs das Taxon, das die größte Übereinstimmung mit den Sequenzdaten des unbekanntes Erregers aufweist. Ferner hat der Benutzer Zugriff auf weiterführende speziesspezifische Informationen und erhält „Links“ zu anderen medizinischen Internet-Datenbanken. Ein unbekannter Keim lässt sich nach diesem Procedere in zwei Tagen identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit einer vollständigen molekularen Differenzierung des Genus *Mycobacterium* untersucht. Zur Anwendung kam die vergleichende Sequenzanalyse der 5'-16S-rDNA und ITS. Die ribosomalen Genomabschnitte wurden sequenziert und zusammen mit taxonspezifischen Informationen in die RIDOM-Datenbank eingetragen.

In denjenigen Fällen, in denen die zur Unterscheidung notwendige Sequenzdiversität zwischen den einzelnen Spezies nicht gegeben war, kamen andere molekularbiologische Verfahren zur Anwendung. Dies waren „Polymerase Chain Reactions“ (PCRs) des *GyraseB*-Genes (*gyrB*), Analysen von „Restriction Fragment Length Polymorphisms“ (RFLP) der *gyrB* und PCRs von genomischen Fragmenten bzw. Insertionselementen im Genom von *M. bovis*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* und *M. ulcerans*.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laboreinrichtungen und Geräte

ABI Prism 377 Sequenzer: PE Applied Biosystems ABI, Weiterstadt

Dialux 22: Leitz, Wetzlar

Gene Amp PCR System 2400: Perkin Elmer, Vaterstetten

Orthomat: Leitz, Wetzlar

Polaroid SprintScan: Polaroid, Cambridge, USA

PrismPette® (8 Kanal-Pipette für ABI-Sequenziersysteme 377): Carl Roth, Karlsruhe

PrismStrip® (8 Gelloader-Spitzen am Strip): Carl Roth, Karlsruhe

Soligor C, AF Makro 100mm MC F 3,5: Soligor, Leinfelden-Echterdingen

Spiegelreflexkamera Nikon F-601: Nikon

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

1 kb DNA Ladder: Gibco BRL, Eggenstein

Agarose: Carl Roth, Karlsruhe

Alconox: Aldrich, Steinheim

Ammoniumacetat: Merck, Darmstadt

Ampuwa: Fresenius, Bad Homburg

APS (Ammoniumpersulfat) 10%: Aldrich-Chemie, Steinheim

Aqua dest.: Fresenius, Bad Homburg

BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready-Reaction Kit: PE Applied Biosystems ABI, Weiterstadt

Blue Dextran / EDTA: PE Applied Biosystems ABI, Weiterstadt

BorSäure: Merck, Darmstadt

Centri-Sep Spin Columns: PE Applied Biosystems ABI, Weiterstadt

Chloroform: Merck, Darmstadt

CTAB (N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium-bromid): Merck, Darmstadt

DMSO (Dimethylsulfoxid): Sigma, Deisenhofen

dNTP (Desoxynukleotide): Pharmacia, Freiburg

EDTA (Ethylendiamintetraacetat): Sigma, Deisenhofen

Ethanol 100%: Fresenius, Bad Homburg

Ethidiumbromid: Biometra, Göttingen

Factor X Strips: Becton Dickinson, San Jose, Calif., USA

Formamid Ultra: Sigma, Deisenhofen

Harnstoff: Bio-Rad, Hercules, Calif., USA

HPLC-Wasser: Merck, Darmstadt

Isoamylalkohol: Merck, Darmstadt

Isopropanol (2-Propanol): Merck, Darmstadt

Jetsorb Gel Extraction Kit: Genomed, Bad Oeynhausen

Kanamycin: Sigma, Deisenhofen

Karbol-Fuchsin-Lösung: Merck, Darmstadt

Kodak Film EPY 64T (Kunstlichtfilm 19 ASA): Kodak, Stuttgart

M13r (355-370 Plasmid)
5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'
(221-205 Plasmid)

PCR-Produkt: 170 bp + Länge des Plasmid-Insert

***M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR**

MTUBf 5' - TCG GAC GCG TAT GCG ATA TC - 3'
(574-593 *gyrB*)

MTUBr 5' - ACA TAC AGT TCG GAC TTG CG - 3'
(1613-1594 *gyrB*)

PCR-Produkt: 1020 bp, *M. tuberculosis* -Position in *gyrB*: 574-1613

***M. tuberculosis gyrB* PCR**

756-G 5' - GAA GAC GGG GTC AAC GGT G - 3'
(738-756 *gyrB*)

1450-C 5' - CCT TGT TCA CAA CGA CTT TCG C - 3'
(1471-1450 *gyrB*)

PCR-Produkt: 734 bp, *M. tuberculosis* -Position in *gyrB*: 738-1471

***M. bovis* BCG RD1 multiplex PCR**

ET1 5' - AAG CGG TTG CCG CCG ACC GAC C - 3'

ET2 5' - CTG GCT ATA TTC CTG GGC CCG G - 3'

ET3 5' - GAG GCG ATC TGG CGG TTT GGG G - 3'

PCR-Produkt bei *M. bovis* (Wildtyp)
von ET1 und ET3: 9650 bp
von ET2 und ET3: 150 bp

PCR-Produkt bei *M. bovis* BCG
von ET1 und ET3: 200 bp

***M. ulcerans* IS 2404 PCR**

MU5 5' - AGC GAC CCC AGT GGA TTG GT - 3'
(383-401 IS 2404)

MU6 5' - CGG TGA TCA AGC GTT CAC GA - 3'
(871-852 IS 2404)

PCR-Produkt: 492 bp, *M. ulcerans*-Position in IS 2404: 383-871

***M. avium* ssp. *paratuberculosis* IS 900 PCR**

P90 5' - GTT CGG GGC CGT CGC TTA GG - 3'

P91 5' - GAG GTC GAT CGC CCA CGT GA - 3'

PCR-Produkt: 400 bp, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*-Position
in IS 900: 22-421

M = C:A, K = G:T, R = A:G, W = A:T; alle im 1:1 molaren Verhältnis

2.1.5 Nährmedien

Löwenstein-Jensen Medium: Becton Dickinson, San Jose, Calif., USA

Middlebrook-Cohn-7H10 Agar mit OADC Anreicherung und Mycobactin: Becton Dickinson, San Jose, Calif., USA

2.1.6 Bakterienstämme

Insgesamt wurden 125 Stämme des Genus *Mycobacterium* und der *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* Typstamm zur vergleichenden DNA-Sequenzanalyse untersucht (s. Tab. 2.1). Es wurden dabei alle (89) validen Spezies (85) und Subspezies (4) berücksichtigt (Stand März 2000).

Unter den Mykobakterien-Isolaten fanden sich 82 Spezies- und 4 Subspezies-Typstämme, d.h. 86 von insgesamt 87 weltweit verfügbaren Typisolaten. Damit konnten bis auf den Typstamm von *M. genavense* alle validen Typstämme analysiert werden. Da von den nicht oder nur schwer kultivierbaren Spezies *M. leprae* und *M. lepraemurium* keine Typisolate existierten, wurde in diesen Fällen mit DNA-Extrakten gearbeitet.

Die meisten Isolate wurden von Stammsammlungen bezogen, d.h. von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig und der American Typ Culture Collection, Manassas, USA. Fünf Typstämme wurden mit denselben Isolaten anderer Stammsammlungen kontrolliert. Sie zeigten identische 5'-16S-rDNA-Sequenzen.

2.1.7 Software

Datenbank RIDOM_TOOL Version 1.5: Christian Singer, Würzburg (basiert auf Microsoft-Access aus dem Microsoft Office Paket 97) (52).

Lasergene Software Package Version 1.60: DNASTar Inc., Wisconsin, USA (Umfangreiches Software Paket zum Bearbeiten von Sequenzen: Teile des Lasergene Packets: EditSeq V 3.89, MapDraw, MegAlign, SeqMan, Primer-Select).

Reference Manager: Research Soft, Berkeley, USA

(Literaturdatenverwaltung, Version 8.01, Professional Edition).

Sequence Navigator Version 1.01: PE Applied Biosystems, Weiterstadt.

Tab. 2.1. Untersuchte Isolate, 5'-16S-rDNA (16S) und „Internal Transcribed Spacer“ Region (ITS) Sequenz

Spezies	Stammsammlung	Bemerkung	16S/ ITS
<i>Corynebacterium</i>	DSM ⁱ 44287		
<i>pseudodiphtheriticum</i> (T) ^a	(ATCC ^f 10700)		+/+
<i>M. abscessus</i> (T)	DSM 44196 (ATCC 19977) ^b		+/+
<i>M. africanum</i> (T)	ATCC 25420	Subtyp I	+/+
<i>M. agri</i> (T)	ATCC 27406 (CIP ^h 1320001)		+/-
<i>M. aichiense</i> (T)	DSM 44147 (ATCC 27280)		+/-
<i>M. alvei</i> (T)	DSM 44176 (ATCC 51304)		+/-
<i>M. asiaticum</i> (T)	DSM 44297 (ATCC 25276)		+/-
<i>M. aurum</i> (T)	DSM 43999 (ATCC 23366)		+/-
<i>M. austroafricanum</i> (T)	DSM 44191 (ATCC 33464)		+/-
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> (T)	DSM 44156 (ATCC 25291)	Serovar 2 Sequevar I/Mav A	+/+
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	DSM 43216	Sequevar II/Mav A	+/+
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (ST) ^a	DSM 44133 (ATCC 19698)	Sequevar I/Mav A	+/+
<i>M. avium</i> ssp. <i>silvaticum</i> (ST)	DSM 44175 (ATCC 49884)	Sequevar I/Mav A	+/+
<i>M. bohemicum</i> (T)	DSM 44277		+/-
<i>M. bohemicum</i>	DSM 44408		+/-
<i>M. botniense</i> (T)	ATCC 700701		+/-
<i>M. bovis</i> (T)	ATCC 319210		+/+
<i>M. bovis</i>	DSM 43990	BCG	+/+
<i>M. branderi</i> (T)	ATCC 51789		+/-
<i>M. brumae</i> ^m (T)	DSM 44177 (ATCC 51384)		+/-
<i>M. celatum</i> (T)	DSM 44243 (ATCC 51131)		+ ^c /+
<i>M. chelonae</i> ⁿ (T)	DSM 43804 (ATCC 35752)		+/+
<i>M. chelonae</i>	DSM 43217		+/-
<i>M. chitae</i> (T)	ATCC 19627		+/-
<i>M. chlorophenicum</i> (T)	DSM 43826 (ATCC 49826)		+/-
<i>M. chubuense</i> (T)	DSM 44219 (ATCC 27278)		+/-
<i>M. confluentis</i> (T)	DSM 44017 (ATCC 49920)		+/-
<i>M. conspicuum</i> (T)	DSM 44136 (CIP 105165)		+/-
<i>M. cookii</i> (T)	DSM 43922 (ATCC 49103)		+/-
<i>M. diernhoferi</i> (T)	DSM 43524 (ATCC 19340)		+/-
<i>M. duvalii</i> (T)	DSM 44244 (ATCC 43910)		+/-
<i>M. fallax</i> (T)	DSM 44179 (ATCC 35219)		+/-
<i>M. farcinogenes</i> (T)	DSM 43637 (ATCC 35753)		+/+
<i>M. farcinogenes</i>	DSM 43646		+/-
<i>M. flavescens</i> (T)	DSM 43991 (ATCC 14474)	Sequevar I/Mfla A	+/+
<i>M. flavescens</i>	DSM 43531	Sequevar II/Mfla B	+/+
<i>M. fortuitum</i> ssp. <i>acetamidolyticum</i> (ST)	DSM 44220 (ATCC 35931)	Sequevar I/Mfo B	+/+
<i>M. fortuitum</i> ssp. <i>acetamidolyticum</i>	ATCC 43266	Sequevar I/Mfo B	+/+
<i>M. fortuitum</i> ssp. <i>fortuitum</i> (T)	DSM 46621 (ATCC 6841)	Sequevar I/Mfo A	+/ ^c
<i>M. fortuitum</i>	ATCC 49403	3rd biovariant complex (Sorbitol +) Sequevar II/Mfo C	+/ ^c
<i>M. fortuitum</i>	ATCC 49404	3rd biovariant complex (Sorbitol -) Sequevar III/Mfo D	+/ ^c
<i>M. gadium</i> (T)	DSM 44077 (ATCC 27726)		+/-
<i>M. gastris</i> (T)	DSM 43505 (ATCC 15754)		+/+
<i>M. genavense</i>	Wue ^l Tb268/96		+/-
<i>M. gilvum</i> (T)	ATCC 43909 (DSM 44245)		+/-
<i>M. gilvum</i>	DSM 9487		+/-
<i>M. goodii</i> (T)	ATCC 700504		+/-
<i>M. gordonae</i> (T)	DSM 44160 (ATCC 14470)	Sequevar I	+/-
<i>M. gordonae</i>	DSM 43212 (ATCC 35756)	Sequevar II	+/-

Fortsetzung nächste Seite

Tab. 2.1 Fortsetzung

Spezies	Stammsammlung	Bemerkung	16S/ ITS
<i>M. gordonae</i>	Bo ^g 4994/99	Sequevar II	+/-
<i>M. gordonae</i>	Bo 11340/99	Sequevar III	+/-
<i>M. gordonae</i>	Bo 10681/99	Sequevar IV	+/-
<i>M. gordonae</i>	Bo 9411/99	Sequevar V	+/-
<i>M. haemophilum</i> (T)	ATCC 29548		+/-
<i>M. hassiacum</i> (T)	DSM 44199		+/-
<i>M. heidelbergense</i> (T)	ATCC 51253		+/-
<i>M. hiberniae</i> (T)	DSM 44241 (ATCC 49874)		+/-
<i>M. hodleri</i> (T)	DSM 44183 (CIP 104909T)		+/-
<i>M. interjectum</i> ^o (T)	ATCC 51457 (DSM 44064)		+/-
<i>M. intermedium</i> (T)	DSM 44049 (ATCC 51848)		+/-
<i>M. intracellulare</i> (T)	DSM 43223 (ATCC 13950)	Serovar 16 Sequevar I/Min A	+/+
<i>M. intracellulare</i>	DSM 44161	Sequevar I/Min A	+/+
<i>M. intracellulare</i>	ATCC 35847	Serovar 7 Sequevar II/MAC E	+/+
<i>M. intracellulare</i>	ATCC 35770	Serovar 18	+/+
		Sequevar III/MAC D	
<i>M. kansasii</i> (T)	DSM 44162 (ATCC 12478)	Sequevar I/Mka A	+/+
<i>M. kansasii</i>	DSM 43495	Sequevar I/Mka A	+/+
<i>M. kansasii</i> ^d	Paris ^k I	Sequevar I	+/-
<i>M. kansasii</i>	Bo 539/99	Sequevar III/Mka C	+/+
<i>M. kansasii</i> ^r	DSM 43221	Sequevar IV/Mka D	+/+
<i>M. kansasii</i>	Bo 10492/98	Sequevar V/Mka E	+/+
<i>M. kansasii</i> ^d	Paris V	Sequevar V	+/-
<i>M. kansasii</i>	DSM 44431	Sequevar VI-1/Mka F	+/+
<i>M. kansasii</i>	Bo 8875/99	Sequevar VI-3/Mka F	+/+
<i>M. komossense</i> (T)	DSM 44078 (ATCC 33013)		+/-
<i>M. lentiflavum</i> (T)	DSM 44418 (ATCC 51985)		+/-
<i>M. leprae</i> ^d	AHI ^e 1104/96		+/-
<i>M. lepraemurium</i> ⁱ	LRC ⁱ Hawaiian		+/-
<i>M. madagascariense</i> (T)	ATCC 49865		+/-
<i>M. mageritense</i> (T)	CIP 104973		+/-
<i>M. malmoense</i> (T)	DSM 44163 (ATCC 29571)		+/-
<i>M. malmoense</i>	DSM 44053		+/-
<i>M. marinum</i> (T)	DSM 44344 (ATCC 927)		+/+
<i>M. marinum</i>	DSM 43518		+/+
<i>M. microti</i> (T)	ATCC 19422 (DSM 44155)		+/+
<i>M. moriokaense</i> (T)	DSM 44221 (ATCC 43059)		+/-
<i>M. mucogenicum</i> (T)	ATCC 49650		+/-
<i>M. murale</i> (T)	DSM 44340		+/+ ^c
<i>M. neoaurum</i> (T)	DSM 44074 (ATCC 25795)		+/-
<i>M. nonchromogenicum</i> (T)	DSM 44164 (ATCC 19530)		+/-
<i>M. nonchromogenicum</i>	ATCC 25142		+/-
<i>M. novocastrense</i> (T)	DSM 44203		+/+ ^c
<i>M. obuense</i> (T)	DSM 44075 (ATCC 27023)		+/-
<i>M. parafortuitum</i> (T)	DSM 43528 (ATCC 19686)		+/-
<i>M. peregrinum</i> ^p (T)	ATCC 14467 (DSM 43271)	Sequevar Mpe A	+/+ ^c
<i>M. peregrinum</i>	ATCC 700686	Sequevar Mpe B	+/+ ^c
<i>M. phlei</i> (T)	DSM 43239 (ATCC 11758)		+/-
<i>M. porcinum</i> (T)	DSM 44242 (ATCC 33776)		+/+
<i>M. poriferae</i> (T)	ATCC 35087		+/-
<i>M. pulveris</i> (T)	DSM 44222 (ATCC 35154)		+/-
<i>M. rhodesiae</i> ^q (T)	DSM 44223 (ATCC 27024)		+/-
<i>M. scrofulaceum</i> (T)	DSM 43992 (ATCC 19981)		+/-
<i>M. senegalense</i> (T)	DSM 43656 (ATCC 35796)		+/+
<i>M. senegalense</i> ^s	DSM 43655		+/-
<i>M. septicum</i> (T)	DSM 44393 (ATCC 700731)		+/+
<i>M. shimoidei</i> (T)	DSM 44152 (ATCC 27962)		+/-

Fortsetzung nächste Seite

Tab. 2.1 Fortsetzung

Spezies	Stammsammlung	Bemerkung	16S/ ITS
<i>M. simiae</i> (T)	DSM 44165 (ATCC 25275)		+/-
<i>M. smegmatis</i> (T)	DSM 43756 (ATCC 19420)		+/-
<i>M. sphagni</i> (T)	ATCC 33027 (DSM 44076)		+/-
" <i>M. sydneyiensis</i> "	Wue Tb0687/99		+/-
" <i>M. sydneyiensis</i> "	Bo 7644/99		+/-
<i>M. szulgai</i> (T)	DSM 44166 (ATCC 35799)		+/-
<i>M. terrae</i> (T)	DSM 43227 (ATCC 15755)	Sequevar I	+/-
<i>M. terrae</i>	DSM 43541	Sequevar II	+/-
<i>M. thermoresistibile</i> (T)	DSM 44167 (ATCC 19527)		+/-
<i>M. tokaiense</i> (T)	ATCC 27282		+/+
<i>M. triplex</i> (T)	ATCC 700071		+/-
<i>M. triviale</i> (T)	DSM 44153 (ATCC 23292)		+/-
<i>M. tuberculosis</i> ssp. <i>caprae</i> (ST)	CIP 105776		+/+
<i>M. tuberculosis</i> ssp. <i>tuberculosis</i> (T)	ATCC 27294		+/+
<i>M. tuberculosis</i> ssp. <i>tuberculosis</i>	ATCC 25177		+/+
<i>M. tusciae</i> (T)	DSM 44338		+/-
<i>M. ulcerans</i> (T)	ATCC 19423 (DSM 44154)		+/+
<i>M. vaccae</i> (T)	DSM 43292 (ATCC 15483)		+/-
<i>M. wolinskyi</i> (T)	ATCC 700010		+/-
<i>M. xenopi</i> (T)	DSM 43995 (ATCC 19250)	Sequevar I	+/-
<i>M. xenopi</i>	DSM 44169	Sequevar II	+/-

^a (T) – Spezies-Typstamm, (ST) – Subspezies-Typstamm

^b (Stammsammlungsnummer) – gleicher Stamm bei anderer Stammsammlung

^c Sequenzierung nur nach Subklonierung des PCR-Produkts möglich

^d Nur als DNA vorliegend

^e AHI – G. Bretzel, Armauer Hansen Institut, Würzburg

^f ATCC – American Typ Culture Collection, Manassas, USA

^g Bo – E. Richter, Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien, Forschungszentrum Borstel

^h CIP - La Collection de l'Institut Pasteur, Paris

ⁱ DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

^j LRC – Y. Kashiwabara, Leprosy Research Center, Tokyo

^k Paris – Veronique Vincent, Laboratoire de Reference des Mycobacteries, Institut Pasteur, Paris

^l Wue – Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg

^m *M. brumae* DSM 44177 (T) überprüft mit ATCC 51384 (T)

ⁿ *M. chelonae* DSM 43804 (T) überprüft mit ATCC 35752 (T)

^o *M. interjectum* ATCC 51457 (T) überprüft mit DSM 44064 (T)

^p *M. peregrinum* ATCC 14467 (T) überprüft mit DSM 43271 (T)

^q *M. rhodesiae* DSM 44223 (T) überprüft mit ATCC 27024 (T)

^r *M. kansasii* DSM 43221 bei DSMZ als *M. gastri* geführt; Persönliche Mitteilung Andreas Roth, Berlin: *M. kansasii* DSM 43221 ist nach ITS-RFLP *M. gastri* Mga B

^s Persönliche Mitteilung Andreas Roth, Berlin: *M. senegalense* DSM 43655 ist nach ITS-RFLP ein *M. fortuitum* Sequevar VIII

2.2 Methoden

2.2.1 Konventionelle Methoden

2.2.1.1 Anzucht von Mykobakterien

Die Kultivierung erfolgte für fast alle Mykobakterien bei 28°C und 37°C auf Löwenstein-Jensen-Medium. *M. haemophilum* hingegen wurde auf Löwenstein-Jensen-Medium mit Faktor X Strips subkultiviert. Die Anzucht von *M. avium* ssp. *paratuberculosis* erfolgte auf Middlebrook-Cohn 7H10 Agar mit OADC Anreicherung und Mycobactin.

Nach Wachstum wurden von jeder Kultur jeweils eine Probe bei –80°C und eine in flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Sie dienen als Referenz für das RIDOM-Projekt und sind Teil der institutseigenen Stammsammlung.

2.2.1.2 Ziehl-Neelsen-Färbung

Die Ziehl-Neelsen-Färbung der Mykobakterien war die Voraussetzung für die Anfertigung mikroskopischer Aufnahmen. Dazu wurde eine auf den Glasobjektträger aufgetragene Suspension säurefester Stäbchen über einer Bunsenflamme hitzefixiert. Es folgte eine Färbung mit Carbolfuchsin-Lösung unter mehrmaligem Erhitzen. Anschließend wurden die Bakterien nach Spülung mit Leitungswasser mit 3% HCl-Ethanol behandelt. Eine Gegenfärbung mit Methyleneblau, erneute Spülung mit Leitungswasser und Lufttrocknung beenden den Vorgang (32).

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 DNA-Extraktion, 16S-rDNA- und ITS-PCR und Sequenzierung

2.2.2.1.1 DNA-Extraktion

Das Verfahren diente der Gewinnung reiner DNA aus Mykobakterien-Kulturen. 1-2 Ösen der Bakterienkultur wurden in 1xTris-EDTA (TE) gelöst und für 30 min bei 80°C inkubiert. Nach diesem Zeitraum konnte von einer Abtötung sämtlicher Organismen ausgegangen werden. Inkubationen mit Lysozym bei 37°C für 1-12 h und 10% SDS/Proteinase K-Lösung bei 65°C für 10 min schlossen die Zellwand auf. Eine 10-minütige Behandlung mit N-cetyl-N,N,N-

trimethylammoniumbromid (CTAB)/NaCl-Lösung band Zellwandtrümmer, überschüssige Polysaccharide und Proteine. Die DNA wurde durch Zentrifugation mit Chloroform/Isoamylalkohol von den Zellfragmenten abgetrennt und in ein neues Gefäß überführt. Dort präzipitierte die DNA in Isopropanol nach halbstündiger Inkubation bei -20°C und ebenso langer Zentrifugation bei 14000 g. Nach einmaligem Waschen mit 70% Ethanol wurde die DNA getrocknet und anschließend in 20 µl 1xTE gelöst (64).

2.2.2.1.2 5'-16S-rDNA PCR

Die Primer 16S-27f und 16S-907r amplifizieren einen 919 bp umfassenden Teilabschnitt der ribosomalen 16S-Untereinheit (*E. coli*-Position 8-926) der extrahierten und gereinigten Mykobakterien-DNA. Der Primernamenname gibt die Position des 3'-Endes des Oligonukleotids auf der 16S-Untereinheit wieder. Die Angaben „f“ und „r“ stehen für „forward“ und „reverse“.

Für die PCR wurden 50 µl eines Reaktionsgemisches benötigt, das sich aus 0,2 µl DNA-Probe, 10 pmol Primer (2 µl), 1 µl 10 mM dNTPs, 3 µl 25 mM MgCl₂, 5 µl Puffer II (10x Puffer [100 mM Tris / HCl pH 8,3; 500 mM KCl]), 0,4 µl Taq (5 U/µl) und 36,4 µl Ampuwa zusammensetzte.

Nach einem „Hot-Start“ bei 80°C mit einer Dauer von 5 min folgten 28 Amplifizierungszyklen, die durch eine Denaturierungsphase von 45 s bei 94°C, eine „Annealing“-Zeit von 1 min bei 53°C und eine Extensionsphase von 1,5 min bei 72°C gekennzeichnet waren. Eine finale Extensionsphase von 10 min bei 72°C beendete die Reaktion.

Ein bereits erfolgreich amplifizierter Mykobakterien-Stamm und jeweils eine Leerprobe aus DNA-Extraktion und PCR wurden als Positiv- bzw. Negativkontrollen bei der PCR und der elektrophoretischen Analyse auf 2% Agarosegel mitgeführt.

2.2.2.1.3 „Internal Transcribed Spacer“ Region (ITS) PCR

Die „Internal Transcribed Spacer“ Region, die sich zwischen der 16S- und 23S-Ribosomenuntereinheit befindet, wurde durch die Oligonukleotide 16S-1511f und 23S-23r, die jeweils mit einer Menge von 10 pmol/Reaktion eingesetzt wurden, amplifiziert.

Eine initiale Denaturierungsphase - „Hot-Start“ - bei 80°C mit einer Dauer von 5 min leitete die 28 Zyklen, die durch eine Denaturierungsphase von 45 s bei 94°C, eine „Annealing“-Zeit von 1 min bei 53°C und eine Extensionsphase von 1,5 min bei 72°C charakterisiert wurden, ein. Eine finale Extensionsphase von 10 min bei 72°C beendete die Reaktion. Die Auswertung erfolgte durch Elektrophorese auf 2% Agarosegel.

2.2.2.1.4 Subklonierung von PCR-Produkten

Insbesondere einige schnellwachsende Mykobakterien-Spezies, wie z.B. *M. fortuitum* ssp. *fortuitum*, besitzen mehrere unterschiedliche, im Genom verteilte „Internal Transcribed Spacer“ Regionen. In diesen Fällen kommt es bei der direkten Sequenzierung zu Sequenzüberlagerungen und somit zu nicht verwertbaren Ergebnissen. Variieren die „Internal Transcribed Spacer“ auch in ihrer Länge, erhält man nach Amplifizierung mehrere verschiedene PCR-Produkte, die sich in ihrer Größe unterscheiden. In der Gelelektrophorese sind deshalb statt nur einer Bande, mehrere zu beobachten. Stämme mit mehreren unterschiedlichen „Internal Transcribed Spacers“ mussten deshalb vor der automatischen Sequenzanalyse subkloniert werden.

Ausgangssubstrat hierfür war die kleinste Bande der Gelelektrophorese mit einer Größe von über 200 bp. Zunächst wurde die Bande ausgeschnitten und mittels des *Jetsorb Gel Extraction Kits* gereinigt. Danach erfolgte die eigentliche Subklonierung mit dem *TOPO TA Cloning*[®] *Kit* nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurde die amplifizierte ITS in den Plasmid-Vektor *pCR*[®]*4-TOPO*[®] eingebaut, so dass dieser in chemisch kompetente *E. coli TOP10* Zellen transformiert werden konnte.

Das Plasmid enthielt Resistenzgene für *Kanamycin* und *Ampicillin*. *E. coli*-Bakterien, bei denen die Transformation gescheitert war, konnten auf Luria-Bertani-Medium mit *Kanamycin* nicht wachsen und wurden somit von den erfolgreich transformierten Stämmen selektiert. Ebenso erfolgte eine Selektion derjenigen Transformanten, bei denen der Einbau der ITS in den Vektor fehlgeschlagen war. Infolgedessen wurde das Fusionsgen *lacZα-ccdB*, das sonst durch die Insertion der ITS dysfunktionell geworden wäre, exprimiert, was zum Untergang des Bakteriums führte – „lethal Disruption“ (4). Rekombinanten hin-

gegen wuchsen auf *Kanamycin*-haltigem Medium, da sie das Plasmid-Resistenzgen besaßen und die in das Plasmid inserierte ITS die letale Disruption des Bakteriums verhinderte.

Nach Wachstum der Rekombinaten wurde die DNA extrahiert. Es folgte eine PCR mit den Primern M13f und M13r, die selektiv die in den Vektor eingebaute ITS amplifizierten. Das ITS-PCR-Produkt konnte nun mit den Primern 16S-1511f und 23S-23r sequenziert werden.

2.2.2.1.5 Automatisierte Sequenzierung mit ABI Prism™ 377 Sequencer

Die 5'-16S-rDNA und ITS-PCR-Produkte wurden nach Anweisungen des Herstellers mit Hilfe des *Taq-cycle (Big)-DyeDeoxy™ Terminator Kit* amplifiziert und im *ABI Prism 377 Sequencer* elektrophoretisch getrennt und detektiert.

Bei der dieser „linearen Amplifizierung“ werden im Unterschied zu den oben beschriebenen PCRs nur ein Primer und Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingesetzt. Die ddNTPs sind entsprechend den unterschiedlichen Nukleotiden mit verschiedenen Farbstoffen markiert und verursachen vorzeitige Strangterminierungen.

Die Sequenzierung wurde für jede Probe mit jeweils einem forward und einem reverse Primer durchgeführt. Zur Anwendung kamen die Primer 16S-27f und 16S-519r für die 16S-rDNA und die Primer 16S-1511f und 23S-23r für die ITS.

Die 25 Zyklen dieser Reaktion setzten sich aus einer Denaturierungsphase von 10 s bei 96°C, einer „Annealing“-Phase von 5 s und einer Extensionsphase von 4 min bei 60°C zusammen. Die Temperaturen der „Annealing“-Phasen betragen bei beiden 5'-16S-rDNA-Primern jeweils 53°C, bei den ITS-Oligonukleotiden 16S-1511f und 23S-23r 55°C und 51°C. Alle Primer wurden mit einer Menge von 5 pmol eingesetzt.

Im Anschluss wurde das Produkt der Reaktion von nicht-inkorporierten ddNTPs durch *Centri-Sep Spin-Columns* getrennt, so dass die Nukleotidfolge des Produkts durch eine Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) im *ABI-Prim™ 377 Sequencer* bestimmt werden konnte.

2.2.2.2 *GyraseB*-Gen-, Insertionselement-PCRs und RFLP-Analysen

2.2.2.2.1 *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR

Mit Hilfe der *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR wurde der *M. tuberculosis* complex von allen anderen Mykobakterien-Spezies unterschieden (22, 37).

Bei dieser PCR wurde mit den Primern MTUBf (25 pmol) und MTUBr (25 pmol) ein 1020 bp umfassender Abschnitt des *GyraseB*-Gens amplifiziert.

Nach einem „Hot-Start“ bei 80°C mit einer Dauer von 5 min folgten 30 Zyklen, die durch eine Denaturierungsphase von 1 min bei 94°C, eine „Annealing“-Zeit von 1 min bei 65°C und eine Extensionsphase von 1 min bei 72°C gekennzeichnet waren. Eine finale Extensionsphase von 10 min bei 72°C beendete die Reaktion.

Der Typstamm *M. tuberculosis* ATCC 27294 diente als Positiv-Kontrolle, der *M. ulcerans* ATCC 19423-Typstamm und jeweils eine Leerprobe aus DNA-Extraktion und PCR waren die Negativkontrollen bei der elektrophoretischen Auswertung auf 2% Agarosegel.

2.2.2.2.2 *M. tuberculosis gyrB* PCR

Das Verfahren differenziert *M. tuberculosis*² von anderen Mitgliedern des *M. tuberculosis* complex. Die Oligonukleotide 756-G und 1450-C amplifizierten einen Teilabschnitt der *GyraseB*-DNA (734 bp PCR-Produkt) und wurden mit jeweils 25 pmol pro Reaktion eingesetzt (22).

Die PCR wurde mit einen „Hot Start“ bei 80°C eingeleitet. Jeder der insgesamt 30 Zyklen bestand aus einer Denaturierungsphase von 1 min bei 94°C und einer „Annealing“/Extensions-Phase von 2 min bei 72°C. Die Reaktion wurde durch eine finale Extensionsphase von 10 min bei 72°C abgeschlossen und auf 2% Agarosegel ausgewertet.

Die Spezifität der Reaktion wurde durch die Typstämme von *M. tuberculosis* ATCC 27294 (positiv) und *M. bovis* ATCC 19210 (negativ) nachgewiesen. Jeweils eine Leerprobe aus DNA-Extraktion und PCR dienten als Negativkontrolle.

² Nach Abschluss der experimentellen Arbeit wurde bekannt, dass die Primer selektiv neben *M. tuberculosis* auch *M. africanum* Subtyp II amplifizieren (37).

2.2.2.2.3 *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR *RsaI* und *SacII* Verdau

Die Analyse der „Restriction Fragment Length Polymorphism“ (RFLPs) der *GyraseB* durch die Restriktionsenzyme *RsaI* und *SacII* führt zur Identifizierung einiger Mitglieder des *M. tuberculosis* complex. Nach *RsaI*-Verdau können drei Gruppen, *M. africanum* Subtyp I (360/560 bp Fragment), *M. bovis* einschließlich „*M. bovis*“ ssp. *caprae*³ (360/480 bp Fragment), und *M. microti* (360/660 bp Fragment) unterschieden werden. *SacII*-Verdau ermöglicht eine weitere Aufteilung von *M. bovis* in PZA-suszeptible („*M. bovis*“ ssp. *caprae*) (280/740 bp Fragment) und PZA-resistente (kein Fragment) Stämme.

Das PCR-Produkt der *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR wurde durch die Restriktionsenzyme *RsaI* und *SacII* verdaut und die Fragmente wurden durch Elektrophorese auf 2% Agarose-Gel aufgetrennt. Die Durchführung des Verfahrens erfolgte in Anlehnung an (22, 37).

2.2.2.2.4 *M. bovis* BCG RD1 multiplex PCR

RD1 multiplex PCR ist ein Verfahren zur Differenzierung des Impfstammes *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) (200 bp PCR-Produkt) vom Wildstamm des *M. bovis* (150 bp PCR-Produkt) (57). Die Oligonukleotide ET1 und ET3 (je 10 pmol), *M. bovis* BCG sowie ET2 (25 pmol) setzen am genomischen Fragment RD1 an.

Die PCR wurde mit einem „Hot Start“ bei 80°C eingeleitet. Jeder der insgesamt 30 Zyklen bestand aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 94°C und einer „Annealing“/Extensions-Phase von 1 min bei 65°C. Die Reaktion wurde durch eine finale Extensionsphase von 10 min bei 72°C abgeschlossen und auf 2% Agarosegel ausgewertet.

Dabei dienten die Typstämme *M. ulcerans* ATCC 19423 (negativ) und *M. bovis* ATCC 19210 und der *Bacillus-Calmette-Guérin* (BCG) *M. bovis* DSM 43990 als Spezifitätsnachweis und jeweils eine Leerprobe aus DNA-Extraktion und PCR als Negativkontrollen.

³ *M. tuberculosis* ssp. *caprae* wurde 1999 valide publiziert (2). Nach Niemann et al. wird diese Subspezies aber als „*M. bovis*“ ssp. *caprae* angesehen (38). Die vorliegende Arbeit folgt letzterer Konvention. Daher wird *M. tuberculosis* ssp. *tuberculosis* im Folgenden auch als *M. tuberculosis* bezeichnet.

2.2.2.2.5 *M. ulcerans* IS 2404 PCR

Ziel dieser Reaktion war die Unterscheidung *M. ulcerans* (492 bp PCR-Produkt) von *M. marinum* (kein PCR-Produkt) mittels des Insertionselements IS 2404. Diese PCR verwendete die Oligonukleotide MU5 und MU6 in einer Menge von jeweils 25 pmol (56).

Ein „Hot Start“ bei 80°C leitete die Reaktion, die aus 30 Zyklen bestand, ein. Ein Zyklus umfasste eine Denaturierungsphase von 1 min bei 94°C, eine „Annealing“-Phase von 1 min bei 60°C und eine Extensionsphase von 2 min bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus folgte eine finale Extensionsphase von 10 min bei 72°C.

Die elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte geschah auf 2,5% Agarosegel. Der Nachweis der Spezifität erfolgte über die Typstämme *M. ulcerans* ATCC 19423 (positiv) und *M. marinum* DSM 44344 (negativ). Es wurden zwei Leerproben aus DNA-Extraktion und PCR als Negativkontrollen mitgeführt.

2.2.2.2.6 *M. avium* ssp. *paratuberculosis* IS 900 PCR

Mit der *M. avium* ssp. *paratuberculosis* IS 900 PCR läßt sich die Subspezies *paratuberculosis* (400 bp PCR-Produkt) von den anderen beiden Subspezies des *M. avium* unterscheiden. Bei diesem Verfahren amplifizierten die Primer P90 und P91 (jeweils 25 pmol) das Multikopie-DNA-Insertionselement IS 900 (34, 51).

Nach einem „Hot-Start“ bei 80°C folgten 30 Zyklen, die durch eine Denaturierungsphase von 1 min bei 94°C, eine „Annealing“-Zeit von 1 min bei 58°C und eine Extensionsphase von 2 min bei 72°C gekennzeichnet waren. Eine finale Extensionsphase von 10 min bei 72°C beendete die Reaktion.

Die elektrophoretischen Auswertung der PCR-Produkte fand auf 2% Agarosegel statt. Der Nachweis der Spezifität erfolgte über die Typstämme *M. avium* ssp. *silvaticum* DSM 44175 (negativ) und *M. avium* ssp. *paratuberculosis* DSM 44133 (positiv). Es wurden zwei Leerproben aus DNA-Extraktion und PCR als Negativkontrollen mitgeführt.

2.2.3 Auswertung der Sequenzdaten

Die Sequenzierungsergebnisse des *ABI Prism 377 Sequencer* wurden mit dem *Sequence Navigator V 1.01* editiert und in der RIDOM-Datenbank gesammelt.

Zur Erstellung von „Alignments“ und zur Untersuchung phylogenetischer Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den einzelnen Stämmen diente das Programm *MegAlign* von Lasergene. Dieser Software liegt der Clustal Algorithmus nach der „Neighbour joining“-Methode von Saitou und Nei zugrunde (50).

2.2.4 GenBank⁴-Sequenzevaluierung

Zur Qualitätskontrolle der öffentlich erhältlichen Sequenzen wurden die 16S-rDNA-Sequenzeinträge von GenBank 5'-16S-rDNA mit den Sequenzdaten der untersuchten Stämme verglichen (3). Identische Mykobakterien Isolate wurden dabei berücksichtigt, wenn eine Überlappung von wenigstens 80% bestand (50).

In der GenBank fanden sich 77 Einträge aus den Jahren 1989 bis 2000, welche diese Voraussetzungen erfüllten. Jede Diskrepanz im „Alignment“ der Sequenzen wurde als Basenunterschied gewertet.

Es wurde der Jahresmittelwert der Basenunterschiede, die Standardabweichungen sowie der Standardfehler dieses Mittelwertes berechnet. Dieselben Werte wurden für den Gesamtzeitraum (1989-2000) und die beiden Zeitabschnitte 1989-1993 und 1994-2000 ermittelt. Da die Daten nicht normalverteilt waren und keine lineare Korrelation bestand, erfolgte die Untersuchung der Korrelation zwischen Basenunterschied und Eintragsjahr mittels der Spearman-Rank-Korrelation (23). Dazu wurde der Rank-Korrelations-Koeffizient ρ und die Irrtumswahrscheinlichkeit p berechnet. Die Jahresmittelwerte der Basenunterschiede und die Standardabweichung (Ordinate) wurden bezogen auf das jeweilige Eintragsjahr (Abszisse) in einem Graph dargestellt. Schließlich wurde eine Kurve durch alle Jahresmittelwerte gelegt und nach dem Lowess-Verfahren geglättet (9).

⁴ „GenBank“ ist Teil des Informationsangebots des „National Center for Biotechnology Information“ der „National Library of Medicine“ an den „National Institutes of Health“ Bethesda, USA.

2.2.5 Datensammlung für das RIDOM-Projekt

Die Auswahl der Mikroorganismen für die RIDOM-Datenbank orientierte sich an der Liste der „Bacterial Nomenclature up-to-date“ der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (11). Alle dort aufgeführten Taxa sind durch ihre Veröffentlichung im „*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*“⁵ validiert. Gültige Taxa wurden zusammen mit ihren Synonymen eingetragen.

Neben den Sequenzen enthält die Datenbank zu allen Mikroorganismen auch mikrobiologische und medizinische Charakterisierungen. Die Informationen hierzu stammen meist aus der Originalliteratur und dem „ASM Manual of Clinical Microbiology“ (33). Bei Taxa, die bereits vor 1986 beschrieben worden waren, wurde aber auch das „Bergey's Manual of Systematic Bacteriology“ als Referenzliteratur genutzt (65).

Die Beschreibung jedes einzelnen Taxons behandelt makro- und mikroskopische Morphologie, Physiologie, differentialdiagnostische Kriterien, Pathogenität und Verbreitung des Mikroorganismus. Dabei verwendete Fachtermini entsprechen sowohl der „International Nomenclature of Diseases“, als auch der „International Classification of Diseases“ (10, 67). Sie können als Schlagwörter für Abfragen anderer Datenbanken, wie z.B. „Medline“ verwendet werden (36). Die Erkrankungen sind hierarchisch entsprechend dem Organsystembefall organisiert in Anlehnung an die „Medical Subject Headings (MeSH)-Tree-Structures“ (35).

Von jeder Spezies und Subspezies wurde zusätzlich jeweils ein mikro- und makroskopisches Diapositiv angefertigt und mit dem *Polaroid Sprint-Scan* digitalisiert. Mikroskopische Aufnahmen erfolgten nach Kulturaustrich auf Objektträger und Ziehl-Neelsen-Färbung. Makroskopisch sichtbare Kolonien wurden mit einer *Nikon F-601*-Kamera fotografiert.

Alle Rohdaten, wie Speziescharakterisierungen, bibliographische Verweise und digitalisierte Aufnahmen, wurden zunächst anhand der Datenbank *RI-*

⁵ Vormals *International Journal of Systematic Bacteriology* (1950-1999).

DOM_TOOL gesammelt und nach Weiterverarbeitung in die eigentliche Unix *mySQL-RIDOM*-Datenbank exportiert.

Die Charakterisierungen der Spezies und Subspezies des Genus *Mycobacterium* sind in gedruckter Form erhältlich (12). Dieses Kompendium beinhaltet ferner eine phänotypische Übersichtstabelle, eine Liste von Synonymen zu den gültigen Spezies und eine vollständige Bibliographie aller valider Taxa.

2.2.6 Literaturrecherche

Für das *RIDOM*-Projekt relevante Literaturangaben wurden mit dem Programm *Reference Manager V 8.01* editiert und verwaltet. Das Programm besitzt viele verschiedene Importfilter, mit dem bibliographische Angaben aus anderen Literaturdatenbanken, wie z.B. „Medline“, direkt übernommen wurden. Die mächtige Software bietet ferner die Möglichkeit nach Duplikaten zu suchen, sowie Referenzen mit Schlüsselwörtern zu versehen.

Nach Bearbeitung mit diesem Programm wurden die Referenzen in die *Microsoft Access 97* Datenbank *RIDOM_TOOL* exportiert. Dazu wurde eine „*Visual Basic for Applications*“ (*VBA*)-Schnittstelle in *RIDOM_TOOL* programmiert. Die zu exportierende Bibliographie wurde vom *Reference Manager* zunächst als Textdatei im *RIS*-Format gesichert (*Research Information Systems*) und dann von dieser Subroutine der *RIDOM_TOOL*-Datenbank eingelesen. Da diese Importroutine erkennt, ob Referenzen bereits in *RIDOM_TOOL* vorhanden sind, kommt es nicht zu Mehrfacheinträgen.

Neben dieser Importschnittstelle wurde eine Literatur-Abfragemaske implementiert. Hiermit können Literaturdatensätze nach ihren Autoren gesucht werden. Die Umsetzung des Unterprogramms erfolgte in *VBA* mittels der „*Structured Query Language*“ (*SQL*), einem einfachen, aber effektiven Hilfsmittel zur Datenbankabfrage.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleichende Sequenzanalyse

3.1.1 Analyse der 5'-16S-rDNA

Mit 125 Mykobakterien-Isolaten und dem *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* Typstamm wurde eine vergleichende 5'-16S ribosomale DNA-Analyse durchgeführt. Dabei wurden alle 89 Mykobakterien-Taxa (85 Spezies und 4 Subspezies) unter Verwendung von 86 der 87 möglichen Typstämme berücksichtigt. Keine Typstämme existierten für *M. leprae* und *M. lepraemurium*, das Typisolat von *M. genavense* war nicht verfügbar.

Nach DNA-Extraktion, 5'-16S-rDNA-PCR und erfolgreicher Sequenzierung - *M. celatum* musste als einzige Spezies subkloniert werden - konnte von jedem Stamm ein zwischen 428 bp (*M. brumae*) bis 457 bp. (*M. leprae*) langer Sequenzabschnitt (*E. coli* Position 54 bis 510) untersucht werden.

Mittels „Clustal-Alignment“ wurde von den Sequenzen aller Stämme eine 5'-16S-rDNA-Phylogenie erstellt. Abb. 3.1 illustriert die Verwandtschaftsverhältnisse des Genus *Mycobacterium* mit *C. pseudodiphtheriticum* als Außengruppe.

Das mit „Slow Growth“ gekennzeichnete Cluster vereint in sich alle Spezies, die zur Kategorie der physiologisch langsamwachsenden Mykobakterien gehören. Ausnahmen in dieser Hauptentwicklungslinie bilden lediglich die schnellwachsenden Spezies *M. brumae* und *M. poriferae*, die auch im Cluster „Slow Growth“ zu finden sind. Die Arten *M. farcinogenes* und *M. tusciae* hingegen sind trotz des physiologisch langsamen Wachstums nicht der Kategorie „Slow Growth“ zugeordnet.

Die meisten Stämme des Clusters „Slow Growth“ (29 von 43 Isolaten mit langsamem Wachstum) besitzen zusätzlich eine um 6 Basenpaare verlängerte Haarnadelstruktur der Helix 18 (*E. coli* Position 455-477, Abb. 3.2). Die Helix 18 ist Teil der Sekundärstruktur der ribosomalen 16S-rDNA. Auf dem Phylogenie-Baum werden diese Stämme unter dem Zweig „Long Helix 18“ zusammengefasst. *M. cookii*, *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae* befinden sich im Zweig „Slow Growth“, nicht aber in der Gruppierung „Long Helix

Abb. 3.1. 5'-16S rDNA-Phylogenie des Genus *Mycobacterium* mit *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* als Außengruppe. Der Baum wurde mit Hilfe des Clustal Algorithmus nach der „Neighbour joining“-Methode von Saitou und Nei erstellt (50). Die phylogenetische Einteilung der 125 Isolate erfolgten in „Slow Growth“, „Long Helix 18“, „Fast Growth“ und „Insertion in Helix 10“. Verschiedene Stämme der gleichen Spezies oder Subspezies mit identischen Sequenzen sind in der gleichen Zeile, durch Kommata getrennt, aufgeführt. (T) - Typstamm. *Siehe nächste Seite.*

18“, obwohl sie eine lange Helix 18 mit einer zusätzlichen Insertion von einem Basenpaar besitzen.

All diejenigen Mykobakterien-Arten, die durch langsames Wachstum charakterisiert sind, aber keine lange Helix 18 besitzen, werden als „intermediäre Gruppe“ (10 von 43) bezeichnet. Im Phylogeniebaum findet man diese Isolate im Cluster „Slow Growth“, nicht aber im Cluster „Long Helix 18“.

Auch Spezies mit physiologischen schnellen Wachstum besitzen keine lange Helix 18 und sind in der Mykobakterien-Phylogenie dem Seitenast „Fast Growth“ zugeordnet.

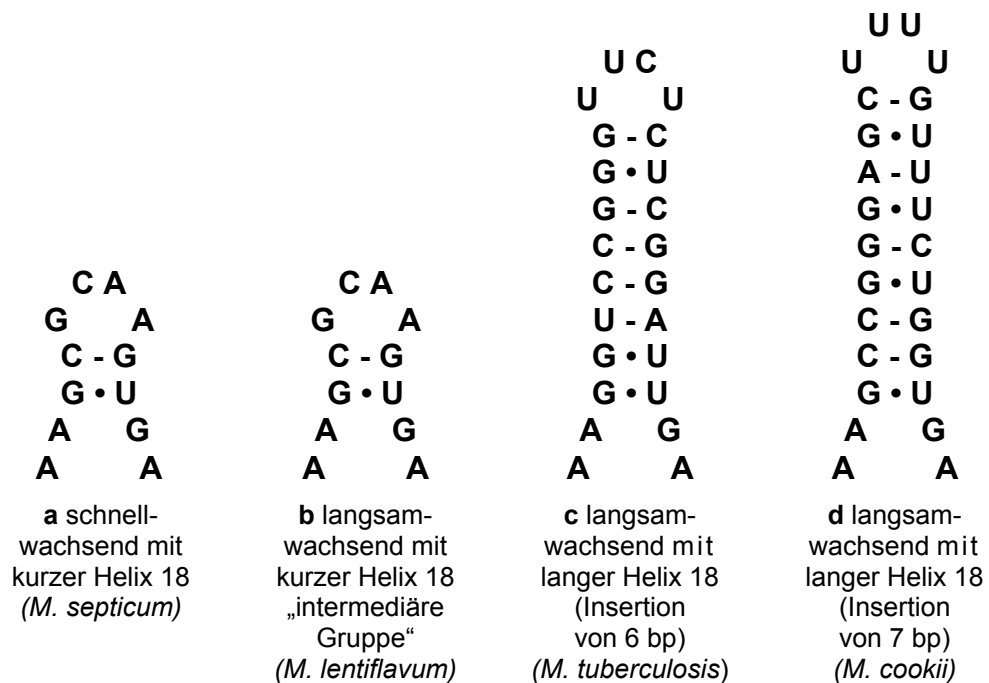
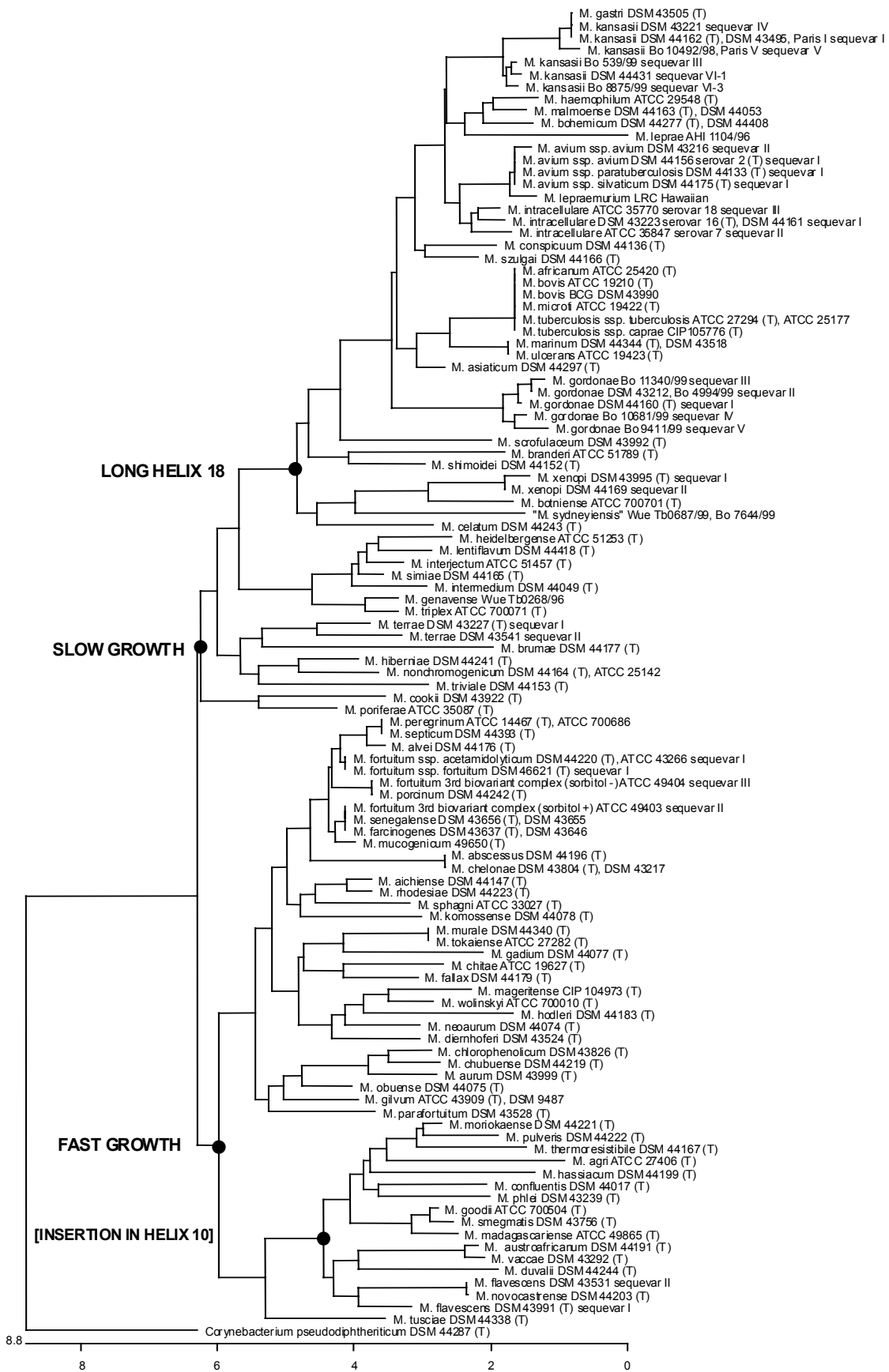


Abb. 3.2. Sekundärstruktur der Helix 18 der ribosomalen 16S-Untereinheit (*E. coli*-Position 455-477). Dargestellt sind Vertreter aus folgenden Guppen: Schnellwachsend mit kurzer Helix 18 (a), langsamwachsend mit kurzer Helix 18 – „intermediäre Gruppe“ (b), langsamwachsend mit langer Helix 18 und zusätzlicher Insertion von 6 (c) bzw. 7 (d) Basenpaaren.



Einige Mykobakterien-Arten wachsen auch noch bei Temperaturen von über 41°C, sie sind somit thermotolerant. Von 21 thermotoleranten Spezies haben 13 (61,9%) eine Insertion von 1 oder 2 Basen in Helix 10 (*E. coli* Position 184-193, Tab. 3.1). Bei diesen 21 thermotoleranten Taxa zeigen 15 physiologisch schnelles und 6 physiologisch langsames Wachstum. Von den 15 schnellwachsenden Spezies besitzen 12 (80%) eine Insertion in Helix 10, von den physiologisch langsamwachsenden Spezies nur eine Einzige (*M. intermedium*). Jene 12 Taxa (schnelles Wachstum, Thermotoleranz und Insertion in Helix 10) sind in der 5'-16S-rDNA-Phylogenie mit Ausnahme von *M. brumae* im Cluster „[Insertion in Helix 10]“ zu finden. Zum gleichen Cluster gehörig ist auch *M. pulveris* (schnelles Wachstum, Thermotoleranz, keine Insertion in Helix 10).

Tab. 3.1: Spezies des Genus *Mycobacterium* mit Thermotoleranz^a bzw. mit Insertion in Helix 10^b der ribosomalen 16S-Untereinheit (*E. coli*-Position 184-193)

Spezies	Langsames Wachstum ^c	Thermotoleranz ^a	Insertion in Helix 10 ^b	Phylogenie ^d „Fast Grower“	Phylogenie ^d „[Insertion H. 10]“
<i>M. agri</i>	-	+	2	+	+
<i>M. botniense</i>	+	+	-	-	-
<i>M. branderi</i>	+	+	-	-	-
<i>M. brumae</i>	-	? ^e	1	-	-
<i>M. celatum</i>	+	+	-	-	-
<i>M. confluentis</i>	-	+	2	+	+
<i>M. duvalii</i>	-	-	2	+	+
<i>M. flavescens</i>	-	v ^f	2	+	+
<i>M. goodii</i>	-	+	2	+	+
<i>M. haemophilum</i>	+	-	1	-	-
<i>M. hassiacum</i>	-	+	1	+	+
<i>M. intermedium</i>	+	+	1	-	-
<i>M. madagascariense</i>	-	-	2	+	+
<i>M. mageritense</i>	-	+	-	+	-
<i>M. moriokaense</i>	-	+	2	+	+
<i>M. novocastrense</i>	-	+	1	+	+
<i>M. phlei</i>	-	+	1	+	+
<i>M. pulveris</i>	-	v ^f	-	+	+
<i>M. shimoidei</i>	+	+	-	-	-
<i>M. smegmatis</i>	-	+	2	+	+
<i>M. thermoresistibile</i>	-	+	2	+	+
<i>M. tusciae</i>	+	-	1	+	-
<i>M. vaccae</i>	-	+	2	+	+
<i>M. wolinskyi</i>	-	+	-	+	-
<i>M. xenopi</i>	+	+	-	-	-

^a Wachstum bei Temperaturen von über 41°C

^b Insertion von einer oder zwei Base(n) in Helix 10

^c Wachstum mit einer Dauer von länger als 7 Tagen

^d Zuordnung zum betreffenden Cluster des 5'-16S-rDNA-Phylogeniebaums (Abb. 3.1)

^e *M. brumae* zeigt Wachstum bei 37°C, nicht aber bei 45°C (30)

^f Variables Wachstumsverhalten bei 41°C

Die verbleibenden thermotoleranten Spezies sind anderen phylogenetischen Zweigen zugeordnet. Mindestens eine Insertion in Helix 10, aber keine Thermotoleranz zeigen 4 Spezies. Die langsamwachsenden *M. haemophilum* und *M. tusciae* besitzen eine Insertion von 1 Base in Helix 10, die schnellwachsenden *M. duvalii* und *M. madagascariense* eine Insertion von 2 Basen. *M. duvalii* und *M. madagascariense* „clustern“ ebenfalls mit dem phylogenetischen Seitenzweig „[Insertion Helix 10]“.

Mit Hilfe der 5'-16S-rDNA Sequenzanalyse ist es möglich 64 der 89 validen Mykobakterien-Taxa (71,9%) zu diagnostizieren. Die verbleibenden 25 Spezies und Subspezies können nicht eindeutig identifiziert werden, da sie mit mindestens einem weiteren Taxon die gleiche 5'-16S-rDNA-Sequenz haben.

Nicht differenzierbar ist der *M. tuberculosis* complex mit seinen Taxa *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, „*M. bovis*“ ssp. *caprae* und *M. tuberculosis*. Auch können die Spezies *M. abscessus* und *M. chelonae*; *M. farcinogenes*, *M. fortuitum* 3rd biovariant complex (Sorbitol +) und *M. senegalense*; *M. flavescens* und *M. novocastrense*; *M. fortuitum* ssp. *acetamidolyticum* und *M. fortuitum* ssp. *fortuitum*; *M. fortuitum* 3rd biovariant complex (Sorbitol -) und *M. porcinum*; *M. gastri* und *M. kansasii*; *M. marinum* und *M. ulcerans*; *M. murale* und *M. tokaiense*; *M. peregrinum* und *M. septicum*; und die Subspezies von *M. avium* nicht unterschieden werden.

3.1.2 Analyse der „Internal Transcribed Spacer“ Region (ITS)

Von 45 Mykobakterien-Isolaten und *C. pseudodiphtheriticum* (T) wurde eine vergleichende Sequenzanalyse der „Internal Transcribed Spacer“ Region (ITS) durchgeführt. Die Länge der ITS ist taxonspezifisch, die ITS-Abschnitte der langsamwachsenden Spezies sind dabei kürzer als die der schnellwachsenden. Die Bandbreite reicht von 258 bp (*M. gordonae*) bis 460 bp (*M. tokaiense*). Bei *M. fortuitum* 3rd biovariant complex (Sorbitol + und -), *M. fortuitum* ssp. *fortuitum*, *M. murale*, *M. novocastrense* und bei den beiden *M. peregrinum*-Stämmen war eine ITS-Sequenzanalyse nur nach vorhergehender Subklonierung möglich.

Mit *C. pseudodiphtheriticum* als Außengruppe wurde analog der 5'-16S-rDNA-Analyse ein „gewurzelter“ phylogenetischer Baum der 45 Mykobakterien-Isolate

berechnet (Abb. 3.3). Die Hauptentwicklungslinien langsames und schnelles Wachstum blieben erhalten – Cluster „Slow Growth“.

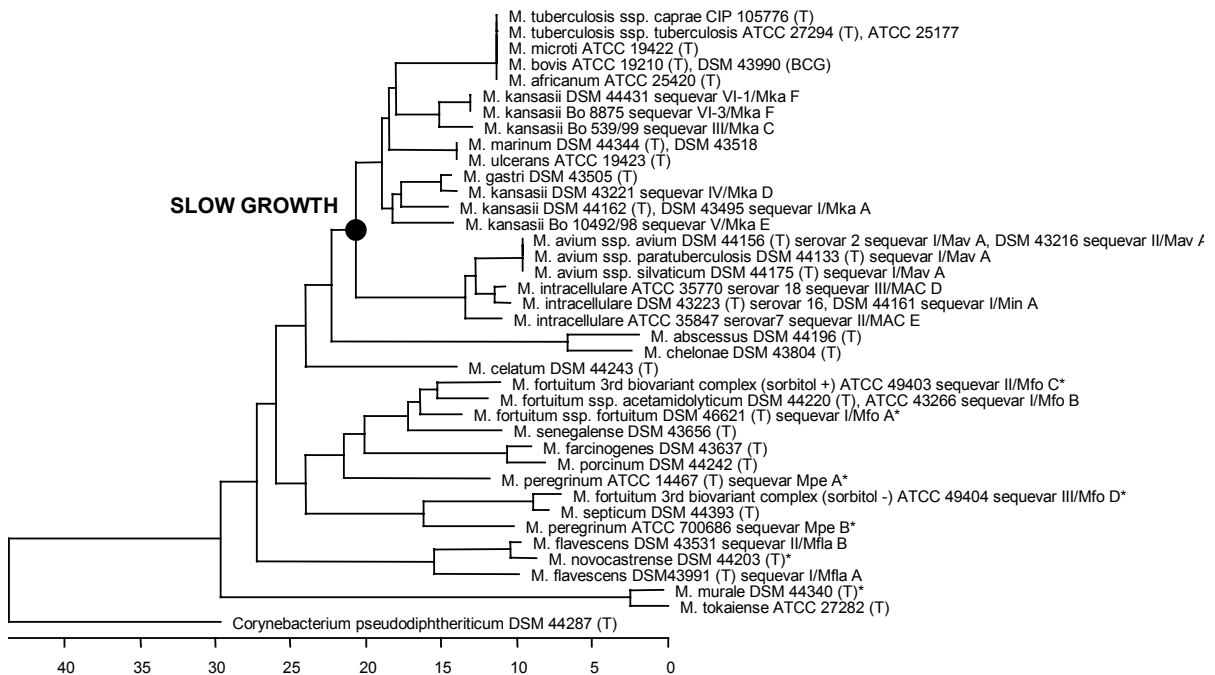


Abb. 3.3. „Internal Transcribed Spacer“ Region (ITS) - Phylogenie von 45 Mykobakterien-Spezies, die mit Hilfe der vergleichenden 5'-16S-Sequenzanalyse nicht eindeutig zu identifizieren sind. Die Hauptentwicklungslinie „Slow Growth“ ist hervorgehoben. Verschiedene Stämme der gleichen Spezies oder Subspezies mit identischen Sequenzen sind in der gleichen Zeile, durch Kommata getrennt, aufgeführt. (T) Typstamm.

Von den 25 validen Spezies und Subspezies, die anhand ihrer 5'-16S-rDNA-Sequenz nicht eindeutig zu identifizieren sind, lassen sich 15 nach Analyse ihrer ITS-Region unterscheiden. Sie sind im Folgenden zusammen mit zwei *M. fortuitum* Biovarianten (keine validen Subspezies) aufgeführt: *M. abscessus* und *M. chelonae*; *M. farcinogenes*, *M. fortuitum* 3rd biovariant complex (Sorbitol +) und *M. senegalense*; *M. flavescens* und *M. novocastrense*; *M. fortuitum* ssp. *acetamidolyticum* und *M. fortuitum* ssp. *fortuitum*; *M. fortuitum* 3rd biovariant complex (Sorbitol -) und *M. porcinum*; *M. gastri* und *M. kansasii*; *M. murale* und *M. tokaiense*; und *M. peregrinum* und *M. septicum*. Auf diese Weise ist es möglich, 79 von 89 (88,8%) der validen Taxa zu differenzieren. Mittels 5'-16S-rDNA- und ITS-Sequenzanalyse sind die verbleibenden 10 Mykobakterien-Taxa nicht

voneinander zu unterscheiden. Das sind im Einzelnen die Spezies des *M. tuberculosis* complex (*M. africanum*, *M. bovis*, „*M. bovis*“ ssp. *caprae*, *M. microti*, *M. tuberculosis*), *M. marinum* und *M. ulcerans*, sowie *M. avium* ssp. *avium*, *paratuberculosis*, *silvaticum*.

3.1.3 GenBank-Sequenzevaluierung

Die GenBank-Datenbank enthielt 77 16S-rDNA-Sequenz-Einträge von identischen Mykobakterien-Stämmen mit einer Überlappung von mindestens 80% (Stand 1. Juli 2000). Jede Diskrepanz im „Alignment“ der Sequenzen wurde als Basenunterschied gewertet.

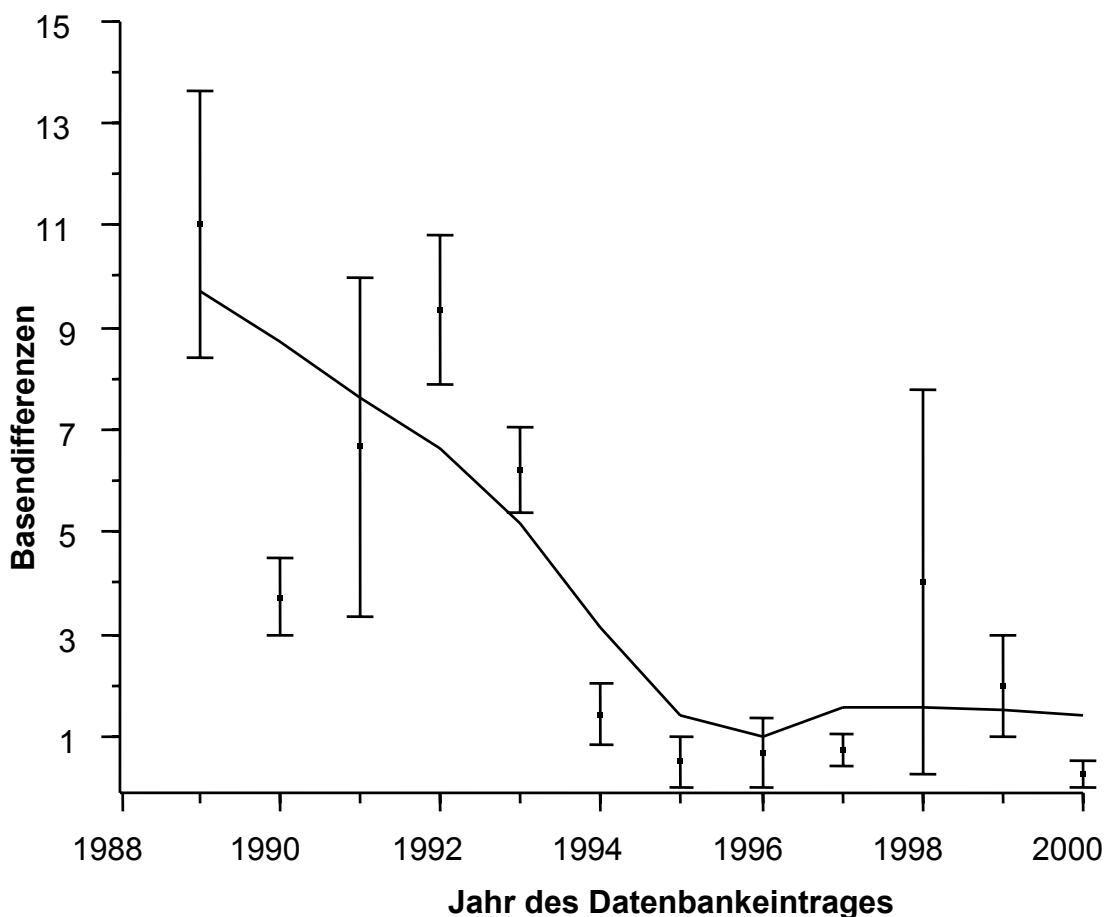


Abb. 3.4. 16S-rDNA-Sequenzvergleich identischer Mykobakterien-Stämmen in RIDOM- und GenBank (1989 – 2000). Darstellung der Basendifferenzen im „Alignment“ der Sequenzen in Relation zum Jahr des Eintrags in die Genbank.

Der Mittelwert aller Basenunterschiede betrug 4,312, der Standardfehler 0,571. In den Jahren 1989-1993 wurden 57,1% aller Sequenzen in die Gen-

Bank-Datenbank eingetragen. In diesem Zeitraum belief sich der Mittelwert der Basenunterschiede auf 6,523, der Standardfehler auf 0,743. Im Zeitabschnitt 1994-2000 (42,9% der Einträge) lagen der mittlere Basenunterschied und der Standardfehler bei 1,364 und 0,584.

Die Möglichkeit eines statistischen Zusammenhangs zwischen der Basenunterschied und dem Jahr des Eintrags wurde geprüft. Zur Anwendung kam dabei das nicht parametrische Verfahren der Spearman-Rank-Korrelation. Der Rank-Korrelations-Koeffizient ρ betrug $-0,563$, die Irrtumswahrscheinlichkeit p war kleiner als $0,0001$. Dies ist eine signifikante negative Korrelation zwischen den Basenunterschieden und dem Jahr des Sequenzeintrages.

Abb. 3.4 visualisiert diesen Zusammenhang zwischen den Basenunterschieden (Ordinate) und dem Eintragsjahr (Abszisse). Eine Kurve wurde durch alle Jahresmittelwerte gelegt und nach dem Lowess-Verfahren geglättet.

3.2 GyraseB-Gen-, Insertionselement-PCRs und RFLP-Analysen

3.2.1 *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR

Die Mitglieder des *M. tuberculosis* complexes wurden durch die *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR von „Mycobacteria other than tubercle bacilli (MOTT)“ und *M. leprae* unterschieden. Der Reaktion liegt ein Polymorphismus der GyraseB-Genes zugrunde.

Dabei setzten die Primer an Regionen der *gyrB* an, die spezifisch für den *M. tuberculosis* complex sind. Nur bei den Mitgliedern des Komplexes, durchgeführt mit *M. bovis* BCG, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, „*M. bovis*“ ssp. *caprae*⁶, *M. africanum* und *M. microti*, wurde deshalb ein 1020 bp umfassender Abschnitt der GyraseB-DNA amplifiziert (Abb. 3.5).

Für andere *Mycobacterium*-Spezies hingegen blieb eine positive Reaktion aus. Die Überprüfung erfolgte für 78 Spezies und Subspezies mit Hilfe von 77

⁶ *M. tuberculosis* ssp. *caprae* wurde 1999 valide publiziert (2). Nach Niemann et al. wird diese Subspezies aber als „*M. bovis*“ ssp. *caprae* angesehen (38). Die vorliegende Arbeit folgt letzterer Konvention. Daher wird *M. tuberculosis* ssp. *tuberculosis* im Folgenden auch als *M. tuberculosis* bezeichnet.

Typstämmen und der DNA von *M. lepraemurium*. Nicht berücksichtigt wurden die Spezies *M. bohemicum*, *M. botniense*, *M. interjectum*, *M. leprae*, *M. septicum*, *M. sphagni*.

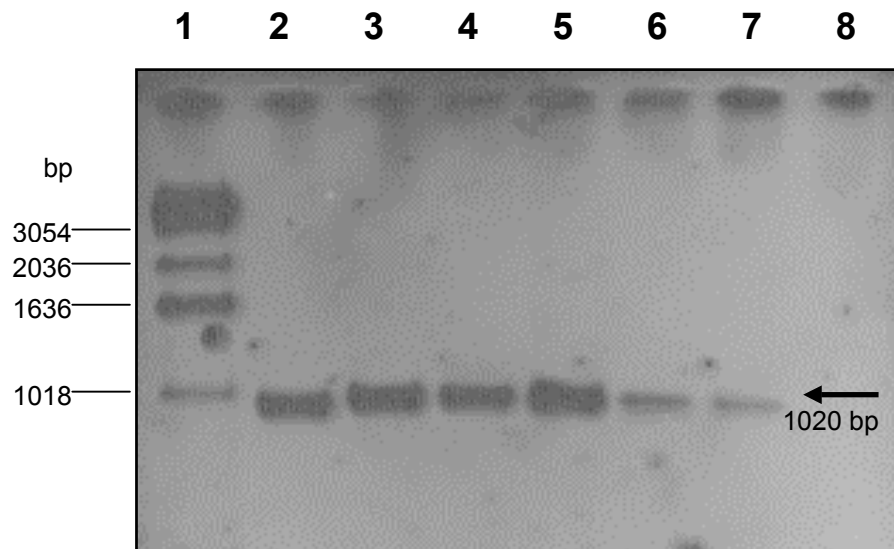


Abb. 3.5. *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR zum Nachweis der Taxa des *M. tuberculosis* complex (1020 bp PCR-Produkt). 1. 1kb-DNA Ladder-Marker, 2. *M. bovis* BCG DSM 43990, 3. *M. bovis* ATCC 19210, 4. *M. tuberculosis* ATCC 27294, 5. „*M. bovis*“ ssp. *caprae* CIP 105776, 6. *M. africanum* Subtyp I ATCC 25420, 7. *M. microti* ATCC 19422, 8. *M. ulcerans* ATCC 19423.

3.2.2 *M. tuberculosis gyrB* PCR

War der *M. tuberculosis* complex anhand der *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR nachgewiesen worden, so wurde im nächsten Schritt mit der *M. tuberculosis gyrB* PCR auf *M. tuberculosis* geprüft.

Die Primer dieser Reaktion erwiesen sich spezifisch für Regionen des *GyrA*-*gyrB*-Genes von *M. tuberculosis*⁷ (734 bp PCR-Produkt, Abb. 3.6). Die *M. tuberculosis* nah verwandten Taxa *M. bovis* Wildstamm, *M. bovis* BCG, „*M. bovis*“ ssp. *caprae*, *M. africanum* Subtyp I, *M. microti* und *M. ulcerans* wurden dabei nicht amplifiziert.

⁷ Nach Abschluss der experimentellen Arbeit wurde bekannt, dass die Primer selektiv neben *M. tuberculosis* auch *M. africanum* Subtyp II amplifizieren (37).

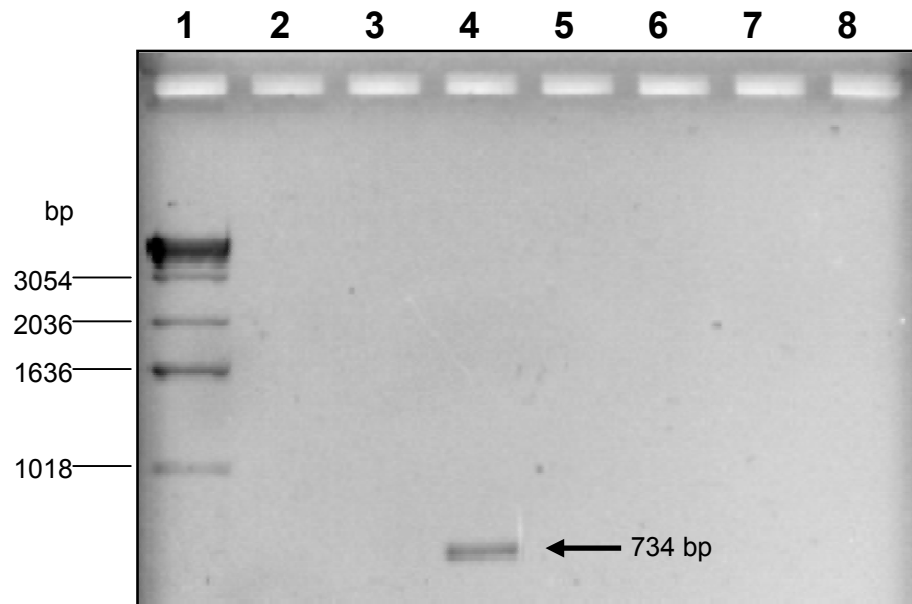


Abb. 3.6. *M. tuberculosis gyrB* PCR zum Nachweis von *M. tuberculosis* (734 bp PCR-Produkt). 1. 1kb-DNA Ladder-Marker, 2. *M. bovis* BCG DSM 43990, 3. *M. bovis* ATCC 19210, 4. *M. tuberculosis* ATCC 27294, 5. „*M. bovis*“ ssp. *caprae* CIP 105776, 6. *M. africanum* Subtyp I ATCC 25420, 7. *M. microti* ATCC 19422, 8. *M. ulcerans* ATCC 19423.

3.2.3 *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR *RsaI* und *SacII* Verdau

Konnte *M. tuberculosis* mit der *M. tuberculosis gyrB* PCR ausgeschlossen werden, so wurde das PCR-Produkt der *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR zur weiteren Differenzierung des Komplexes mittels der Restriktionsenzyme *RsaI* oder *SacII* verdaut.

Anhand der Größe der Restriktionsfragmente wurden beim *RsaI*-Verdau mehrere Gruppen unterschieden. *M. africanum* Subtyp I (Fragmente 360/560 bp), *M. bovis* (Fragmente 360/480 bp) und *M. microti* (Fragmente 360/660 bp).

Nach *SacII*-Verdau ließ sich das PZA-suszeptible *M. bovis* („*M. bovis*“ ssp. *caprae*) (Fragmente 280/740 bp) von PZA-resistenten Stämme *M. bovis* (kein Verdau) unterscheiden (37).

3.2.4 *M. bovis* BCG RD1 multiplex PCR

M. bovis BCG RD1 multiplex PCR ist ein Verfahren zur weiteren Differenzierung der PZA-resistenten *M. bovis*-Stämme in den Impfstamm *Bacillus Calmette*

Guérin und den *M. bovis* Wildstamm. Das genomische Fragment RD1 ist mit Ausnahme von *M. bovis* BCG in allen Mitgliedern des *M. tuberculosis* complex vorhanden (57).

Die Oligonukleotide der Multiplex-PCR, die spezifisch für dieses genomische Fragment und dessen Nachbarregionen sind, amplifizierten bei *M. bovis* BCG ein 200 bp PCR-Produkt, beim *M. bovis* Wildstamm und anderen Taxa des *M. tuberculosis* complex, wie *M. tuberculosis*, „*M. bovis*“ ssp. *caprae*, *M. africanum* Subtyp I und *M. microti* ein 150 bp PCR-Produkt. Die Reaktion blieb negativ für *M. ulcerans* (Abb. 3.7).

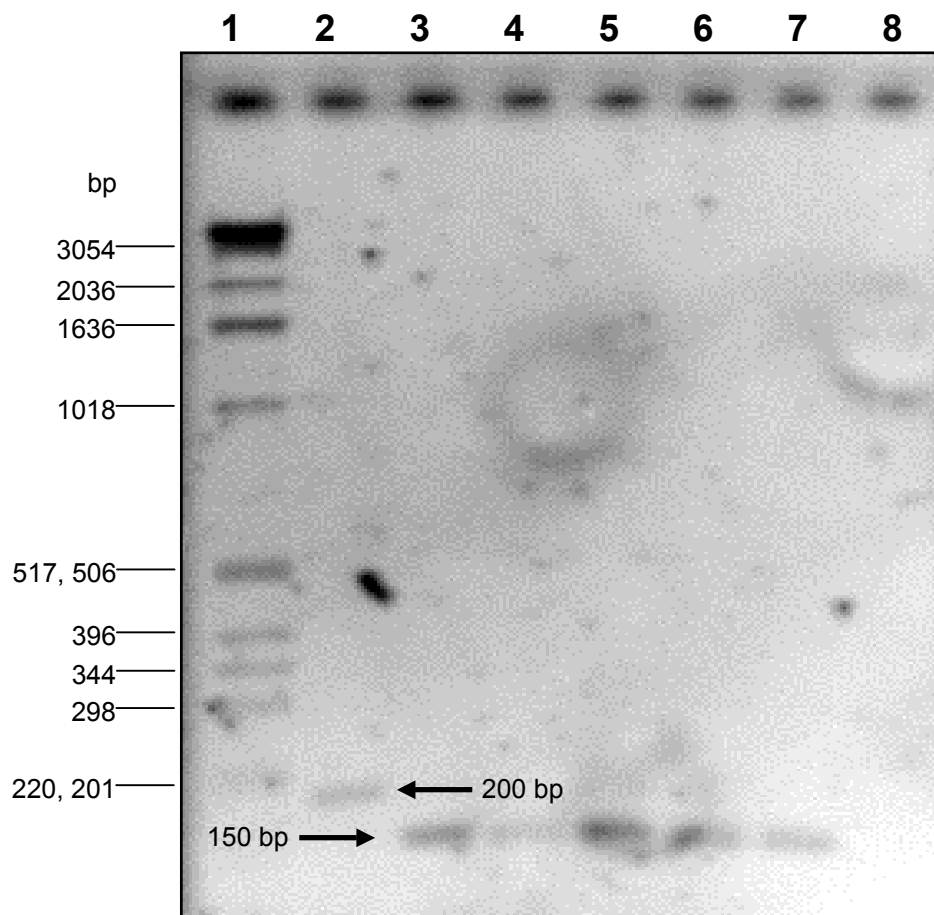


Abb. 3.7. *M. bovis* BCG RD1 multiplex PCR zur Differenzierung des *M. bovis* BCG-Stammes (200 bp PCR-Produkt) von *M. bovis* Wildstamm (150 bp PCR-Produkt). 1. 1kb-DNA Ladder-Marker, 2. *M. bovis* BCG DSM 43990, 3. *M. bovis* ATCC 19210, 4. *M. tuberculosis* ATCC 27294, 5. „*M. bovis*“ ssp. *caprae* CIP 105776, 6. *M. africanum* Subtyp I ATCC 25420, 7. *M. microti* ATCC 19422, 8. *M. ulcerans* ATCC 19423.

3.2.5 *M. ulcerans* IS 2404 PCR

Diese PCR differenzierte *M. ulcerans* von *M. marinum*. Die Reaktion setzt am Insertionselement IS 2404 an, das zwar im Genom von *M. ulcerans*, nicht aber in dem von *M. marinum* vorhanden ist. Ein 492 bp großes Fragment des Insertionselements wurde von *M. ulcerans*, nicht aber von *M. marinum* amplifiziert (Abb. 3.8).

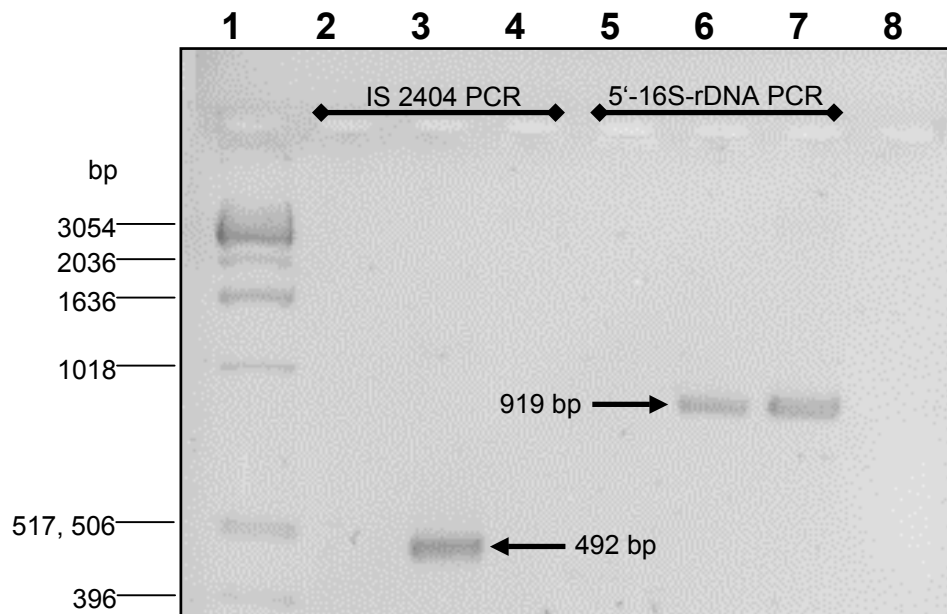


Abb. 3.8. *M. ulcerans* IS 2404 PCR zur Unterscheidung von *M. ulcerans* von *M. marinum*. Die Reaktion fällt mit einem 492 bp PCR-Produkt positiv für *M. ulcerans* aus. 1. 1kb-DNA Ladder-Marker. **IS2404 PCR:** 2. Negativ-Kontrolle, 3. *M. ulcerans* ATCC 19423, 4. *M. marinum* DSM 44344. **5'-16S rDNA PCR:** 5. Negativ-Kontrolle, 6. *M. ulcerans* ATCC 19423, 7. *M. marinum* DSM 44344.

3.2.6 *M. avium* ssp. *paratuberculosis* IS 900 PCR

M. avium ssp. *paratuberculosis* wurde anhand des Multikopie-DNA-Insertionselement IS 900, das nur in dieser *M. avium*-Subspezies existiert, von den anderen Taxa des *M. avium-intracellulare* complexes (MAC) differenziert. Bei der Überprüfung wurde *M. avium* ssp. *paratuberculosis* amplifiziert (400 bp PCR-Produkt), nicht aber *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *silvaticum* und *M. intracellulare* (Abb. 3.9).

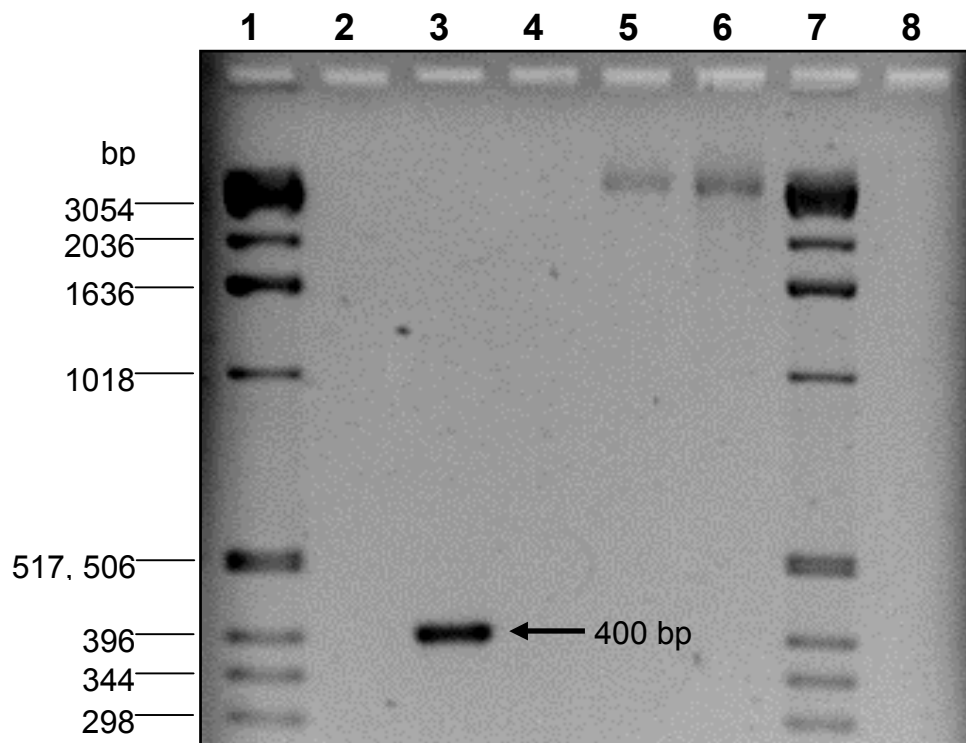


Abb. 3.9. *M. avium* ssp. *paratuberculosis* IS 900 PCR zur Identifizierung von *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (400 bp PCR-Produkt) 1. und 7. 1kb-DNA Ladder-Marker. 2. Negativ-Kontrolle der PCR, 3. *M. avium* ssp. *paratuberculosis* DSM 44133, 4. *M. avium* ssp. *silvaticum* DSM 44175. 5. *M. avium* ssp. *avium* DSM 44156, 6. *M. intracellulare* DSM 43223.

4 Diskussion

Auf dem 10. „Internationalen Medicinischen Congress“ 1890 in Berlin präsentierte Robert Koch notwendige Bedingungen, deren Erfüllung beweisend für das Vorliegen einer Infektionserkrankung ist. Diese Koch'schen Postulate stellen eine ursächliche Beziehung zwischen der Krankheit und ihrem infektiösen Agens her: Dabei muss ein regelmäßiger mikroskopischer Nachweis des Krankheitserregers in Körperflüssigkeiten bzw. in Ausscheidungen des infizierten Organismus gegeben sein (i). Ferner muss der Erreger stets aus dem Organismus isoliert und in Reinkultur angezüchtet werden können (iii). Schließlich muss sich anhand dieser Reinkultur im Tierversuch jederzeit das gleiche Krankheitsbild erzeugen lassen (iii) (28).

Weiterentwickelte Diagnoseverfahren und neu entdeckte Erreger (z.B. Viren), die nicht alle dieser Forderungen erfüllen können, führten zur Erweiterung der Koch'schen Postulate. Fredricks und Relman veröffentlichten 1996 Richtlinien für den molekularbiologischen Nachweis einer Infektionserkrankung (14).

Die molekulare oder **genotypische Identifizierung** eines Mikroorganismus erfolgt anhand von Zielregionen im Genom, die spezifisch für das jeweilige Taxon sind. Die vieluntersuchte ribosomale DNA (rDNA) ist in allen lebenden Organismen vorhanden und damit ein gut geeignetes „Target“ molekularer Analyse. Ribosomale Diagnoseverfahren besitzen außerdem eine hohe Sensitivität, da die rDNA als „Multi-Copy“-Gen vorliegt. Das gleichzeitige Vorhandensein konservierter, variabler und hypervariabler Regionen ermöglicht eine Differenzierung der Mikroorganismen auf den verschiedenen taxonomischen Ebenen. Ferner kann die ribosomale DNA als molekularer Zeitmesser betrachtet werden – „Clock Hypothesis“. Die rDNA liefert damit die Voraussetzung für stammesgeschichtliche Untersuchung von Mikroorganismen (39, 66).

Die **vergleichende Sequenzanalyse der rDNA** ist eine molekulare Diagnostik, die in dieser Arbeit zur Anwendung kam. Dieses Verfahren erfordert eine Datenbank, die genormte ribosomale Sequenzabschnitte enthält. Werden die Sequenzen von Stammsammlungsisolaten angefertigt, können diese von Dritten auf einfache Weise zu Referenzzwecken bezogen werden. Zur Identifi-

zierung des unbekanntem Erregers werden dessen Sequenzdaten mit denen der Datenbank verglichen.

Öffentliche Datenbanken, wie beispielsweise die GenBank des NCBI, oder spezialisierte Datenbanken wie das „Ribosomal Database Project“ oder die „Database on the structure of small ribosomal subunit RNA“ können die notwendig Referenzfunktion nur bedingt wahrnehmen (3, 31, 62). Ihre Einträge beziehen sich zuweilen auf Stämme, deren Herkunft nur mangelhaft dokumentiert ist. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Sequenzen den unterschiedlichsten Regionen der rDNA entstammen und keinen einheitlichen Qualitätsstandards entsprechen. Eine Vergleichbarkeit der Isolate dieser Sequenzen ist damit nicht oder nur begrenzt möglich. Als Referenzen ebenfalls ungeeignet sind diejenigen Einträge, deren wissenschaftlicher Name sich nicht im Einklang mit den aktuell gültigen Nomenklaturvereinbarungen befindet (11).

Zur **Evaluierung der Qualität der GenBank-Sequenzen** wurden die mykobakteriellen 5'-16S-rDNA-Abschnitte, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert worden waren, mit den Sequenzeinträgen identischer Stämme der GenBank verglichen. Die Differenzen im „Alignment“ wurden als Basenunterschiede gewertet (Abb. 3.4). Die mittleren Unterschiede nehmen über die Jahre (1989-2000) stetig ab. Sie lagen in der ersten Hälfte des beobachteten Zeitraums noch auf dem hohen Niveau von 6,523 und sanken erst in der zweiten Hälfte auf durchschnittliche 1,364. Es wurde eine signifikante negative Korrelation zwischen Basenunterschieden und dem Jahr des Sequenzeintrages festgestellt. Die Vermutung liegt deshalb nahe, die Basenunterschiede als Fehlerrate der GenBank-Sequenzen zu interpretieren. Auf diese Weise kann die Abnahme der Fehlerrate der neueren Sequenzeinträge mit dem technischen Fortschritt in den modernen Sequenzierungstechnologien wie der *Taq-Cycle-Reaktion* und der *automatischen Sequenzierung* in Zusammenhang gebracht werden.

Die Beschaffenheit der öffentlichen Datenbanken machte es notwendig, eine eigene Sequenzdatenbank zur „**Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms**“ (**RIDOM**) aufzubauen (19, 20). Die ribosomalen Sequenzen dieser Datenbank sind in ihrer Länge, Anfangs- und Endposition einheitlich genormt und entsprechen einem hohen Qualitätsstandard. Ziel der RIDOM-Datenbank

ist eine möglichst vollständige Sequenzsammlung aller medizinisch relevanten Mikroorganismen. Bei der Auswahl der Organismen wird – soweit dort verfügbar - nur auf Isolate öffentlicher Stammsammlungen, die entsprechend der aktuell gültigen Nomenklatur ausgewählt werden, zurückgegriffen. Neben den Sequenzen enthält die Datenbank zu allen Mikroorganismen auch mikrobiologische und medizinische Charakterisierungen. Durch die Einbindung der Datenbank in das „World Wide Web“ (WWW) stehen dem Benutzer auch Ressourcen anderer Datenbanken zur Verfügung.

Aus ähnlichen Erwägungen entstand etwa zur gleichen Zeit das „**MicroSeq 500 16S-rDNA Bacterial Identification System**“ (41). Die kommerziell erhältliche Sequenzdatenbank (Applied Biosystems) beinhaltet exakt genormte, qualitativ hochwertige, ribosomale 16S-Sequenzen von ATCC-Stammsammlungsisolaten und ist hierin dem RIDOM-Projekt gleichzustellen. Während sich der Datenbestand des RIDOM-Projekts noch im Aufbau befindet, enthält MicroSeq 500 bereits die Sequenzen von über 1000 Mikroorganismen. Es gibt aber noch weitere Unterschiede zwischen beiden Systemen. Die Datenbank MicroSeq 500 ist ein „stand alone“, proprietäres System ohne Anbindung an das „World Wide Web“. Im Würzburger WWW-System hingegen werden die eingetragenen Taxa zusammen mit weiterführenden Informationen und Links zu anderen Internet-Datenbanken in einen medizinischen und mikrobiologischen Kontext gestellt, der bei MicroSeq 500 fehlt.

Eine Evaluierung der MicroSeq 500 und RIDOM Mykobakterien-Datenbanken wurde kürzlich von Turenne und Mitarbeiter durchgeführt (61). MicroSeq 500 und RIDOM wurden hierbei "hervorragende Ergebnisse" im Vergleich mit 122 Testisolaten attestiert. Jedoch übertraf RIDOM das MicroSeq 500 System nicht nur hinsichtlich einer höheren Übereinstimmung mit den Suchergebnissen, sondern auch durch seine freie Verfügbarkeit und sein weiterführendes Informationsangebot.

Die Abschnitte, die zur vergleichenden ribosomalen Sequenzanalyse des Genus *Mycobacterium* herangezogen wurden, befinden sich auf der ribosomalen 16S-DNA und auf dem „Internal Transcribed Spacer“ (ITS). In diesen Berei-

chen befinden sich Sequenzfolgen, die genus- und speziesspezifisch für Mykobakterien sind (21, 25, 46).

Nach DNA-Extraktion, 5'-16S-rDNA-PCR und automatischer **Sequenzierung von 125 Stämmen** war es möglich 64 der 89 validen Mykobakterien-Taxa (71,9%) zu differenzieren. Die verbleibenden 25 Spezies und Subspezies konnten nicht eindeutig identifiziert werden, da sie mit mindestens einem weiteren Taxon dieser Gruppe die gleiche 5'-16S-rDNA-Sequenz haben. Es wurden deshalb die „Internal Transcribed Spacer“ Regionen (ITS) dieser Taxa untersucht. Die Hinzunahme der ITS-Sequenzen ermöglichte es, 15 der 25 Taxa mit uneindeutiger 5'-16S-rDNA-Sequenz zu identifizieren. Anhand beider Sequenzanalyseverfahren gelang es somit 79 der 89 (88,8%) validen Taxa eindeutig zu identifizieren.

Zu den Spezies mit **identischer 16S-Sequenz und unterschiedlicher ITS** gehören *M. chelonae* und *M. abscessus*. Identische 5'-16S-rDNA-Sequenzen beider Spezies werden von Kirschner et al., sowie Pitulle und Mitarbeiter bestätigt (26, 43), die „Internal Transcribed Spacer“ sind jedoch verschieden (49). Ebenso verhält es sich mit *M. gastri* und *M. kansasii*, sowie mit *M. farcinogenes*, *M. senegalense* und *M. fortuitum* 3rd biovariant complex (Sorbitol +) (26, 47, 48). Aus der Literatur war jedoch noch nicht bekannt, dass auch die Paare *M. murale* und *M. tokaiense*, *M. flavescens* und *M. novocastrense*, *M. peregrinum* und *M. septicum*, *M. fortuitum* 3rd biovariant complex (Sorbitol -) und *M. porcinum*, sowie *M. fortuitum* ssp. *fortuitum* und ssp. *acetamidolyticum* jeweils identische 5'-16S-rDNA-Sequenzabschnitte, aber unterschiedliche ITS haben.

Neben dieser Gruppe – identische 5'-16S-rDNA, aber unterschiedliche ITS, gibt es auch Spezies und Subspezies, die sich **weder in 5'-16S-rDNA, noch in der ITS unterscheiden**. Dazu zählt der *M. tuberculosis* complex mit den Spezies *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* und *M. tuberculosis* (15, 26). Gleiches wurde auch bei den *M. avium* Subspezies festgestellt und steht infolgedessen im Widerspruch zu den Ergebnissen von van der Giesens et al., der in der ITS zwischen den Subspezies *avium* und *paratuberculosis* Unterschiede beobachtet hatte (17, 63). Roth weist auf die identische 5'-16S-rDNA und ITS von

M. ulcerans und *M. marinum* hin (48); nicht bestätigt werden konnte, da nicht untersucht, eine Variabilität dieser Spezies im 3'-16S-rDNA Bereich (44).

Bei Auswertung der 5'-16S-rDNA- und ITS-Sequenzdaten wurden auch bei einigen Spezies und Subspezies **Mikroheterogenitäten**, d.h. Sequenzunterschiede im gleichen Taxon, beobachtet. Die Sequenzvarianten oder „Sequevar“ der 5'-16S-rDNA werden dabei mit römischen Ziffern, die der ITS mit lateinischen Großbuchstaben durchnummeriert. Bei der ITS-Nomenklatur sind diesen Buchstaben weitere vorangestellt. Sie setzen sich zusammen aus dem ersten Buchstaben des Genusnamen und bis zum ersten Vokal auch aus dem Speziesnamen (Beispiel: *M. flavescens* Mfla A).

Eine Gruppe für Mikroheterogenitäten bildet der *M. avium*-*M. intracellulare* complex (MAC). Die Isolate weisen Differenzen am 5'-Ende der 16S-rDNA auf und bestätigen die Ergebnisse von Böddinghaus (5). Bei der 5'-16S-rDNA- und ITS Analyse der Spezies *M. avium* standen insgesamt 4 Stämme zur Verfügung. Es gab 3 Isolate der Sequenzvariante I (Typstämme der Subspezies *avium*, *paratuberculosis* und *silvaticum*) und ein Isolat der Sequenzvariante II (Subspezies *avium*, DSM 43216). Alle 4 Stämme waren von derselben ITS-Variante Mav A. Die verschiedenen 16S-rDNA-Genotypen von *M. intracellulare*, die Böddinghaus 1990 aufstellte, konnten, soweit die Serovaren zur Überprüfung zur Verfügung standen, überprüft werden. Serovar 16 (Sequevar I), der in Böddinghaus Studie noch nicht untersucht wurde, zeigte sich phylogenetisch verschieden von den Serovaren 7 (Sequevar II) und 18 (Sequevar III). Eine Subtypisierung des *M. avium*-*M. intracellulare* complex anhand des variablen ITS unternahm Frothingham und Wilson an 35 Referenzstämmen, von denen die MAC-Isolate in vorliegender Arbeit als Sequenzvarianten Mav A (*M. avium*), MAC D und E (*M. intracellulare*), und Min A (ebenfalls *M. intracellulare*) identifiziert werden konnten (16).

Auch verschiedene Stämme des Lungenpathogens *M. kansasii* sind mikroheterogen in Sequenzen des Hitzeschockproteins *hsp65*, der 16S-rDNA und der ITS (1, 45). Die Einteilung der Spezies in 5 verschiedene Sequenzvarianten (I-V), die Picardeau und Mitarbeiter nach Anwendung mehrerer molekularer Typisierungsverfahren getroffen hatten, konnte für 4 Varianten – Sequevar II

stand nicht zur Verfügung – nach Anwendung beider Analyseverfahren bestätigt werden (42). Im betrachteten 5'-16S-rDNA-Sequenzabschnitt sind Sequevar I und IV, sowie der Typstamm von *M. gastri* identisch. Sequevar VI besitzt mehrere Untertypen, von denen in der Würzburger Studie die Isolate VI-1 und VI-3 durch 5'-16S-rDNA-, nicht aber durch ITS-Analyse unterschieden wurden (45).

Mikroheterogen ist auch das skotochromogene *M. gordonae*. Zwischen den *E. coli* Positionen 100 und 300 (5'-16S-rDNA) lassen sich bei verschiedenen Isolaten 4 unterschiedliche Nukleotidfolgen finden. Diese bereits von Kirschner beschriebenen Sequevaren wurden ebenfalls festgestellt (24).

Neben 3 Sequenzvarianten im 5'-16S-rDNA-Bereich I-III, gibt es bei der Spezies *M. fortuitum* auch Unterschiede in den Nukleotidfolgen der ITS – Varianten Mfo A-D. Darauf wurde in Teilen erstmalig von Springer hingewiesen (53).

M. terrae wurde anhand der vergleichenden 5'-16S-rDNA-Sequenzanalyse differenziert. Diese Art der Analyse ermöglichte auch eine Subtypisierung von *M. terrae* in die 2 Sequenzvarianten I und II in Übereinstimmung mit Torkko et al. (58).

Nicht nur der 5'-16S-rDNA-Vergleich, sondern auch die Untersuchung der „Internal Transcribed Spacer“ Region macht auf die Mikroheterogenität von *M. xenopi* aufmerksam. Durch ersteren Vergleich konnten 2 Sequenzvarianten I und II identifiziert werden. Die ITS-Varianten Mxe A, B und C, die Roth et al. 1998 beschrieben hatten, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachtet (48).

Ebenfalls von Roth veröffentlicht sind die Intraspeziesvarianten der beiden Arten *M. flavescens* und *M. peregrinum*. Während sich die Heterogenitäten bei *M. flavescens* sowohl im 5'-16S-rDNA-, als auch im ITS-Bereich äußerten (Sequevaren I/MflaA und II/Mfla B), konnten bei *M. peregrinum* nur Differenzen in der ITS entdeckt werden (Mpe A und Mpe B) (49).

Die 5'-16S-rDNA-Sequenzen dienten nicht nur der molekularen Diagnostik der Mykobakterien-Taxa, sondern waren auch Grundlage für die bisher vollständigste **16S-rDNA-Phylogenie**. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von 1989/90 finden erstmals sämtliche validen Spezies, sowie Subspezies des Genus Berücksichtigung (Abb. 3.1) (7, 54, 55).

Wie bereits in diesen Arbeiten gezeigt werden konnte, spiegeln sich die physiologische Eigenschaften langsames und schnelles Wachstum in zwei phylogenetischen Hauptentwicklungslinien wider. Dabei sind die langsamwachsenden Spezies untereinander näher verwandt als die schnellwachsenden Arten. Sie werden durch den monophyletische Zweig „Slow Growth“ repräsentiert, während das polyphyletische Cluster „Fast Growth“ alle schnellwachsenden Taxa der verbleibenden Gruppierungen vereint. Lediglich die langsamwachsenden Spezies *M. farcinogenes* und *M. tusciae*, sowie die schnellwachsenden Taxa *M. brumae* und *M. poriferae* weisen eine falsche phylogenetische Zuordnung auf. Das Wachstumsverhalten dieser vier Spezies wurde deswegen anhand eigener Subkulturen mit der Originalliteratur überprüft und bestätigt (8, 30, 40, 59). Auch gaben die Sequenzen der langsamwachsenden *M. farcinogenes* und *M. tusciae* keinerlei Hinweise auf eine fehlerhafte genotypische Zuordnung, sind die Sequenzen doch mit denen der GenBank-Einträgen derselben Stämme identisch. Zu den Stämmen der „Fast Growers“ *M. brumae* und *M. poriferae* gab es in der GenBank kein Vergleichsdatenmaterial. Die Sequenzen der Typstämme von *M. brumae* und *M. poriferae* stimmten jedoch mit den Analysen von Reischl⁸ überein. Auch sind die 16S-rDNA-Abschnitte beider untersuchter *M. poriferae*-Stämme identisch.

Physiologisches langsames Wachstum äußert sich bei 29 von 43 Taxa in einer um 6 Basenpaare erweiterten Helix 18 (Abb. 3.2). Die Helix 18 ist eine haarnadelförmige Sekundärstruktur der 16S-rDNA (*E.coli* Position 455-477). Schnellwachsende Spezies, sowie 10 der 43 langsamwachsenden Spezies – sog. „intermediäre Gruppe“ - besitzen keine Insertion in Helix 18 (6).

Die langsamwachsenden Taxa mit langer Helix 18 bilden das Cluster „Long Helix 18“. Bei *M. cookii*, *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae* ist die Helix um ein weiteres Basenpaar verlängert. Diese Spezies sind zusammen mit der „intermediären Gruppe“ zwar in der phylogenetischen Gruppierung „Slow Growth“, aber nicht im Cluster „Long Helix 18“ zu finden. Das Phänomen „lange Helix 18“ wurde bereits von Böttger et al. und Stahl et al. beschrieben (7, 55).

⁸ Persönliche Mitteilung Udo Reischl, Regensburg.

Da nicht alle langsamwachsenden Arten eine „lange Helix 18“ („intermediäre Gruppe“) besitzen, vermutete Böttger, dass sich das Merkmal „langsameres Wachstum“ vor der Akquirierung des Merkmals „lange Helix 18“ ausbildete (7).

Auch einer weiteren Sekundärstruktur, der Helix 10, wurde phänotypische Bedeutung zugeschrieben (7, 55). Bei diesen Untersuchungen erweckten die sog. thermotoleranten Spezies, d.h. Mykobakterien die bei Temperaturen von über 41°C Wachstum zeigen, Aufmerksamkeit, besaßen sie doch alle in Helix 10 eine Insertion von einer oder zwei Basen. Analysiert wurden jedoch nur die schnellwachsende Spezies *M. flavescens*, *M. phlei*, *M. smegmatis* und *M. thermoresistibile*. Die von Böttger aufgestellte These, dass eine Insertion von mindestens einer Base in Helix 10 mit der Exprimierung des Merkmals „Thermoresistenz“ korreliert, konnte in der vorliegenden Arbeit deshalb auch nur für die schnellwachsenden thermoresistenten Taxa bestätigt werden (7). Denn von 15 thermotoleranten Mykobakterien-Spezies mit physiologisch schnellem Wachstum haben 12 (80%) das genotypische Merkmal in Helix 10, von den 6 langsamwachsenden Arten mit Thermotoleranz nur eine einzige (*M. intermedium*). Der Zweig des phylogenetischen Baumes, der die meisten schnellwachsenden thermoresistenten Arten mit Insertion in Helix 10 vereint, wurde mit „[Insertion in Helix 10]“ bezeichnet. Keine Thermotoleranz, aber mindestens eine Insertion in Helix 10 zeigen ganze 4 Spezies (*M. duvalii*, *M. haemophilum*, *M. madagascariense* und *M. tusciae*).

Analog zur 16S-rDNA-Phylogenie illustriert Abb. 3.3 die **ITS-Verwandtschaftsverhältnisse** der analysierten Sequenzen. Auch hier bleiben die Hauptentwicklungslinien langsames und schnelles Wachstum erhalten – gekennzeichnet ist die Wurzel „Slow Growth“ (48). Verglichen mit dem 5'-16S-rDNA Sequenzbereich weist die ITS eine höhere Variabilität auf.

Die Kombination beider Sequenzanalyseverfahren ließ eine Identifizierung von 79 der 89 (88,8%) validen Mykobakterien-Taxa zu. Lediglich der *M. tuberculosis* complex, *M. ulcerans* und *M. marinum*, sowie die Subspezies von *M. avium* konnten auf diese Weise nicht differenziert werden. Zur Bestimmung dieser Mykobakterien wurden deshalb andere molekularbiologische Techniken angewandt, so dass es möglich wurde, fast alle Taxa des Genus *Mycobacteri-*

um anhand ihres Genotyps zu unterscheiden. Abb. 4.1 verdeutlicht die notwendigen Schritte zur **klinischen Diagnostik in Form eines Flussdiagramms**. Zuerst wird die DNA der unbekannte klinischen Probe extrahiert. Wegen der außerordentlichen klinischen Relevanz, ist es wichtig, die Probe möglichst rasch auf *M. tuberculosis* und andere Mitglieder des *M. tuberculosis* complex hin zu überprüfen. Ein positives Ergebnis der *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR (Abb. 3.5) identifiziert den Komplex und schließt differenzialdiagnostisch alle anderen Mykobakterien Spezies aus. Der PCR liegt ein Polymorphismus der *GyraseB* zugrunde (22, 37). Das *GyraseB*-Gen besitzt Regionen, die nicht nur spezifisch für alle Taxa des *M. tuberculosis* complex sind, sondern auch für einzelne Spezies. So amplifizieren die Primer der *M. tuberculosis gyrB* PCR (Abb. 3.6) selektiv *M. tuberculosis* und *M. africanum* Subtyp II⁹. Auch der Verdau des PCR-Produkts der *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR mit Hilfe der Restriktionsenzyme *RsaI* und *SacII* macht sich der Artspezifität der *gyrB* zunutze. Nach Ausschluss von *M. tuberculosis* und *M. africanum* Subtyp II beantwortet der *RsaI*-Verdau anhand der Größe der Restriktionsfragmente die Frage nach *M. africanum* Subtyp I, *M. microti* und *M. bovis*.

Handelt es sich bei der Probe um *M. bovis*, so können die Stämme mit dem Verdau des *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR-Produkts durch das Restriktionsenzym *SacII* in Pyrazinamid (PZA)-suszeptible Isolate („*M. bovis*“ ssp. *caprae*) und Pyrazinamid-resistente eingeteilt werden (Abb. 4.2).

Abb. 4.1 Algorithmus zur molekularen Differenzierung des Genus *Mycobacterium*. Nach DNA-Extraktion und *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR kann festgestellt werden, ob es sich bei der untersuchten Mykobakterien-Probe um ein Mitglied des *M. tuberculosis* complex handelt. Die Differenzierung des *M. tuberculosis* complex geschieht wie folgt: Mit der *M. tuberculosis gyrB* PCR können *M. tuberculosis/M. africanum* Subtyp II identifiziert werden. Nach *RsaI*-Verdau des *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR-Produkts lassen sich *M. africanum* Subtyp I, *M. microti* und *M. bovis* voneinander unterscheiden. Weitere Differenzierung von *M. bovis* siehe Abb. 4.2. Bei Isolaten, die nicht dem *M. tuberculosis* complex angehören, findet eine weitere Charakterisierung durch die 5'-16S-rDNA statt. Sollte damit noch keine eindeutige Bestimmung der Spezies möglich sein, so muss eine Sequenzanalyse der ITS-Region oder eine IS-PCR angeschlossen werden (Abb. 4.3). *Siehe nächste Seite*.

⁹ Der Subtyp II ist eine Variante von *M. africanum*, die v.a. endemisch in Ostafrika anzutreffen und TCH resistent ist. Subtyp I ist in Westafrika verbreitet und TCH suszeptibel (37).

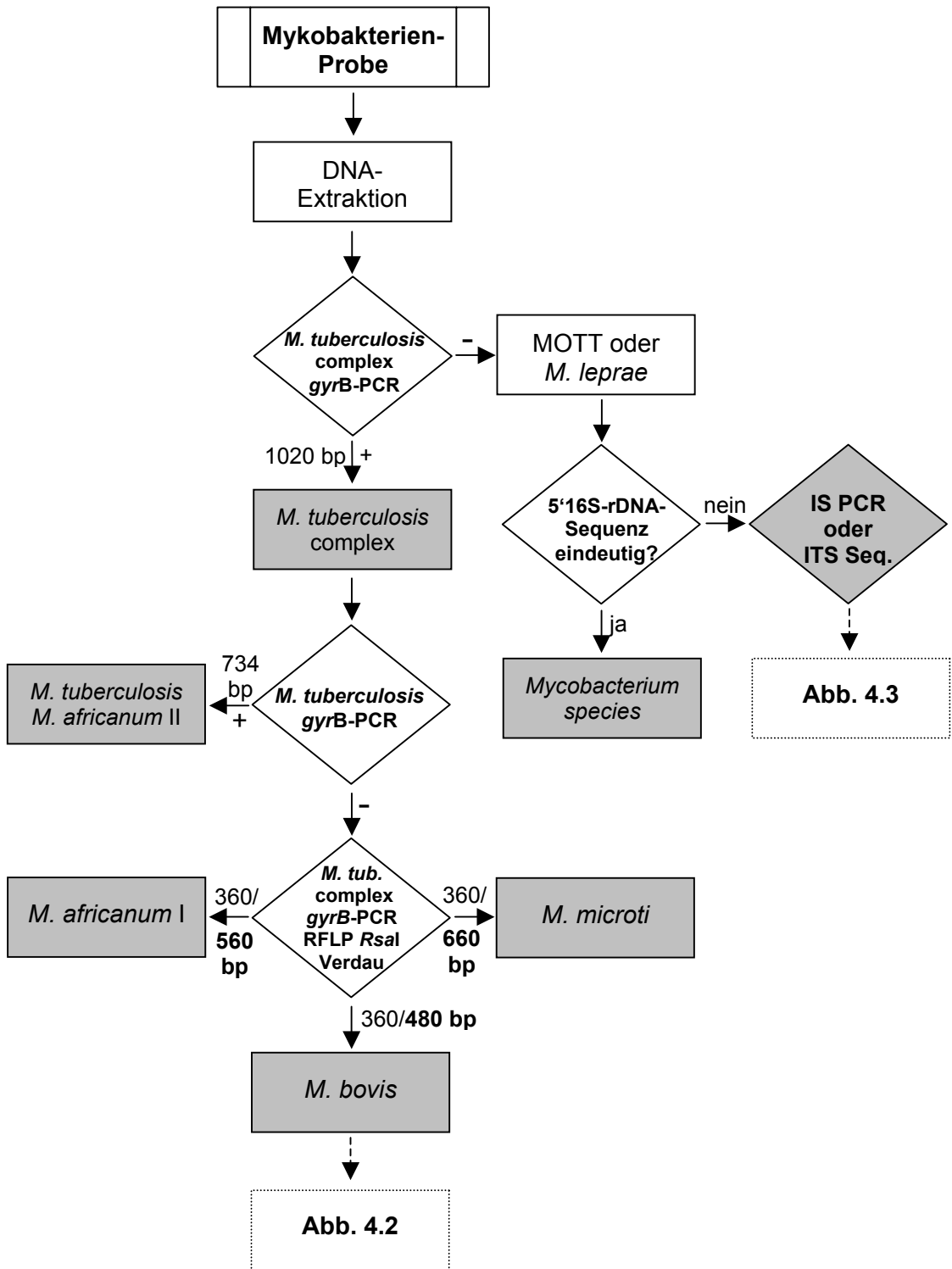


Abb. 4.2. Algorithmus zur molekularen Differenzierung von *M. bovis*. Durch *RsaI*-Verdau des *M. tuberculosis* complex *gyrB* PCR-Produkts lassen sich Pyrazinamid (PZA) resistente und suszeptible Stämme von *M. bovis* unterscheiden. PZA suszeptible Isolate werden als „*M. bovis*“ ssp. *caprae* bezeichnet (2, 38). In der *M. bovis* RD1 multiplex PCR erfolgt die Differenzierung der resistenten Biovarianten in *M. bovis*-Wildstamm und in den Impfstamm *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG).

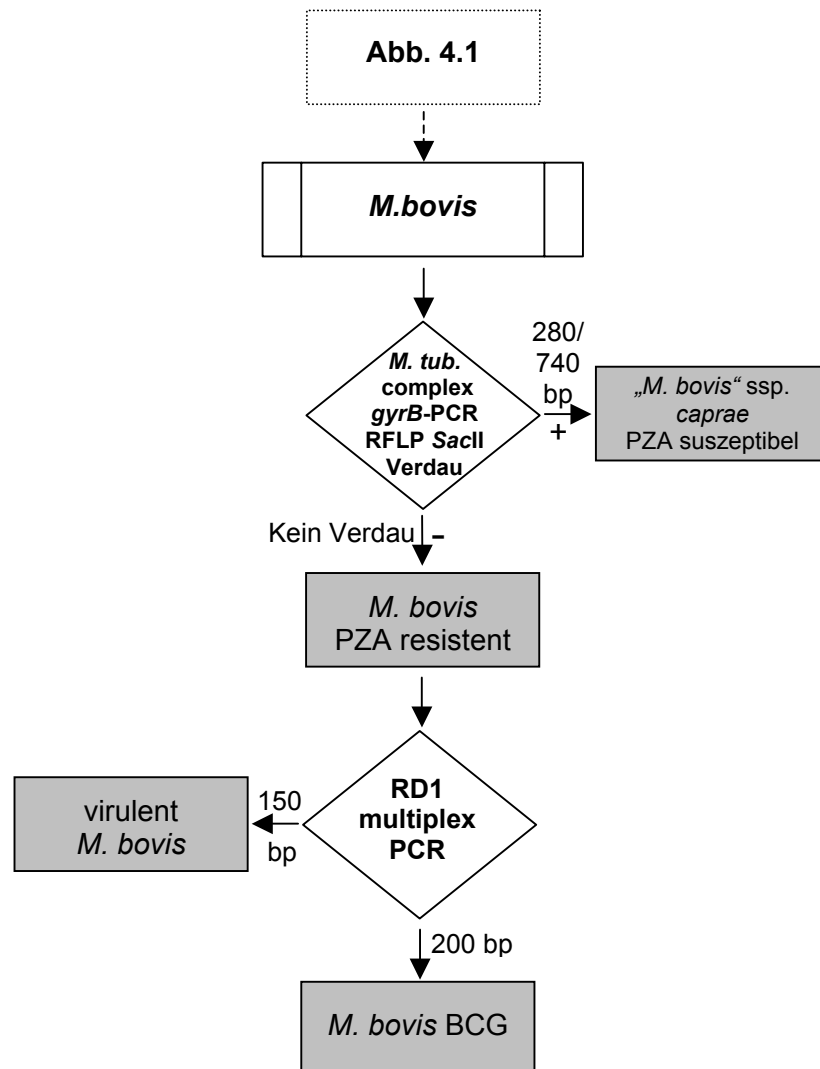
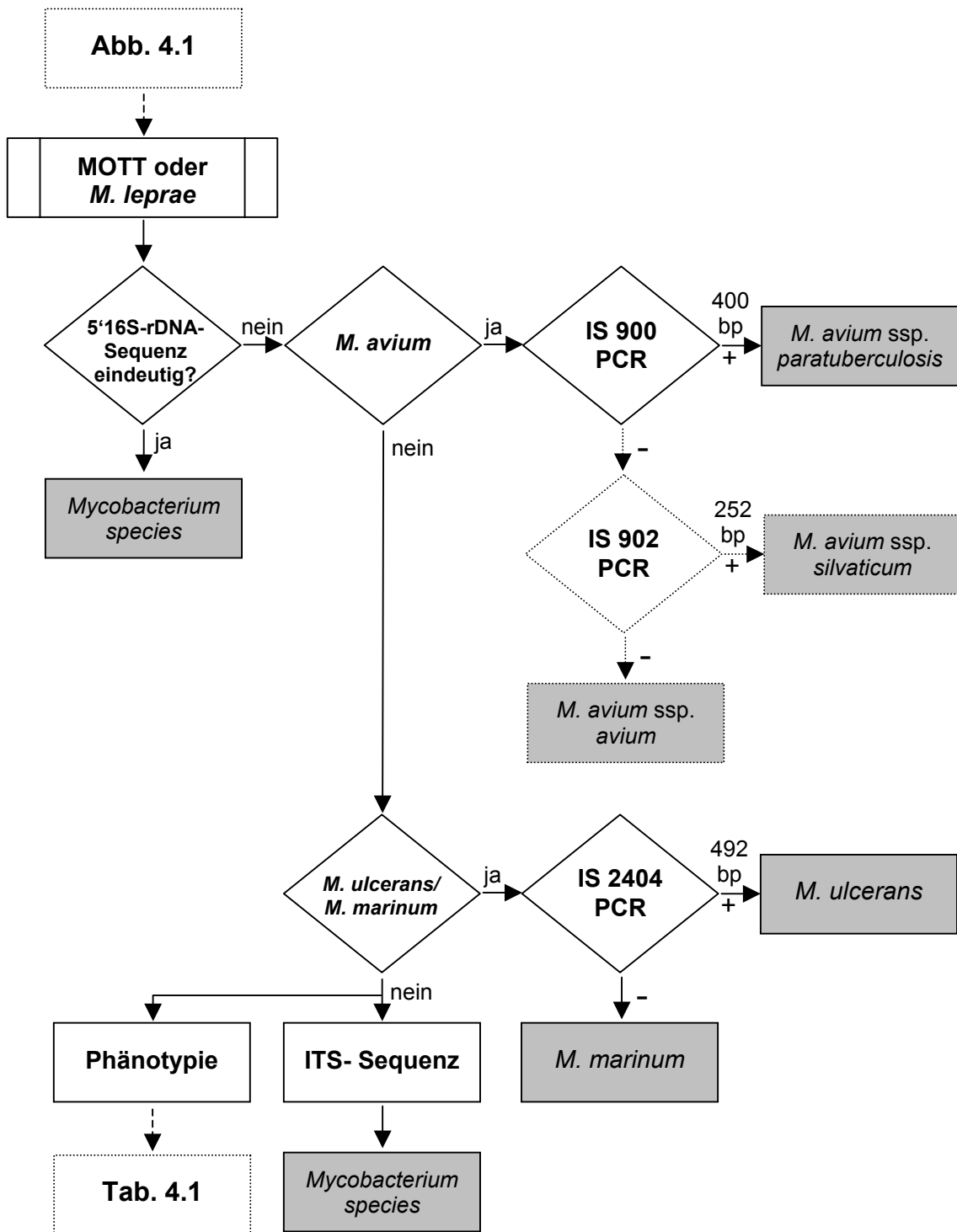


Abb. 4.3. Algorithmus zur molekularen Differenzierung der „Mycobacteria other than tubercle bacilli“ – MOTT und *M. leprae*. Gibt die 5'16S-rDNA Sequenz der zu bestimmenden Probe keinen eindeutigen Hinweis auf eine Spezies bzw. Subspezies, ist eine Eingrenzung des Taxons anhand der ITS-Sequenz möglich. Ausnahmen bilden lediglich die Subspezies von *M. avium* und die Spezies *M. ulcerans* und *M. marinum*, sie können aber mit Hilfe von Insertions-PCRs unterschieden werden. Die *M. avium* ssp. *silvaticum* IS 902 PCR wurde nicht überprüft. Siehe nächste Seite.



Zu letzteren gehören auch der *M. bovis* Wildtyp und der attenuierten Impfstamm *Bacillus-Calmette-Guérin* (BCG). Bei Immungeschwächten mit zellulärer Immundefizienz kann der BCG-Stamm ein der Tuberkulose ähnliches Krankheitsbild auslösen. Eine Differenzierung bis zur Subspezies-Ebene gewinnt dadurch nicht nur klinische sondern auch versicherungsrechtliche Bedeutung (57). Mit der RD1 multiplex PCR gelingt eine Unterscheidung beider *M. bovis* Varianten. Die PCR macht sich das Fehlen der RD1-Fragments im Genom des BCG-Stamms zunutze (Abb. 3.7).

Konnte durch die *M. tuberculosis* complex *gyrB*-PCR der *M. tuberculosis* complex ausgeschlossen werden, handelt es sich bei der Probe um ein „Mycobacteria other than tubercle bacilli“ oder *M. leprae*. In der überwiegenden Zahl dieser Fälle kann die vergleichende 5'-16S-rDNA-Sequenzanalyse zu einer Identifizierung des Erregers führen. Läßt sich hingegen anhand der 5'-16S-Nukleotidfolge nicht eindeutig auf ein Taxon schließen, führt eine ITS-Sequenzanalyse zum Ziel (Abb. 4.3, Tab. 4.1). Ausnahmen bilden lediglich die *M. avium* Varianten, sowie *M. ulcerans* und *M. marinum*, sie besitzen identische ITS-Sequenzen, können aber mit Insertions-PCRs identifiziert werden.

Moss et al. wiesen in zweien der drei *M. avium* Subspezies Multikopie-DNA-Insertionselemente nach, anhand derer die Taxa unterschieden werden können. *M. avium* ssp. *paratuberculosis* besitzt das Element IS 900. Das Insertionselement IS 902¹⁰ ist bei der Infraspesies *silvaticum* nachzuweisen. Die *M. avium* ssp. *paratuberculosis* PCR wurde bestätigt (Abb. 3.9) (34, 51).

Auf analoge Weise können auch *M. ulcerans* und *M. marinum* voneinander unterschieden werden. In der *M. ulcerans* IS 2404 PCR wurde nach den Angaben von Stinear die Existenz des Insertionselement IS 2404 nachgewiesen, das in *M. marinum* fehlt (Abb. 3.8) (56).

Auf beschriebene Weise ist mit wenigen Schritten eine schnelle Differenzierung des *M. tuberculosis* complex, sowie sämtlicher anderer Spezies und Subspezies des Genus *Mycobacterium* möglich.

¹⁰ Die *M. avium* ssp. *silvaticum* IS 902 PCR ist bei allen humanpathogenen Stämmen von *M. avium* ssp. *avium* negativ, allerdings sind die meisten Schweineisolate (Serovar 2) und einige Tierisolate der Serovaren 1 und 3 falsch positiv (34).

Tab. 4.1. Gruppen von Taxa des Genus *Mycobacterium* mit identischer 5'-16S-rDNA-Sequenz und unterschiedlicher (oben) bzw. identischer (unten) ITS-Region.

Spezies	Phänotypie
<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i>	Toleranz von 5% NaCl + Toleranz von 5% NaCl -
<i>M. farcinogenes</i> <i>M. fortuitum</i> 3 rd biovariant complex (Sorbitol +) <i>M. senegalense</i>	langsamwachsend, Pigmentierung +, Nitrat Reduktion + schnellwachsend, Pigmentierung -, Nitrat Reduktion + schnellwachsend, Pigmentierung -, Nitrat Reduktion -
<i>M. flavescens</i> sequevar II <i>M. novocastrense</i>	Tween Hydrolyse + Tween Hydrolyse -
<i>M. fortuitum</i> ssp. acetamidolyticum <i>M. fortuitum</i> ssp. <i>fortuitum</i>	Acetamid (als einzige C- und N-Quelle) + Acetamid (als einzige C- und N-Quelle) -
<i>M. fortuitum</i> 3 rd biovariant complex (Sorbitol -) <i>M. porcinum</i>	Nitrat Reduktion + Nitrat Reduktion -
<i>M. gastri</i> <i>M. kansasii</i> Sequevar I und IV	nonchromogen, Nitrat Reduktion - photochromogen, Nitrat Reduktion +
<i>M. murale</i> <i>M. tokaiense</i>	Katalase + Katalase -
<i>M. peregrinum</i> <i>M. septicum</i>	Arylsulfatase nach 3 Tagen + Arylsulfatase nach 3 Tagen -
<i>M. africanum</i>	mikroaerophiles Wachstum (Lebek-medium), PZA +, Farbwechsel (Bromcresol Medium) -
<i>M. bovis</i>	mikroaerophiles Wachstum (Lebek-medium), Nitrat Reduktion -, Niacin -, TCH -, PZA - Farbwechsel (Bromcresol Medium) -
„ <i>M. bovis</i> “ ssp. <i>caprae</i>	mikroaerophiles Wachstum (Lebek-medium), Nitrat Reduktion -, Niacin -, TCH -, PZA + Farbwechsel (Bromcresol Medium) -
<i>M. microti</i>	mikroaerophiles Wachstum (Lebek-medium), TCH -, PZA +
<i>M. tuberculosis</i>	aerophiles Wachstum (Lebek-medium), Nitrat Reduktion +, Niacin +, TCH +, PZA + Farbwechsel (Bromcresol Medium) +
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> <i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> <i>M. avium</i> ssp. <i>silvaticum</i>	Wachstum auf Eier-Medium + Wachstum auf Eier-Medium - Wachstum auf Eier-Medium (Mycobactin-Zusatz) +
<i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i>	photochromogen, Tween Hydrolyse + , Arylsulfatase + nonchromogen, Tween Hydrolyse - , Arylsulfatase -

Eine Ausnahme bildet lediglich *M. tuberculosis* und *M. africanum* Subtyp II, die aber durch phänotypische Testverfahren voneinander unterschieden werden können. Subkultivierung von *M. tuberculosis* auf Bromcresol Medium führt im

Gegensatz zu *M. africanum* Subtyp II zu einem Farbwechsel. Auf Lebek Medium zeigt *M. tuberculosis* aerophiles, das *M. africanum*-Isolat hingegen mikroaerophiles Wachstum (38). Auch all diejenigen Taxa, die im Algorithmus über die vergleichende ITS-Sequenzanalyse identifiziert werden, können über herkömmliche phänotypische Verfahren (Tab. 4.1) oder ITS-PCR RFLP unterschieden werden (49). Gerade der ITS-PCR RFLP ist im Vergleich zur Sequenzanalyse preiswerter als auch einfacher anzuwenden, da er auf die (noch) teuren Sequenzierautomaten verzichtet. Die zunehmende Verbreitung dieser Geräte in den klinischen Labors wird zu einer weiteren Kostenreduzierung der Sequenzidentifizierung von Mikroorganismen führen. Dies lässt die genotypische Diagnostik v.a. wegen ihrer schnellen Durchführbarkeit und hohen Präzision zu einer ernstzunehmenden Konkurrenz der bisherigen phänotypischen Testverfahren werden und wird diese immer mehr aus den Routinelabors verdrängen. Sammlungen hochwertiger Sequenzen können zudem Voraussetzung für die Entwicklung von diagnostischen „Microchips“ sein, die langfristig auch in der Routinediagnostik Einzug halten dürften (60).

5 Zusammenfassung

Mykobakterien sind langsamwachsende, säurefeste und aerobe Stäbchenbakterien. Eine phänotypische Differenzierung ist deshalb langwierig. Molekularbiologische Diagnoseverfahren, wie die vergleichende Sequenzanalyse, erlauben hingegen eine schnelle Identifizierung.

Daher wurde von 125 Mykobakterien-Isolaten die ribosomale 5'-16S-rDNA (*E. coli* Position 54 bis 510) und von 45 Stämmen die „Internal Transcribed Spacer“ Region (ITS) untersucht. Es wurden alle 89 validen Taxa des Genus unter Verwendung von 86 der 87 verfügbaren Typstämme berücksichtigt. Zur Qualitätskontrolle der öffentlichen Sequenzdatenbank GenBank wurden die analysierten 5'-16S-rDNA Sequenzen mit GenBank-Einträgen identischer Stämme (n=77) aus den Jahren 1989-2000 verglichen. Im Zeitraum 1989-93 betrug der mittlere Basenunterschied 6,52 hingegen von 1994-2000 nur 1,36. Es bestand eine signifikante negative Korrelation zwischen dem mittleren Basenunterschied und dem Jahr des Sequenzeintrags ($\rho = -0,56$; $p < 0,0001$).

Mittels 5'-16S-rDNA-Sequenzanalyse war es möglich 64 der 89 validen Mykobakterien-Taxa (71,9%) zu diagnostizieren. Durch Hinzunahme der ITS-Analyseergebnisse ließen sich weitere 15 Spezies, d.h. insgesamt 79 der 89 Taxa (88,8%) differenzieren. Dazu gehörten: *M. abscessus* und *M. chelonae*; *M. gastri* und *M. kansasii*; *M. farcinogenes*, *M. fortuitum* 3rd biovariant (Sorbitol +) und *M. senegalense*; *M. flavescens* und *M. novocastrense*; *M. fortuitum* ssp. *acetamidolyticum* und ssp. *fortuitum*; *M. fortuitum* 3rd biovariant (Sorbitol -) und *M. porcinum*; *M. murale* und *M. tokaiense*; *M. peregrinum* und *M. septicum*. Die verbleibenden Spezies konnten mittels weiterer molekularer Techniken unterschieden werden. So war eine Identifizierung und Differenzierung des *M. tuberculosis* complex möglich durch *GyraseB*-Gen PCRs und evtl. anschließender RFLP-Analyse. Lediglich *M. tuberculosis* und *M. africanum* Subtyp II ließen sich untereinander nicht differenzieren. Anhand des genomischen Fragments RD1 konnte *M. bovis* weiter in Wildtyp und BCG-Typ eingeteilt werden. Die Subspezies von *M. avium* wurden mittels Insertionselements-PCRs (IS 900 und IS 902) identifiziert. Ebenfalls durch den Nachweis eines Insertionselementes (IS 2404) ließen sich *M. marinum* und *M. ulcerans* differenzieren.

6 Literaturverzeichnis

1. **Alcaide, F., I. Richter, C. Bernasconi, B. Springer, C. Hagenau, R. Schulze-Robbecke, E. Tortoli, R. Martin, E.C. Böttger, and A. Telenti.** 1997. Heterogeneity and clonality among isolates of *Mycobacterium kansasii*: implications for epidemiological and pathogenicity studies. *J.Clin.Microbiol.* **35**:1959-1964.
2. **Aranaz, A., E. Liébana, E. Gómez-Mampaso, J.C. Galán, D. Cousins, A. Ortega, J. Blázquez, J. Baquero, A. Mateos, G. Suárez, and L. Domínguez.** 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **49**:1263-1273.
3. **Benson, D.A., I. Karsch-Mizrachi, D.J. Lipman, J. Ostell, B.A. Rapp, and D.L. Wheeler.** 2000. GenBank. *Nucleic.Acids.Res.* **28**:15-18.
4. **Bernard, P. and M. Couturier.** 1992. Cell killing by the F Plasmid CcdB Protein involves poisoning of DNA-Topoisomerase II complexes. *J.Mol.Biol.* **226**:735-745.
5. **Böddinghaus, B., J. Wolters, W. Heikens, and E.C. Böttger.** 1990. Phylogenetic analysis and identification of different serovars of *Mycobacterium intracellulare* at the molecular level. *FEMS Microbiol.Lett.* **70**:197-204.
6. **Böttger, E.C.** 1989. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiol.Lett.* **65**:171-176.
7. **Böttger, E.C.** 1991. Systematik, Differenzierung und Nachweis von bakteriellen Infektionserregern - die Familie *Mycobacteriaceae*. *Immun.Infekt.* **19**:143-152.
8. **Chamoiseau, G.** 1979. Etiology of farcy in African bovines: nomenclature of the causal organisms. *Mycobacterium farcinogenes* Chamoiseau and *Mycobacterium senegalense* (Chamoiseau) comb. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **29**:407-410.
9. **Cleveland, W.S.** 1979. Robust locally weight regression and smoothing scatterplots. *J.Am.Statistic.Assoc.* **74**:829-836.

10. **Council for International Organizations of Medical Sciences.** 1985. International nomenclature of diseases. Volume II - Infectious diseases. Council for International Organizations of Medical Sciences, Geneva, Switzerland.
11. **Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.** 2000. Bacterial Nomenclature up-to-date - a service provided by the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm> (letzter Zugriff: 28.07.2000).
12. **Dostal, S., E. Richter, and D. Harmsen.** 2000. Concise guide to Mycobacteria and their molecular differentiation. Distributed by the authors, University of Würzburg (Germany), Würzburg.
13. **Eisenstadt, J., G.S. Hall, S.M. Gibson and D.F. Dunbar.** 1995. *Mycobacterium tuberculosis* and other nontuberculous mycobacteria. p. 636-676. In C.R. Mahon and G. Manuselis. (ed.), Textbook of Diagnostic Microbiology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA.
14. **Fredricks, D.N. and D.A. Relman.** 1996. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin.Microbiol.Rev.* **9**:18-33.
15. **Frothingham, R., H.G. Hills, and K.H. Wilson.** 1994. Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J.Clin.Microbiol.* **32**:1639-1643.
16. **Frothingham, R. and K.H. Wilson.** 1993. Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. *J.Bacteriol.* **175**:2818-2825.
17. **Frothingham, R. and K.H. Wilson.** 1994. Molecular phylogeny of the *Mycobacterium avium* complex demonstrates clinically meaningful divisions. *Infect.Dis.* **169**:305-312.
18. **Haney, P.E., B.A. Raymond, J.M. Hernandez, S. Seeman, and A.J. Berry.** 1996. Tuberculosis makes a comeback. *AORN J.* **63**:705-715.
19. **Harmsen, D., J. Rothgänger, J. Albert and M. Frosch.** 2000. Ribosomal differentiation of medical micro-organisms (RIDOM). <http://www.ridom.hygiene.uni-wuerzburg.de/> (letzter Zugriff: 28.07.2000).

20. **Harmsen, D., J. Rothgänger, C. Singer, J. Albert, and M. Frosch.** 1999. Intuitive hypertext-based molecular identification of micro-organisms. *Lancet* **353**:291.
21. **Ji, Y.E., M.J. Colston, and R.A. Cox.** 1994. Nucleotide sequence and secondary structures of precursor 16S rRNA of slow-growing mycobacteria. *Microbiology* **140**:123-132.
22. **Kasai, H., T. Ezaki, and S. Harayama.** 2000. Differentiation of phylogenetically related slowly growing Mycobacteria by their *gyrB* sequences. *J.Clin.Microbiol.* **38**:301-308.
23. **Kirkwood, B.R.** 1988. Non-parametric Methods. p. 147-152. Medical Statistics. Blackwell, Oxford.
24. **Kirschner, P. and E.C. Böttger.** 1992. Microheterogeneity within rRNA of *Mycobacterium gordonae*. *J.Clin.Microbiol.* **30**:1049-1050.
25. **Kirschner, P. and E.C. Böttger.** 1998. Species identification of mycobacteria using rDNA sequencing. *Methods Mol.Biol.* **101**:349-361.
26. **Kirschner, P., B. Springer, U. Vogel, A. Meier, A. Wrede, M. Kiekenbeck, F.C. Bange, and E.C. Böttger.** 1993. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J.Clin.Microbiol.* **31**:2882-2889.
27. **Koch, R.** 1882. Die Aetiologie der Tuberculose. *Berliner klin.Wochnschr.* **19**:221-230.
28. **Koch, R.** 1890. Über bakteriologische Forschung. Verhandlung des X. Internationalen Medicinischen Congresses, Berlin, 1890, Hirschwald, Berlin. *Xth International Congress of Medicine*, Berlin.
29. **Lehmann, K.B. and R. Neumann.** 1896. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik. p. 1-448. J.F. Lehmann, München.
30. **Luquin, M., V. Ausina, V. Vincent-Lévy-Frébault, M.A. Laneelle, F. Belda, M. García-Barceló, G. Prats, and M. Daffé.** 1993. *Mycobacterium brumae* sp. nov., a rapidly growing, nonphotochromogenic mycobacterium. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **43**:405-413.

31. **Maidak, B.L., G.J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M.J. McCaughey, and C.R. Woese.** 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* **25**:109-110.
32. **Master, R.M.** 1992. Mycobacteriology. Chapter 3.5. In H.D. Isenberg. (ed.), *Clinical Microbiology Procedure Handbook*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
33. **Metchock, B.G., F.S. Nolte and R.J. Wallace.** 1999. *Mycobacterium*. p. 399-427. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover. (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C.
34. **Moss, M.T., J.D. Sanderson, M.L. Tizard, J. Hermon-Taylor, F.A. el Zaatari, D.C. Markesich, and D.Y. Graham.** 1992. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp silvaticum in long term cultures from Crohn's disease and control tissues. *Gut* **33**:1209-1213.
35. **National Library of Medicine.** 2000. NLM-MeSH tree Structures - Category C. Diseases. <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html> (letzter Zugriff: 28.07.2000).
36. **National Library of Medicine.** 2000. PubMed. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi> (letzter Zugriff: 28.07.2000).
37. **Niemann, S., D. Harmsen, S. Rüscher-Gerdes, and E. Richter.** 2000. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J.Clin.Microbiol.* **38**:3231-3234.
38. **Niemann, S., E. Richter, and S. Rüscher-Gerdes.** 2000. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *J.Clin.Microbiol.* **38**:152-157.
39. **Olsen, G.J., C.R. Woese, and R. Overbeek.** 1994. The winds of (evolutionary) change: Breathing new life into microbiology. *J.Bacteriol.* **176**:1-6.

40. **Padgitt, P.J. and S.E. Moshier.** 1987. *Mycobacterium poriferae* sp. nov., a scotochromogenic, rapidly growing species isolated from a marine sponge. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **37**:186-191.
41. **Patel, J.B., D.G.B. Leonard, X. Pan, J.M. Musser, R.E. Berman, and I. Nachamkin.** 2000. Sequence-based identification of *Mycobacterium species* using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. *J.Clin.Microbiol.* **38**:246-251.
42. **Picardeau, M., G. Prod'Hom, L. Raskine, M.P. LePennec, and V. Vincent.** 1997. Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J.Clin.Microbiol.* **35**:25-32.
43. **Pitulle, C., M. Dorsch, J. Kazda, J. Wolters, and E. Stackebrandt.** 1992. Phylogeny of rapidly growing members of the genus *Mycobacterium*. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **42**:337-343.
44. **Portaels, F., P.-A. Fonteyne, H. de Beenhouwer, P. de Rijk, A. Guedenon, J. Hayman, and M.W. Meyers.** 1996. Variability in 3' end of 16S rRNA sequence of *Mycobacterium ulcerans* is related to geographic origin of isolates. *J.Clin.Microbiol.* **34**:962-965.
45. **Richter, E., S. Niemann, S. Rüsç-Gerdes, and S. Hoffner.** 1999. Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (AccuProbe) and molecular techniques. *J.Clin.Microbiol.* **37**:964-970.
46. **Rogall, T., T. Flohr, and E.C. Böttger.** 1990. Differentiation of *Mycobacterium species* by direct sequencing of amplified DNA. *J.Gen.Microbiol.* **136**:1915-1920.
47. **Rogall, T., J. Wolters, T. Flohr, and E.C. Böttger.** 1990. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **40**:323-330.
48. **Roth, A., M. Fischer, M.E. Hamid, S. Michalke, W. Ludwig, and H. Mauch.** 1998. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J.Clin.Microbiol.* **36**:139-147.

49. **Roth, A., U. Reischl, A. Streubel, L. Naumann, R.M. Kroppenstedt, M. Habicht, M. Fischer, and H. Mauch.** 2000. Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *J.Clin.Microbiol.* **38**:1094-1104.
50. **Saitou, N. and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol.Biol.Evol.* **4**:406-425.
51. **Sanderson, J.D., M.T. Moss, M.L. Tizard, and J. Hermon-Taylor.** 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* **1992**:890-896.
52. **Singer, C.** 2000. Molekulare Differenzierung von *Neisseriaceae* and *Moraxellaceae*. Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg (Dissertation in Vorbereitung).
53. **Springer, B., E.C. Böttger, P. Kirschner, and R.J. Wallace, Jr.** 1995. Phylogeny of the *Mycobacterium chelonae*-like organism based on partial sequencing of the 16S rRNA gene and proposal of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **45**:262-267.
54. **Stackebrandt, E. and J. Smida.** 1988. The phylogeny of the genus *Mycobacterium* as determined by 16S rRNA sequences, and development of DNA probes. p. 244-250. In *Biology of actinomycetes*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
55. **Stahl, D.A. and J.W. Urbance.** 1990. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J.Bacteriol.* **172**:116-124.
56. **Stinear, T., B.C. Ross, J.K. Davies, L. Marino, R.M. Robins-Browne, F. Oppedisano, A. Sievers, and P.D.R. Johnson.** 1999. Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of *Mycobacterium ulcerans* by PCR. *J.Clin.Microbiol.* **37**:1018-1023.
57. **Talbot, E.A., D.L. Williams, and R. Frothingham.** 1997. PCR Identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J.Clin.Microbiol.* **35**:566-569.

58. **Torkko, P., M. Suutari, S. Suomalainen, L. Paulin, L. Larsson, and M.L. Katila.** 1998. Separation among species of *Mycobacterium terrae* complex by lipid analyses: comparison with biochemical tests and 16S rRNA sequencing. *J.Clin.Microbiol.* **36**:499-505.
59. **Tortoli, E., R.M. Kroppenstedt, A. Bartolini, G. Caroli, I. Jan, J. Pawlowski, and S. Emler.** 1999. *Mycobacterium tusciae* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **49**:1839-1844.
60. **Troesch, A., H. Nguyen, C.G. Miyada, S. Desvarenne, T.R. Gingeras, P.M. Kaplan, P. Cros, and C. Mabilat.** 1999. *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J.Clin.Microbiol.* **37**:49-55.
61. **Turenne, C.Y., L. Tschetter, J. Wolfe, and A. Kabani.** 2001. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: Identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J.Clin.Microbiol.* **39**:3637-3648.
62. **van de Peer, Y., J. Jansen, P. de Rijk, and R. de Wachter.** 1997. Database on the structure of small ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Res.* **25**:111-116.
63. **van der Giessen, J.W., R.M. Haring, and B.A. van der Zeijst.** 1994. Comparison of the 23S ribosomal RNA genes and the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes of the closely related *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* and the fast-growing *Mycobacterium phlei*. *Microbiology* **140**:1103-1108.
64. **van Embden, J.D.A., M.D. Cave, J.T. Crawford, J.W. Dale, K.D. Eisenach, B. Giquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T.M. Shinnick, and P.M. Small.** 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *J.Clin.Microbiol.* **31**:406-409.
65. **Wayne, L.G. and G.P. Kubica.** 1986. The Mycobacteria. p. 1435-1457. In J.G. Holt, P.H. Sneath, N.S. Mair, and M.E. Sharpe. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
66. **Woese, C.R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol.Rev.* **51**:221-271.

67. **World Health Organization.** 1994. International statistical classification of diseases and related health problems - 10th revision. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
68. **World Health Organization.** 2000. Global Tuberculosis Control WHO Report 2000. <http://www.who.int/gtb/> (letzter Zugriff: 28.07.2000).
69. **World Health Organization.** 2000. WHO Leprosy Info. <http://www.who.int/lep/> (letzter Zugriff: 28.07.2000).

7 Abkürzungsverzeichnis

16S-rDNA	ribosomale 16S-DNA
23S-rDNA	ribosomale 23S-DNA
5'-16S-rDNA	5'-16S ribosomale Desoxiribonucleid Acid
AHI	Armauer Hansen Institut, Würzburg
ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Bacillus Calmette Guérin
Bo	Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien, Forschungsinstitut Borstel
bp	Basenpaar
CIP	La Collection de l'Institut Pasteur, Paris
CTAB	N-cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
ddNTPs	Didesoxynukleotide
dNTPs	Desoxynukleotide
DNA	Desoxiribonucleid Acid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>gyrB</i>	<i>GyraseB</i> -Gen
ITS	Internal Transcribed Spacer
LRC	Leprosy Research Center, Tokyo
MAC	<i>M. avium-M. intracellulare</i> complex
MeSH	Medical Subject Headings
MOTT	Mycobacteria other than tubercle bacilli
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
NIH	National Institutes of Health, Bethesda, USA
NLM	National Library of Medicine, Bethesda, USA
Paris	Laboratoire de Reference des Mycobacteries, Institut Pasteur, Paris
PCR	Polymerase Chain Reaction
PZA	Pyrazinamid

rDNA	ribosomale Desoxiribonucleid Acid
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIDOM	Ribosomal Differentiation of Medical Micro-organisms
RIS	Research Information Systems
RNA	Ribonucleid Acid
SQL	Structured Query Language
TB	Tuberkulose
TBE	Tris-Borsäure, EDTA
TCH	Thiophene-2carboxylic acid hydrazide
TE	Tris-HCl, EDTA
VBA	Visual Basic for Applications
WHO	World Health Organisation
Wue	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg
WWW	World Wide Web

8 Index

- Bacillus Calmette Guérin** Siehe *M. bovis*
BCG
- BCG Siehe *M. bovis* BCG
- M. abscessus** 27, 28, 39, 51
- M. africanum* 2, 27, 29, 39
Subtyp I 18, 32, 44
Subtyp II 17, 31, 44, 49, 51
- M. avium* 19, 27, 39, 43, 46, 48, 51
M. avium-intracellulare complex 2, 34
Mikroheterogenität 40
ssp. *avium* 29, 35, 39, 48
ssp. *paratuberculosis* 5, 13, 19, 29, 34, 35, 39, 48
ssp. *silvaticum* 29, 35, 48
- M. avium* ssp. *paratuberculosis* IS 900 PCR 8, 19, 34, 35, 48
- M. avium* ssp. *silvaticum* IS 902 PCR 46, 48
- M. bovis** 2, 5, 18, 27, 29, 39, 44, 46
BCG 18, 33, 46, 48, 51
PZA-resistent 18, 32, 44, 46
PZA-suszeptibel Siehe *M. bovis* ssp. *caprae*
ssp. *caprae* 18, 27, 29, 30, 32, 44, 46
Wildstamm 18, 33, 46, 48
- M. bovis* BCG RD1 multiplex PCR 8, 18, 32, 33, 46
- M. brumae* 23, 42
- M. celatum** 23
- M. chelonae* 27, 28, 39, 51
- M. cookii* 23, 24, 42
- M. duvalii** 27, 43
- M. farcinogenes** 23, 27, 28, 39, 42, 51
- M. flavescens* 27, 28, 39, 43, 51
- M. fortuitum*
3rd biovariant complex (Sorbitol -) 27, 28, 39, 51
3rd biovariant complex (Sorbitol +) 27, 28, 39, 51
Mikroheterogenität 41
ssp. *acetamidolyticum* 27, 28, 39, 51
ssp. *fortuitum* 15, 27, 28, 39, 51
- M. gastri** 27, 28, 39, 51
- M. genavense* 9, 23
- M. gordonae* 27
Mikroheterogenität 41
- M. haemophilum** 13, 27, 43
- M. hiberniae* 23, 42
- M. intermedium** 26
- M. intracellulare* 2, 35
Mikroheterogenität 40
- M. kansasii** 27, 28, 39, 51
Mikroheterogenität 40
- M. lentiflavum** 24
- M. leprae* 2, 3, 9, 23, 30, 46, 48
- M. lepraemurium* 9, 23
- M. madagascariense** 27, 43
- M. marinum* 19, 27, 29, 34, 40, 43, 46, 48, 51
- M. microti* 2, 18, 27, 29, 32, 39, 44
- M. murale* 27, 28, 39, 51
- M. nonchromogenicum** 23, 42
- M. novocastrense* 27, 28, 39, 51
- M. peregrinum** 27, 28, 39, 51
Mikroheterogenität 41
- M. phlei* 43
- M. porcinum* 27, 28, 39, 51
- M. poriferae* 23, 42
- M. pulveris* 26
- M. senegalense** 27, 28, 39, 51
- M. septicum* 24, 27, 28, 39, 51
- M. smegmatis* 43
- M. terrae** 23, 42
Mikroheterogenität 41
- M. thermoresistibile* 43

M. tokaiense 27, 28, 39, 51
M. tuberculosis 1, 2, 17, 18, 24, 27, 29, 30,
 31, 32, 39, 44, 48, 49, 51
 complex 2, 17, 18, 27, 29, 30, 31, 33,
 39, 43, 48
 ssp. *caprae* Siehe *M. bovis* ssp. *caprae*
 ssp. *tuberculosis* Siehe *M. tuberculosis*
M. tuberculosis complex 31, 44, 51
M. tuberculosis complex gyrB PCR 8, 17,
 30, 31, 32, 44, 46
RsaI Verdau 18, 32, 44
SacII Verdau 18, 32, 44, 46
M. tuberculosis gyrB PCR 8, 17, 31, 32, 44
M. tusciae 23, 27, 42, 43
M. ulcerans 5, 19, 27, 29, 34, 40, 43, 46,
 48, 51
M. ulcerans IS 2404 PCR 8, 19, 34, 48
M. xenopi
 Mikroheterogenität 41
MAC Siehe *M. avium-intracellulare*
complex
 Mikroheterogenität 40
MOTT Siehe *Mycobacteria other than tu-*
bercle bacilli
Mycobacteria other than tubercle bacilli 2,
 30, 46, 48
Mycobacterium 1, 5, 9, 22, 23, 24, 26, 30,
 38, 39, 44, 48, 49

Danksagung

Diese Arbeit entstand als ein Teil des RIDOM-Projektes am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg und wurde 1999 begonnen.

Mein Dank gilt Prof. Dr. M. Frosch für die Genehmigung der Arbeit, Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die Übernahme des Referats.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Dr. D. Harmsen bedanken, der mir das Thema überließ und mich hervorragend während meiner Arbeit anleitete. Eine ebenso exzellente Unterstützung erfuhr ich von Fr. M. Bergmann in der technischen Ausführung der Arbeit. Auch ihr gilt mein herzlichster Dank. Ferner bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen des DNA- und TB-Labors des Instituts, bei Fr. S. Ebner, Fr. A. Hansen, Fr. M. Patzke-Öchsner und Fr. I. Ray, die mir stets hilfreich zur Seite standen.

Weiterhin danke ich Fr. Dr. G. Bretzel, Würzburg, Prof. Dr. Y. Kashiwabara, Tokyo, Fr. Dr. E. Richter, Borstel und Fr. Prof. Dr. V. Vincent, Paris für die Überlassung von Mykobakterien-Isolaten.

Lebenslauf

Stefan Dostal

geboren am 9. März 1974

in Regensburg, ledig

1980 – 1984	Besuch der Grundschule Prüfening in Regensburg
1984 – 1993	Besuch des Goethe-Gymnasiums in Regensburg
9. Juli 1993	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
November 1993 – September 1995	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg, Vorklinischer Abschnitt
Oktober 1995 – November 2001	Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg, Klinischer Abschnitt
2000-2001	Praktisches Jahr an den Universitäten
Oktober 2000 – Januar 2001	Medical University of Southern Africa - MEDUNSA, Pretoria, Südafrika
Februar – Mai 2001	Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, Brasilien
Juni – Oktober 2001	Schweizerisches Tropeninstitut, Basel
20. September 1995	Ärztliche Vorprüfung
29. August 1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
9. September 1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
29. November 2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Würzburg, Dezember 2001

Stefan Dostal