

Aus dem Institut für Pathologie
Klinikum München-Bogenhausen
Leiter: Prof. Dr. med. A. Nerlich

**Molekulare Untersuchungen zum Nachweis von
M. tuberculosis-Komplex und deren Subtypen an
Paraffin eingebetteten humanen und tierischen
Gewebeproben**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Isabelle Petit

aus

München

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Nerlich
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gisela Bretzel
Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2014

Inhaltsverzeichnis

Stammdifferenzierung der Mitglieder des <i>Mykobakterium tuberculosis</i>-Komplexes und <i>MOTTs</i> an Formalin-Fixierten Paraffin eingebetteten histologischen Schnitten von porcinen Proben aus der Veterinärmedizin und humanmedizinischen Proben mittels PCR und Spoligotyping.....	1
Inhaltsverzeichnis.....	3
1 Einleitung	7
1.1 Überblick Mykobakterien.....	7
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> und weitere Mitglieder des <i>Mycobacterium tuberculosis</i> – Komplexes.....	8
1.2.1 Geschichtlicher Hintergrund zur Tuberkulose.....	9
1.2.2 Pathologie der Tuberkulose.....	10
1.2.3 Diagnostik der Tuberkulose.....	12
1.2.4 Aktuelles zur Tuberkulose.....	14
1.2.5 <i>Mycobacterium bovis</i>	15
1.3 <i>MOTTs</i> - <i>Mycobacterium other than Tuberculosis</i>	16
1.3.1 <i>Mycobacterium avium</i> -Komplex.....	16
1.3.2 <i>Mycobacterium avium</i> - Geflügeltuberkulose.....	17
1.3.3 <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> - Paratuberkulose.....	17
1.3.4 Diagnostischer Möglichkeiten im Bereich der Veterinärmedizin.....	18
1.4 Fragestellung.....	19
2 Material	20
2.1 Probenmaterial.....	20
2.1.1 Gewebeproben von Patienten.....	20
2.1.2 Gewebeproben von Tieren.....	20
2.2 Verwendete Geräte.....	21
2.3 Einwegmaterialien und Hilfsmittel.....	22

2.4	<i>Chemikalien</i>	23
2.5	<i>Reagenzien und Enzyme</i>	25
2.6	<i>Standard-Lösungen und Puffer</i>	26
3	Methoden	28
3.1	<i>Paraffin-Schnitte</i>	28
3.2	<i>Färbungen</i>	29
3.2.1	HE-Färbung – Hämalaun-Eosin-Färbung	29
3.2.2	Ziehl-Neelsen-Färbung.....	30
3.3	<i>Histologische Beurteilung</i>	31
3.4	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion</i>	31
3.4.1	Allgemeines.....	31
3.4.2	PCR aus Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben.....	32
3.4.3	Maßnahmen zur Vermeidung von Kontamination	33
3.5	<i>DNA-Amplifikation</i>	33
3.5.1	Amplifikation von β -Aktin.....	33
3.5.2	Amplifikation von mykobakterieller DNA	35
3.5.3	zusätzliche Amplifikation bei den porcinen Proben.....	36
3.6	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	39
3.7	<i>Restriktionsenzymverdau</i>	40
3.8	<i>Spoligotyping</i>	41
3.8.1	Allgemeines.....	41
3.8.2	Spoligotyping der PCR-Produkte.....	42
4	Ergebnisse	45
4.1	<i>Diagnostische Ergebnisse der porcinen Proben</i>	45
4.1.1	Histologische Ergebnisse.....	45
4.1.2	Molekulargenetische Ergebnisse	47
4.2	<i>Diagnostische Ergebnisse der humanmedizinischen Proben</i>	50
4.2.1	Histologische Ergebnisse.....	51

4.2.2	Molekulargenetische Ergebnisse mittels PCR.....	53
4.2.3	Weitergehende Bestimmung der mykobakteriellen DNA mithilfe von Spoligotyping	54
5	Diskussion.....	57
5.1	<i>Einschränkungen der Analyse</i>	57
5.1.1	Maßnahmen zur Vermeidung von Kontamination	57
5.1.2	Polymerasekettenreaktion aus Formalin-fixierten Paraffinschnitten	58
5.1.3	Spoligotyping - Grenzen	59
5.2	<i>Diagnostische Ergebnisse bei porcinen Proben.....</i>	59
5.2.1	Histologische Untersuchung.....	60
5.2.2	Genetische Untersuchungen mittels PCR.....	61
5.2.3	Zoonotischer Aspekt.....	65
5.3	<i>Diagnostische Methoden bei humanen Proben.....</i>	66
5.3.1	Molekulargenetische Ergebnisse mittels PCR.....	67
5.3.2	Epidemiologische/ Phylogeographische Untersuchungen	68
5.3.3	Spoligotyping und andere molekulargenetische Techniken	68
5.3.4	Weitergehende Bestimmung der mykobakteriellen DNA unserer humanen Proben mithilfe von Spoligotyping	71
5.4	<i>Möglichkeiten und Grenzen der molekularen Stammdifferenzierung.....</i>	75
5.4.1	Korrelation Stämme des MTBC und Bevölkerungsschichten.....	76
5.4.2	Weitere phänotypische Unterschiede	77
5.4.3	Der Nutzen phylogeographischer Untersuchungen.....	77
5.4.4	Einschränkungen	77
6	Zusammenfassung	79
	Literaturverzeichnis.....	82
	Abkürzungen	95
	Abbildungsverzeichnis	96

Tabellenverzeichnis 97

Anhang 99

1. Einleitung

Tuberkulose begleitet die Menschheit seit alters her. Dabei handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen und Krankheitserregern. Eine genaue Kenntnis über die diversen Stämme und insbesondere deren Entwicklung hat besondere Bedeutung, als durch Rückschlüsse über die Evolution der mykobakteriellen Stämme Hinweise auf die „Wirksamkeit“ gezogen werden. In der Zukunft könnte dieses Wissen genutzt werden, um unter anderem neue wirksamere Medikamente mit niedriger Resistenzbildung der Mykobakterien zu entwickeln. Die vorliegende Arbeit nimmt an der gegenwärtigen Forschung teil, indem sie Stammdifferenzierung der Mykobakterien an Probenmaterial des städtischen Klinikums Bogenhausen vornimmt.

1.1 Überblick Mykobakterien

Mykobakterien gehören zu der Familie *Mycobacteriaceae* mit der einzigen Gattung *Mycobacterium*, die um die 100 Arten umfasst. Sie gehören zu der Gruppe der grampositiven Bakterien, sind sporenlos und obligat aerob. Ein Teil dieser Arten sind pathogen für Menschen und Tiere und verursachen verschiedene Erkrankungen. Die bekanntesten Krankheitsbilder beim Menschen sind Lepra und Tuberkulose, bei den Tieren die Rindertuberkulose. Die Gattung wird in drei Gruppen unterteilt:

- Der *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex,
- *Mycobacterium leprae*, dem Erreger der Lepra,
- *Mycobacteria other than tuberculosis* kurz MOTT, nichttuberkulöse Mykobakterien, die fakultativ pathogen sind.

Eine typische Eigenschaft dieser Bakterien ist die schlechte Anfärbbarkeit aufgrund des besonderen Zellwandaufbaus. Dieser enthält zum Schutz vor äußeren Einflüssen wachsartige Substanzen und Mykolsäuren, die zu der charakteristischen Säurefestigkeit führen. Dieser Wandaufbau verhindert einen schnellen Stoffaustausch mit der Umgebung und bedingt langsames Wachstum und Vermehrung. Das langsame Wachstum ist charakteristisch für alle Mykobakterien. Gerade pathogene Mykobakterien zeichnen sich hierdurch aus. Dies führt zu besonderen Problemen bei der Diagnostik, da die Kultur als Goldstandard gilt. Eine Kultur der Mykobakterien dauert - je nach Stamm - bei schnell wachsenden Mykobakterien sieben Tage,

bei *M. bovis*-Stämmen bis zu acht Wochen oder bei *M. avium subsp. paratuberculosis* 12 Wochen (Mayr2007). Interessanterweise scheinen sich die langsam wachsenden Mykobakterien aus den schnell wachsenden entwickelt zu haben (Rogall et al., 1990).

Im Folgenden wird die Rolle der Mykobakterien als Krankheitserreger bei Menschen und Tieren ausgeführt. Die verschiedenen Mitglieder haben sich auf unterschiedliche Wirte spezialisiert, zu denen sowohl der Mensch als auch verschiedene Tierarten zählen.

1.2 *Mycobacterium tuberculosis* und weitere Mitglieder des *Mycobacterium tuberculosis* – Komplexes

Der bekannteste Krankheitserreger des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes ist das *Mycobacterium tuberculosis (typus humanus)*, welches der bedeutendste Erreger der menschlichen Tuberkulose und der häufigste Krankheitserreger beim Menschen ist. Der *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex besteht zusätzlich aus den Stämmen *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* Subtyp 1 (clade 1 und clade 2), *Mycobacterium microti* und *Mycobacterium canettii* (van Soolingen et al., 1997). Vor wenigen Jahren wurden *M. bovis* subsp. *caprae* comb. nov. Nieman et al.,2002 und *M pinnipedii* (Cousins et al., 2003) hinzugefügt. Eine tabellarische Übersicht gibt die Tabelle 1. Abgesehen von ihrer engen genetischen Verwandtschaft von bis zu 85-100%, haben diese Stämme unterschiedliche Bedeutung bei Mensch und Tier. Sie geben verschiedenen Wirten den Vorzug, so ist *M. tuberculosis* beispielsweise fast immer mit dem Menschen vergesellschaftet, *M. bovis* tritt vorrangig bei Rindern und *M. pinnipedii* bei Meeressäugetieren auf. Diese Präferenzen sind nicht so streng wie bei anderen Bakterien. Die Funktion des Wirtes kann auch durch eine andere Tierspezies übernommen werden. So wurde *M. bovis* bei Dachsen in England nachgewiesen. Es wird hierbei die Theorie vertreten, dass der ursprüngliche Wirt der Dachs sei. Rinder stellen lediglich Übergangswirte (Smith et al.1, 2006, Smith et al.2, 2006).

Tabelle 1: Überblick über die Krankheitserreger des *M. tuberculosis*-Komplexes der wichtigsten Wirte

<u>Spezies</u>	<u>Wirt</u>
<i>M. tuberculosis</i>	Mensch
<i>M. bovis</i>	Säugetiere wie Rinder, Menschen etc.

<i>M. africanum</i> Subtyp 1 clade 1, clade 2)	Mensch
<i>M. pinnipedii</i>	Meeressäuger, Robben
<i>M. microti</i>	Wühlmäuse, Waldmäuse, Spitzmäuse
<i>M. bovis</i> subsp. <i>caprae</i> com. nov.	Rinder
<i>M. canettii</i>	Mensch

1.2.1 Geschichtlicher Hintergrund zur Tuberkulose

Die Menschheit wird seit langem von Tuberkulose begleitet. So konnten Tuberkelbakterien eine große Vielfalt entwickeln, wie sie auf dem Boden einer langen Phylogenese ermöglicht wird. Nach neueren Untersuchungen ist *M. tuberculosis* schon vor über 10 000 Jahren aufgetreten. Typische makroskopische Veränderungen an Knochen und an der Haut konnten an archäologischen Funden nachgewiesen werden. Moderne molekulare Forschungen konnten diese Vermutung durch den wiederholten Nachweis von Tuberkulose zum Beispiel an ägyptischen Mumien bestätigen (Zink et al., 2001, Zink et al., 2003). Paläopathologische Studien wiesen Tuberkulose an Knochenfunden von 9250 – 8160 v. Chr. im östlichen Mittelmeerraum (Hershkovitz et al., 2008) und während der präkeramischen Jungsteinzeit, 9500 – 8500 v. Chr., in Italien nach (Formicola et al., 1987). Tuberkulose dürfte also damals bereits wie heute weltweit verbreitet gewesen sein. In Asien, genauer in China und Korea, wurden Hinweise auf Tuberkulose von vor mindestens 2000 Jahren gefunden. (Fusegawa et al., 2003, Suzuki et al., 2008). Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes waren auch in Amerika vorhanden, noch vor der Ankunft Christoph Columbus (Rothschild et al., 2006, Salo et al., 1994).

Über die Zeit wurde die Krankheit mit klangvollen Namen wie *phthisis*, griechisch für Schwund, Schwindsucht, King's Evil und Lupus vulgaris belegt – je nach klinisch dominierendem Erscheinungsbild. Die Krankheit wurde im alten Griechenland von Hippokrates und während der Römerzeit von Claudius Galen beschrieben. Sehr viel später wurde sie aber auch in der Literatur, z.B. in Romanen wie dem *Zauberberg* von Thomas Mann, aufgegriffen. Berühmte weitere Vertreter, die selbst von dieser Krankheit betroffen waren, sind unter anderem Franz Kafka und Charlotte Brontë (Mathema et al., 2006). Geschichtliche Aufzeichnungen zeigen, dass besonders im 17. und 18. Jahrhundert Tuberkulose eine der größten Todesursa-

chen in Europa war. So schrieben Autopsien in Paris im frühen 19. Jahrhundert ein Drittel der Todesfälle in der Stadt der Tuberkulose zu (Bloom et al., 1992). Ein Grund für die Expansion der Krankheit zu jener Zeit mag die industrielle Revolution und die Zunahme der menschlichen Bevölkerung sowie das enge Zusammenleben derselben sein. Dadurch wurde den Stämmen des *M. tuberculosis*-Komplex ermöglichte, sich im größerem Stil auszudehnen (Wirth et al., 2008). Die Suche nach der Ursache beschäftigte große Pathologen wie Rudolf Virchow. Schließlich beschrieb der deutsche Mediziner und Mikrobiologe Robert Koch (1843-1910) 1882 den Erreger der Tuberkulose, das *Mycobacterium tuberculosis* (Koch1882). Er isolierte das Mycobacterium aus Tuberkeln und vermehrte es in einer Kultur, wofür er 1905 den Nobelpreis der Medizin erhielt. Während seiner Forschungsarbeit entwickelte er die Theorie der sogenannten Koch'schen Postulate. Die Postulate beschreiben die Ursache-Wirkungs-Beziehung zwischen Bakterien und dem Wirt, die mit Hilfe dieser Postulate untersucht und abgegrenzt werden kann. Ein Postulat fordert die Züchtung der Reinkultur des Erregers. Noch heute werden zum Nachweis Kulturen von Erregern angelegt (Bloom et al., 1992).

Nun folgt eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten historischen Entwicklungen im Kampf gegen die Tuberkulose: 1854 wurden die ersten Sanatorien mangels effektiver Therapiemöglichkeiten von Hermann Brenner gegründet. Die Pasteurisierung der Milch wurde ca zehn Jahre später eingeführt, um die Übertragung von Rindertuberkulose zu verhindern. 1908 entwickelten Albert Calmette und Camille Guerin eine Impfung gegen Tuberkulose, die *Bacillus Calmette-Guerin* Impfung auf dem Boden eines apathogenen Stammes, kurz *BCG*-Impfung (Calmette1927). Ein Durchbruch stellte die Entdeckung der medikamentösen Therapie, unter anderem mit Streptomycin dar (Waksman1965). Die Ära der Sanatorien wurde durch die Einführung der antibiotischen Therapie beendet (Bloom et al., 1992).

1.2.2 Pathologie der Tuberkulose

Im Kampf gegen die Krankheit ist ein genaues Wissen der Pathologie erforderlich. Die Erkrankung wird durch Tröpfcheninfektion übertragen, wobei sich im Kern eines Tröpfchens mehrere, oft aber auch nur wenige Bakterien befinden. Diese werden tief in die Alveolen der Lunge eingeatmet, wo sie von Alveolarmakrophagen phagozytiert werden. Alveolarmakrophagen als Schlüsselzellen des angeborenen Immunsystems stellen hier die erste Barriere gegen eine TB-Infektion dar, wobei jedoch die bereits oben erwähnte spezifische Hülle (Wachshülle) Mykobakterien vor direktem bakteriolytischem Angriff schützen können. Ab einer

gewissen Bakterienzahl führt dies zu einer Rekrutierung von T-Zellen an den Ort der Infektion. Diese locken ihrerseits bei dem Versuch, das Pathogen auszurotten, zusätzliche Makrophagen an. Insgesamt führt diese Antwort des Immunsystems zu einer Bildung einer granulomatösen Läsion, einem der typischen Kennzeichen der Tuberkulose. Den meisten infizierten Individuen gelingt es, das Bakterium in dieser Läsion zu isolieren. So befinden sie sich in einem latenten Infektionsstadium ohne klinische Zeichen. Nur 5-10% der Infizierten entwickeln eine klinische Manifestation der Krankheit. Die Inkubationszeit beträgt im Mittel sechs Monate.

Prädisponierend sind soziale Faktoren, wie Mangelernährung und schlechte medizinische Versorgung, sowie verschiedene Formen der Abwehrschwäche, wie Alkoholismus, HIV-Infektionen und ähnliches. Die häufigste extrapulmonale Form ist die Lymphadenitis. Hier wird in 80% die Lunge mit Zeichen einer konsumierenden Erkrankung befallen, wie chronischer Husten mit Auswurf, subfebrile Temperaturen, Nachtschweiß, Gewichtsabnahme und Leistungsdefizit. Kavernen, die sich unter Nekrosebildung in der Lunge gebildet haben, können rupturieren und der Bakterien- (und Nekrose-) haltige Inhalt über die Luftwege verschleppt werden. Es kann somit über Aerosole zur Ausbreitung in die Umwelt kommen, weitere Individuen können infiziert werden, die Tuberkulose wird zur „offenen TB“.

Der Krankheitsprozess und die Pathologie aller Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes, auch die, die andere Säugetiere als Wirte bevorzugen, ähneln sich im Allgemeinen, obwohl die latente Infektion bei Tieren bisher weniger gut verstanden ist (Smith et al., 2009). In Deutschland sind sowohl die Erkrankung aber auch der Therapieabbruch beim Menschen namentlich meldepflichtig. Patienten, die unter einer wirksamen antituberkulösen Kombinationstherapie stehen, sind schon nach zwei bis drei Wochen nicht mehr infektiös. Ein besonderes Augenmerk gilt den HIV-Patienten, da sie durch die Immunsuppression ihrer Krankheit ein 5-10fach höheres Risiko der Tuberkulose-Erkrankung und -Reaktivierung haben. Tuberkulose gilt als Hinweiszeichen auf eine HIV-Erkrankung, weil die Symptome der Tuberkulose oft früher als die der HIV-Erkrankung klinisch auffällig werden (Böddinghaus et al., 2005).

Heutzutage gibt es wirksame Therapien gegen Tuberkulose, die allerdings mit mehrmonatigen Medikamenteneinnahmen aufwendig und mit Nebenwirkungen behaftet sind. Das führt zu niedriger Compliance bei den Patienten sowie zur Gefahr eines frühzeitigen Therapieabbruches, was eine Mitursache für die Resistenzbildung der Mykobakterien gegenüber den gängigen Therapeutika ist. Die medikamentöse Therapie besteht aus Kombinationstherapien, bei

denen häufig folgende fünf Standardmedikamente eingesetzt werden: Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid, Ethambutol und Streptomycin. Darüber hinaus gib es sogenannte Zweit- oder Reservemedikamente, die bei Resistenzen oder Unverträglichkeiten zum Einsatz kommen. Die Kombinationstherapie soll die Erreger optimal bekämpfen und so der Resistenzbildung vorbeugen. Bei konsequenter Therapie wird die Heilung in mehr als 97% der Fälle erreicht (Renz-Polster et al., 2004).

1.2.3 Diagnostik der Tuberkulose

In der Diagnostik wird ein Tuberkulin-Hauttest, häufig nach *der Mendel-Mantoux-Methode*, zum Nachweis einer Infektion ohne manifeste Erkrankung eingesetzt. Bei beispielsweise HIV-Erkrankten oder nach einer *BCG*-Impfung ist er allerdings nur eingeschränkt beurteilbar. Daneben können immunologische Testverfahren, die *Interferon-Gamma Release Assays*, kurz IGRA, eingesetzt werden (Trajman et al., 2013). Bei manifester Erkrankung wird ein Röntgenthoraxbild der Patienten angefertigt, das zur Diagnostik und Verlaufbeurteilung der Erkrankung dient.

Die bakteriologische Diagnostik erfolgt in der Regel aus Sputum, Bronchialsekret oder Trachealsekret, ist aber auch aus Magensaft, Urin, Pleuraexsudat, Liquor, anderen Punktions- bzw. Biopsieproben möglich. Die labordiagnostischen Methoden umfassen direkte Untersuchungen von Kulturen und gefärbten Ausstrichen unter dem Mikroskop, sowie verschiedene immunhistochemische und molekulargenetische Untersuchungen. Auf einige wird im Folgenden exemplarisch genauer eingegangen.

Die mikroskopische Untersuchung von Sputum oder angefärbten Gewebeproben ist weit verbreitet. Wegen der speziellen Lipidschicht ist die Färbung von Gewebeproben schwierig und erfordert spezielle Verfahren, wie die *Ziehl-Neelsen (ZN)* oder *Auramin* Färbungen. Die mikroskopische Untersuchung der gefärbten säurefesten Stäbchen kann in kurzer Zeit erfolgen, hat aber mit 35-70% eine niedrige Sensitivität und erfordert eine Mindestzahl von 5000-10.000 Bakterien pro ml Sputum (WHO2006). Sie ist wenig spezifisch und differenziert weder zwischen den einzelnen Stämmen noch zwischen normalen und medikamentenresistenten Stämmen. Es wird lediglich die Anwesenheit von säurefesten Stäbchen festgestellt. Die histologischen Zeichen für granulomatöse Entzündungen können in verschiedenen anderen Erkrankungen wie Sarkoidose, Syphilis, Morbus Crohn und anderen gesehen werden, die differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden müssen.

Die Kultur ist sensitiver als die Mikroskopie, aber sehr zeitraubend wegen des langsamen Wachstums der Mykobakterien. Sie kann sich daher über Wochen hinziehen. Trotzdem gilt sie nach wie vor als Goldstandard bei der Diagnostik der Tuberkulose. Sie fordert eine geringere Anzahl an Bakterien als die Mikroskopie, nämlich 10-100 Bakterien pro ml statt 5000-10.000 pro ml Sputum. Außerdem ist auch eine Testung auf Medikamentenresistenzen möglich (Böddinghaus et al., 2005).

Neben dem direkten bakterioskopischen Erregernachweis und der Kultur haben sich in den letzten Jahren molekularbiologische Nachweistechiken etabliert, die über einen spezifischen Nachweis des Erreger-Genoms mit Hilfe von Amplifikationstechniken, eine Infektion nachweisen können. Im Zentrum dieser Techniken steht eine dabei notwendige Vervielfältigungsreaktion in Form der nachfolgend etwas näher beschriebenen Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).

Die *Polymerase-Ketten-Reaktion* (PCR) hat sich als Standardverfahren in der modernen Diagnostik durchgesetzt und basiert auf der Vervielfältigung der Erbsubstanz (DNA) in vitro. Die PCR verkürzt die Zeit der Diagnostik der Tuberkulose von mehreren Wochen (Kultur) auf Stunden (einschl. der vorbereitenden Maßnahmen) und zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus, auch bei Nachweis von niedrigen Bakterienzahlen und in kleinem Probevolumen. Die mykobakterielle DNA kann unabhängig von den physiologischen Bedingungen und der Lebensfähigkeit der Bakterien extrahiert und analysiert werden. Allerdings kann die PCR nicht zwischen einer abgelaufenen Entzündung, bei der noch wenige (avitale) Bakterien vorhanden sind, und einer aktiven Infektion unterscheiden. Darüber hinaus ist sie teurer und erfordert ein höheres Maß an labortechnischer Ausstattung als andere Methoden. In den europäischen Breitengraden stellt das kein Problem dar, da die PCR ein Standardverfahren in diagnostischen Laboren geworden ist. Bei weitem problematisch verhält sich dies in Entwicklungsländern mit weitverbreiteter Tuberkulose.

In der Routinediagnostik werden Gewebeproben in Formalin fixiert und die histologischen Schnitte in Paraffin eingebettet. Mittlerweile wird auch an solchen Schnitten die PCR-Analytik zum mykobakteriellen Nachweis erfolgreich durchgeführt, auch wenn durch diesen Prozesse die DNA an Degenerationen und Veränderungen leidet, so gibt es doch genügend Studien, die den erfolgreichen Einsatz an solchem Material belegen (Hsiao et al., 2003, Ikonomopoulos et al., 1999, Ghossein et al., 1993, Hofman et al., 2003, Li et al., 2000).

Außer dem „einfachen“ Nachweis von Erreger-DNA durch PCR-Analyse existiert inzwischen ein PCR-basiertes Verfahren zum Nachweis von spezifischen mykobakteriellen Erreger-Subtypen, das sogenannte Spoligotyping. Dieses wird weniger in der Diagnostik als in epidemiologischen Studien eingesetzt (Kammerbeek et al., 1997). *Spacer Oligonukleotid Typing*, kurz *Spoligotyping* basiert auf der *direct repeat* (DR) Region des *M. tuberculosis* Komplex. DR-basierte PCR Primer amplifizieren bis zu 43 einzelne Spacer Regionen, die zwischen jedem DR Locus liegen. Amplikons der einzelnen Spacer werden durch dot-blot Hybridisierung auf eine Membran sichtbar gemacht, was wie ein Fingerabdruck fungiert. Die verschiedenen Stämme des *M. tuberculosis*-Komplexes zeigen in sich konstante Deletionen. Spoligotyping unterscheidet die verschiedenen Familien durch charakteristische Muster. Der Verlust der Spacer ist nur in eine entwicklungsgeschichtliche Richtung bekannt, die Daten können somit evolutionäre Trends anzeigen.

1.2.4 Aktuelles zur Tuberkulose

Nach wie vor ist die Tuberkulose eine der gefährlichsten Infektionskrankheiten, die in jüngerer Zeit erneut an Bedeutung gewinnt. Hierbei spielt die Korrelation mit der immunsupprimierenden HIV-Erkrankung eine wichtige Rolle, da immungeschwächte Personen anfälliger für Tuberkulose sind. Laut WHO ist mehr als ein Drittel der Weltbevölkerung infiziert, allein im Jahre 2006 sind das 9,2 Millionen neue Erkrankungs- und 1,7 Millionen Todesfälle, davon fallen 0,7 Millionen Erkrankte und 0,2 Millionen Tote auf HIV-positive Patienten (WHOglobalreportsummary2008). Aufgrund dieser Zahlen führt die WHO großangelegte Projekte gegen Tuberkulose durch. Eines der von der WHO festgesetzten *Millenium Development Goals* ist die Reduzierung der Zahl der Tuberkulosekranken um 50% bis 2015 (WHO2006). Schnelle Aufdeckung, eine angemessene Therapie und die Vorbeugung der Verbreitung sind Schlüsselemente im Kampf gegen diese Erkrankung.

■ FIGURE 1.1
Estimated number of new TB cases, by country, 2007

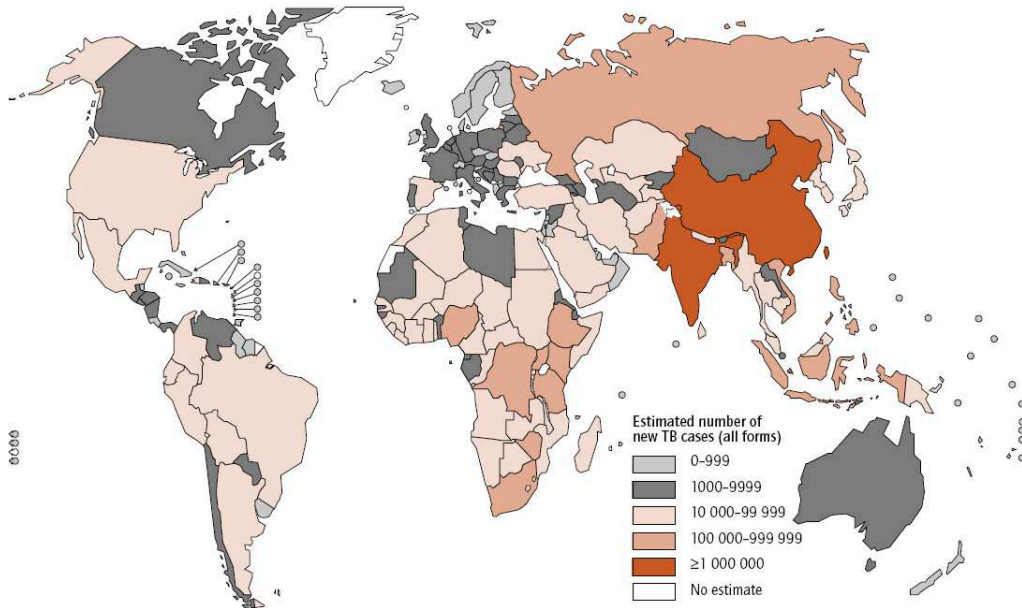


Abbildung 1: geschätzte Zahl neuer Tuberkulosefälle, 2007. Global Tuberculosis Control, WHO Report 2009,

1.2.5 Mycobacterium bovis

Der typische Erreger der *Rindertuberkulose* ist das *Mycobacterium bovis*, dessen Wirt Wiederkäuer und Schweine sind. Durch rohe Kuhmilch kann dieser Erreger auf den Menschen übertragen werden, wodurch der Spruch 'Rindertuberkulose – Kindertuberkulose' geprägt wurde. *Louis Pasteur* (1822-1895) entwickelte ein Verfahren, das so genannte Pasteurisieren, bei dem Lebensmittel wie Milch für kurze Zeit hoch erhitzt werden. Die Bakterien werden abgetötet und dadurch wird die Übertragung der Krankheit durch Lebensmittel gesenkt.

Bei erwachsenen Rindern ist meist die Lunge betroffen. Die klinischen Symptome sind unspezifisch und bestehen in Leistungsabfall, Abmagerung, Fieberschüben und Husten. Bei Befall einer Herde besteht die Routinediagnostik aus einem Tuberkulin Test, ähnlich wie der beim Menschen, und der histologischen Untersuchung auf säurefeste Stäbchen. In der molekularen Diagnostik mittels PCR kann wie bei *M. tuberculosis* typus humanus auf die Insertionssequenz IS6110 untersucht werden, da *M. bovis* zum *M. tuberculosis*-Komplex gehört. Allerdings enthält der *M. bovis* weniger häufig die hierbei getestete repetitive Sequenz. Die

Erkrankung ist anzeigepflichtig, der Bestand darf weder therapiert noch geimpft werden, sondern muss ausgemerzt werden (Mayr2007).

Während in Deutschland die Rindertuberkulose als ausgerottet gilt, ist der Verzehr roher Kuhmilch in der Dritten Welt jedoch bedenklich. Rindertuberkulose ist weltweit bekannt mit Ausnahme der Antarktis. Generell gilt: Wo es Rinder gibt, existiert die Rindertuberkulose. Die Ausnahme sind nur jene Länder, die erfolgreich ein Test und Schlachtprogramm anwenden, um befallene Tiere auszumerzen. In Australien, manchen karibischen Inseln und Teilen Südamerikas wurde die Ausrottung erreicht, während in anderen Ländern wie USA, Kanada, Europa – außer den britischen Inseln - und Südafrika Rindertuberkulose zu vernachlässigbaren Niveaus reduziert wurde.

1.3 MOTTs - Mycobacterium other than Tuberculosis

Neben dem *M. tuberculosis*-Komplex gibt es die MOTTs, die Mycobacterium other than Tuberculosis.

1.3.1 Mycobacterium avium-Komplex

Der *Mycobacterium avium*-Komplex (MAC) besteht aus den Mykobakterien *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium avium subspecies avium*, *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* und *Mycobacterium silvaticum*, die schwerwiegende Erkrankung bei Menschen und Tieren verursachen können, wie in Tabelle 2 gezeigt. *M. avium subspecies paratuberculosis* verursacht eine schwere chronische Enteritis, wie Kapitel 1.3.3 beschrieben. Bakterien des MAC wurden bei verschiedenen Tieren nachgewiesen, wie Ziegen und Rindern, aber auch bei AIDS Patienten und in der Umwelt, d.h. im Boden und im Wasser. Das Genom der verschiedenen Bakterien ähnelt sich sehr stark, weshalb eine genaue diagnostische Unterscheidung wichtig ist (Ellingson et al., 2000). Diese genaue Unterscheidung zwischen den verschiedenen Mitgliedern ist ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit für die PCR verwendeten verschiedenen Primer gibt Tabelle 17.

Tabelle 2: Übersicht zum *M. avium*-Komplex

<u>Spezies/Subspezies</u>	<u>Bedeutung</u>
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Paratuberkulose der Wiederkäuer, obligater Parasit, kein Nachweis in der Umwelt

<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	Geflügeltuberkulose, Mykobakteriosen bei Menschen und Tieren, Nachweis in der Umwelt
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	Tuberkuloseartige Erkrankungen bei Vögeln, paratuberkuloseartige Erkrankungen bei Säugetieren, obligater Parasit
<i>M. intracellulare</i>	Mykobakteriosen

1.3.2 *Mycobacterium avium* - Geflügeltuberkulose

Das *Mycobacterium avium* ist Erreger der Geflügeltuberkulose, die vor allem Hühner befällt. Es ist der wichtigste Vertreter der *MOTT* (*Mycobacterium other than Tuberculosis*) bei Tieren. Es kommt zum Befall des Darmes, der Leber und der Milz durch den oralen Übertragungsweg. Die betroffenen Tiere leiden an Durchfall, Abmagerung und reduziertem Allgemeinzustand. Der Nachweis erfolgt mikroskopisch und die Erkrankung ist meldepflichtig. Ein erhöhtes Risiko für einen Befall besteht bei schlechten hygienischen Bedingungen, extensiver Hühnerhaltung und überalterten Beständen. Bei Befall muss der gesamte Bestand ausgerottet werden und es ist mit einer langfristigen Sperrung des Stalles zu rechnen (Mayr2007).

1.3.3 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* - Paratuberkulose

Das *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ist der Erreger der *Paratuberkulose* oder *John'schen Erkrankung*. 1895 beschrieben *Johne* und *Frothingham* erstmalig diese chronische Enteritis der Wiederkäuer mit Fieber, Durchfall und Abmagerung bis zum Tod. Der Erreger wird über Kot, Milch und Sperma ausgeschieden und oral übertragen. Man beobachtet den Erreger auch bei anderen Huftierarten wie beispielsweise Schweinen und Ziegen. *Johne's Disease* ist bei Infektion über einige Jahre klinisch unauffällig, bis die ersten schweren Symptome auftreten. Jedoch ist zu diesem Zeitpunkt meist schon ein Großteil der Herde infiziert. Das Bakterium zeichnet sich artentypisch durch ein extrem langsames Wachstum aus. Für die Diagnostik ist die Kultur Goldstandard, für erste Ergebnisse müssen die Kulturen jedoch mindestens vier Wochen bebrütet werden und dürfen nicht vor der 12. Woche abgebrochen werden. In dieser Zeitspanne kann sich der Erreger auf den gesamten Viehbestand ausbreiten. Auch diese Erkrankung ist meldepflichtig und bei Befall muss die Herde geschlachtet werden. Bislang existieren weder eine wirksame Therapie noch effektive Impfungen gegen Paratuber-

kulose bei Tieren. Daher sind der Aufbau und Erhalt paratuberkulose-freier Bestände das Ziel der Viehhaltung.

Die wirtschaftlichen Folgen der Erkrankung sind beachtlich, die Verluste übersteigen in der Milchvieh- und Rinderwirtschaft in den USA jedes Jahr 1,5 Billionen US Dollar (Stabel 1998), die wirtschaftliche Einschätzung der Schäden für die einzelne Herde ist jedoch schwierig. Die Erkrankung wird meist unterschätzt, allerdings wird in den USA an einem Ausrottungs-Programm gearbeitet.

Seid einigen Jahren forschen verschiedene Gruppen an einer einfachen, spezifischen und sensitiven Methode, um eine schnellere Diagnose stellen zu können. (Coetsier et al., 2000) Es wird verstärkt nach molekularer Diagnostik gesucht, wobei Methoden wie ELISA und Agar Gel Immundiffusion niedrige Spezifität und Sensitivität aufweisen (Motiwala et al, 2003). Für eine schnellere Diagnostik wurden verschiedene PCR-Methoden, für die Untersuchung von beispielsweise Milch und Kot, entwickelt. Hierbei gilt die Insertionssequenz IS900 für das *M. avium* subsp. *paratuberculosis* als spezifisch (Green et al., 1989).

Aufgrund der Ähnlichkeit im Krankheitsbild und unterstützt von verschiedenen mikro- und molekularbiologischen Untersuchungen wird über eine mögliche Mitbeteiligung des Erregers an der Krankheit Morbus Crohn, einer chronisch entzündliche Darmerkrankung des Menschen, diskutiert. Aus intestinalem Gewebe von Patienten mit M. Crohn konnte das *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isoliert werden. Es werden verschiedene Übertragungswege wie über Dung, kontaminiertes Trinkwasser und Milch in Betracht gezogen. Das Bakterium zeichnet sich zusätzlich durch eine hohe Thermostabilität aus, sodass es durch Pasteurisierung nicht immer abzutöten ist (Falkingham, 1996). Allerdings konnte bis jetzt kein eindeutig kausaler Zusammenhang zwischen dem *M. avium* subsp. *paratuberculosis* und dem M. Crohn festgestellt werden (Motiwala et al, 2003). In der Literatur wird kein Beweis über die Übertragung des Bakteriums durch den Verzehr von Innereien und Fleisch befallener Tiere auf den Menschen geführt, trotzdem besteht der Verdacht weiterhin. (Harris et al., 2001).

1.3.4 Diagnostische Möglichkeiten im Bereich der Veterinärmedizin

Gerade im veterinärmedizinischen aber auch im humanmedizinischen Bereich ist die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Stämmen der Mykobakterien interessant, für beispielsweise Therapieentscheidungen oder Entscheidung über die Ausrottung von Tierherden. Die genetische Verwandtschaft kann sehr eng sein, gerade bei den Mitgliedern des *M. avium*-

Komplexes. Im Gegensatz dazu steht die breite Vielfalt der verursachten Krankheiten sowie der befallenen Wirten. Weiterhin erhofft man sich durch die genaue Differenzierung der verschiedenen Bakterienstämme Informationen für epidemiologische Analysen und damit ein tieferes Verständnis für die Populationsgenetik der Stämme (Amonsis et al., 2004). Deshalb gab es in den letzten Jahren Bemühungen unterschiedlicher Labore, wirksame diagnostische Tests mit verschiedenen PCR Panels, ähnlich wie Multiplex-PCR, zu entwickeln (Ellingson et al., 2000).

1.4 Fragestellung

Ziel der Arbeit war es, den Nutzen molekularbiologischer Methoden wie PCR und Spoligotyping für die Differenzierung zwischen den verschiedenen Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplex und der atypischen Mykobakterien an einer größeren Anzahl Formalin fixierter und in Paraffin eingebetteter Proben aus human- und veterinärmedizinischem Umfeld zu erproben. Hierbei wurde zunächst die Routinediagnostik mittels histologischer Aufarbeitung und danach der PCR durchgeführt. Hierdurch wurde allerdings noch keine Stammesdifferenzierung vorgenommen. Deshalb sollte mittels Spoligotyping eine weiterführende Untersuchung mit dem Ziel der Stammdifferenzierung durchgeführt werden. Hierbei sollte die Praktikabilität an veterinärmedizinischen Proben erprobt und bei humanmedizinischen Proben weitergehende Forschungsmöglichkeiten evaluiert werden.

Siebenundsiebzig archivierte Gewebeproben mit klinischem und/oder histologischem Verdacht auf Tuberkulose bzw. Mykobakteriose wurden mithilfe der PCR untersucht.

Davon stammen 12 der Proben aus dem veterinärmedizinischen Bereich, genauer aus dem veterinärmedizinischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München. Sie fielen als atypische Mykobakteriosen bei der Begutachtung von Schlachtvieh auf. Eine genauere Analyse erfolgte im Institut für Pathologie des Klinikums Bogenhausen, München. Zunächst wurden die Proben erneut histologisch und dann weiterführend mit PCR mit verschiedenen Primern untersucht. Im veterinärmedizinischen Bereich ist es bisher in der Routinediagnostik nicht üblich, PCR an archivierten Proben anzuwenden. Somit erhob sich die Frage, ob diese Diagnostik an so aufbereiteten Proben durchführbar und praktikabel ist. Die übrigen 65 Proben aus der Humanmedizin wurden im Rahmen der Routinediagnostik im Institut für Pathologie des Klinikums Bogenhausen gesammelt und untersucht.

In der Literatur gibt es nur wenige Daten über die Erfolgsquote von Spoligotyping an archivierten histologischen Schnitten. Bis 2008 wurden zwei Studien veröffentlicht, die den erfolgreichen Einsatz von Spoligotyping an Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Material beschreiben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Spektrum der Diagnostik auf die Anwendbarkeit des Spoligotyping erweitert. Proben mit dem Verdacht auf Tuberkulose wurden mit dem Ziel der Stammdifferenzierung untersucht, wobei im Gegensatz zu den genannten Studien auch klinisch unklare Fälle mit eingeschlossen wurden. Die Ergebnisse der Untersuchung wurden mit internationalen Datenbanken verglichen, um eventuell Rückschlüsse auf die geographische Herkunft der Infektion schließen zu können.

2. Material

Für die Aufarbeitung der Proben wurden Materialien und Chemikalien benötigt. Nachfolgend werden diese aufgezählt.

2.1 Probenmaterial

Das Probenmaterial wurde im städtischen Klinikum Bogenhausen gesammelt und bearbeitet.

2.1.1 Gewebeproben von Patienten

Die Untersuchungen wurden an in der Routinediagnostik hergestellten Formalin-fixierten in Paraffin-eingebetteten Biopsien von 65 Patienten durchgeführt. Bei diesen Patienten bestand der Verdacht auf Tuberkulose entweder wegen klinischer Symptome oder histomorphologischer Auffälligkeiten.

Die Proben wurden im Rahmen der Routinediagnostik des Instituts für Pathologie des Klinikums Bogenhausen gesammelt. Fälle ohne histomorphologische Anzeichen für Granulomatose oder nekrotisierende Entzündungen wurden von der Studie ausgeschlossen, auch wenn die klinische Differentialdiagnose TB mit einschloss. Die Proben wurden unter anderem aus Lungengewebe, dem Urogenitaltrakt, der Wirbelsäule und Lymphknoten gewonnen.

2.1.2 Gewebeproben von Tieren

Diese wurden in freundlicher Zusammenarbeit mit dem Institut für Tierpathologie der Fakultät für Tiermedizin der LMU München erhoben. Bei einer Autopsie von bestimmten Tieren auffällige Befunde wurden dort zunächst routinehistologisch untersucht, die relevanten Befunde für diese Studie dann jedoch zusätzlich auch noch im Institut für Pathologie am Klinikum

Bogenhausen nachuntersucht. Die Proben stammen von zwölf unterschiedlichen Schweinen und setzten sich aus Biopsien von Lunge, Leber und Lymphknoten zusammen.

2.2 Verwendete Geräte

Autoklaven, Heraeus Instruments

Brutschrank, Heraeus Instruments

Bunsenbrenner

Computer, ABI PRISM™ 310 Gene Analyser, Perkin Elmer

Computer, Deskpro, Compaq

Computer, Image Master®, Pharmacia Biotech VDS (Video Documentation System for Gel Electrophoresis)

DNA Thermocycler Typ Primus, MWG AG, Biotech

DNA Thermocycler Typ Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer

Elektrophoresekammer Typ Mupid 21 (10x15cm), Cosmo Bio Co., LTD

Fixationsautomat, Automat VIP 5, Vacuum Infiltration Processor, Fa. Sakura

Gefrierschrank Typ economic super, Bosch

Inkubationsbox (Tupperware)

Kühlschrank Typ ecc (energy computed controll), Liebherr

Magnetrührer Typ MR 2002, Heidolph

Mikrowellenherd Typ MWE 700, Bauknecht

Präzisionswaage Typ Navigator™, Ohaus®

Rotationsmischer, Agitateur rotatif, Marke unbekannt

Schlittenmikrotom, Fa. pfm, Schwenningen

Speed Vac Typ DNA 110, Savant

Stromversorgung, Mupid-21, Cosmo Bio Co., LTD.

Thermomixer Typ compact, Eppendorf

UV-Lampe, 245 nm, Marke unbekannt

UV-Transluminator Typ Mighty Bright, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco

Vortexer Typ MS 2, IKA- Labortechnik

Werkbank, steril, Typ Herasafe, Heraeus Instruments

Zentrifuge Typ 2-4, Sigma

Zentrifuge Typ 1.OR, Heraeus Universalzentrifuge, Laborteam Schultheiss

Zentrifuge Typ 5417R, Eppendorf

Zentrifuge Typ 5415CR, Eppendorf

Spoligotyping:

Hybridisierungs – Ofen mit schwenkbarer Plattform

Miniblotter (MN 45)

Auflage für den Miniblotter

Röntgenfilme

Expositions Kassette (24 cm x 30 cm)

PCR-Maschine

2.3 Einwegmaterialien und Hilfsmittel

Deckgläser, Fa. Langenbrinck, Emmendingen

Dye ExTM Spin Kits (50), Quiagen GmbH, Hilden

Eppendorf Reaktionsgefäße safe lock (2,0 ml), Eppendorf

Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns, Quantum Prep[®], Biorad

Laboratories

Genetic Analyser Sample Tubes (0,5 µ), Perkin Elmer, Applied Biosystems Division

Kleenex[®] Tücher, Kimberley-Clark

Microcon[™] 30 Filter, Millipore GmbH, Eschborn

Multi-PCR-Tubes (0,2 ml), PEQ LAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Multireaktionsgefäße (0,65 ml), Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Objekträger, Fa. Langenbrinck, Emmendingen

Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), Eppendorf

Pipettenspitzen mit Filter (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), Biozym,

Oldendorf

PS-Tubes (4,5 ml), Greiner Labortechnik

Reaktionsgefäße (0,6 ml), Biozym, Oldendorf

Skalpellklinge (22), BAYHA

Spoligomembran, aus Spoligo Kit, Isogen, Maarsen, The Netherlands, <http://www.isogen.nl>

ThermoTubes (0,2µl), PEQ LAB Biotechnologie GmbH

Untersuchungshandschuhe, puderfrei, Safeskin[®], California

Zentrifugenröhrchen PP (14 ml), Josef Peske oHG, Aindling

2.4 Chemikalien

Aceton, Merck Eurolab GmbH, Ismaning

Agarose, SeaKem[®] LE agarose, Biozym Diagnostik

Aqua ad injectabilia, B. Braun, Melsungen AG

Aqua bidest, H. Kerndl GmbH, Weißenfeld

Bromphenol-Blau, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Carbol-Fuchsin-Lösung, Fa. SAV LP, Flintsbach a. Inn

Diatomeen-Erde, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

DNA-Leiter (100 bp), Promega Corporation, Wisconsin (USA)

DNA ZAP, Solution 1 und 2, Ambion Inc., Texas (USA)

EDTA (Ethylendinitrotetraacetat Dinatrium-Dihydrat), Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Taufkirchen

Eosin-Lösung, Herstellung in der hauseigenen Apotheke

Ethanol absolut, Merck Eurolab GmbH, Ismaning

Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Formol, Formaldehyd 4%, Fa. SAV, Flintsbach a. Inn

Glycerol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Guanidinium-Thiocyanat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Hämalaun-Lösung, Fa. SAV LP, Flintsbach a. Inn

HCl, Merck Eurolab GmbH, Ismaning

Methylenblau, Fa. Merck Eurolab, GmbH, Ismaning

Natriumhypochloridlösung (4%), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Paraffin, Schmelzpunkt bei 50-52°C, Fa. SAV LP, Flintsbach a. Inn

1x TBE Buffer, TRIS-Borat-EDTA-Buffer, Borat = Eisessig, Merck Eurolab GmbH, Ismaning

10x TBE Buffer, 10x TBE Buffer, Invitrogen, life technologies

Triton X-100, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Tris (Tri[hydroxymethyl]aminlethan), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Tris-Cl, Merck Eurolab, GmbH, Ismaning

Xylol, Fa. SAV LP, Flintsbach a. Inn

Spoligotyping

20 x SSPE, 4 l

SDS specially pure (500 g)

Super Taq DNA polymerase (5000 U)

Streptavidin-POD-conjugate

ECL detection liquid

2.5 Reagenzien und Enzyme

AmpliTaTMq Gold DNA-Polymerase (5 U/μl), Applied Biosystems, Weiterstadt

DNA Extraktions Kit, Gen-ial First-DNA Kit, Fa. Gen-ial, Troisdorf, Germany,
<http://www.gen-ial.de/>

DNA Polymerisations-Mix (20 mM), Applied Biosystems, Weiterstadt

DNA Purification Kit (Freeze'n Squeeze; Bio-Rad, Hercules, California, USA)

DNA Sequencing Kit (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction enthält A-, C-, G-, T-Dye Terminator; dITP, dATP, dCTP, dTTP; Tris-HCl (pH 9,0); MgCl₂, thermal stable pyrophosphatase; AmpliTaTMq DNA Polymerase) applied Biosystems, Weiterstadt, Germany

DNA Sequenzierung automatisch, ABI PRISMTM 310 genetic analyser P.E. Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany

MgCl₂-Solution (25 mM), Applied Biosystems, Weiterstadt

Hae III, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland, <http://www.roche.com>

PCR Gold Puffer, (10 x, enthält: 150 mM Tris/HCl, pH 8,05, 500 mM KCl), GeneAmp[®],
Applied Biosystems, Weiterstadt

Positiv Kontrolle 1, M. tuberculosis Stamm H37Rv aus SpoligoKit

Positiv Kontrolle 2, M. bovis BCG P3 aus Spoligo Kit

Primer ACT - 1/2 (50 pmol/μ), Thermo Electron GmbH, Ulm

Primer Dra, biotinylated aus Spoligo Kit

Primer DRb, aus Spoligo Kit

Primer IS900 - 1/2 (50 pmol/μ), Thermo Electron GmbH, Ulm

Primer TB - 3/ 4 (50 pmol/μ), Thermo Electron GmbH, Ulm

Primer 16S - 1/2 (50 pmol/μ), Thermo Electron GmbH, Ulm

Primer 65 kDa – 1/2 (50 pmol/μ), Thermo Electron GmbH, Ulm

Spoligotyping Kit, Isogen, Maarsen, The Netherlands, <http://www.isogen.nl>

Thermo Hybaid Interactiva Division, Ulm

POP-6TM (Performance Optimized Polymer 6), ABI PRISM, P.E. Applied Biosystems,

Weiterstadt

Proteinase K, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Termination ready mix, Applied Biosystems, Weiterstadt

2.6 Standard-Lösungen und Puffer

Ladepuffer

75 mg Bromphenolblau 75mg

4,5 ml Glycerol (30%)

ad 15 ml Aqua bidest

TBE Buffer (20x)

242 g Tris-Base

57,1 ml Eisessig

18,61 g EDTA (0,5 M; pH 8,0)

Spoligotyping

20xSSPE

35,6 g/l	0.2 M Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O
210.24 g/l	3.6 M NaCl
7.4 g/l	20 mM EDTA
	pH bei 7.4

2xSSPE

20xSSPE	mit 10 Teilen demineralisiertem Wasser mischen
---------	--

10% SDS

10 g SDS / 100 ml demineralisiertem Wasser

2xSSPE / 0.1% SDS

100 ml	20xSSPE
10 ml	10% SDS
890 ml	demineralisiertes Wasser

2xSSPE / 0.5% SDS

100 ml	20xSSPE
50 ml	10% SDS
850 ml	demineralisiertes Wasser

3. Methoden

Im letzten Kapitel wurde auf das verwendete Material eingegangen, in diesem werden die verwendeten Methoden vorgestellt.

Die Histologie, die Gewebelehre, ist eine der wichtigsten Methoden in der Anatomie und Pathologie. Mit dem Mikroskop werden Proben von Operationen, Probeexzisionen und Biopsien untersucht. Der Franzose Marie Francois Xavier Bichat (1771-1802) gilt als Begründer der Histologie, er beschrieb 21 Gewebetypen ohne Mikroskop. Der deutsche Pathologe und Politiker Rudolf Virchow (1821-1902) bezieht alle Krankheiten auf Veränderungen der Zelle und begründet damit die Histopathologie.

Molekulare Untersuchungstechniken sind Erfindungen der neueren Zeit, sie sind aus der modernen Medizin nicht mehr wegzudenken. Die hier verwendeten Methoden umfassen PCR, Restriktionsenzymverdau, Sequenzierung und Spoligotyping.

Zunächst wird auf die histologische Bearbeitung eingegangen. Um Gewebe unter dem Mikroskop beurteilen zu können, werden Paraffin-Schnitte hergestellt und gefärbt.

3.1 Paraffin-Schnitte

Formalin oder wie es auch genannt wird Formaldehyd ist ein Eiweißfällender und Eiweißvernetzer. Es verhindert die Autolyse der Gewebe, bewirkt eine Materialhärtung für bessere Schneidbarkeit des Gewebes und tötet Bakterien und Krankheitserreger.

Die Verarbeitung frisch entnommenen Gewebes begann mit der Fixierung in vierprozentiger neutral gepufferter Formaldehydlösung über eine halbe Stunde, Austausch der Lösung und erneute Fixierung über eine halbe Stunde. Das so bearbeitete Gewebe wurde makroskopisch begutachtet und ggf. zugeschnitten. Die Nach-Fixierung und Entwässerung erfolgte automatisiert und standardisiert in einem Fixationsautomaten. Anschließend konnte es in Paraffin eingebettet werden. Paraffin mischt sich nicht mit Wasser, deshalb mussten die Schnitte zunächst entwässert werden. Die Entwässerung wurde mit einer Alkoholreihe mit aufsteigender Konzentration durchgeführt. Gleichzeitig werden durch den Alkohol Lipide ausgelöst. Die Entwässerung wurde mit 70%igem Ethanol begonnen und in sechs Schritten (70%, 96%, 96%, 99%, 99%, 99%) bis zu 99%igem Ethanol über je eine Stunde erhöht. Daraufhin wurde das Gewebe zwei Stunden im Lösungsmittel Xylol eingelegt, nach einer Stunde wurde das Xylol einmal gewechselt. Es wurde nun in vier Schritten in Paraffin mit einem Schmelzpunkt bei

50-52°C über zweimal eine halbe Stunde und anschließend zweimal eine Stunde eingebettet. Dadurch erhielt man einen Block, aus dem mit einem Schlittenmikrotom, einem Schneidegerät mit Feather-Klingen, 3 µm dicke Schnitte angefertigt wurden. Diese wurden auf einen Glasobjektträger aufgezogen und angetrocknet. Nun waren die Schnitte paraffiniert und vorbereitet für die verschiedenen Färbungen. Da die meisten Färbungen wasserhaltig sind, mussten aus den Schnitten das Paraffin mit dem organischen Lösungsmittel Xylol wieder entfernt werden. Xylol wurde seinerseits anschließend mit 100%igem Alkohol entfernt. Die Schnitte wurden in einer Alkoholreihe mit absteigender Konzentration (96%, 80%, 70% für 3-5 Minuten) gewässert, um anschließend gefärbt werden zu können.

3.2 Färbungen

In dieser Arbeit wurden folgende zwei Färbungen verwendet.

3.2.1 HE-Färbung – Hämalaun-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist eine der am weitesten verbreiteten Standardfärbungen in der Histologie und gilt als Übersichtsfärbung zur Orientierung in histologischen Schnitten. Hierbei werden zwei verschiedene Einzelfärbungen kombiniert, um die verschiedenen Strukturen der Zelle blau und rot anzufärben. Hämalaun, ein aus pflanzlichen Bestandteilen gewonnener Farbstoff, färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen wie Zellkerne, Kalk, sauren Schleim und grampositive Bakterien blau. Eosin, ein synthetischer saurer Farbstoff, färbt die basischen Bestandteile in verschiedenen Rottönen.

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und mit Aqua dest. bedeckt. Anschließend wurden sie in Hämalaun-Lösung für fünf Minuten eingestellt, wobei hier die Kerne zunächst rötlich-braun angefärbt werden. Die Farbe wird durch den niedrigen pH-Wert verursacht. Erst durch das sogenannte Bläuen mittels Erhöhung des pH-Wertes erhalten die Präparate ihre typische blauviolette Farbe. Hierbei wurden die Objektträger 5 Minuten lang mit fließendem Leitungswasser gespült. Danach wurden sie kurz in 70%igem Alkohol ausdifferenziert.

Daraufhin wurden die Präparate für zwei Minuten mit Eosin-Lösung, das in einer 0,1% Verdünnung in Aqua dest. angerichtet wurde, gegengefärbt. Hierbei sollten die Präparate ein wenig überfärbt werden, weil beim nachfolgenden Spülen mit Wasser und Alkohol viel Farbe verloren geht. Um das Wasser aus dem Gewebe zu verdrängen, wurde eine aufsteigende Alkoholreihe verwendet. Begonnen wurde mit 80%igem Äthanol zur Abstufung, danach wurden die Präparate für zwei mal zwei Minuten in 96 – 100%igem Äthanol gewaschen. Zuletzt wur-

den die Schnitte noch mit Xylol für drei bis fünf Minuten geklärt und anschließend ein gedeckt. Auf diese Weise erhält man Schnitte, die Jahrzehnte überdauern können (Stein et al., 2004).

3.2.2 Ziehl-Neelsen-Färbung

Achtzehnhundertdreiundachtzig beschrieb Paul Ehrlich die säurefesten Stäbchen, zu denen die Mykobakterien gehören. Franz Ziehl und Friedrich Karl Adolf Neelsen haben 1882 – 1883 eine spezielle Färbung für Mycobakterien entwickelt und verbessert, die dazu dient, säurefeste Stäbchen wie Mycobakterien und Nocardien einzufärben. Die Bakterien lassen sich aufgrund ihrer speziellen Lipidstrukturen in der Zellwand mit den üblichen Färbungen nicht einfärben.

Zunächst wurde eine Karbolfuchsin – Färbelösung hergestellt. Erstens wurde ein Gramm basisches Fuchsin in 10 ml Äthanol gemischt. Zweitens wurden fünf Gramm Phenol in 100 ml Aqua dest. aufgelöst. Diese beiden Lösungen wurden vermengt. Zur Färbung selbst wurden die Abstriche zunächst an der Luft getrocknet und mit Hitze fixiert. Anschließend wurde die Karbolfuchsinlösung aufgetropft und der Objektträger durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen, die Schnitte wurden somit zweimal erhitzt bis Dampf aufstieg. Für fünf Minuten kühlten sie bei Raumtemperatur ab. Bei dem Schritt mit der hohen Temperatur nehmen selbst die säurefesten Stäbchen den Farbstoff auf. Danach wurde der Farbstoff mit Leitungswasser abgespült. Nun wurden die nicht säurefesten Strukturen entfärbt, hierbei behalten die Mykobakterien bei normalen Temperaturen den roten Farbstoff. Die Schnitte wurden über ein bis drei Minuten mit einer Lösung aus einprozentigem Chlorwasserstoff in 70%igem Alkohol differenziert, bis keine Farbwolken mehr abgingen. Die Schnitte wurden mit Leitungswasser gespült und mit Löfflers-Methylblau kurz gegengefärbt, wobei die nichtsäurefesten Strukturen eine blaue Färbung annehmen. Zuletzt wurde der Farbstoff mit destilliertem Wasser abgespült und die Objektträger trockneten an der Luft.

Diese Färbemethode ist eine wichtige differentialdiagnostische Hilfe bei der Diagnose von Krankheiten wie Tuberkulose und Lepra, allerdings kann man keine Aussagen über die einzelnen Stämme machen (Stein et al., 2004).

Nach der Färbung werden die Schnitte mit Eindeckmedien und Deckglas eindeckt, vorher muss dazu mit einer aufsteigenden Alkoholreihe das Wasser wieder entzogen werden. Das Eindecken dient zum Schutz vor äußeren Einflüssen (Stein et al., 2004).

3.3 Histologische Beurteilung

Die Beurteilung von histologischen Schnitten mit dem Mikroskop ist eine alte und etablierte Methode in der Medizin. Bei vielen Erkrankungen spielt sie eine wichtige Rolle für die Erkennung und Einschätzung, so auch bei der Tuberkulose. Finden sich unter dem Mikroskop Hinweise auf Tuberkulose, müssen diese heutzutage durch weitergehende Untersuchungen verifiziert werden. Mittels Mikroskop werden lediglich säurefeste Stäbchen diagnostiziert, die Bestimmungen der genauen Spezies muss mit anderen diagnostischen Methoden erfolgen. Der negative Befund der Histologe, also kein Nachweis auf säurefesten Stäbchen, ist vorsichtig zu beurteilen. Der Schnitt kann gerade in einem Abschnitt sein, indem keine Veränderungen oder Mykobakterien zu finden sind. Das erklärt die niedrige Sensitivität dieser Methode.

Die histologischen Merkmale der Tuberkulose sind nachfolgend zusammengefasst.

In das befallene Gewebe wandern *Makrophagen* ein. Sie wandeln sich durch Lymphokine in Epitheloidzellen und mehrkernige Riesenzellen um. *Riesenzellen vom Langhans-Typ* haben reichlich eosinrotes Zytoplasma. Die multiplen Kerne sind hufeisenförmig in der Zellperipherie angeordnet (siehe Abbildung 4). Differentialdiagnostisch muss man bei derartigen Riesenzellen auch an andere Erkrankungen wie Sarkoidose und verschiedene Mykosen denken.

Die Epitheloidzellen zeigen einen langgestreckten, in der Mitte leicht eingezogenen Kern; die Zellgrenzen sind nicht zu erkennen.

Das typische *tuberkulöse Granulom* besteht aus einer zentral käsigen Nekrose, die von Epitheloidzellen und mehrkernigen Riesenzellen umgeben ist. In der Peripherie finden sich reichlich Lymphozyten. In der Nekrosezone sind keine erhaltenen Zell- oder Gewebestrukturen mehr. Im Verlauf der Erkrankung verkalken diese Nekrosen (*Kreideherde*) (Thomas & Müller, 2001).

3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

3.4.1 Allgemeines

Neunzehnhundertfünfundachtzig veröffentlichte Kary Mullis erstmalig die Methode der PCR (Saiki et al., 1985). Er erhielt 1993 dafür den Nobelpreis. Die Methode basiert auf der Vervielfältigung von DNA-Strängen mithilfe des Enzyms Polymerase. Durch die Verwendung einer hitzestabilen Taq (*Thermophilus aquaticus*)-Polymerase anstelle des ursprünglich verwendeten *E.coli* Klenow-Fragmentes (Saiki et al., 1988), das bei hohen Denaturierungstemperaturen

inaktiviert wurde, konnte die Methode wesentlich verbessert und automatisiert werden (Saiki et al., 1988).

Tabelle 3: Einzelbestandteile zur Herstellung eines PCR-Ansatzes

<u>Bestandteil</u>	<u>Funktion</u>
Ausgangs-DNA	Enthält den zu amplifizierenden Abschnitt
Zwei Primer	Markieren des Startpunkts der DNA-Synthese auf jedem der beiden Einzelsträngen der DNA, wodurch der zu vervielfältigende Bereich von beiden Seiten begrenzt wird
DNA-Polymerase	Baut die zugesetzten Nukleotide komplementär zum Ausgangsstrang ein, muss hitzestabil sein
Nukleotide	Sind Bausteine für die Synthese neuer Stränge
Puffer	Sorgen für geeignete Reaktionsbedingungen der Polymerase

Der PCR- Zyklus beinhaltet drei Schritte:

1. Denaturierung: die doppelsträngige DNA wird bei 96°C aufgetrennt.
2. Primer Annealing: durch eine Temperatursenkung auf primer-spezifische Temperaturen können sich die Primer an die Komplementär-Sequenz anlagern.
3. Elongation: nach einer Temperaturerhöhung auf 72 °C verlängert die DNA-Polymerase die DNA. Sie beginnt bei den Primern und arbeitet sich unter Nutzung der freien Nukleotide Richtung 3' Ende vor.

Jeder neu synthetisierte DNA-Strang dient als Matrize für einen weiteren Strang. Dieser Zyklus wird bis zu 45-mal wiederholt, anschließend reduziert der Thermocycler die Temperatur auf 6°C zur Konservierung bis zur Weiterverarbeitung.

3.4.2 PCR aus Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben

Um eine PCR aus Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben durchzuführen, müssen einige zusätzliche vorbereitende Schritte erfolgen. Die Proben wurden mit Xylol überschichtet und durch Zentrifugation von Paraffin befreit. Die DNA wurde mit dem Gen-ial

First-DNA Kit nachextrahiert. Kurzgefasst wurden nach der Entfernung von Xylol, 500 µl Lysis Buffer 1, 50 µl von Lysis Buffer 2 und 10 µl Proteinase K hinzugefügt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Um sich Zugang zur mykobakteriellen DNA zu verschaffen wurde die Lösung im Vorfeld vier Minuten lang auf 90°C erhitzt und danach in flüssigem Stickstoff Schock gefroren, dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Nach diesem Schritt wurden 375 µl von Buffer 3 hinzugefügt, die gesamte Lösung im Vortexer gemischt und auf minus 20°C abgekühlt. Danach wurden die Proben mit 13.000 rpm 20 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand wurde in neue sterile Tubes übertragen. Zuletzt wurde die DNA mit Ethanol ausgefällt und mit sterilem H₂O auf 50 µl Zielvolumen verdünnt.

3.4.3 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontamination

Die PCR hat eine hohe Sensitivität, leider ist sie auch sehr anfällig für Kontamination, selbst wenige fremde DNA-Moleküle können zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Aus diesem Grund wurden folgende Vorkehrungen getroffen: Es wurden Einwegmesser zum Schneiden der Paraffin-Blöcke verwendet und nach jedem Schritt gewechselt. Die Schritte der PCR, der PCR-Amplifikation und der anschließenden Untersuchungen wurden in getrennten Räumen vorgenommen. Es wurde nur steriles H₂O verwendet. Als Kontrollen für die saubere Extraktion wurden Wasserproben verwendet. Diese Kontrollen waren übereinstimmend mit den Proben der Extraktion und enthielten alle Reagenzien ohne Gewebe und Gewebeextraktion, um sich der Abwesenheit von mykobakterieller DNA zu vergewissern. Positivkontrollen wurden bei der PCR nicht verwendet, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Beim Spoligotyping wurden sie zur Erfolgskontrolle verwendet.

3.5 DNA-Amplifikation

Bei der Untersuchung der Proben auf mykobakterielle DNA wurde die PCR mithilfe verschiedener Primersequenzen für die Amplifikation verschiedener Zielgenen des *M. tuberculosis*-Komplexes und des *M. avium*-Komplexes durchgeführt.

3.5.1 Amplifikation von β-Aktin

Als interne Kontrolle für die erfolgreiche DNA-Extraktion und dem Nachweis von Säugetier-DNA wurde die Amplifikation von β-Aktin durchgeführt (Ghossein et al., 1993). β-Aktin ist ein Multicopygen, welches mehrfach verteilt im Genom vorkommt. Das Ergebnis ist ein 202 Basenpaar langes Fragment (GenBank, National Center for Biotechnical Information –

NCVI). Die Primersequenz und der PCR-Ansatz werden in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 4: Primersequenzen für β -Aktin Nachweis

ACT-1: 5' - CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT G -3'
ACT-2: 5' - GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC - 3'

Tabelle 5: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für β -Aktin

<u>Ingredienz</u>	<u>Ausgangs-Konzentration</u>	<u>Ziel-Konzentration</u>	<u>Volumen für Mastermix von 20 Proben</u>	<u>Volumen pro Ansatz</u>
Puffer	10 fach	1 fach	40 μ l	2,0 μ l
MgCl ₂	25 mM	2 mM	32 μ l	1,6 μ l
dNTP	20 mM	0,2 mM	4,0 μ l	0,2 μ l
Taq-Polymerase	5 U/ μ l	0,05 U/ μ l	4,0 μ l	0,2 μ l
Primer Act 1	50 pM	1 pM	8,0 μ l	0,4 μ l
Primer Act 2	50 pM	1 pM	8,0 μ l	0,4 μ l
dH ₂ O			284 μ l	14,2 μ l
DNA	Variabel			1,0 μ l

Die PCR Mixtur wurde wie in Tabelle 5 beschrieben angefertigt. Der Mastermix wurde auf 15 Proben, vier Extraktionskontrollen und eine PCR-Kontrolle aufgeteilt. Das folgende Amplifikationsprotokoll wurde verwendet:

Initiale Denaturierung	10 Min. bei 95°C
45 Zyklen	Denaturierung bei 94°C für 1 Min.

	Annealing bei 60°C für 1 Min. Extension bei 72°C für 1 Min.
Verlängerte Synthese	8 Min. bei 72°C

3.5.2 Amplifikation von mykobakterieller DNA

Die in dieser Arbeit verwendeten Schlüsselsequenzen für Mykobakterien sind die Einzelstrangnachweise des 65kDa (hsp) (Eriks et al., 1996) und der 16S rRNA (Wilton et al., 1992) sowie die Insertionssequenzen IS6110 (Eisenach et al., 1990) und IS900 (Green et al., 1989).

IS6110 als Nachweis für Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes

Das 123-bp Segment des IS6110 Gen gilt als spezifisch für den *M. tuberculosis*-Komplex (Eisenach et al., 1990). Tabelle 6 und Tabelle 7 zeigen die Primersequenz, den PCR-Ansatz und die PCR Bedingungen.

Tabelle 6: Primersequenzen für den *M. tuberculosis* Nachweis IS6110

TB-3: 5´ - CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG – 3´
TB-4: 5´ - CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG – 3´

Tabelle 7: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für IS6110

<u>Ingredienz</u>	<u>Ausgangs-Konzentration</u>	<u>Ziel-Konzentration</u>	<u>Volumen für Mastermix von 20 Proben</u>	<u>Volumen pro Ansatz</u>
Puffer		1 fach	40 µl	2,0 µl
MgCl ₂	18,75 mM	1,5 mM	24 µl	1,2 µl
dNTP	20 mM	0,2 mM	4,0 µl	0,2 µl
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,05 U/µl	2 µl	0,1 µl

Primer TB 3	50 pM	1 pM	6 µl	0,3 µl
Primer TB 4	50 pM	1 pM	6 µl	0,3 µl
dH ₂ O			298 µl	14,9 µl
DNA	Variabel			1,0 µl

Die Bedingungen der PCR waren wie folgt:

Initiale Denaturierung	10 Min. bei 95°C
45 Zyklen	Denaturierung bei 94°C für 1 Min.
	Annealing bei 66°C für 1 Min.
	Extension bei 72°C für 1 Min.
Verlängerte Synthese	8 Min. bei 72°C

3.5.3 zusätzliche Amplifikation bei den porcinen Proben

Zusätzlich zu den oben angeführten Sequenzen wurden bei den Schweine-Proben noch die nachfolgenden Sequenzen getestet:

65 kDa hsp als Nachweis für Mykobakterien

Hitzeschockproteine (hsp) helfen anderen Proteinen bei der korrekten Faltung. Das für das 65 kDa hsp kodierende Gen wurde vollständig sequenziert. Hierbei wurde eine so große genetische Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Mykobakterien festgestellt, dass es als allgemeinen Nachweis auf Mykobakterien gilt (Shinnick, 1987). Die Tabelle 8 und

Tabelle 9 zeigen die Primersequenz, den PCR-Ansatz und die PCR Bedingungen.

Tabelle 8: Primersequenzen für 65 kDa hsp Protein

65kDa 1: 5`-GGC-TAC-ATC-TCG-GGG-TAC-TTC-3`
65kda 2: 5`-CTC-GGT-GGT-CAG-GAA-CAG-C-3`

Tabelle 9: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für 65 kDa hsp Protein

<u>Ingredienz</u>	<u>Volumen für Mastermix von 20 Proben</u>	<u>Volumen pro Ansatz</u>
Puffer	40 µl	2,0 µl
MgCl ₂	32 µl	1,6 µl
dNTP	4,0 µl	0,2 µl
Taq-Polymerase	4,0 µl	0,2 µl
Primer 65 kDa 1	8,0 µl	0,4 µl
Primer 65 kDa 2	8,0 µl	0,4 µl
dH ₂ O	284 µl	14,2 µl
DANN		1,0 µl

16S rRNA als Nachweis für den *M. avium*-Komplex

Die rRNA Sequenzen wurden während der Evolution stark konserviert. Der Vergleich der 16S rRNA Sequenz von *M. avium* subsp. *paratuberculosis* und *M. avium*, den Erregern der Paratuberkulose und Geflügeltuberkulose zeigt eine 99,9%ige Übereinstimmung. Somit lässt ein positiver Befund von einem 193 bp Produkt auf das Vorhandensein einer dieser beiden Spezies schließen (Wilton et al., 1992). Tabelle 10 und

Tabelle 11 zeigen die Primersequenz, den PCR-Ansatz und die PCR Bedingungen.

Tabelle 10: Primersequenzen für 16S rRNA als Nachweis für den *M. avium* Komplex

M-16S-1: 5´ - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3´
M-16S-2: 5´ - ACC AGA AGA CAT GCG TCT TG – 3´

Tabelle 11: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für 16S rRNA

<u>Ingredienz</u>	<u>Volumen für Mastermix von 20</u>	
	<u>Proben</u>	<u>Volumen pro Ansatz</u>
Puffer	40 µl	2,0 µl
MgCl ₂	32 µl	1,6 µl
dNTP	4,0 µl	0,2 µl
Taq-Polymerase	2,0 µl	0,1 µl
Primer 16S 1	8,0 µl	0,4 µl
Primer 16S 2	8,0 µl	0,4 µl
dH ₂ O	296 µl	14,8 µl
DNA		0,5 µl

Primus A 65 A 10, gleicher Ansatz wie Aktin

IS900 als Nachweis für *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

Die Insertionssequenz IS900 wurde als erste bei Mykobakterien gefunden. Mit ihr gelingt die Unterscheidung zwischen *M. avium* subsp. *paratuberculosis* und *M. avium*, da sie für *M. avium* subsp. *paratuberculosis* spezifisch ist (Green et al., 1989). Ein 229 bp langes Produkt bestätigt den Nachweis. Die Tabelle 12 und Tabelle 13 zeigen die Primersequenz, den PCR-Ansatz und die PCR Bedingungen.

Tabelle 12: Primersequenzen für IS900 als Nachweis für *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

M-IS900-1: 5' - CCG CTA ATT GAG AGA TGC GAT TGG – 3'
M-IS900-2: 5' - AAT CAA CTC CAG CAG CGC GGC CTC G - 3'

Tabelle 13: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für IS900

<u>Ingredienz</u>	<u>Volumen für Mastermix von 20 Proben</u>	<u>Volumen pro Ansatz</u>
Puffer	40 µl	2,0 µl
MgCl ₂	32 µl	1,6 µl
dNTP	4,0 µl	0,2 µl
Taq-Polymerase	2,0 µl	0,1 µl
Primer IS900 1	8,0 µl	0,4 µl
Primer IS900 2	8,0 µl	0,4 µl
dH ₂ O	296 µl	14,8 µl
DNA		0,5 µl

Primus A65A10, gleicher Ansatz wie Aktin

3.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein elektrisches Verfahren, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Die Fragmente werden mit schon bekannter DNA, der sogenannten DNA-Leiter, verglichen. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes hat die Agarose die Funktion eines Siebes für Moleküle. Mithilfe eines elektrischen Gleichstromfeldes werden die negativ geladenen Nukleinsäuren durch die Gelmatrix gezogen, wobei kleinere Moleküle schneller wandern als größere. Die DNA-Banden werden sichtbar gemacht durch den in das Gel eingemischten Farbstoff Ethidiumbromid, der mit DNA-Doppelsträngen interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert.

Da die gesuchten DNA-Fragmente relativ klein sind, wurde eine Agarosekonzentration von 4% gewählt. Die kleineren DNA-Stücke würden bei einer niedrigeren Konzentration zu schnell durch das Gel wandern. Die Trägermatrix benötigt 1x TBE Buffer. 1xTBE Buffer wurde mit 900 ml entmineralisiertem Wasser und 100 ml 10x TBE Buffer hergestellt.

Für die Herstellung der Gele wurden 200 ml des hergestellten 1x TBE mit 4 g Agarosepulver gemischt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen des Geles auf ca. 60°C wurden 20 µl des Farbstoffes Ethidiumbromid hinzu pipettiert. Da Ethidiumbromid toxisch ist, musste besondere Vorsicht bei diesem und den nachfolgenden Schritten durch konsequentes Tragen von Handschuhen gelten. Das flüssige Gel wurde in einen waagrechten Gelbegrenzer (10cm x 5cm) gegossen und zwei Kämmen mit je 11 Zähnen (je 5mm x 1mm) wurden eingetaucht. Nachdem ungefähr 30 Minuten später das Gel erkaltet war, wurden zuerst die Kämmen und anschließend das Gel aus der Gießvorrichtung entfernt. Das Agarosegel wurde in eine horizontale Gelelektrophoresekammer (10cm x 15cm) gelegt und mit ausreichend 1 x TBE-Buffer bedeckt. Die Taschen befanden sich auf der Seite mit der negativen Spannung. In die jeweils erste Tasche einer Reihe wurden 5 µl Standard pipettiert, um die Größe der Lauffront bestimmen zu können. Der Standard setzt sich aus 40 µl 1x TBE, 10 µl 50 bp Leiterlösung und 10 µl Ladepuffer zusammen. Je 8 µl des PCR-Produktes wird mit 2 µl Ladepuffer vermischt und in eine Tasche gegeben. Nach jedem Schritt wurden die Pipettenspitzen gewechselt. Anschließend wurde ein elektrisches Feld mit ca. 100 V und 70 mA über 40 Minuten angelegt. Danach wurde das Gel auf einen UV-Tisch gelegt und der Raum abgedunkelt, um das Ergebnis beurteilen und fotografieren zu können.

3.7 Restriktionsenzymverdau

Restriktionsenzyme, genauer Restriktionsenzymendonuklease, sind Enzyme, die die DNA innerhalb einer Sequenz schneiden können, indem sie genau ein bestimmtes Basenpaar erkennen und schneiden. Diese Methode ist sehr spezifisch und wird verwendet, um bei einem positiven Ergebnis der PCR das Resultat zu überprüfen und zu bestätigen. Die Schnittstelle wird in Tabelle 14 dargestellt. Hierbei können verschiedene Enden, beispielsweise mit Überhang, entstehen. Wir verwendeten bei unserer Methode das Restriktionsenzym Hae III, das die Enden glatt ohne Überhang schneidet.

Tabelle 14: Eigenschaften Restriktionsenzym Hae III

<u>Enzym</u>	<u>Name</u>	<u>Erkennungssequenz</u>	<u>Schnittstelle</u>	<u>Ende</u>
Hae III	<i>Haemophilus egyptius</i>	5'-GGCC-3'	5'--GG CC--3' 3'--CC GG--5'	Glatt

IS6110, die Sequenz, die spezifisch für den *M. tuberculosis*-Komplex ist, hat eine Länge von 123 bp. Hae III schneidet es in zwei Stücke von 94 bp und 29 bp Länge.

Die Methode wurde folgendermaßen durchgeführt: Für den Verdau wurden 8 µl des PCR-Produkts mit 10 U Hae III für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Überprüfung, ob die bei der PCR entstandenen Stücke die richtige Länge besaßen, wurde die Größe durch Elektrophorese mit vierprozentigem Agarose Gel, welches damit einen niedrigen Schmelzpunkt hat, bestimmt. Falls die DNA an einer anderen Stelle, die zufälligerweise dieselbe Basenpaarabfolge aufweisen würde, geschnitten worden wäre, würden Schnittstücke anderer Länge erhalten werden. Dieser letzte Vorgang wird *Restriktionskartierung* genannt.

3.8 Spoligotyping

Spoligotyping wurde 1997 erstmalig von Kammerbeek et al. beschrieben (Kammerbeek et al., 1997). Es basiert auf dem Polymorphismus der direct repeat (DR) Region auf dem mykobakteriellen Chromosom.

3.8.1 Allgemeines

Die DR Region ist eine der am besten untersuchtesten Regionen auf dem Genom *des M. tuberculosis*-Komplexes, die beachtliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen aufweist. Die gut konservierten 36 Basen-Paar (bp) langen DR sind durchsetzt mit individuellen Spacer Sequenzen. Die Spacer Sequenzen wiederholen sich nicht und sind 35 - 41 bp lang. Die Reihenfolge (,order') dieser Spacer ist immer dieselbe, aber es können Insertionen oder Deletionen auftreten. *Direct variant repeats* (DVR) bezeichnen DR und die angrenzenden Spacer. Die Stämme unterscheiden sich in der Zahl und in der An- und Abwesenheit von DRs und den angrenzenden Spacern. Die Reihenfolge der verschiedenen DVR innerhalb der verschiedenen Stämme bleibt erstaunlich konstant, wobei die biologische Funktion unklar ist. Zurzeit sind 94 verschiedene Spacer Sequenzen bekannt, wobei 43 für die Differenzierung des *M. tuberculosis*-Komplexes genutzt werden (Embden et al., 2000).



Abbildung 2: DR Region (Fragment). 43 Spacer werden beim Spoligotyping genutzt

Der Polymorphismus der DR Region wird beim Spoligotyping genutzt, um die verschiedenen Stämme des *M. tuberculosis*-Komplexes zu unterscheiden. Die DR Regionen der getesteten Stämme werden mittels PCR amplifiziert und mithilfe eines Primers mit einem Label versehen. Membrane, die mit 43 synthetischen Oligonukleotiden bestückt sind, werden mit den PCR Produkten hybridisiert. Hierbei wird ein bestimmtes Muster, ein Spoligotype erhalten, das mit Chemilumineszenz sichtbar gemacht wird. Jeder Spoligotype kann mit einem binären System, Spacer an- oder abwesend, mit 43 Stellen dargestellt werden und bequem verglichen werden. Eine Darstellung im Oktal Kode System wird ebenfalls weithin genutzt (Dale et al., 2001).

3.8.2 Spoligotyping der PCR-Produkte

Zur Überprüfung der korrekten Durchführung der Methode lässt man Kontrollen mitlaufen. Für die Positivkontrollen werden chromosomale DNA der Stämme *M. tuberculosis* H37Rv und *M.bovis* P3, für die Negativkontrolle wird Wasser verwendet. Zunächst werden die DR-Regionen des vorhandenen Stammes durch PCR vervielfältigt. Tabelle 15 zeigt die Bestandteile der Reaktionsmischung.

Tabelle 15: Spoligotyping Reaktionsmischung

<u>Volumen</u>	<u>Ingredienz</u>
2 µl	template DANN
4 µl	Primer DRa
4 µl	Primer DRb
4 µl	dNTP-Mixtur (2.5 mM je dNTP, letztes Konzentrationsverhältnis 0.2 mM je dNTP)
5 µl	10x Super Tth buffer
0.1 µl	Super Tth Polymerase (5 units/µl)
33-x µl	MQ Wasser (bis zu einem Endvolumen von 50µl)

Danach platziert man die Reaktionsgefäße in eine PCR-Maschine und stellt folgenden Temperaturzyklus ein, der 45mal wiederholt wird:

3 min bei 96°C	20x
1 min bei 96°C	
1 min bei 55°C	
30 sec bei 72°C	
5 min bei 72°C	

PCR-Produkte, die nicht innerhalb von 24 h verwendet wurden, wurden bei minus 20°C aufbewahrt. Der nächste Schritt war die Hybridisierung, hierbei lagert sich an den Einzelstrang der DNA ein komplementärer DNA-Strang unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken an.

Durch die PCR entstehen DNA-Produkte mit zwei unterschiedlichen Längen: einmal die vervielfältigten Spacer, aber auch das PCR Substrat kann vervielfältigt werden. Um diese zwei Längen zu unterscheiden, verwendet wird ein Biotin labeled reverse Primer verwendet, der sich nur an die Kehrseite der Stränge anlagert.

Folgende Lösungen wurden dafür vorbereitet:

1. 250 ml 2xSSPE/0.1% SDS
2. 500 ml 2xSSPE/0.5% SDS
3. 250 ml 2xSSPE

In vorher beschrifteten Reaktionsgefäßen wurden je 20 µl des PCR Produktes und 150 µl 2xSSPE/0.1% SDS gegeben. Zur Denaturation wurden die PCR-Produkte für 10 min auf 99°C erhitzt und, um ein erneutes Aneinanderlagern der DNA-Stränge zu verhindern, danach sofort auf Eis gekühlt. Die Membran wurde während dessen 5 Minuten lang in 250 ml 2xSSPE/0.1% SDS bei 60 °C gewaschen. Anschließend wurden die Membran und ein Supportcushion lotrecht auf den Miniblotter gelegt, sodass die Reihen des Miniblotters senkrecht zu den Linien der aufgetragenen Oligonukleotide stehen. Eventuelle Flüssigkeiten wurden durch Aspiration mit einer Pipette entfernt.

Oligonukleotide von den bekannten Spacern sind in parallelen Linien auf der aktivierten Membran kovalent gebunden. Die PCR Produkte von den zu untersuchenden Proben werden

nun lotrecht durch die slots des Miniblotters darauf aufgetragen. Hierbei muss darauf geachtet werden, keine Luftblasen in die Slots zu bringen. Nun findet die Hybridisierung bei 60°C während 60 Minuten auf einer horizontalen Oberfläche statt. Die Platte soll möglichst in der Waagrechten gehalten werden, um Kontamination zwischen den Slots zu vermeiden. Danach wurden die Proben durch Aspiration entfernt und die Membran mit Pinzetten aus dem Miniblatter entfernt. Die Membran wurde zweimal in 250 ml 2xSSPE/0.5%SDS bei 60°C für 10 Minuten gewaschen. Die Membran wurde in einer runden Flasche platziert und abkühlen gelassen, um der Gefahr der Inaktivierung der Peroxidase im nächsten Schritt vorzubeugen. Anschließend wurden 2.5 µl Streptavidin-Peroxidase Konjugat (500U/ml) und 10 ml 2xSSPE/0.5% SDS gemischt und die Membran in dieser Lösung für 45 bis 60 Minuten bei 42°C in der rollenden Flasche inkubiert. Hierbei binden sich die Biotin Label mit den PCR Produkten, die dadurch fluoreszierendes Licht abgeben, weil die Peroxidase, die auf dem Streptavidin vorhanden ist, eine lichtenstehende Reaktion katalysiert. Danach wurde die Membran wiederum zweimal in 250 ml 2xSSPE/0.5% SDS bei 42°C während 10 Minuten und für fünf Minuten bei Raumtemperatur in 250 ml 2xSSPE gewaschen.

Um den chemielumineszierenden Effekt zu erzielen, wurde die Membran für 1 Minute in 20 ml ECL detection Flüssigkeit inkubiert. Anschließend wurde die Membran auf einen Röntgenfilm abgelichtet, dazu wurde sie in einer Dunkelkammer in einer lichtdichten Box platziert. Im Dunkeln wurde nun der Röntgenfilm auf die Membran gelegt und die Box geschlossen. Die Belichtungszeit von ca. fünf Minuten wurde jeweils mit einem neuen Film so oft variiert, bis das bestmögliche Resultat erreicht war.

Anschließend wurde die Membran wiederaufbereitet, wobei man jede Membran ungefähr 10-mal für diese Methode verwenden kann bevor sie unbrauchbar wird. Zur Wiederaufbereitung wurde die Membran zweimal in 1%iger SDS für 30 Minuten inkubiert, danach für 15 Minuten in 20 mM EDTA Lösung bei pH 8 bei Raumtemperatur gewaschen und bei 4°C bis zur nächsten Benutzung aufbewahrt (Spoligotyping kit manual)

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen werden hier zusammengefasst. Zunächst werden die veterinärmedizinischen Ergebnisse vorgestellt, anschließend die humanmedizinischen Ergebnisse.

4.1 Diagnostische Ergebnisse der porcinen Proben

Die Ergebnisse der veterinärmedizinischen Proben werden nach histologischen und molekularen Gesichtspunkten betrachtet.

4.1.1 Histologische Ergebnisse

Tabelle 16 gibt einen Überblick über die histologische Untersuchung. Folgende Formalinfixierten Paraffinschnitte von Schweinen wurden untersucht: zwei Proben aus der Lunge, zwei aus der Leber und acht aus Lymphknoten. Jede Probe stammte von einem anderen Tier, also insgesamt von 12 verschiedenen Tieren.

Tabelle 16: Ergebnis der histologischen Untersuchung der porcinen Proben

<u>Probennummer</u>	<u>Organ</u>	<u>Granulom</u>	<u>RZ</u>	<u>Nekrosen</u>	<u>Kalk</u>	<u>Bakterien-nachweis in der ZNF</u>
1	Lunge	1+	1+	-	-	-
2	Lunge	1+	-	-	-	-
3	Leber	EZ 2+	2+	-	-	-
4	Leber	EZ 1+	1+	1+	-	-
5	LK	EZ 1+	-	-	-	-
6	LK	EZ 1+	-	-	-	-
7	LK	EZ 1+	-	2+	-	-
8	LK	EZ 3+	3+	3+	3+	Paucibacillär
9	LK	EZ 1+	-	1+	3+	Paucibacillär
10	LK	EZ 2+	-	2+	3+	Paucibacillär
11	LK	EZ 3+	-	3+	3+	Paucibacillär
12	LK	EZ 3+	2+	3+	3+	Paucibacillär

RZ – Riesenzellen; ZNF – Ziehl-Neelsen Färbung; Gran. – Granulom; EZ – Epitheloidzelle; LK – Lymphknoten; Paucibacillär – wenige Bakterien nachweisbar; - negativ

Bei der histologischen Untersuchung wiesen zwei Proben Granulome auf. Bei den übrigen zehn fanden sich Epitheloidzellen unterschiedlicher Zahl. In fünf Proben fanden sich Riesenzellen unterschiedlicher Anzahl, wobei keine Korrelation mit einem anderen pathologischen Zeichen gesehen wurde. Bei sieben Proben waren Nekrosen unterschiedlicher Anzahl zu sehen, davon wiesen fünf Proben zusätzlich Verkalkungen auf. In denselben fünf Proben wurde in der Ziehl-Neelsen Färbung Bakterien nachgewiesen. Also wurde hier eine Korrelation zwischen Verkalkungen, Nekrosen und dem Nachweis der Bakterien in der Ziehl-Neelsen-Färbung gefunden.

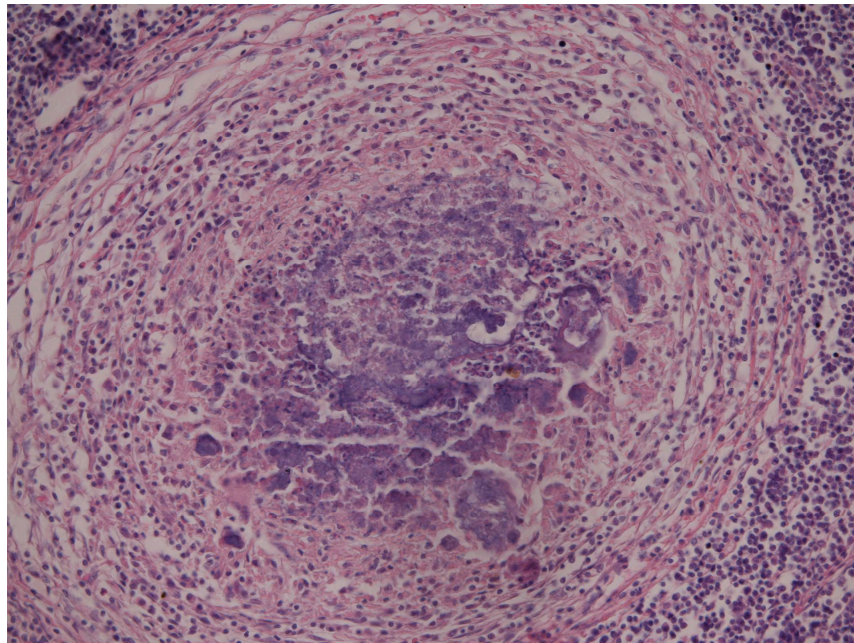


Abbildung 3: Histologischer Schnitt der porcinen Proben: Granulom mit Nekrose

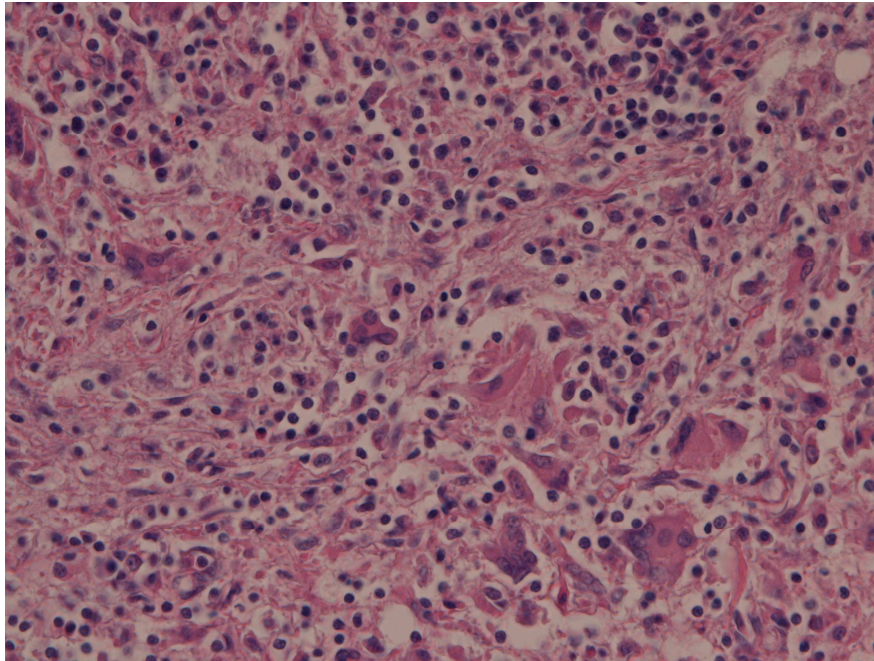


Abbildung 4: Histologischer Schnitt aus einer der porcinen Proben: Riesenzellen, Epitheloidzellen

4.1.2 Molekulare Ergebnisse

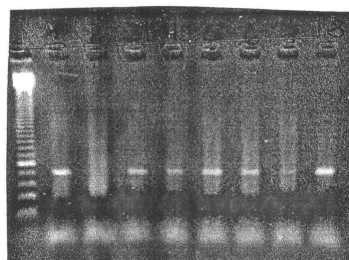
Die Formalin-fixierten Paraffinschnitte wurden mit PCR mit verschiedenen Primern untersucht, die in der Tabelle 17 aufgeführt werden. Die verwendeten Primer waren β -Aktin Primer zum Nachweis von amplifizierbarer DNA bei Säugetieren, 65kDa (hsp) zum allgemeinen Nachweis von Mykobakterien, 16S rRNA für *M. avium* subsp. *paratuberculosis* und *M. avium* subsp. *avium*, IS900 für *M. avium* subsp. *paratuberculosis* und schließlich IS6110 für den *M. tuberculosis*-Komplex.

Tabelle 17: Überblick über Primer

<u>PRIMER</u>	<u>NACHWEIS FÜR</u>	<u>HINWEIS AUF</u>
β -Aktin	Säugetiere	
65 kDa hsp	Mykobakterien	Mykobakterien
16S rRNA	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Geflügeltuberkulose oder Paratuberkulose

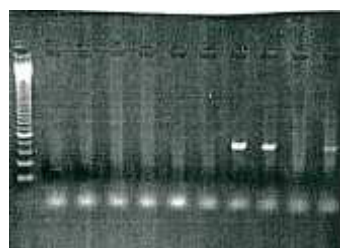
IS900	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Paratuberkulose
IS 6110	<i>M. tuberculosis</i> -Komplex <ul style="list-style-type: none"> • <i>M. tuberculosis</i> • <i>M. bovis</i> • <i>M. africanum</i> • <i>M. microti</i> • <i>M. canetti</i> • <i>M. pinnipedii</i> 	Tuberkulose, Rindertuberkulose, u. a. Tuberkuloseerkrankungen bei Mensch und Tier

Die PCR-Amplifikate wurden sequenziert. Die Ergebnisse ergaben eine vollständige Übereinstimmung mit den Zielsequenzen.



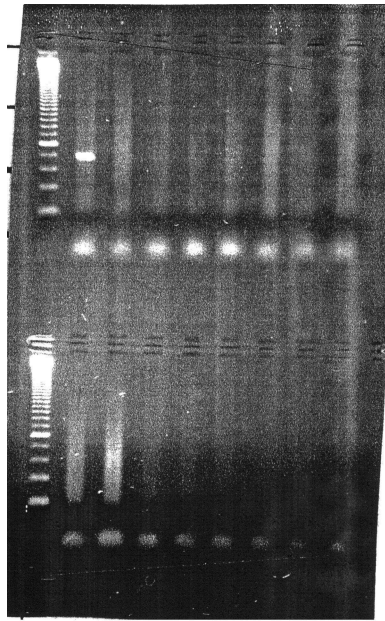
1	Probe 11-1	Positiv	5	Sonstige Probe	Positiv
2	Probe 11-2	Negativ	6	Sonstige Probe	Positiv
3	Probe 3-1	Positiv	7	Probe 4-1	Positiv
4	Probe 3-2	Positiv	8	Probe 4-2	Positiv
5	Sonstige Probe = Proben, die nicht Bestandteil dieser Arbeit sind				

Abbildung 5: Polymerase Ketten Reaktion (PCR) Amplifikation von β -Actin der porcinen Proben



1	Probe 1	Negativ	6	Sonstige Probe	Negativ
2	Probe 1	Negativ	7	Probe 10-1	Positiv
3	Sonstige Probe	Negativ	8	Probe 10-2	Positiv
4	Sonstige Probe	Negativ	9	Probe 8 -1	Negativ
5	Sonstige Probe	Negativ	10	Probe 8-2	Positiv

Abbildung 6: Polymerase Ketten Reaktion (PCR) Amplifikation von 193 bp Fragment von 16S rRNA der porcinen Proben.



1	Probe 1-1	Positiv	11	Sonstige Probe	Negativ
2	Probe 1-2	Negativ	12	Sonstige Probe	Negativ
3	Probe 3-1	Negativ	13	Sonstige Probe	Negativ
4	Probe 3-2	Negativ	14	Sonstige Probe	Negativ
5	Sonstige Probe	Negativ	15	Sonstige Probe	Negativ
6	Sonstige Probe	Negativ	16	Sonstige Probe	Negativ
7	Probe 4-1	Negativ	17	Kontrolle 1	
8	Probe 4-2	Negativ	18	Kontrolle 2	
9	Sonstige Probe	Negativ	19	Kontrolle 3	
10	Sonstige Probe	Negativ	20	Kontrolle 4e	

Abbildung 7: Polymerase Ketten Reaktion (PCR) Amplifikation von 16S RNA

Tabelle 18 gibt einen Überblick über die molekularen Ergebnisse der PCR. Bis auf eine Probe konnte bei allen Proben β -Aktin nachgewiesen werden.

Die Probe Nummer 11 war zwar negativ auf 65 kDa hsp. Diese Probe war positiv auf 16S rRNA, sowie positiv auf IS900, diese Insertionssequenz gilt als typisch für das *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Harris et al., 2001, Miller et al., 1997, Miller et al., 2002). Diese Probe gehört also zu *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Nach Recherche in der Literatur ist dies erstmalig bewiesen worden.

Tabelle 18: PCR-Ergebnisse der Schweineproben

<u>Proben-</u> <u>nummer</u>	<u>β-Aktin</u>	<u>65kDa (hsp)</u>	<u>16S rRNA</u>	<u>IS 900</u>	<u>IS 6110</u>	<u>Interpretation</u>
1	+	-	-	-	-	1)
2	+	-	-	-	-	1)
3	+	-	-	-	-	1)
4	+	-	-	-	-	1)
5	+	-	-	-	-	1)

6	+	+	-	-	-	Mykobakterium unbekannter Herkunft
7	+	-	-	-	-	1)
8	+	+	+	-	-	Kein Nachweis auf Paratuberkulose, demnach <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
9	+	+	+	-	-	
10	+	+	+	-	-	
11	+	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
12	?	-	-	-	-	1)

1) Kein Nachweis auf Mykobakterien

Vier Proben waren positiv auf 65k Da (hsp), d.h. auf den allgemeinen Nachweis von Mykobakterien, davon waren drei zusätzlich positiv auf 16S rRNA, aber negativ auf IS900. 16S rRNA gilt als spezifisch für *M. avium* subsp. *avium* und *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Miller et al., 2002). Demnach gehören diese drei Proben zu dem *M. avium*-Komplex, aber sie sind nicht *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Der Erreger ist somit derselbe wie bei der Geflügeltuberkulose, also *M. avium* subsp. *avium*.

Die vierte positive 65k Da hsp Probe, Nummer 6, reagierte auf keinen anderen Primer. Somit handelt es sich um einen mykobakteriellen Stamm, der nicht von uns getestet wurde. Keine einzige Probe war positiv auf IS6110, den *M. tuberculosis*-Komplex.

Die Probe Nummer 11 war zwar negativ auf 65 kDa hsp. Diese Probe war positiv auf 16S rRNA, sowie positiv auf IS900, diese Insertionssequenz gilt als typisch für das *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Harris et al., 2001, Miller et al., 1997, Miller et al., 2002). Diese Probe gehört also zu *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Laut Literatur ist dies der erste nachgewiesene Fall bei Schweinen.

4.2 Diagnostische Ergebnisse der humanmedizinischen Proben

Die Ergebnisse der humanmedizinischen Proben setzen sich aus den Ergebnissen der histologischen und den weitergehenden molekularen Untersuchungen zusammen.

4.2.1 Histologische Ergebnisse

Fünfundsechzig Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Proben wurden untersucht. Hierbei stammten die Proben aus unterschiedlichen Bereichen des Körpers. Im Einzelnen waren Regionen wie verschiedene innere Organe, Lymphknoten, Knochen und Haut vertreten.

Tabelle 19: Überblick histologische Ergebnisse der humanen Proben

<u>Fall-Nr.</u>	<u>Alter in Jahren</u>	<u>m/w</u>	<u>Land</u>	<u>Klinische Diagnose</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>epithel. Gran.</u>	<u>RZ</u>	<u>Nekrose</u>	<u>ZNF</u>
1	61	W	D	TB	Tibia	+	+	+	-
2	50	W	D	Uro-TB	Niere	+	+	+	-
3	64	W	D	Tumor	Leber	+	+	-	-
4	79	W	D	Abszess	Vulva	+	-	+	-
5	67	W	D	TB	Paravertebral	+	-	-	-
6	42	M	Arab.	Lymphom	LK	+	+	+	-
7	74	M	PL	Entzündung	Nebenhoden	+	+	+	-
8	79	M	D	Tumor	Prostata	+	-	-	-
9	40	W	D	TB	LK	+	+	+	-
10	65	M	D	Spondylitis	WS	+	-	+	-
11	23	M	VN	Lymphom	Nacken	+	+	+	-
12	70	W	D	Granulom	Finger	+	-	+	-
13	43	M	D	Granulom	Oberschenkel	+	-	+	-
14	54	M	D	Spondylitis	WS	+	-	-	-
15	63	M	D	BCGitis	Harnblase	+	+	+	-
16	77	M	D	chron. Entz.	Brustwand	+	-	+	-
17	49	M	TR	Granulom	Larynx	+	-	+	-
18	61	M	D	BCGitis	Prostata	+	-	-	-
19	55	M	D	Tumor	Lunge	+	-	-	-
20	58	M	D	Spondylitis	Brust-WS	+	-	+	-
21	50	M	D	BCGitis	Prostata	+	+	+	-
22	64	M	D	TB	Lunge	+	-	-	-
23	83	M	D	Spondylitis	Lumbal-WS	-	-	+	-
24	61	M	D	BCGitis	Prostata	+	-	-	-
25	23	W	D	TB	Lunge	+	+	-	-
26	45	M	TR	TB	Haut	+	+	-	-
27	35	W	Afrika	Tumor	Tonsillen	+	+	-	-
28	45	W	D	Tumor	Lunge	+	-	-	-
29	67	M	D	Tumor	Prostata	+	-	+	-
30	58	W	D	TB	Lunge	+	+	-	-
31	34	M	Arab	TB	Lunge	+	-	-	-
32	58	M	D	Tumor	Intervertebral	+	+	-	-
33	61	M	D	TB	Lunge	+	+	+	-
34	75	W	D	TB	Lunge	+	+	+	-
35	54	M	D	Tumor	Prostata	+	-	+	-
36	76	M	D	Tumor	Lunge	+	-	+	-
37	59	M	D	Tumor	Lunge	+	+	+	+

38	50	W	D	Epidur. Tumor	Spinalkanal	+	+	-	-
39	87	W	HR	Tumor	Lunge	+	+	+	+
40	24	W	D	Tumor	Becken	+	+	+	+
41	71	W	D	TB	Lunge	+	+	+	+
42	30	M	RUS	Tumor	LK	+	+	+	-
43	19	M	Arab	Spondylitis	WS	+	+	+	-
44	55	W	D	TB	Lunge	+	+	+	+
45	30	M	PK	Spondylitis	WS	+	+	+	-
46	31	W	PK	Tumor	Becken	+	+	+	-
47	87	W	D	TB	Lunge	-	-	+	+
48	77	W	D	Spondylitis	WS	+	+	+	+
49	75	M	D	Bursitis, Abszess	Lumbal-WS	+	+	+	+
50	19	W		TB	Lunge	+	?	-	+
51	65	W	D	M. Wegener, TB	Lunge	-	-	+	-
52	63	M	D	Uro-TB	Prostata	-	-	+	-
53	69	M	D	Tumor	Urogenital-Trakt	+	+	+	-
54	67	W	RUS	TB	Axilla	+	-	+	-
55	74	W	TR	Tumor	Gl. Submandibularis	+	+	-	-
56	59	W	D	TB, Tumor	re. Halsseite	-	-	-	-
57	47	M	E	Bronchialtumor	Bronchialsystem	+	+	+	-
58	33	M	D	Lymphadenitis, TB	re. Halsseite	+	+	+	-
59	69	M	D	bek. ProstataCa, V.a. Sekundärtumor	Lunge	-	-	+	
60	71	M	D	Tumor	Lunge	+	+	+	+
61	29	M	Unbek	TB	LK	+	+	+	-
62	29	W	OE	TB	LK	+	?	-	-
63	22	W	Arab	Lymphadenitis	li. Halsseite	+	+	+	-
64	48	W	D	TB, Pneumonie	Lunge	+	-	+	+
65	44	M	D	TB	Supraclavikulär	+	+	+	

m - männlich, w – weiblich; Nekr. - Nekrosen, ZNF - Ziel-Neelsen-Färbung; LK Lymphknoten, RZ - Riesenzellen, Epithel. Gran. - epitheloid Granulom; Land der Herkunft; Legende: D - Deutschland; HR - Kroatien; RUS - Russland; Arab - Arabien; PK - Pakistan; PL - Polen; VN - Vietnam; TR - Türkei; E - Spanien; OE - Osteuropa; unbek. - unbekannt

Tabelle 19 zeigt detaillierte Informationen über alle Fälle, inklusiver klinischer Diagnose, Lokalisation der Biopsie und bedeutende histopathologische Zeichen. Demzufolge zeigten alle Proben außer sechsen typische epitheloider Granulome. Sechsendreißig wiesen Riesenzellen vom Langerhans-Typ auf, 45 zeigten Nekrosen, die in den meisten Fällen die typischen Zeichen von verkäsender Nekrose aufwiesen. Nur in den Proben, die Epitheloidzellen präsentierten, wurden auch Riesenzellen gefunden, eine Probe war sogar histologisch komplett unauffällig.

Folglich waren in jedem der 65 Fälle bis auf einen einzigen entweder epitheloide Granulome oder Nekrosen vorhanden. In der ZN-Färbung waren nur elf Fälle positiv, in den übrigen Fällen fanden sich bei dieser Färbung keine diagnostischen Informationen.

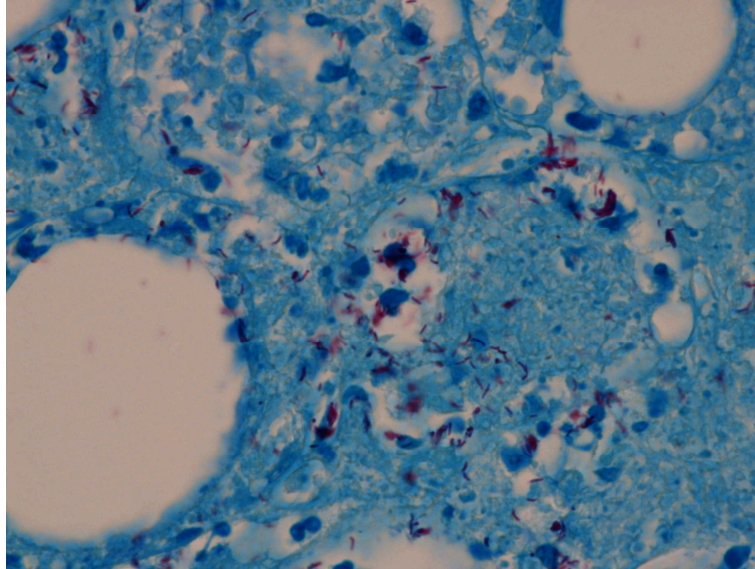


Abbildung 8: Humanmedizinischer Schnitt: positive Ziehl-Neelsen Färbung

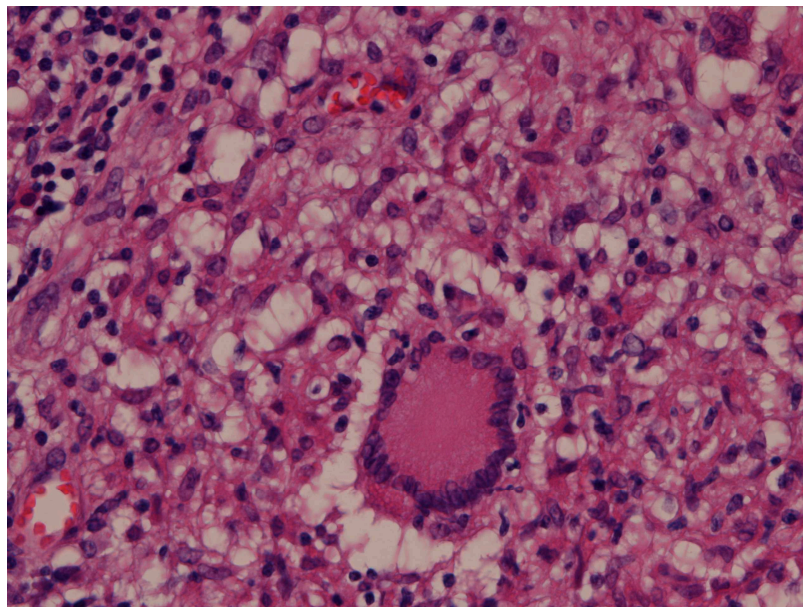


Abbildung 9: Humanmedizinischer Schnitt: Riesenzelle in der HE-Färbung

4.2.2 Molekulargenetische Ergebnisse mittels PCR

Sechsdreißig der 65 Biopsie Proben zeigten ein spezifisches Amplifikationsprodukt in der PCR mit der Zielsequenz IS6110, deren Spezifität durch die typischen Spaltprodukte bei dem

Restriktionsenzymverdau bestätigt wurde. In verschiedenen Fällen wurden sie auch durch die direkte Sequenzierung, wie sie von der Datenbank (BLASTN) Datenbank bekannt ist, bestätigt. Durch diese Methoden wurde der molekulargenetische Nachweis der humanpathogenen Mykobakterien erbracht. Darüber hinaus wurden alle elf Proben mit histochemisch positivem Nachweis von säurefesten Stäbchen molekulargenetisch bestätigt. Zusätzlich wurde eine spezifische molekulare Diagnose in 25 Fällen ohne histologischen Nachweis von Tuberkelbakterien gestellt.

4.2.3 Weitergehende Bestimmung der mykobakteriellen DNA mithilfe von Spoligotyping

Die 36 IS6110 positiven Fälle wurden mit Spoligotyping weitergehend untersucht. Einen Überblick gibt Tabelle 20. Typische Spoligotyping Muster wurden in 23 Fällen erhalten. Sechs Fälle brachten unvollständige Muster mit nur wenigen und verschmierten Hybridisierungssignalen hervor. Sieben Fälle brachten kein Signal hervor.

Tabelle 20: Molekulare Ergebnisse der IS6110 positiven Fälle der humanen Proben

Fall-Nr.	β -Aktin	IS 6110	Spoligotyping
1	+	+	<i>M. bovis</i>
2	+	+	Unvollständig
6	+	+	-
7	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
9	+	+	-
11	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
15	+	+	<i>M. bovis</i>
20	+	+	Unvollständig
21	+	+	<i>M. bovis</i>
25	+	+	Unvollständig
33	+	+	Unvollständig
36	+	+	Unvollständig
37	+	+	<i>M. bovis</i>
39	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
40	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
41	+	+	Unvollständig
44	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
47	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
48	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
49	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
50	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
51	+	+	Neu
52	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
53	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
54	+	+	Neu
55	+	+	Neu
56	+	+	Neu
57	+	+	-
58	+	+	Neu
59	+	+	-
60	+	+	-
61	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
62	+	+	-
63	+	+	Neu
64	+	+	-
65	+	+	<i>M. tuberculosis</i>

Von den 23 erfolgreich erhaltenen Spoligotyping Signaturen wurden 13 als *M. tuberculosis* klassifiziert. Tabelle 21 gibt einen Überblick. Elf trugen typische *M. tuberculosis* Muster, die durch die Anwesenheit der Spacer 37-43 charakterisiert sind (Kammerbeek et al., 1997). Bei neun dieser Fälle waren die Spacer 33-36 abwesend, was ebenfalls typisch für *M. tuberculosis* ist. Zwei Fälle (47 und 48) zeigten Spoligotyping Muster, die in der internationalen Datenbank gespeichert sind und zwei der häufigsten Stämme weltweit ähneln. (shared type number 50 und 53) (Filliol et al., 2002). Ein weiterer Fall (7) wurde vorher in Houston, Texas, (Soini et al., 2000) beschrieben und ähnelt einem sogenannten Shared Type ST Nummer 280 der Datenbank. Fall Nummer 65 gehört zum ST 742 und wird der H3 Familie zugeordnet. Fall Nummer 52 gehört zum ST 766, der T1 Familie. Fall Nummer 50 gehört zum ST 1913, einer Untergruppe der T5-Familie, Fall Nummer 49 zum ST 2553, der keiner Unterfamilie zugeordnet wurde.

Tabelle 21: Spoligotyping Ergebnisse der Paraffin eingebetteten Proben

<u>Fall-Nr.</u>	<u>Spoligotyping – binär</u>	<u>Spoligotyping – oktal</u>	<u>Familie</u>
39		577767437640771	<i>M. tuberculosis</i>
7		770000777760771	<i>M. tuberculosis</i>
48		777777777720771	<i>M. tuberculosis</i>
65		777777770020771	<i>M. tuberculosis</i>
47		777777777760771	<i>M. tuberculosis</i>
52		777761007760771	<i>M. tuberculosis</i>
50		777767757760771	<i>M. tuberculosis</i>
40		577567777760771	<i>M. tuberculosis</i>
49		777777777000771	<i>M. tuberculosis</i>
53		676763677777771	<i>M. tuberculosis</i>
11		777725000403771	<i>M. tuberculosis</i>
44		557567435660241	<i>M. tuberculosis</i>
61		703367400001600	<i>M. tuberculosis</i>
37		200003777377600	<i>M. bov. subsp. caprae</i>
21		476767477770600	<i>M. bovis</i>
1		030040012013000	<i>M. bovis</i>
15		404763773756200	<i>M. bovis</i>
51		770001677000771	neu
54		637767677760771	neu
55		774000673776771	neu
56		776763677777771	neu
58		770367773760671	neu
63		60000007760670	neu
2		00000035660000	unvollständig
36		000003434000000	unvollständig
41		1007434000000	unvollständig
20		00000000004000	unvollständig
25		00000014000000	unvollständig
33		00000004000000	unvollständig

Uncharakteristische Muster für *M. tuberculosis* trugen vier Fälle. Ein Fall, Nummer 61, stellt ein Fall der Unterfamilie CAS dar und gehört zum ST 1675. Fall Nummer 53 gehört zum ST Nummer 695. Die verbleibenden vier Fälle von *M. tuberculosis* konnten keinen bekannten Unterstämmen zugeordnet werden und unterscheiden sich von den bis jetzt eingeordneten und bestimmten Unterklassen.

Bei vier Proben, den wurden Spacer an den Positionen 3 bis 9 nachgewiesen, wobei sich keine Spacer 39 bis 43 fanden, ein für *M. bovis* typisches Muster.

Ein Fall zeigte eine charakteristische Signatur für *M. bovis* subsp. *caprae* (Niemann et al., 2000).

Im Vergleich mit der Datenbank konnte bei sechs Fällen keine Zuordnung zu bestehenden Mustern gemacht werden, sie sind entweder neue Muster oder konnten wegen unvollständiger Signaldarstellung nicht korrekt zugeordnet werden.

5. Diskussion

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Untersuchungen kritisch dargestellt. Die Möglichkeiten und Grenzen der verschiedenen Primer der PCR aufgeführt. Die Stärken und Schwächen des Spoligotyping für die moderne Biologie und Medizin werden dargestellt.

5.1 Kritische Betrachtungen und Grenzen der Analyse

Die Untersuchungsergebnisse können verschiedenen Einflüssen unterliegen. Die genauen Kenntnisse der Fehlerquellen und der korrekte Umgang mit den Proben vermeiden falsche Ergebnisse.

5.1.1 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontamination

Das zunächst größte technische Problem und die relevanteste Gefahrenquelle für ein falsch-positives Ergebnis sind Kontaminationen, wie z.B. Übertragungskontaminationen zwischen verschiedenen Fällen. Verschiedene Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung von Kontamination wurden während der Extraktion und der molekularbiologischen Analytik angewandt. Die Extraktion, die PCR-Reaktion und die nachfolgenden Analysen wurden deshalb in verschiedenen Räumen des Instituts durchgeführt um Verunreinigungen/Übertragungen zu vermeiden. Einweghandschuhe wurden bei allen Arbeitsschritten getragen und mindestens bei jedem neuen Arbeitsschritt gewechselt. Sterile Aerosolfilter wurden verwendet und regelmäßig so ge-

wechselt, dass keine Kreuzinfektionen entstehen konnten. Die Hilfsmittel wurden regelmäßig gereinigt oder autoklaviert, wenn es angemessen war. Zusätzlich zu den Proben wurden Leerproben (sog. „Wasserproben“) bei den Methoden „Extraktion, PCR und Spoligotyping“ wie „normalen“ Proben mitgeführt. Sie liefen während des gesamten Untersuchungsvorgangs mit. Bei einem positiven Ergebnis der Wasserproben besteht der Verdacht der Verunreinigung der gesamten Proben. Während der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen fand sich kein Anhalt für eine Probenverunreinigung bzw. Übertragung.

5.1.2 Polymerasekettenreaktion aus Formalin-fixierten Paraffinschnitten

Formalin-fixierte Paraffinschnitte werden in diagnostischen Laboren routinemäßig hergestellt. Die PCR-Methode an diesem Material anzuwenden, bietet den Vorteil, Proben auch nach längerer Zeit mit relativ wenig Aufwand untersuchen zu können, ebenso wie routinemäßig gewonnenes Probenmaterial, z.B. für eine histologische Abklärung eines ansonsten zunächst nicht infektionsverdächtigen Falles, noch nachträglich für eine diagnostisch verwertbare Analyse genutzt werden können. Nachteil dabei ist, dass üblicherweise die DNA kann im Zuge der histologischen Verarbeitung chemisch alteriert wird und damit grundsätzlich die Diagnostik erschwert werden kann. Allerdings muss die DNA für die PCR-Reaktion nicht intakt sein, da bei der PCR nur DNA-Fragmente vervielfältigt werden. Die PCR kann somit nicht zwischen lebenden und toten Organismen unterscheiden. Der PCR-basierte Nachweis kann auch keine Informationen über das Krankheitsstadium geben. Eine aktive Tuberkuloseerkrankung, reaktivierte Tuberkulose, asymptomatische Infektionen und ruhende Tuberkulose nach einer Therapie können in der PCR die gleichen positiven Ergebnisse liefern. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse gerade von Patienten, die erst kürzlich gegen Tuberkulose behandelt wurden oder eine BCG-Therapie (z.B. bei Harnblasentumoren) erhielten, mit Vorsicht zu betrachten. In beiden Fällen kann ein positives Ergebnis gewonnen werden. Das Ergebnis muss dementsprechend v.a. im Zusammenhang mit dem klinischen Bild des Patienten interpretiert werden (Li et al., 2000). Im Gegensatz zur PCR muss bei der Kultur der Organismus vermehrungsfähig sein. Das Wachstum der Tuberkelbakterien kann mehrere Wochen in Anspruch nehmen.

Bei der PCR aus Formalin-fixierten Paraffinschnitten müssen einige Besonderheiten beachtet werden:

Die Taq DNA Polymerase kann ihre Funktion durch Inhibition von Formalin und Paraffin verlieren. Dadurch können falsch negative Ergebnisse gewonnen werden (Plante et al., 1996).

Deshalb wurden immer geeignete Positivkontrollen neben den normalen Proben untersucht. Falls diese Proben ein negatives Ergebnis aufwiesen und dadurch eine Enzymhemmung anzeigten, wurde der Vorgang nach neuerlicher Aufreinigung wiederholt.

Die zu lange Anwendung von Formalin-Fixation kann zu einem so starken Zerfall der DNA aus dem Gewebe führen, dass auch eine hochsensitive PCR-Reaktion negativ ausfällt. Deshalb sollte das Gewebe üblicherweise nicht länger als 24-48 Stunden in Formalin fixiert werden, bevor es in Paraffin eingebettet wird (Plante et al., 1996). Es sollten nur Primer für kurze Sequenzen (≤ 200 bp) verwendet werden, da dadurch DNA Fragmente besser detektiert werden können (Miller et al., 1999). Die in dieser Arbeit verwendeten Primer für IS6110 erfüllen diesen Anspruch und wurden in verschiedenen Studien auf ihre Spezifität mit dem *M. tuberculosis*-Komplex gründlich getestet. Gerade die 123-bp Sequenz scheint relativ resistent gegen die Auswirkungen der Formalin-Fixierung zu sein.

Eine dritte mögliche Fehlerquelle besteht in der Abwesenheit der gesuchten DNA im untersuchten Organismus (Plante et al., 1996). Manche Mykobakterien besitzen keine IS6110 Sequenz und können daher nicht mit einer PCR für diese Insertionssequenz erkannt werden. In bestimmten Regionen Asiens werden beispielsweise mykobakterielle Stämme ohne die IS6110 Sequenz beschrieben (Li et al., 2000). Dennoch ist diese Sequenz allgemein für den Nachweis von *M. tuberculosis* anerkannt und wird weithin genutzt.

5.1.3 Spoligotyping - Grenzen

Spoligotyping kann zwar mit relativ wenig DNA durchgeführt werden, dennoch muss als Grundvoraussetzung eine Mindestmenge DNA vorhanden sein. Eine zu geringe DNA Konzentration führt zu einem inkompletten Hybridisierungsmuster (Zanden et al., 1998) und kann damit zu einer mangelhaften Vergleichbarkeit mit Internationalen Datenbanken führen. Spoligotyping Muster, die augenscheinlich nur aus Rudimenten bestanden, wurden nicht in die Analyse mit eingeschlossen.

5.2 Diagnostische Ergebnisse bei porcinen Proben

Die Methoden und Ergebnisse der veterinärmedizinischen Proben werden nun nach histologischen und molekularbiologischen Gesichtspunkten erörtert. Verschiedene Überlegungen wurden hinsichtlich der Auswahl der Primer angestellt. Auf die Überlegungen wird nach der histologischen Untersuchung eingegangen.

5.2.1 Histologische Untersuchung

Beim Vergleich der Ergebnisse der histologischen mit den molekularbiologischen Untersuchungen, wie in Tabelle 22 dargestellt, fallen einige Besonderheiten auf. Treten in der Histologie Epitheloid- oder Riesenzellen ohne sonstige pathologische Zeichen isoliert auf, so ließ sich der Verdacht auf eine mykobakterielle Erkrankung durch die PCR nicht bestätigen. Wenn allerdings mehrere histologische Zeichen zusammentrafen, wie der Nachweis von zusätzlichen Nekrosen, Kalk oder der positiven Ziehl-Neelsen-Färbung, erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit einer positiven molekularbiologischen Bestätigung.

Tabelle 22: Vergleich histologischer mit molekularbiologischer Untersuchung der porcinen Proben

<u>Prob-nr.</u>	<u>Organ</u>	<u>Histologischer Befund</u>						<u>Molekularer Befund</u>
		<u>Granulom</u>	<u>RZ</u>	<u>Nekr.</u>	<u>Kalk</u>	<u>Bakterien-nachweis in der ZNF</u>	<u>V. a.</u>	<u>Interpretation nach PCR</u>
1	Lunge	1+	1+	-	-	-	Fremdkörper-Granulom	*
2	Lunge	1+	-	-	-	-	"Pneumonie"	*
3	Leber	EZ 2+	2+	-	-	-	Mykobakteriose	*
4	Leber	EZ 1+	1+	1+	-	-	Mykobakteriose	*
5	LK	EZ 1+	-	-	-	-	Mykobakteriose	*
6	LK	EZ 1+	-	-	-	-	Follikuläre Hyperplasie	Mykobakterium unbekannter Herkunft
7	LK	EZ 1+	-	2+	-	-	Mykobakteriose	
8	LK	EZ 3+	3+	3+	3+	Paucibacillär	Mykobakteriose	Kein Nachweis auf Paratuberkulose, wahrscheinlich gleicher Erreger wie bei Geflügeltuberkulose
9	LK	EZ 1+	-	1+	3+	Paucibacillär	Pilze?	
10	LK	EZ 2+	-	2+	3+	Paucibacillär	Mykobakteriose	
11	LK	EZ 3+	-	3+	3+	Paucibacillär	Mykobakteriose	Paratuberkulose
12	LK	EZ 3+	2+	3+	3+	Paucibacillär	Mykobakteriose	*

Probnr. – Probennummer; RZ – Riesenzellen; Nekt. – Nekrosen; ZNF – Ziehl-Neelsen Färbung; Gran. – Granulom; EZ – Epitheloidzelle; LK – Lymphknoten; - negativ; * keine mykobakterielle DNA nachweisbar; V.a. – Verdachtsdiagnose der zuständigen Pathologin

Proben mit einer positiven Ziehl-Neelsen Färbung fielen auch in der molekularbiologischen Diagnostik durch einen positiven Nachweis auf. Die einzige Ausnahme ist die Probe 12. Hier treten alle histologischen Zeichen auf, die PCR ist aber unauffällig. Da allerdings keine β -Aktin-Amplifikation vorliegt, kann eine Hemmung der DNA vermutet werden, die auch trotz mehrfacher Nachreinigungsschritte nicht beseitigt werden konnte.

Insgesamt wurde eine hohe Korrelation zwischen der Ziehl-Neelsen Färbung und der molekulargenetischen Untersuchung festgestellt. Dies ist nicht verwunderlich, da die Proben nach histologischen Auffälligkeiten ausgewählt wurden. Bei der Ziehl-Neelsen Färbung wird nur der Nachweis auf säurefeste Stäbchen geführt, ohne dass dadurch auf Tuberkelbakterien geschlossen werden kann. Der genaue Erreger kann deshalb nur mit der PCR nachgewiesen werden.

5.2.2 Weitere molekularpathologische Untersuchungen mittels PCR

Die molekulare bzw. weiterführende molekularpathologische Untersuchung der Proben liefert im Gegensatz zur Histologie eine genauere Unterscheidung der verschiedenen Stämme. Durch eine geschickte Auswahl der Primer können verschiedenen Stämme und Unterstämme bestimmt werden. Die porcinen Proben wurden nicht nur auf die üblichen Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes untersucht, sondern im Speziellen auch auf MOTTs.

5.2.2.1 Wahl der Primer

Mykobakterien zeichnen sich durch eine enge genomische Verwandtschaft aus. So ähneln sich die Genome der Mitglieder des *M. avium*-Komplexes zu mindestens 80% (Harris et al., 2001). Der genetische Vergleich mit dem Primer IS900, der Insertionssequenz für *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, ergab eine Übereinstimmung von 82% (Harris et al., 2001).

Diese enge Verwandtschaft erfordert eine exakte molekulare Untersuchung mit einer genauen Auswahl der Primer. Die genaue Kenntnis des Genoms der verschiedenen Mykobakterien erleichtert die Auswahl der Primer und erleichtert dadurch die Unterscheidung der verschiedenen Mitglieder des *M. avium*-Komplexes und des *M. tuberculosis*-Komplexes. Die Kenntnis der Genome erleichtert unter anderem die Entwicklung von Tests, mit denen man beispiels-

weise Paratuberkulose diagnostizieren kann. Eine Kombination aus verschiedenen Primern erhöht die Wahrscheinlichkeit der genaueren Differenzierung zwischen den Mitgliedern. Im Folgenden werden die verwendeten Primer aufgeführt.

5.2.2.1.1 β -Aktin

Zunächst wurde sowohl bei den veterinärmedizinischen als auch den humanmedizinischen Proben der Nachweis von β -Aktin durchgeführt. Dies dient als Nachweis der erfolgreichen Extraktion der DNA (Ghossein et al., 1993). β -Aktin wird eingesetzt, um falsch negative Befunde zu erkennen. Kann β -Aktin in der Untersuchung nicht nachgewiesen werden, so ist das ein Hinweis auf verunreinigte oder gehemmte DNA. Bei 11 von 12 veterinärmedizinischen Proben konnte es nachgewiesen werden. Allein Probe 12 wies, wie bereits in Kapitel 5.2.1 beschrieben, ein negatives Ergebnis auf. Bei über der Hälfte der menschlichen Proben konnte es nachgewiesen werden.

5.2.2.1.2 65kDa hsp

Dieser Primer wurde wie die nachfolgenden nur bei den porcinen Proben verwendet.

Hitzeschockproteine oder *heat shock proteins* (hsp) kommen ubiquitär vor und ähneln sich zu großen Teilen in Eu- und Prokaryonten. Sie helfen anderen Proteinen bei der Faltung und Erhaltung der Sekundärstruktur, weshalb sie zum Teil auch *Chaperone* genannt werden. Das zu dem 65kDa (hsp) gehörige Gen ist in seiner kompletten Sequenz bekannt. Dabei sind die Sequenzen bei verschiedenen mykobakteriellen Stämmen soweit ähnlich oder gar identisch, dass mit dieser Sequenz ein „allgemeiner Nachweis“ von Mykobakterien geführt werden kann (Cocito et al., 1994). Allerdings kann das 65kDa hsp zur Unterscheidung zwischen *M. avium* subsp. *avium* und *M. avium* subsp. *paratuberculosis* verwendet werden, wenn anschließend ein Restriktionsenzymverdau durchgeführt wird (Eriks et al., 1996). Vier der untersuchten porcinen Proben, Proben 6, 8, 9 und 10, waren positiv mit diesem Primer. Die Probe Nummer 6 war zwar positiv auf 65kDa hsp, die anderen für den Nachweis von dem *M. avium*-Komplex verwendeten Primer konnten aber nicht gefunden werden, wie in Tabelle 18 in Kapitel 4.1.2 aufgeführt. Damit wird die Präsenz dieser Stämme bei der fraglichen Probe ausgeschlossen. Die deutet daher auf das Vorhandensein eines anderen mykobakteriellen Unterstammes als die zum *M. avium*-Komplex oder *M. tuberculosis*-Komplex gehörigen hin. Es handelt sich um einen Unterstamm, der nicht durch die verwendeten Primer weiter identifiziert werden konnte.

5.2.2.1.3 16S rRNA

Die rRNA Sequenzen werden ebenfalls für die Untersuchung der genetischen Verwandtschaft von verschiedenen bakteriellen Genera und Spezies verwendet, da sie während der Evolution stark konserviert wurden. Die genetische Übereinstimmung der 16S rRNA ist bei den Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes fast identisch (Brosch et al., 2002, Huard et al., 2006). Der Vergleich der 16S rRNA Sequenz von *M. avium* subsp. *paratuberculosis* und *M. avium*, den Erregern der Paratuberkulose und Geflügeltuberkulose, zeigt eine 99,9%ige Übereinstimmung. Mit Primern, die die Sequenz 16S rRNA identifizieren, schließt man also auf das Vorkommen von einer der beiden Unterstämmen *M. avium* subsp. *avium* oder *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Cocito et al., 1994, Wilton et al., 1992, Ellingson et al., 2000). Gerade bei Formalin-fixierten Paraffinproben hat sich die Anwendung bewährt. Die Erkennungsrate hängt von der Tierart ab. Im Speziellen bei Nichtwiederkäuern und hier im Besonderen bei Schweinen bewegt sie sich um die 72% und hat damit eine höhere Quote als bei Wiederkäuern. (Miller et al., 1999). Damit eignet sich dieser Primer besonders für die in dieser Arbeit verwendeten Proben von Schweinen. Vier der Proben (8, 9, 10, 11) waren, wie Tabelle 18 zeigt, positiv auf diesen Primer. Drei davon (8, 9, 10) waren zusätzlich positiv auf 65kDa hsp, auf den allgemeinen Nachweis von Mykobakterien, aber negativ auf IS900. Nach allgemeiner Meinung schließt dieser Umstand *M. avium* subsp. *paratuberculosis* aus. Diese drei Fälle gehören demnach einem anderen Unterstamm des *M. avium*-Komplexes, dem Unterstamm *M. avium* subsp. *avium* (Miller et al., 1999), an. Diese Beobachtung deckt sich auch mit einer norwegischen Studie an Schweinen. Bei dieser wurde vorwiegend *M. avium* subsp. *hominissuis* festgestellt (Johansen et al., 2007). Nach Mjjs et al ist *M. avium* subsp. *hominissuis* derselbe Stamm wie *M. avium* subsp. *avium* (Mijs et al., 2002).

Probe 11 war zusätzlich auf den Primer IS900 positiv. Sie wird bei der Erklärung des Primer IS900 weiter diskutiert.

5.2.2.1.4 Insertionssequenzen

Insertionssequenzen (IS) sind kleine mobile genetische Elemente, normalerweise weniger als 2,5 kb groß, die in den meisten bakteriellen Genomen weit verbreitet sind. IS Elemente werden dadurch definiert, dass sie nur die genetischen Informationen tragen, die mit ihrer eigenen Transposition und Regulation verbunden sind. Im Gegensatz dazu tragen Transposons Informationen für phänotypische Merkmale wie zum Beispiel Antibiotika Resistenzen. Transpo-

sition von IS Elementen bewirken oft eine Genunterbrechung, die die ursprüngliche Funktion des Gens verändert. Das kann eine Aktivierung oder Änderung der Expression angrenzender Gene hervorrufen. Von evolutionsgeschichtlicher Seite gibt es zwei verschiedene Hypothesen, die die Rolle von IS Elementen im Genom erklären. Die eine sieht die Elemente als genomische Parasiten, die ihrem Wirt, zum Beispiel Bakterien, schaden. Im Gegensatz besagt die andere Hypothese, dass IS Elemente für ihren Wirt für eine adaptive Evolution wichtig sind (Mathema et al., 2006).

5.2.2.1.5 IS900

Die genaue Unterscheidung zwischen *M. avium* subsp. *avium* oder *M. avium* subsp. *paratuberculosis* gelingt schließlich mit einer Insertionssequenz. Die Insertionssequenz IS900 war die erste, die bei Mykobakterien gefunden wurde, sie gilt als spezifisch für *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Green et al., 1989, Ikonomopoulos et al., 2004, Miller et al., 1999, Ellingson et al., 2000). IS900 wurde bei verschiedenen Tierarten wie Rindern nachgewiesen (Miller et al., 2002, Harris et al., 2001) IS900 und IS900-ähnliche Sequenzen wurden auch bei anderen Mykobakterien nachgewiesen, deshalb gilt ein vorsichtiger Umgang mit den Ergebnissen. Der genetische Vergleich mit IS900 und IS1626, einer typische Insertionssequenz für das *M. avium*, ergab eine Übereinstimmung von 82% (Harris et al., 2001). Allerdings kann die Erkennung von IS900 durch einen anderen Test verifiziert werden, beispielsweise durch einen Restriktionsenzymverdau (Motiwala et al, 2003), der in dieser Arbeit angewandt wurde. In großangelegten Studien wurde IS900 schließlich als spezifischer Primer mit hoher Sensitivität für das *M. avium* subsp. *paratuberculosis* bestätigt (Ellingson et al., 2003). So wurde ein PCR-Kit für IS900 als erster kommerzieller Test für *Johne's Disease* bei Rindern herausgebracht (Idexx Corp) (Cocito et al., 1994).

In unseren Proben war eine Probe positiv auf 16S rRNA und zugleich auf IS900, was für das Vorhandensein von *M. avium* subsp. *paratuberculosis* spricht.

Damit führten wir den erfolgreichen Beweis eines Falles mit *M. avium* subsp. *paratuberculosis* bei Schweinen. Gemäß der Literaturrecherche wurde ein solcher Fall noch nicht beschrieben. Unsere Ergebnisse zeigen, dass bei Schweinen Paratuberkulose entdeckt werden kann. Es zeigt die Notwendigkeit der standardisierten Untersuchungen von verdächtigen Proben bei Schlachtvieh mit standardisierten PCR Panels, wie sie in der Literatur vorgeschlagen werden (Ellingson et al., 2000).

Auffälligerweise war sie negativ für 65kDa (hsp). Dieser Primer war offensichtlich nicht sensitiv genug, um mit der Probe positiv reagieren zu können. Miller et al empfehlen die hier angewendete Kombination der Primer IS900 und 16S rRNA für den Nachweis von *M. avium* Komplex. Bei dieser Studie reagierten gerade die Schweineproben nicht auf diesen Primer, was das Vorhandensein von *M. avium* subsp. *paratuberculosis* unwahrscheinlich werden lässt (Miller et al., 1999).

5.2.2.1.6 IS6110.

IS6110 wurde bei den porcinen und humanmedizinischen Proben angewandt. IS Elemente in Bakterienspezien sind in verschiedenen Anzahlen von Kopien vorhanden. Thierry et al beschrieben als erste IS6110, ein 1,355 bp Mitglied der IS3 Familie, die wenn intakt, spezifisch für den *M. tuberculosis*-Komplex ist (Thierry et al., 1990). IS6110 hat fehlerhafte 28-bp inverted repeats an seinem Ende und erreicht eine 3 bis 4 bp Zielverdoppelung bei Insertion. Obwohl 'hot spots' bemerkt wurden, also Regionen innerhalb des *M. tuberculosis* Genoms, in denen das IS6110 vorzugsweise eingefügt ist, sind IS6110 Elemente mehr oder weniger zufällig über das gesamte Genom verteilt. Die Anzahl der Kopien variiert von keiner einzigen bei seltenen Klonen bis zu solchen mit 26 Kopien. Die Spezifität dieser Insertionssequenz für den *M. tuberculosis*-Komplex wurde in Studien hinterfragt. Beispielsweise hatten Kammerbeek et al. die Abwesenheit von IS6110 bei 33 mykobakteriellen Stämmen festgestellt (Kammerbeek et al., 1997). Trotzdem wurde in anderen Studien die Spezifität dieses 123 bp langen Fragmentes bestätigt (Marchetti et al., 1998, Hellyer1997, Miller et al., 1999), ebenso wie die Stabilität (Waksman1965Waksman1965 Waksman S.: The Conquest of Tuberculosis. London, Hale, 1965,

Warren et al., 2002). IS6110 wurde für verschiedene Methoden untersucht und ist ein getestetes und anerkanntes Werkzeug für human- und veterinärmedizinische Fragestellungen (Eisenach et al., 1990, Li et al., 2000, Miller et al., 1997).

Alle 12 Proben der Schweine waren negativ, demnach konnten keine Mykobakterien des *M. tuberculosis*-Komplexes nachgewiesen werden.

5.2.3 Zoonotischer Aspekt

Tuberkulose ist eine Erkrankung von Mensch und Tier. Diese Tatsache zieht Überlegungen der Entwicklung der Krankheit nach sich. War die Erkrankung erst bei einer Spezies vorhan-

den und übertrug sich im Laufe der Zeit auf andere? Die Überlegung, ob Tuberkulose von Tieren, insbesondere von Rindern, auf den Menschen übertragen wurde, wurde oft diskutiert, ohne einen überzeugenden Beweis dafür liefern zu können (Gutiérrez et al., 1997, Johansen et al., 2007). Grundlage für diese Überlegungen scheint die Vorstellung, dass Rinder „weniger reinlich“ als Menschen wären. Dennoch wurde vor über einem Jahrzehnt bei genomischem Vergleich gezeigt, dass die direkte Abstammung von *M. tuberculosis* von einem bovinen Strang unwahrscheinlich sei (Gibbons, 2008, Gordon et al., 1999). Diese These wurde von der ersten größeren stammesgeschichtlichen Untersuchung des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes (Brosch et al., 2002) und in zahlreichen weiteren Studien unterstützt (Hershberg et al., 2008, Filliol et al., 2006, Mostowy et al., 2005, Gutacker et al., 2006). Speziell in der genomischen Sequenzierung wurde gezeigt, dass *M. bovis* ein kleineres Genom als *M. tuberculosis* hat. Weil klonale Organismen wie *M. tuberculosis* keine Deletionen der chromosomalen DNA durch Rekombination reparieren können, kann man annehmen, dass *M. bovis* nicht der Urstamm von *M. tuberculosis* ist. Der angenommene gemeinsame Urstamm von *M. tuberculosis* und *M. bovis* war auf chromosomaler Ebene *M. tuberculosis* näher (Smith et al., 2009).

Der Umkehrschluss, nämlich dass der Mensch Tuberkulose auf Tiere und insbesondere auf Rinder übertragen hat (Gibbons, 2008), scheint demnach wahrscheinlicher. Jedoch noch viel wahrscheinlicher ist es, dass ein gemeinsamer Vorfahre existierte, aus dem sich die verschiedenen Stämme entwickelt hätten. Nach heutigen Kenntnissen scheint die Entwicklung der Tier-bezogenen Stämme sich aus einem einzelnen Klon von *M. tuberculosis* ergeben zu haben, der anderen Säugetieren als Menschen infizieren, übertragen und in der fremden Spezies überleben konnte. Er übertrug sich im Folgenden von einer Säugetierspezies auf die nächste. Das betrifft beispielsweise Dachse auf Rinder (Smith et al., 2006) und Füchse in Neuseeland (Smith et al., 2006, Brosch et al., 2002, Mostowy et al., 2005). Die direkte Übertragung über beispielsweise Aerosole vom Tier auf den Menschen oder umgekehrt erscheint unwahrscheinlich.

5.3 Diagnostische Methoden bei humanen Proben

Die humanen Proben wurden mit der PCR und anschließend mit Spoligotyping untersucht. Spoligotyping ist eine neuere Methode der Molekularbiologie, die bisher nicht in der Routinediagnostik etabliert ist.

5.3.1 Molekulargenetische Ergebnisse mittels PCR

Wie in Kapitel 5.1.2 ausgeführt, kann eine PCR-Analyse an in Paraffin eingebetteten Proben problembehaftet sein. Doch Studien – speziell auch im Rahmen von Ringversuchen, an denen auch das Institut für Pathologie am Klinikum Bogenhausen als Referenzlabor teilgenommen hat - belegen eine erfreulich gute Vergleichbarkeit von PCR-Untersuchungen im Hinblick auf die mykobakterielle Diagnostik (Schewe et al., 2005). Weitere Studien belegen die hohe Sensitivität von mindestens 73,6%, und Spezifität von mindestens 88% der PCR-Analyse (Sailan et al., 1998, Park et al., 2003).

Somit wurden beste Ausgangsbedingungen für die Untersuchung der Proben geschaffen. Bei allen Patienten konnte β -Aktin erfolgreich nachgewiesen werden. Damit wurde einerseits Säugetier-DNA, andererseits die Replizierbarkeit der vorhandenen DNA nachgewiesen, wie in Kapitel 5.2.2.1 beschrieben. Die Proben mit dem erfolgreichen β -Aktin Nachweis wurden mit einer PCR mit der Zielsequenz IS6110 untersucht. Wie in Kapitel 5.2.2.1 ausgeführt, erfolgt damit der Nachweis auf Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes (Zink et al., 2003, Eisenach et al., 1990).

Mit diesem Ansatz konnte nicht nur die Anwesenheit von Mykobakterien in den elf Fällen, in denen die positiven ZN-Färbungen eine mykobakterielle Infektion gezeigt hatte, bestätigt werden. Zusätzlich wurden in 13 von 65 Fällen mit histologisch unklaren oder verdächtigten mykobakteriellen Infektion molekulargenetisch Mykobakterien nachgewiesen. Diese Rate deckt sich mit den Ergebnissen verschiedener vorhergehender Studien, die Proben aus Formalin-fixierten Paraffinschnitten von Patienten mit dem klinischen Verdacht auf Tuberkulose mit einschlossen (Li et al., 2000, Park et al., 2003). Die Amplifikation mykobakterieller DNA von säurefesten Stäbchen unterstreicht klar die hohe Spezifität der IS6110 basierten PCR. Dadurch bestätigen sich die Ergebnisse vorhergehender Studien, die den Schwerpunkt auf die Sensitivität und Spezifität dieses molekularen Ansatzes legten (Sailan et al., 1998, Li et al., 2000, Miller et al., 1997, Park et al., 2003).

Mit dieser Methode endet bisher im Regelfall die Routinediagnostik. Aus epidemiologischen Aspekten wurden weitergehende Untersuchungen veranlasst und alle Proben mit positiver Amplifikation von IS6110 wurden zur weiteren Analyse dem Spoligotyping mithilfe des Spoligotyping Kit zugeführt.

Zum leichteren Einstieg in dieses Thema folgt ein Überblick über die verschiedenen epidemiologischen bzw. phylogeographischen Methoden.

5.3.2 Epidemiologische/ Phylogeographische Untersuchungen

Auch wenn Tuberkulose in den hiesigen Breiten scheinbar kaum verbreitet ist, so ist es doch ein aktuelles Thema, mit dem sich die WHO, wie in Kapitel 1.2.4 erwähnt, intensiv auseinandersetzt. Insbesondere Mykobakterien entwickelten sich in den letzten Jahren zu einem beliebten Forschungsthema, mit einem Schwerpunkt bei der Phylogenie oder Epidemiologie der Bakterien, die hinter dieser Krankheit stehen.

5.3.3 Spoligotyping und andere molekulargenetische Techniken

Verschiedene molekulargenetische Techniken werden zur Untersuchung der Evolution der Tuberkelbakterien und anderer Bakterienspezies eingesetzt. Diese in ihrer Gesamtheit aufzuzählen und zu erläutern, ist nicht Ziel dieser Arbeit. Exemplarisch wird IS6110 RFLP typing als Pendant zu Spoligotyping erklärt. Eine weitere Methode ist SNPs, die *Single Nukleotide Polymorphisms*. Zunächst wird aber auf die Entstehung der Deletionen bei den Spoligotyping Muster eingegangen, da dies einen wesentlichen Bestandteil dieser Methode darstellt.

5.3.3.1 Spoligotyping und die Entstehung von Deletionen der Spacern

Spoligotyping unterscheidet zwischen den verschiedenen Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes durch die An- oder Abwesenheit von Spacern (Kammerbeek et al., 1997).

Es wird angenommen, dass die DR Regionen Spacer unwiederbringlich aufgrund von homologer Rekombination oder IS6110 Transposition verlieren, allerdings können sie keine zusätzlichen DNA Fragmente gewinnen. Hinsichtlich der bakteriellen Genetik ist Rekombination die Übertragung eines Segments der chromosomalen DNA von einem Stamm auf den anderen. Vergleichbar ist der Vorgang mit Geschlechtsverkehr bei anderen Spezies, da Rekombination die Verknüpfung zwischen Allelen bei verschiedenen Orten aufbricht. Für den *M. tuberculosis* Komplex außer für *M. canetti* finden sich nur wenige Nachweise für Rekombinationen, die Rekombinationsrate in den sequenzierten Genen ist vernachlässigbar.

Die *M. tuberculosis* Isolate zeichnen sich durch die Abwesenheit der Spacer in den Positionen 33 bis 36 aus. Die Klassifikation von *M. africanum* ist schwieriger, zeichnet sich wahrscheinlich durch die Abwesenheit des Spacer 39 aus. Analog dazu weisen auch *M. microti* und *M. canetti* spezifische Muster auf.

Deletionen von DR und Spacern können mehrfach und unabhängig voneinander bei verschiedenen Stämmen auftreten, was zu ähnlichen Entwicklungsmustern bei stammesgeschichtlich unterschiedlichen Stämmen führen kann. Die Spoligotyping Muster gleichen sich trotz der unterschiedlichen Stämme (Waksman 1965, Warren et al., 2002), weshalb diese Methode durch andere wie das IS6110 RFLP ergänzt wird.

5.3.3.2 Spoligotyping

Innerhalb dieser Arbeit fiel die Entscheidung auf das Spoligotyping als Analysemethode, weil es verschiedene Vorteile bietet. Spoligotyping ist eine interessante Alternative zu anderen Methoden, wenn schnelle Ergebnisse gefragt sind. In unseren Breiten werden für das Spoligotyping problematische Stämme, wie der W-Beijing Stamm, nicht häufig erwartet.

Die W-Beijing Familie beispielsweise ist eine große, stammesgeschichtlich verwandte Gruppe von *M. tuberculosis* Isolaten, die alle ähnliche Spoligotyping-Muster aufweisen. Bei ihnen fehlen die Spacer 1 bis 34. Mit IS6110 RFLP kann die Familie weiter unterschieden werden, weil sie aus hunderten ähnlichen und trotzdem verschiedenen IS6110 Mustern besteht (Bifani et al., 2002). Hier kann Spoligotyping genutzt werden, um W-Beijing Fälle in einer Bevölkerung nachzuweisen. Jedoch werden Ansteckungen durch die verschiedenen Unterstämme der Familie schlecht mit Spoligotyping erkannt, vor allem in Regionen, wo Genotypen als endemisch gelten, so in Russland, China und Südafrika (Bifani et al., 2002).

Außerdem werden die W-Beijing Stämme erkannt, nur die weitere Differenzierung ist ungenau. Da hierbei etablierte Techniken wie die PCR verwendet werden, ist es für Labore ohne hohen finanziellen Aufwand möglich, diese Technik routinemäßig zu etablieren. Es ist somit die einfachste Technik für die Genotypisierung des *M. tuberculosis*-Komplexes, indem es vorhandene Techniken wie die PCR nutzt und bietet sich für den täglichen Gebrauch an. Hierbei bestätigt man nicht nur Fälle, bei denen die PCR IS6110 Sequenz nachgewiesen werden kann, sondern gewinnt zusätzlich Informationen über die verschiedenen Stämme der Mykobakterien. Bei der Aufdeckung von Doppelinfektionen verschiedener mykobakterieller Stämme können diese Informationen hilfreich ist. Darüber hinaus wird die Identifikation von Stämmen und Unterstämmen bei immer wieder auftretenden Infektionen sogar in archivierten Proben wie Paraffinschnitten ermöglicht.

Spoligotyping bietet einige Vorteile. Die Daten können in einem binären Code, zum Beispiel plus und minus, oder in einem oktalen Code System dargestellt werden. Damit können sie bequem zwischen verschiedenen Laboren oder mit einer Datenbank verglichen werden, wie mithilfe eines Word Prozessors. Es gibt zwei große Internetseiten, siehe Tabelle 23, die für vergleichende Analysen verfügbar sind: Sola et al. erstellten erstens eine Datenbank auf der Basis bisher veröffentlichter Spoligotypes, in der sie Spoligotyping-Muster aufführten, die bei mehr als zwei Patienten weltweit auftraten. Die Datenbank umfasst knapp 2000 verschiedene Spoligotypes, die in große Spoligotype Familien organisiert wurden (Brudey et al., 2006). Die Familien werden nach gemeinsamen Leitstrukturen der abwesenden Spacer festgelegt.

Tabelle 23: Internetauftritte für Spoligotyping

http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/
SpolDB4 database und SITVIT database
http://cgi2.cs.rpi.edu/~bennek/SPOTCLUST.html
SPOTCLUST homepage - für Analysen der Spoligofamilien

Kürzlich wurde zweitens ein Internet-basiertes Programm entwickelt, das Spoligotypes in die einzelnen Familien zuordnet: die SPOTCLUST homepage.

Membrane für die Analyse von bis zu 45 Proben gleichzeitig sind kommerziell erhältlich. Die standardisierte Analyse von 43 Spacern kann direkt an Zell Lysaten ohne vorherige Reinigung der DNA durchgeführt werden. Spoligotyping erfordert wenig bakterielle DNA zur Durchführung, es genügen deutlich weniger als 2 µl, und es kann in relativ kurzer Zeit durchgeführt werden. Im Gegensatz zu beispielsweise der Kultur kann es demnach an Bakterien, die nicht mehr lebensfähig sind, durchgeführt werden. Es erlaubt die Genotypisierung von gekochtem oder in Paraffin eingebettetem Material sowie von Ziehl-Neelsen Schnitten (Zanden et al., 1998, Quian et al., 1999). Klinische Proben können so auch nach Jahren retrospektiv aufgearbeitet werden. Beispielsweise wurden Kulturen Robert Koch's, an denen er Tuberkulose erforschte, im Rahmen neueren Untersuchungen mittels PCR und Spoligotyping aufgearbeitet (Taylor et al., 2003). Selbst Forschungen an archäologischem Material wie ägyptischen Mumien ist möglich, denn es ist keine Kultur nötig und auch kurze IS Sequenzen werden erkannt (Zink et al., 2003, Hershkovitz et al., 2008). Zink et al enthüllten die Anwesenheit von ver-

schiedenen *M. tuberculosis* und *M. africanum* Stämmen an 4000 Jahre altem Probematerial und zeigten die hohe Sensitivität dieses Ansatzes. Mykobakterien wurden mit Spoligotyping in fossilem Gewebematerial von Bisons, das auf 17,000 Jahre zurückdatiert wurde, nachgewiesen (Rothschild et al., 2001).

Diese Technik wird ausgiebig für phylogeographische Studien genutzt, z.B. in Taiwan (Dou et al., 2008) und Kanada (Reed et al., 2009). Es eignet sich für die erste grobe Analyse von *M. tuberculosis*, vor allem in Regionen mit verschiedenen Populationen zur Unterscheidung von molekularer Epidemiologie, wie in Kapitel 5.3.3.2 dargestellt.

Mit dem Spoligotyping können auch Resistenzen gegenüber Medikamenten entdeckt und überwacht werden (Zanden et al., 1998). Es erlaubt eine rasche Aufdeckung des Stammes sowie dessen schnelle Bekämpfung im Falle einer Epidemie oder Superinfektion an Orten, in denen sich viele immunsupprimierte Personen aufhalten, wie z.B. in Krankenhäusern und Gefängnissen. Außerdem kann der Erreger bei genauer Dokumentation bei Patienten zwischen neuer Erkrankung und wieder aufgetretener Infektion unterschieden werden. Falls beispielsweise eine BCG-geimpfte Person die Symptome einer Tuberkulose-Infektion entwickelt, kann man mithilfe von Spoligotyping durch Stammdifferenzierung herausfinden, ob es sich um den Impfstamm oder eine Neuinfektion handelt (Kammerbeek et al., 1997). Auch eine Unterscheidung zwischen Krankheitsrückfall oder Reinfektion ist möglich, wenn sich die Stämme unterscheiden. Dies kann auch zur Entdeckung von Fehlern oder Kreuz-Kontaminationen zwischen verschiedenen Laboren dienen.

5.3.4 Weitergehende Bestimmung der mykobakteriellen DNA unserer humanen Proben mithilfe von Spoligotyping

Die Ergebnisse dieser Arbeit wiesen die erfolgreiche Anwendung von Spoligotyping für die Identifikation von humanpathogenen Stämmen der Mykobakterien in etwa zwei Drittel der archivierten Gewebeproben der Pathologie des Klinikums Bogenhausens nach. Die vorherigen Studien wandten Spoligotyping nur bei klaren histomorphologischen Zeichen an (Zanden et al., 1998, Quian et al., 1999). Dagegen wurden hier unklare Proben ebenfalls mit eingeschlossen und auf mykobakterielle DNA geprüft. Alle Proben wurden auf Identifikation und Charakterisierung der DR Region des mykobakteriellen Genoms untersucht, wobei der erfolgreiche Einsatz von Spoligotyping an einer größeren Zahl Proben gezeigt wurde.

Es wurde nachgewiesen, dass PCR und Spoligotyping fast identische Ergebnisse lieferten. Das Spoligotyping allerdings erlaubt einen höheren Informationsgewinn im Gegensatz zum Einzelgen-Nachweis.

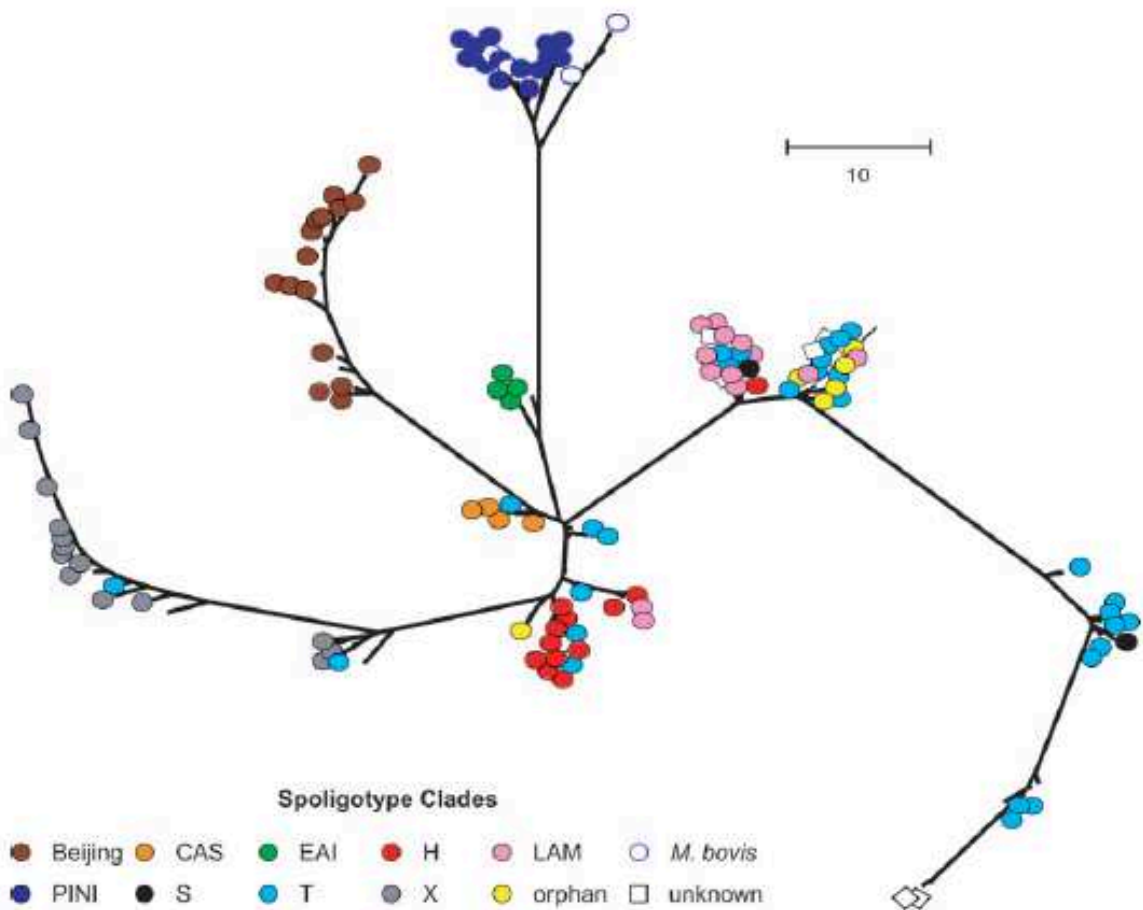


FIG. 6. Distribution of the spoligotype clades on the SNP-based phylogeny. Each isolate is indicated by a dot, which is color coded according to the spoligotype clade assignment. CAS, Central Asian clade; EAI, East African-Indian clade; H, Haarlem clade; LAM, Latin American and Mediterranean clade; PINI, *Mycobacterium pinnipedii* clade; S, S clade; T, T clade; X, X clade.

Abbildung 10: Verteilung der verschiedenen Clades des *M. tuberculosis*-Komplex Filliol et al., 2006

Zusätzlich kann mit Spoligotyping eine genauere Strangdifferenzierung des *M. tuberculosis*-Komplex erfolgen. Dabei wurden die in dieser Arbeit erhaltenen Signaturen mit der internationalen Datenbank des Institut Pasteur Guadeloupe (Internetadresse in Tabelle 23) verglichen und es wurden Übereinstimmungen mit Mustern gefunden, die aus Studien aus verschiedenen geographischen Regionen erhalten wurden. Eine Übersicht über die Muster und zugeordneten Shared Types gibt Tabelle 24 im Anhang.

Zwei der Muster (47, 48) erwiesen sich als weltweit üblich, d.h. sie treten auf mindestens drei Kontinenten und in mindestens sechs Arealen oder auf vier oder mehr Kontinenten auf. Fall Nummer 47 wurde der Familie T1 zugeordnet und gehört zum klassischen Typ ST 53, bei dem alle Spacer anwesend sind bis auf 33-36. In Europa repräsentiert ST 53 9% der Spoligotypes (Filliol et al., 2002). Die T-Familie, ein moderner Tuberkulosestamm wurde in fünf Unterklassen (T1-T5) unterteilt, basierend auf Unterschiede zwischen einzelnen Spacern. Sie kristallisierten sich mit robusten Spoligotyping Mustern heraus. Ihre Namen werden zusammengesetzt aus ihrer vermuteten Bezeichnung zum höheren Clade, gefolgt von der vermuteten geographischen Zuordnung, beispielsweise T5-Russia/2 (Brudey et al., 2006). Fall 52 gehört gleichfalls zu T1, welche durch die Abwesenheit der Spacer 33-36 bestimmt wird. Ein Clade bezeichnet eine Gruppe Organismen, die von einem gemeinsamen Ahnen abstammen, und keine Änderungen in den stammesgeschichtlichen Hauptinformationsmakern aufweisen (Smith et al., 2006). Ein Bild der Verteilung der verschiedenen Clades des *M. tuberculosis*-Komplex gibt Abbildung 10, die Filliol et al aufgrund ihrer molekularen Untersuchungen erstellt haben (Filliol et al., 2006). Ein weiteres Muster (7) wurde in Houston, Texas, beschrieben. (Soini et al., 2000). Dieser Fall gehört zum ST 280, der Familie T1-Russia/2. Der Patient stammt aus Polen und es liegt eine Übereinstimmung zwischen geografischer Beziehung von Wirt und Parasit vor.

Fall Nummer 50 wurde der Familie T5 zugeordnet.

Fall Nummer 48 wurde ST 50 zugeordnet, welcher zu der Familie Haarlem3, also H3, gehört. Haarlem3 wird durch die Abwesenheit des Spacers 31 und der Spacer 33-36 festgelegt. Die Haarlem-Familie steht für 8% der Fälle in Europa (Filliol et al., 2002). Gleichfalls wird Fall Nummer 65 zur H3 Familie zugeordnet.

Zwei weitere wiesen typische Muster von *M. tuberculosis* auf, wurden allerdings nicht in der Datenbank gefunden. Es stellt sich nun die Frage, ob diese zwei Muster zu neuen, bisher noch nicht beschriebenen Unterstämmen gehören oder ob die Unvollständigkeit der Signaturen auf das Aussetzen einzelner Spacer zurückzuführen ist. In einem solchen Falle kann die Auswertung der Spoligotyping-Muster zu Fehleinschätzungen kommen und sollte deshalb nicht weiter verfolgt werden.

Untypische Muster für *M. tuberculosis* wiesen weitere vier Fälle (53, 11, 44, 61) auf. Fall 11 wird der EAI4 Familie zugeordnet. EAI ist definiert als East-African-Indian lineage, die all-

gemein dem Indischen und Asiatischem Raum zugeordnet wird. Bei Familie EAI4 fehlen die Spacer 26–27 und 29–32 (Filliol et al., 2002). Die Familie EAI4 wird phylogeographisch vor allem Vietnam zugeordnet (Brudey et al., 2006). Hierbei ist es besonders interessant, dass gerade dieser Patient aus Vietnam kommt. Es deckt sich mit der von Huard et al. gemachten Beobachtung, dass die Mykobakterien solche Wirte bevorzugen, die geographisch aus der gleichen Region stammen (Huard et al., 2006). Zumindest läßt sich davon ausgehen, dass diese Infektion schon im Herkunftsland erfolgte.

Fall Nummer 61 wird dem ST1675 und damit einer Variante des CAS, der CAS_KILI, zugeordnet. Die Central-Asian (CAS) lineage wird hauptsächlich Indien, dem indischen Subkontinent und Tansania zugeordnet (Brudey et al., 2006.) CAS1 wird definiert durch die Abwesenheit der Spacer 4–7 und 23–34 (Filliol et al., 2002).

Interessanterweise wurden mindestens vier *M. bovis* spezifische Muster eindeutig mit Spoligo-typing identifiziert. Davon stammt eines von einem Patienten mit dem klinischen Beweis einer Lungentuberkulose. Dieser Fall wurde eindeutig als typisches Muster des *M. bovis subsp. caprae* identifiziert (Niemann et al., 2000), der bisher hauptsächlich bei Schafen und Ziegen isoliert wurde (Gutiérrez et al., 1997). Kubica et al wiesen in einer Studie nach, dass dieser Unterstamm für ein Drittel aller humaner Tuberkulosefälle, die von bovinen Tuberkelbakterien in Deutschland zwischen 1999 und 2001 verursacht wurden, verantwortlich war (Kubica et al., 2003).

Die drei übrigen Muster zeigten alle die Abwesenheit der Spacer 3 und 9, zusätzlich waren in zwei Fällen die Spacer 16 abwesend. Diese Spacer sind üblicherweise in *M. bovis* BCG Stämmen abwesend (Kammerbeek et al., 1997). In diesem Kontext ist es interessant, dass diese beiden Patienten zuvor mit einer BCG-Therapie für Urothelcarcinome der Blase behandelt wurden und deshalb höchstwahrscheinlich eine lokale BCG-Infektion entwickelt haben. Hier zeigt sich der Nutzen einer Differenzierung der Unterstämme bei einer Therapieentscheidung.

Sechs weitere Fälle zeigten ein unvollständiges schmieriges Muster, bei denen keine weitere Stammdifferenzierung möglich war, was als Folge schlechter DNA-Konservierung aufgrund mangelhafter Fixierung oder Einbettung gelten kann. Es kann angenommen werden, dass diese chemischen Maßnahmen an den Gewebeproben während der histologischen Aufarbeitung

den Degenerationsprozess der DNA fördern und die Menge der detektierbaren Bakterien mindern (Greer et al., 1991, Karlsen et al., 1994).

Zusammenfassend zeigte diese Arbeit sehr schön, dass Formalin-fixierte Paraffinschnitte für epidemiologische und evolutionstheoretische Studien genutzt werden können. Es wird ein klarer Beweis geführt, dass die Epidemiologie von *M. tuberculosis*-Komplex Stämmen und Unterstämmen in archiviertem Material bestimmt werden kann. Außerdem können mit dieser Technik Daten über Superinfektionen mit verschiedenen Tuberkulosestämmen sowie klinisch relevante Daten über Stämme mit Medikamentenresistenzen gesammelt werden.

5.4 Möglichkeiten und Grenzen der molekularen Stammdifferenzierung

Mehrere Studien haben sich in jüngerer Zeit mit stammesgeschichtlichen und evolutionsgeschichtlichen Thesen beschäftigt. Hierbei wurden verschiedene Theorien über die weltweite Stammverteilung des *M. tuberculosis*-Komplexes und der Mykobakterien im Allgemeinen entwickelt. Möglich wurden diese Überlegungen durch verschiedene moderne molekulare Methoden wie Spoligotyping, IS6110 RFLP und anderen. In jüngerer Zeit erarbeiteten Gagneux & Small einen Konsensus aus fünf verschiedenen Studien, die auf Spoligotyping, Indels und SNPs basierten (Gagneux & Small, 2007). *M. tuberculosis* besteht laut ihnen aus sechs phylogenetischen Linien. Sie werden mit Abstammung 1 bis Abstammung 6 bezeichnet. Die sechs Abstammungen von *M. tuberculosis* zeigen biogeographische Spezialisierungen, indem die einzelnen Abstammungen mit bestimmten geographischen Regionen vergesellschaftet sind (Abbildung 11: Biographische Spezialisierung von *M. tuberculosis*-Komplex). Manche dieser Assoziationen spiegeln wahrscheinlich alte menschliche Wanderungen wieder. So spiegelt die Verteilung der Abstammung 4 in Europa, Amerika, in Teilen Afrikas und Australien vermutlich die globale Kolonisation der Europäer wieder (Mathema et al., 2006).

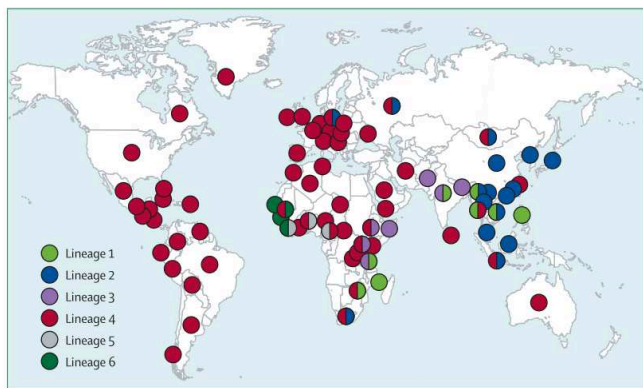


Figure 2: Global phylogeography of *M. tuberculosis*

Abbildung 11: Biographische Spezialisierung von *M. tuberculosis*-Komplex

5.4.1 Korrelation Stämme des MTBC und Bevölkerungsschichten

Die Populationsstruktur von *M. tuberculosis* kann in der heutigen Zeit mit diesen sechs stammesgeographischen Linien weltweit bestimmt werden. An einer städtischen Umgebung mit Bevölkerungsgruppen aus verschiedensten Teilen der Welt und mit einer hohen Übertragungsrate von Tuberkulose, nämlich in San Francisco, USA, wurde eine interessante Beobachtung gemacht: Jede der sechs Linien ist mit einer bestimmten ethnischen Bevölkerungsgruppe gleicher Herkunft verbunden. Beispielsweise handelt es sich, wenn ein Chinese erkrankt, mit höherer Wahrscheinlichkeit um einen ostasiatischen Stamm als um einen der anderen. Wurden Stämme bei Patienten einer anderen als der sonst üblichen Herkunft nachgewiesen, betrafen sie unangemessen oft Hochrisiko-Patienten mit eingeschränkter Immunabwehr (Huard et al., 2006, Gagneux et al., 2006). Sehr ähnliche Ergebnisse wurden mithilfe von Spoligotyping und RFLP aus Montreal, Kanada, erhalten, einer Stadt mit einer niedrigen Rate an Tuberkuloseübertragung und zwei sehr unterschiedlichen Bevölkerungsstrukturen. Hierbei wurde ebenfalls das enge Verhältnis eines Genotypes mit einer bestimmten Bevölkerungsstruktur beobachtet (Reed et al., 2009). Eine ähnliche Verbindung von Wirt und Genotypen von *M. tuberculosis* wurde mithilfe von Spoligotyping in einer anderen ethnischen Bevölkerung in Taiwan gefunden, dessen Migrationsaktivitäten vor 55 bis 500 Jahren stattfanden (Dou et al., 2008). Auch Hirsh et al. beschreiben die enge Verbindung zwischen dem Wirt und dem Krankheitserreger, die abhängig vom Ursprungsort des Wirtes ist und die trotz Ortswechsel stabil bleibt. Sie führen diese enge Verbindung auf eine lange gemeinsame Entwicklungsgeschichte von Wirt und Krankheitserreger zurück (Hirsh et al., 2004).

5.4.2 Weitere phänotypische Unterschiede

Unterschiede zwischen der Virulenz bei verschiedenen Stämmen wurden schon im in der ersten Hälfte des 20 Jahrhunderts festgestellt (Gagneux & Small, 2007). Die Antwort des Immunsystems kann, abhängig vom Bakterienstamm, unterschiedlich in Qualität oder Quantität ausfallen. In der klinischen Manifestation existieren ebenfalls Unterschiede. Es konnte eine Korrelation zwischen den verschiedenen Genotypen von *M. tuberculosis* und deren klinischer Manifestation als pulmonaler und extrapulmonaler Tuberkulose festgestellt werden. Anhand des *Beijing*-Stammes/ Ostasiatischen Stammes zeigten Thwaites et al, dass dieser Stamm eher eine meningeale Tuberkulose hervorruft und mit einer erhöhten Medikamentenresistenz einhergeht, die den Therapieerfolg beeinflusst (Thwaites et al., 2008).

5.4.3 Der Nutzen phylogeographischer Untersuchungen

Stammesgeschichtliche Studien ziehen Rückschlüsse auf bestimmtes menschliches Verhalten in der Geschichte wie Völkerwanderungsbewegungen. Die direkte Aufdeckung und Bestimmung von aDNA ermöglicht eine genaue zeitliche Zuordnung dieser Veränderungen. Molekularbiologische Daten von historischem Material können zum anthropologischen Verständnis der Faktoren beitragen, die menschliche Wanderung, Niederlassungen und Interaktionen beeinflusst haben. Ein wachsendes Verständnis der Faktoren, die die Krankheitserreger-Wirtsbeziehung beeinflusst haben, ist heutzutage von großer Wichtigkeit. Phylogeographische Stammunterschiede können die Entwicklung von neuer Diagnostik, von Medikamenten und Impfungen beeinflussen. So werden neue Medikamente entwickelt, auf die bestimmte Stämme resistent sind. Beispielsweise ist *M. bovis* von Natur aus resistent auf Pyrazinamid. Eine genaue Stammdifferenzierung vor der Erstgabe dieser Medikamente kann sinnvoll sein, um Therapiekosten senken, die Compliance der Patienten zu erhöhen und schlicht unnötige Medikamenteneinnahmen zu verhindern. Die Impfung BCG bei Tuberkulose hat einen Wirkungsgrad zwischen 0 und 80%, eine mögliche Ursache kann aufgrund der Unterschiede zwischen den Stämmen sein (Gagneux & Small, 2007). Es gibt zusätzlich eine wachsende menschliche Bevölkerung in dichteren Siedelungen und eine rasche weltweite Reisebewegung, hier kann die Stammdifferenzierung wichtig für Therapieentscheidungen sein.

5.4.4 Einschränkungen

Die aktuelle Diskussion über die Evolution und molekulare Besonderheiten von *M. tuberculosis*-Komplex sollte als Warnung für andere, die in anderen Bereichen der Mikrobiologie arbei-

ten, gelten. Daten aus molekulargenetischen Untersuchungen wie die hier vorgestellten sind einfach zu erhalten, aber die angemessene Analyse und Interpretation dieser Daten ist ein langwieriger und teurer Prozess (Smith et al., 2009).

6. Zusammenfassung

Mykobakterien sind heterogene Krankheitserreger und befallen Mensch und Tier. Der bekannteste Vertreter ist das *Mycobacterium tuberculosis* als Hauptverursacher der Tuberkulose und wichtigster Vertreter des *M. tuberculosis*-Komplexes. Daneben gibt es *Mycobacteria other than tuberculosis*, die MOTTs, die für verschiedene Krankheitsbilder bei unterschiedlichen Spezies verantwortlich sind. In dieser Gruppe sind die Mitglieder des *M. avium*-Komplexes am häufigsten vertreten. Sie zeigen eine große Vielfalt hinsichtlich Wirtsauswahl und ausgelösten Krankheiten und trotzdem haben sie eine so hohe genetische Übereinstimmung, dass die diagnostische Differenzierung erschwert wird.

In der aktuell üblichen Diagnostik in der Humanmedizin werden bei vielen Fragestellungen, so auch beim Verdacht auf Tuberkulose, routinemäßig histologische Schnitte mittels Formalin Fixierung und Paraffin Einbettung hergestellt. Bei der weiterführenden molekularen Untersuchung in der Diagnostik auf Tuberkulose wird meist `nur` auf die Anwesenheit der Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes untersucht, ohne eine genauere Differenzierung zwischen den verschiedenen Unterstämmen vorzunehmen. Doch gerade diese Informationen können wichtige Hilfestellungen bezüglich Übertragungswegen und Therapieentscheidungen liefern. Deshalb wurden verschiedene PCR Ansätze für eine möglichst genaue Differenzierung entwickelt.

In dieser Arbeit wurde der Versuch der molekularbiologischen Stammdifferenzierung bei einer größeren Zahl Formalin fixierter und in Paraffin eingebetteter Proben vorgenommen. Hierbei wurden sowohl Patientenproben als auch Proben aus dem veterinärmedizinischem Bereich herangezogen, die zunächst histologisch begutachtet wurden.

Im veterinärmedizinischen Institut der LMU wurden 12 Proben von Schweinen für eine genauere molekularbiologischen Untersuchung mittels PCR gesammelt. Die Proben fielen bei der Schlachtschau durch atypische histologische Zeichen auf.

Bei fünf von 12 veterinärmedizinischen Fällen wurden säurefeste Stäbchen in der Ziehl-Neelsen Färbung gefunden. In der molekularen Untersuchung wurden bei allen diesen Fälle bis auf einen, bei dem die DNA vermutlich gehemmt ist, und einem zweiten, der in der Färbung unauffällig war, die Anwesenheit von Mykobakterien bestätigt. Bei diesem in der Färbung unauffälligen Fall wurde das Vorhandensein von unbekanntem Mykobakterien nachgewiesen. Bei den übrigen vier Fällen wurde dreimal das *M. avium* subsp. *avium*, normalerweise

Erreger der Geflügeltuberkulose, und einmal das *M. avium* subsp. *paratuberculosis* nachgewiesen. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ist Erreger der Paratuberkulose, einer chronischen Enteritis bei Rindern. Es konnten keine Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes nachgewiesen werden.

Somit bestätigte die molekularbiologische Untersuchung das Vorhandensein von Mykobakterien erst beim Zusammentreffen mehrerer histologischer Zeichen.

Die Arbeit erwies die gute Untersuchbarkeit so aufbereiteten Materials. Mykobakterien, insbesondere *Mycobacteria other than tuberculosis*, können demnach durchaus im Schlachtvieh nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass Mitglieder, die sich nach allgemeiner Meinung auf bestimmte Rassen beschränken, durchaus auch bei anderen Tierarten zu finden sind. Die Einführung bestimmter PCR Panels bei Schlachtvieh kann überlegt werden, um eine genauere Bestimmung der Krankheitserreger durchführen zu können.

Aus dem Bereich der Humanmedizin wurden Patientenproben aus der Routinediagnostik histologisch und molekularbiologisch mit PCR und Spoligotyping untersucht. In der Ziehl-Neelsen-Färbung wurde histologisch nach Tuberkulose-typischen Auffälligkeiten wie Granulome, Epitheloidzellen und Nekrosen gefahndet. Anschließend wurden die Proben molekularbiologisch mit PCR auf β -Aktin als Hinweis auf replizierbare DNA und auf IS6110 als Hinweis auf Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes untersucht. IS6110-positive Proben wurden mit dem Ziel der genauen Stammdifferenzierung dem Spoligotyping zugeführt. Spoligotyping ist eine auf PCR basierende Technik, die gerne für epidemiologische Fragestellungen genutzt wird.

Folgende weitere Ergebnisse wurden gewonnen: Die molekulare Untersuchung mittels PCR zeigte die Anwesenheit von *M. tuberculosis*-Komplex DNA in 36 von 65 humanen Fällen, wohingegen säurefeste Stäbchen in der Ziehl-Neelsen Färbung nur in elf Fällen entdeckt werden konnten. Alle IS6110 positiven Fälle wurden mit Spoligotyping weitergehend untersucht. Dreizehn Fälle boten *M. tuberculosis* spezifische Muster, während *M. bovis* spezifische Muster in vier Fällen erhalten wurden.

Aus diesen Ergebnissen. wird folgende Schlussfolgerung gezogen: Diese Arbeit legt den klaren Beweis vor, dass Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material für weitere Studien der Stammdifferenzierung sowohl zwischen den Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplex als auch zwischen atypischen Mykobakterien verwendet werden kann. Deshalb kann

diese Technik eindeutig für das Studium der Epidemiologie und Evolution von Mykobakterien genutzt werden

Literaturverzeichnis

- Achtman2008 Achtman M: Evolution, Population Structure, and Phylogeography of Genetically Monomorphic Bacterial Pathogens. *Annu Rev Microbiol.* 2008, 62, S.53-70,
- Amons et al., 2004 Amons A., Li L.L., Zhang Q., Bannantine J.P., Motiwala A.S., Sreevatsan S., Kapur V. : Multilocus Short Sequence Repeat Sequencing Approach for Differentiating among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains. *J Clin Microbiol.* 2004, 42, S.1694-1702,
- Bauer et al., 1999 Bauer J., Andersen A.B., Kremer K., Mörner H.: Usefulness of Spoligotyping to Discriminate IS6110 Low-Copy-Number *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains Cultured in Denmark. *J Clin Microbiol.* 1999, 37, S.2502-2606,
- Bifani et al., 2002 Bifani P.J., Mathema Z., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N.: Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.* 2002, 10, S.45-52,
- Bloom et al., 1992 Bloom R.B., Murray C.J.L.: Tuberculosis: Commentary on a Reemergent Killer. *Science.* 1992, 257, S.1055-1064,
- Böddinghaus et al., 2005 Böddinghaus B., Enzensberger R., Brade V.: Mykobakterien-Infektion. Hrsg.: Thomas L.: Labor und Diagnose - Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 6. Frankfurt-Main, Th-Books-Verlags-Gesellschaft, 2005, S.1621- 1626,
- Brosch et al., 2002 Brosch R., Gordon S.V., Brodin P., Buchrieser C., Eiglmeier K., Garnier T., Gutierrez C., Hewinson G., Kremer K., Parson L.M., Pym A.S., Samper S., van Soolingen D., Cole S.T.: A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2002, 99, S.3684-3689,
- Brudey et al., 2006 Brudey K., Driscoll J., Sola C., et al.: *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiology.* 2006, 6, S.23,
- Calmette1927 Calmette A.: La vaccination préventive contre la tuberculose par 'BCG', avec la collaboration de C. Guérin, A. Boquet et L. Nègre. Masson, Paris. 1927,

- Clark et al., 2006 Clark C., Driver C., Munsiff S., Driscoll J., Kreiswirth B., Zhao B., Ebrahimzadeh A., Salfinger M., Piatek A., Abdelwahab J., : Universal Genotyping in Tuberculosis Control Program, New York City, 2001-2003. *Emerg Infect Dis.* 2006, *12*, S.719-724,
- Cocito et al., 1994 Cocito C., Gilot P., Coene M., Kesel M., Poupart P., Vannuffel P.: Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev.* 1994, *3*, S.328-345,
- Coetsier et al., 2000 Coetsier C., Vannuffel P., Blondeel N., Deneef J-F., Cocito C., Gala J-L.: Duplex PCR for Differential Identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues from Cattle. *J Clin Microbiol.* 2000, *38*, S.3048-3054,
- Cousins et al., 2003 Cousins D., Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe S., Dow S., Dui-gnan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D., Butler W. et al.: Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003, *53*, S.1305-1314,
- Dale et al., 2001 Dale, J.W., Brittain D., Cataladi A.A., Cousins D., Crawford J.T., Driscoll J., Heersma H., Lillebaek T., Quitugua T., Rastogi N., Skuce R.A., Sola C., van Soolingen D., Vincent V.: Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2001, *5*, S.216-219,
- Dou et al., 2008 Dou HY., Tseng FC., Lu JJ., Jou R., Tsai SF., Chang JR., Lin CW., Miu WC., Su IJ.: Associations of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes with different ethnic and migratory populations in Taiwan. *Infect Genet Evol.* 2008, *8*, S.323-330,
- Eisenach et al., 1990 Eisenach K.D., Cave M.D., Bates J.H., Crawford J.T.: Polymerase Chain Reaction Amplification of a Repetitive DNA Sequence Specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1990, *161*, S.977-981,
- Ellingson et al., 2000 Ellingson J.L.E., Stabel J.E., Bishai W.R., Frothingham R., Miller J.M.: Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. *Molecular and Cellular Probes* . 2000, *14*, S.153-161,

- Ellingson et al., 2003 Ellingson J.L.E., Cheville J.C., Brees S., Miller J.M., Cheville N.F.: Absence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Components from Crohn's Disease Intestinal Biopsy Tissues. *Clinical Medicine & Research*. 2003, *1*, S.217-226,
- Embden et al., 2000 Embden J.D.A. van, van Gorkom T., Kremer K., Jansen R., van der Zeijst B.A.M., Schouls L.M.: Genetic Variation and Evolutionary Origin of the Direct Repeat Locus of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Bacteria. *J Bacteriol.* 2000, *182*, S.2393-2401,
- Eriks et al., 1996 Eriks I.S., Munck K.T., Besser Thomas E., Cantor G.H., Kapur V.: Rapid Differentiation of *Mycobacterium avium* and *M. paratuberculosis* by PCR and Restriction Enzyme Analysis. *J Clin Microbiol.* 1996, *34*, S.734-737,
- Falkingham,1996 Falkingham J.O.: Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 1996, *9*, S.177-215,
- Filliol et al., 2002 Filliol I., Driscoll J., van Soolingen D. et al: Global Distribution of *Mycobacterium tuberculosis* Spoligotypes. *Emerg Infect Dis.* 2002, *8*, S.1347-1349,
- Filliol et al., 2006 Filliol I., Motiwala A., Cavatore M., Qi W., Hazbon M., del Valle M., Fyfe J., Garcia-Garcia L., Rastogi N., Sola C., Zozio T., Guerro M., Leon C., Crabtree J., Angiuoli S., Eisenach K., Durmaz R., et al.: Global Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single Nucleotide Polymorphism (SNP) analysis: Insights into Tuberculosis Evolution, Phylogenetic Accuracy of Other DNA Fingerprinting Systems, and Recommendations for a Minimal Standard SNP Set. *J Bacteriol.* 2006, *188*, S.759-772,
- Formicola et al., 1987 Formicola, V., Milanesi, Q., Scarsini, C.: Evidence of spinal tuberculosis at the beginning of the fourth millenium BC from Arene Candide cave (Liguria, Italy). *Am J Phys Antrophol.* 1987, *72 (1)*, S.1-6,
- Fusegawa et al., 2003 Fusegawa, H., Wang, BH, Sakuri, K., Nagasawa, K., Okauchi, M., Nagakura, K.: Outbreak of tuberkulosis in a 2000-year-old Chinese population. *Kansenshogaku Zasshi.* 2003, *77 (3)*, S.146-149,
- Gagneux et al., 2006 Gagneux S., DeRiemer K., Van T., Kato-Maeda M., de Jong B., Narayanan S., Nicol M., Niemann S., Kremer K., Gutierrez M., Hilty M., Hopewell P.,

- Small P.: Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006, *103*, S.2869-2873,
- Gagneux & Small, 2007 Gagneux S., Small P.M.: Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis*. 2007, *7*, S.328-337,
- Ghossein et al., 1993 Ghossein R., Ross D., Salomon R., Rabson A.: A Search for Mycobacterial DNA in Sarcoidosis Using the Polymerase Chain Reaction. *Am J Clin Pathol.* 1994, *101*, S.733-737,
- Gibbons, 2008 Gibbons A.: Tuberculosis Jumped From Humans to Cows, Not Vice Versa. *Science*. 2008, *320*, S.608,
- Gordon et al., 1999 Gordon S.V., Brosch R., Billault A., Garnier T., Eiglmeier K., Cole S.: Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol*. 1999, *32 (3)*, S.643-655,
- Green et al., 1989 Green EP., Tizard MLV., Moss MT., Thompson J., Winterbourne DJ., McFadden JJ., Hermon-Taylor J.: Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic acids research*. 1989, *17*, S.9063-9073,
- Greer et al., 1991 Greer C.E., Peterson S.L., Kiviat N.B., Manos M.M.: PCR Amplification from Paraffin-Embedded Tissues. *Am J Clin Pathol.* 1991, *95*, S.117-124,
- Gutacker et al., 2006 Gutacker M., Mathema B., Soini H., Shashkina E., Kreiswirth B., Graviss E.A., Musser J.M.: Single-Nucleotide Polymorphism-Based Population Genetic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strains from 4 Geographic Sites. *J Infect Dis.* 2006, *193*, S.121-128,
- Gutiérrez et al., 1997 Gutiérrez M., Samper S., Jiménez M.S., van Embden J.D.A., Marín J.F.G., Martín C: Identification by Spoligotyping of a Caprine Genotype in *Mycobacterium bovis* Strains Causing Human Tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 1997, *35*, S.3328-3330,
- Harris et al., 2001 Harris N.B., Barletta R.G: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev.* 2001, *14*, S.489-512,

- Hellyer1997 Hellyer TJ, DesJardin LE, Assaf MK et al: Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* 1997, *35*, S.799-801,
- HermansInfktImmun1991 Hermans P.W.M., van Soolingen D., Bik E.M., de Haas P.E.W., Dale J.W., van Embden J.D.A.: The insertion element IS987 from *M.bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *M.tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* 1991, *59*, S.2695-2705,
- Hershberg et al., 2008 Hershberg R. et al.: High Functional Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* Driven by Genetic Drift and Human Demography. *PLoS Biol.* 2008, *6 (12)*, S.e311,
- Hershkovitz et al., 2008 Hershkovitz, I., Donoghue, H.D., Minnikin, D.E., Besra, G.S., Lee, O.Y-C., Gernaey, A.M., Galili, E., Eshed, V., Greenblatt, C.L., Lemma, E., Bar-Gal, G.K., Spigelman, M.: Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. *PLoS ONE.* 2008, *3*, S.e3426,
- Hirsh et al., 2004 Hirsh A. Tsolaki A., DeRiemer K., Small P. : Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004, *14*, S.4871-4876,
- Hofman et al., 2003 Hofman V., Selva E., Landraud L., Sicard D., Vénissac N., Castillo L., Kermarec A., Mouroux J., Dellamonica P., Hofman P.: Apport des techniques d'amplification par PCR réalisées à partir de coupes tissulaires déparaffinées pour le diagnostic d'infection à *Mycobacterium tuberculosis*. *Ann Pathol.* 2003, *23*, S.206-215,
- Hsiao et al., 2003 Hsiao P.F., Tzen C.Y., Chen H.C., Su H.Y.: Polymerase chain reaction based detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissue showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. *Int J Dermatol.* 2003, *42*, S.281-286,
- Huard et al., 2006 Huard R., Fabre M., de Haas P., Lazzarini L.C.O., van Soolingen D., Cousins D., Ho J.L.: Novel Genetic Polymorphisms That Further Delineate the Phy-

- logeny of the Mycobacterium tuberculosis Complex. *J Bacteriol.* 2006, *188*, S.4271-4287,
- Ikonomopoulos et al., 1999 Ikonomopoulos J.A., Gorgoulis V.G., Zacharatos P.V., Manolis E.N., Kanavaros P., Rassidakis A., Kittas C.: Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Detection of Mycobacterial DNA in Cases of Tuberculosis and Sarcoidosis. *Modern Pathology.* 1999, *12 (9)*, S.854-862,
- Ikonomopoulos et al., 2004 Ikonomopoulos J., Gazouli M., Pavlik I., Bartos M., Zacharatos P., Xylouri E., Papalambros E., Gorgoulis V.: Comparative evaluation of PCR assays for the robust molecular detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *J Microbiol Methods.* 2004, *56*, S.315-321,
- Innis et al., 1988 Innis M., Myambo K., Gelfand D., Brow M.: DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988, *85*, S.9436-9440,
- Johansen et al., 2007 Johansen T.B., Olsen I., Jensen M.R., Dahle U.R., Holstad G., Djonne B.: New probes used for IS1245 and IS1311 restriction fragment length polymorphism of Mycobacterium avium subsp. avium and Mycobacterium avium subsp. hominissuis isolates of human and animal origin in Norway. *BMC Microbiol.* 2007, *35*, S.907-914,
- Kammerbeek et al., 1997 Kammerbeek J., Schouls L., Kolk A., Agterveöd M., Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., van Embden J.: Simultaneous detection and Strain Differentiation of Mycobacterium tuberculosis for Diagnosis and Epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997, *35*, S.907-914,
- Karlsen et al., 1994 Karlsen F., Kalantari M., Chitmerere M., Johannson B., Hagmar B.: Modifications of Human and Viral Deoxyribonucleic Acid by Formaldehyde Fixation. *Lab Invest.* 1994, *71*, S.604-611,
- Koch1882 Koch R.: Die Aetiologie der Tuberculose. *Berl. klinische Wochenschr.* 1882, *19*, S.221-230,
- Kremer et al.,1999 Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R., Haas W., Hermanns P., Martín C., Palittapongarnpim P., Plikaytis B., Riley L., Yakrus M., Musser J., van Embden J.: Comparison of Methods Based on Different Molecular Epidemiological

- Markers for Typing of Mycobacterium tuberculosis Complex Strains: Interlaboratory Study of Discriminatory Power and Reproducibility. *J Clin Microbiol.* 1999, *37*, S.2607-2618,
- Kubica et al., 2003 Kubica T., Rüsç-Gerdes S., Niemann S.: Mycobacterium bovis subsp. caprae Caused One-Third of Human M. bovis-Associated Tuberculosis Cases Reported in Germany between 1999 and 2001. *J Clin Microbiol.* 2003, *41*, S.3070-3077,
- Li et al., 2000 Li J.Y., Lo S.T., Ng C.S.: Molecular detection of Mycobacterium tuberculosis in Tissues Showing Granulomatous Inflammation Without Demonstable Acid-Fast Bacilli. *Diagn Mol Pathol.* 2000, *9*, S.67-74,
- Marchetti et al., 1998 Marchetti G., Gori A., Catozzi L., Vago L., Nebuloni M., Rossi M.C., Esposti A.D., Bandera A. Franzetti F: Evaluation of PCR in Detection of Mycobacterium tuberculosis from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues: Comparison of Four Amplification Assays. *J Clin Microbiol.* 1998, *36*, S.1512-1517,
- Mathema et al., 2006 Mathema B., Kurepina N.E., Bifani P.J., Kreiswirth B.N.: Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. *Clin Microbiol Rev.* 2006, *19*, S.658-685,
- Mayr 2007 Rolle, M., Mayr, A.: Bakterielle Krankheiten der Tiere. Hrsg.: Mayr, A.: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 8. Stuttgart, Enke Verlag, 2007, S.526-534 ,
- Mijs et al., 2002 Mijs W., de Haas P., Rossau R., van der Laan T., Rigouts L., Portaels F., van Soolingen D: Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation Mycobacterium avium subsp. avium for bird-type isolates and 'M. avium subsp. hominis-suis' for the human/porcine type of M. avium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002, *52*, S.1505-1518,
- Miller et al., 1997 Miller J., Jenny A., Rhyan J., Saari D., Suarez D. : Detection of Mycobacterium bovis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for Mycobacterium tuberculosis complex organisms. *J Vet Diagn Invest.* 1997, *9*, S.244-249,

- Miller et al., 1999 Miller J., Jenny A., Ellingson J: Polymerase chain reaction identification of *Mycobacterium avium* in formalin-fixed, paraffin-embedded animal tissues. *J Vet Diagn Invest.* 1999, *11*, S.436-440,
- Miller et al., 2002 Miller J., Jenny A., Payeur J.: Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants. *Veterinary Microbiology.* 2002, *87*, S.15-23,
- Mostowy et al., 2005 Mostowy S., Inwald J., Gordon S., Martin C., Warren R., Kremer K., Cousin D., Behr M.: Revisiting the Evolution of *Mycobacterium bovis*. *J Bacteriol.* 2005, *187*, S.6386-6395,
- Motiwala et al, 2003 Motiwala A.S., Strother M., Amonsin A., Byrum B., Naser S.A., Stabel J.R., Shulaw W.P., Bannantine J.P., Kapur V., Sreevatsan S.: Molecular Epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: Evidence for Limited Strain Diversity, Strain Sharing, and Identification of Unique Targets for Diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2003, *41*, S.2015-2026,
- Nieman et al.,2002 Niemann S., Richter E., Ruesch-Gerdes S.: Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1870 (Approved list 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. . *Int J Syst Bacteriol.* 2002, *52*, S.433-436,
- Niemann et al., 2000 Niemann S., Richter E., Rüsck-Gerdes S.: 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.* 2000, *38*, S.152-157,
- Park et al., 2003 Park D.Y., Kim J.Y., Choi K.U., Lee J.S., Lee C.H., Sol M.Y., Suh K.S. : Comparison of Polymerase Chain Reaction With Histopathologic Features for Diagnosis of Tuberculosis in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Histologic Specimens. *Arch Pathol Lab Med.* 2003, *127*, S.326-330,
- Paustian et al., 2004 Paustian M.L., Amonsin A., Kapur V., Bannantine J.P.: Characterization of Novel Coding Sequences Specific to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculo-

- sis: Implications for Diagnosis of Johne's Disease. *J Clin Microbiol.* 2004, 42, S.2675-2681,
- Plante et al., 1996 Plante Y., Remenda B.Q., Chelack B.J., Haines D.M.: Detection of Mycobacterium paratuberculosis in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues by the Polymerase Chain Reaction. *Can J Vet Res.* 1996, 60, S.115-120,
- Quian et al., 1999 Quian L., van Embden J.D., van der Zanden A.G.M., Weltevreden E.F., Duanmu H., Douglas J.T. : Retrospective Analysis of the Beijing Family of Mycobacterium tuberculosis in Preserved Lung Tissues. *J Clin Microbiol.* 1999, 37, S.471-474,
- Reed et al., 2009 Reed M., Pichler V., McIntosh F., Mattia A., Fallow A., Masala S., Domenesch P., Zwerling A., Thibert L., Menzies D., Schwartzmann K., Behr M.: Major Mycobacterium tuberculosis Lineages Associate with Patient Country of Origin. *J Clin Microbiol.* 2009, 47, S.1119-1128,
- Renz-Polster et al., 2004 Braun J., Renz-Polster H.: Lunge - Infektiöse Lungenerkrankungen. Hrsg.: Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J.: Basislehrbuch Innere Medizin. 3. München - Jena, Urban & Fischer, 2004, S.468-475,
- Rogall et al., 1990 Rogall T., Wolters J., Flohr T., Böttger E.: Towards a Phylogeny and Definition of Species at the Molecular Level within the Genus Mycobacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 1990, 40, S.323-330,
- Rothschild et al., 2001 Rothschild, B.M., Martin, L.D., Lev, G., Bercovier, H., Bar-Gal, G.K., Greenblatt, C., Donoghue, H., Spiegelman, M., Brittain, D.: Mycobacterium tuberculosis Complex DNA from an Extinct Bison Dated 17,000 Years before the Present. *Clin. Infect. Dis.* . 2001, 33, S.305-311,
- Rothschild et al., 2006 Rothschild B.M., Martin L.D.: Did ice-age spread tuberculosis?. *Naturwissenschaften.* 2006, 93, S.565-569,
- Saiki et al., 1985 Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N.: Enzymatic Amplification of beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science.* 1985, 230, S.1350-1354,

- Saiki et al., 1988 Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J. Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.: Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*. 1988, *239*, S.487-491,
- Sailan et al., 1998 Sailan N.V., Rish J.A., Eisenach K.D., Cave M.D., Bates J.H.: Polymerase Chain Reaction to Detect *Mycobacterium tuberculosis* in Histologic Specimens. *Am J Respir Crit Care*. 1998, *158*, S.1150-1155,
- Salo et al., 1994 Salo W., Aufderheide A., Buikstra J., Holocomb T.: Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994, *91*, S.2091-2094,
- Sanger et al., 1977 Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977, *74*, S.5463-5467,
- Sanger, 1981 Sanger F.: Determination of Nucleotide Sequences in DNA. *Science*. 1981, *214*, S.1205-1210,
- Schewe et al., 2005 Schewe C., Goldmann T., Grosser M., Zink A., Schlüns K., Pahl S., Ulrichs T., Kaufmann S.H.E., Nerlich A., Baretton G.B., Dietel M., Vollmer E., Petersen I.: Inter-Laboratory validation of PCR-based detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch.* 2005, *447*, S.573-585,
- Shinnick, 1987 Shinnick, T.M.: The 65-Kilodalton Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. 1987, *169*, S.1080-1088,
- Smith et al., 2009 Smith N.H., Hewinson R.G., Kremer K., Brosch R., Gordon S.V.: Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Rev Microbiol*. 2009, *7*, S.537-544,
- Smith et al.1, 2006 Smith N.H., Kremer K., Inwald J., Dale J., Driscoll J.R., Gordon S.V., van Soolingen D., Wewinson R.G., Smith J.M.: Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Theor Biol.* 1996, *239*, S.220-225,
- Smith et al.2, 2006 Smith N.H. Gordon S.V., de la Rua-Domenech R., Clifton -Hadley R.S., Hewinson R.G.: Bottleneck and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nature Rev Microbiol.* 2006, *4*, S.670-681,

- Soini et al., 2000 Soini H., Pan X., Amin A., Graviss E.A., Siddiqui A., Musser J.M.: Characterization of Mycobacterium tuberculosis Isolates from Patients in Houston, Texas, by Spoligotyping. *J Clin Microbiol.* 2000, 38, S.669-676,
- Soini et al., 2001 Soini H., Teeter L., Musser J., Graviss E.: Transmission Dynamics and Molecular Characterization of Mycobacterium tuberculosis Isolates with Low Copy Numbers of IS6110. *J Clin Microbiol.* 2001, 39, S.217-221,
- Sola et al., 2001 Sola C., Filliol I., Gutierrez M.C., Mokrousov I., Vincent V., Rastogi N.: Spoligotype Database of Mycobacterium tuberculosis: Biogeographic Distribution of Shared Types and Epidemiologic and Phylogenetic Perspectives. *Emerging Infectious Diseases.* 2001, 7, S.390-396,
- Spoligotyping kit manual Hrsg.: Isogen Life Science: Manual for 'Spoligotyping' a PCR-based method to simultaneously detect an type Mycobacterium tuberculosis complex bacteria.
- Stabel1998 Stabel J. R.: Johne's Disease: A Hidden Threat. *J Dairy Sci.* 1998, 81, S.283-288,
- Stein et al., 2004 Stein KH., Flenker H., Henne C., Storjohann H.: Histologie. Hrsg.: Stein KH: Basiswissen Histologie und Zytologie . 3. Hoenstedt Zeitschriften, dvta, 2004, S.35-87,
- Suzuki et al., 2008 Suzuki, T., Fujita, H., Choi, J.G.: Brief Communication: New Evidence of Tuberculosis From Prehistoric Korea-Population Movement and Early Evidence of Tuberculosis in Far East Asia. *Am J Phys Anthropol.* 2008, 136, S.357-360,
- Taylor et al., 2003 Taylor G.M., Steward G.R., Cooke M., Chaplin S., Ladva S., Kirkup J., Pamler S., Young D.B.: Koch's Bacillus - a look at the first isolate of Mycobacterium tuberculosis from a modern perspective. *Microbiol.* 2003, 149, S.3213-3220,
- Thierry et al., 1990 Thierry, D., Cave M.D., Eisenach K.D., Crawford J.T., Bates J.H., Gicquel B., Guesdon J.L.: IS6110, an IS-like element of Mycobacterium tuberculosis complex. *Nucleic Acids Res.* . 1990, 18, S.188,
- Thomas & Müller, 2001 Thomas c., Adler CP., Barth P., Böcking A., Büttner R., Dienes H.P., Falk S., Geller A.C., Hagedorn M., Heene R., Kreipe H.H., Moll R., Müller K.M., Plate K.H. Salfelder K., Schmid KW., Teßmann D., Weiyers I.: Atmungsorgane -

- Lungentuberkulose. Hrsg.: Thomas C.: Histopathologie. 13. Stuttgart, Schattauer, 2001, S.88-91,
- Thwaites et al., 2008 Thwaites G., Caws M., Chau T.T.H., D'Sa A., Lan N.T.N., Huyen M.N.T., Gagneux S., Anh P.T.H, Tho D.Q., Torok E., Nhu N.T.Q., Duyen N., Duy P., RIchenberg J., Simmons C., Hien T., Farrar J. : Relationship between Mycobacterium tuberculosis Genotype and the Clinical Phenotype of Pulmonary and Meningeal Tuberculosis. J Clin Microbiol. 2008, 46, S.1363-1368,
- Trajman et al., 2013 Trajman A., Steffen Re., Menzies D., : Interferon-Gamma Release Assays versus Tuberculin Skin Testing for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Overview of the Evidence. Pulm Med. 2013
- Ulrichs et al., 2005 Ulrichs T., Lefmann M., Reich M., Morawietz L., Roth A., Brinkmann V., Kosmiadi G.A., Seiler P., Aichele P., Hahn H., Krenn V., Göbel U., Kaufmann S.: Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl-Neelsen-negative Mycobacterium tuberculosis organisms and their precise localization in human tissue. J Pathol. 2005, 205, S.633-640,
- van Soolingen et al., 1997 van Soolingen D., Hoogenboezem T., de Haas P., Hermanns P., Koedam M., Teppe,a K., Brennan P., Beesra G., Portaels F., Top J., Schouls L., van Embden J.: A Novel Pathogenic Taxon of the Mycobacterium tuberculosis Complex, Canetti: Characterization of an Exceptional Isolate from Africa. Int J Syst Bacteriol.. 1997, 47, S.1236-1245,
- Waksman1965 Waksman S.: The Conquest of Tuberculosis. London, Hale, 1965,
- Warren et al., 2002 Warren R., Streicher E., Sampson S., van der Spuy G., Richardson M., Nguyen D., Behr M., Victor T., van Helden P.: Microevolution of the Direct Repeat Refion of Mycobacterium tuberculosis: Implications for Interpretation of Spoligotyping Data. J Clin Microbiol. 2002, 40, S.4457-4465,
- WHO2006 Hrsg.: WHO: Diagnosis for tuberculosis: global demand and market potential. Geneva, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2006, 92 4 156330 3.
- WHOglobalreportssummary2008 WHO: Global Report Tuberculosis 2008. Hrsg.: WHO: 2008, 17.10.2008,
http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/pdf/summary.pdf.

- Wilton et al., 1992 Wilton S., Cousins D.: Detection and Identification of Multiple Mycobacterial Pathogens by DNA Amplification in a Single Tube. *PCR Methods and Applications*. 1992, *1*, S.269-273,
- Wirth et al., 2008 Wirth T., Hildebrand F., Allix-Béguet C., Wölbeling F., Kubica T., Kremer K., van Soolingen D., Rüsche-Gerdes S., Locht C., Brisse S., Meyer A., Supply P., Niemann S: Origin, Spread and Demography of the Mycobacterium tuberculosis Complex. *PLoS Pathog*. 2008, *e1000160*,
- Zanden et al., 1998 van der Zanden A.G.M., Hoentjen A.H., Heilmann F.G.C., Weltevreden E.F., Schouls L.M., van Embden J.D.A.: Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. *J Clin Pathol*.. 1998, *51*, S.209-214,
- Zink et al., 2001 Zink A., Haas C.J., Reischl U., Szeimies U., Nerlich A.G.: Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. *J. Med. Microbiol*.. 2001, *50*, S.355-366,
- Zink et al., 2003 Zink A., Sola C., Reischl U., Grabner W., Rastogi N., Wolf H., Nerlich A.: Characterization of Mycobacterium tuberculosis Complex DNAs from Egyptian Mummies by Spoligotyping. *J. Clin. Microbiol*.. 2003, *41*, S.359-367,
- Zink et al., 2004 Zink A., Nerlich A.: Molecular strain identification of the Mycobacterium tuberculosis complex in archival tissue samples. *J Clin Pathol*. 2004, *57*, S.1185-1192,

Abkürzungen

AIDS	
Aqua dest.	aqua destillata, destilliertes Wasser
BCG	<i>Bacillus Calmette Guerin</i>
g	Gramm
hsp	Hitzeschockprotein
kDa	Kilodalton
M.	Mykobakterium
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> -Komplex
ml	Milliliter
mM	Milli-Mol
MOTT	<i>Mycobacteria other than tuberculosis</i>
M. tb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
RFLP	restriction-fragment length polymorphism
SNP	Single Nukleotide Polymorphisms
µl	Mikroliter
ZN	Ziehl-Neelsen
ZNF	Ziehl-Neelsen Färbung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: geschätzte Zahl neuer Tuberkulosefälle, 2007. Global Tuberculosis Control, WHO Report 2009,

Abbildung 2: DR Region (Fragment). 43 Spacer werden beim Spoligotyping genutzt

Abbildung 3: Histologischer Schnitt der porcinen Proben: Granulom mit Nekrose

Abbildung 4: Histologischer Schnitt aus einer der porcinen Proben: Riesenzellen, Epitheloidzellen

Abbildung 5: Polymerase Ketten Reaktion (PCR) Amplifikation von β -Actin der porcinen Proben

Abbildung 6: Polymerase Ketten Reaktion (PCR) Amplifikation von 193 bp Fragment von 16S rRNA der porcinen Proben.

Abbildung 7: Polymerase Ketten Reaktion (PCR) Amplifikation von 16S RNA

Abbildung 8: Humanmedizinischer Schnitt: positive Ziehl-Neelsen Färbung

Abbildung 9: Humanmedizinischer Schnitt: Riesenzelle in der HE-Färbung

Abbildung 10: Verteilung der verschiedenen Clades des *M. tuberculosis*-Komplex Filliol et al., 2006

Abbildung 11: Biographische Spezialisierung von *M. tuberculosis*-Komplex

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über die Krankheitserreger des *M. tuberculosis*-Komplexes der wichtigsten Wirte

Tabelle 2: Übersicht zum *M. avium*-Komplex

Tabelle 3: Einzelbestandteile zur Herstellung eines PCR-Ansatzes

Tabelle 4: Primersequenzen für β -Aktin Nachweis

Tabelle 5: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für β -Aktin

Tabelle 6: Primersequenzen für den *M. tuberculosis* Nachweis IS6110

Tabelle 7: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für IS6110

Tabelle 8: Primersequenzen für 65 kDa hsp Protein

Tabelle 9: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für 65 kDa hsp Protein

Tabelle 10: Primersequenzen für 16S rRNA als Nachweis für den *M. avium* Komplex

Tabelle 11: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für 16S rRNA

Tabelle 12: Primersequenzen für IS900 als Nachweis für *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

Tabelle 13: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für IS900

Tabelle 14: Eigenschaften Restriktionsenzym Hae III

Tabelle 15: Spoligotyping Reaktionsmischung

Tabelle 16: Ergebnis der histologischen Untersuchung

Tabelle 17: Überblick über Primer

Tabelle 18: PCR-Ergebnisse der Schweineproben

Tabelle 19: Überblick histologische Ergebnisse der humanen Proben

Tabelle 20: Molekulare Ergebnisse der IS6110 positiven Fälle

Tabelle 21: Spoligotyping Ergebnisse der Paraffin eingebetteten Proben

Tabelle 22: Vergleich histologischer mit molekularbiologischer Untersuchung der porcinen Proben

Tabelle 23: Internetauftritte für Spoligotyping

Tabelle 24: Spoligotyping – Ergebnisse mit Unterteilung in Familien und Unterfamilien

Anhang

Tabelle 16: Ergebnis der histologischen Untersuchung der porcinen Proben

<u>Probennummer</u>	<u>Organ</u>	<u>Granulom</u>	<u>RZ</u>	<u>Nekrosen</u>	<u>Kalk</u>	<u>Bakterien-nachweis in der ZNF</u>
1	Lunge	1+	1+	-	-	-
2	Lunge	1+	-	-	-	-
3	Leber	EZ 2+	2+	-	-	-
4	Leber	EZ 1+	1+	1+	-	-
5	LK	EZ 1+	-	-	-	-
6	LK	EZ 1+	-	-	-	-
7	LK	EZ 1+	-	2+	-	-
8	LK	EZ 3+	3+	3+	3+	Paucibacillär
9	LK	EZ 1+	-	1+	3+	Paucibacillär
10	LK	EZ 2+	-	2+	3+	Paucibacillär
11	LK	EZ 3+	-	3+	3+	Paucibacillär
12	LK	EZ 3+	2+	3+	3+	Paucibacillär

RZ – Riesenzellen; ZNF – Ziehl-Neelsen Färbung; Gran. – Granulom; EZ – Epitheloidzelle; LK – Lymphknoten; Paucibacillär – wenige Bakterien nachweisbar; - negativ

Tabelle 18: PCR-Ergebnisse der Schweineproben

<u>Probennummer</u>	<u>β-Aktin</u>	<u>65kDa (hsp)</u>	<u>16S rRNA</u>	<u>IS 900</u>	<u>IS 6110</u>	<u>Interpretation</u>
1	+	-	-	-	-	1)
2	+	-	-	-	-	1)
3	+	-	-	-	-	1)
4	+	-	-	-	-	1)

5	+	-	-	-	-	1)
6	+	+	-	-	-	Mykobakterium unbekannter Herkunft
7	+	-	-	-	-	1)
8	+	+	+	-	-	Kein Nachweis auf Paratuberkulose, demnach <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
9	+	+	+	-	-	
10	+	+	+	-	-	
11	+	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
12	?	-	-	-	-	1)

1) Kein Nachweis auf Mykobakterien

Tabelle 19: Überblick histologische Ergebnisse der humanen Proben

<u>Fall-Nr.</u>	<u>Alter in Jahren</u>	<u>m/w</u>	<u>Land</u>	<u>Klinische Diagnose</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>epithel. Gran.</u>	<u>RZ</u>	<u>Nekrose</u>	<u>ZNF</u>
1	61	W	D	TB	Tibia	+	+	+	-
2	50	W	D	Uro-TB	Niere	+	+	+	-
3	64	W	D	Tumor	Leber	+	+	-	-
4	79	W	D	Abszess	Vulva	+	-	+	-
5	67	W	D	TB	Paravertebral	+	-	-	-
6	42	M	Arab.	Lymphom	LK	+	+	+	-
7	74	M	PL	Entzündung	Nebenhoden	+	+	+	-
8	79	M	D	Tumor	Prostata	+	-	-	-
9	40	W	D	TB	LK	+	+	+	-
10	65	M	D	Spondylitis	WS	+	-	+	-
11	23	M	VN	Lymphom	Nacken	+	+	+	-
12	70	W	D	Granulom	Finger	+	-	+	-
13	43	M	D	Granulom	Oberschenkel	+	-	+	-
14	54	M	D	Spondylitis	WS	+	-	-	-
15	63	M	D	BCGitis	Harnblase	+	+	+	-
16	77	M	D	chron. Entz.	Brustwand	+	-	+	-
17	49	M	TR	Granulom	Larynx	+	-	+	-
18	61	M	D	BCGitis	Prostata	+	-	-	-
19	55	M	D	Tumor	Lunge	+	-	-	-
20	58	M	D	Spondylitis	Brust-WS	+	-	+	-
21	50	M	D	BCGitis	Prostata	+	+	+	-
22	64	M	D	TB	Lunge	+	-	-	-
23	83	M	D	Spondylitis	Lumbal-WS	-	-	+	-
24	61	M	D	BCGitis	Prostata	+	-	-	-
25	23	W	D	TB	Lunge	+	+	-	-

26	45	M	TR	TB	Haut	+	+	-	-
27	35	W	Afrika	Tumor	Tonsillen	+	+	-	-
28	45	W	D	Tumor	Lunge	+	-	-	-
29	67	M	D	Tumor	Prostata	+	-	+	-
30	58	W	D	TB	Lunge	+	+	-	-
31	34	M	Arab	TB	Lunge	+	-	-	-
32	58	M	D	Tumor	Intervertebral	+	+	-	-
33	61	M	D	TB	Lunge	+	+	+	-
34	75	W	D	TB	Lunge	+	+	+	-
35	54	M	D	Tumor	Prostata	+	-	+	-
36	76	M	D	Tumor	Lunge	+	-	+	-
37	59	M	D	Tumor	Lunge	+	+	+	+
38	50	W	D	Epidur. Tumor	Spinalkanal	+	+	-	-
39	87	W	HR	Tumor	Lunge	+	+	+	+
40	24	W	D	Tumor	Becken	+	+	+	+
41	71	W	D	TB	Lunge	+	+	+	+
42	30	M	RUS	Tumor	LK	+	+	+	-
43	19	M	Arab	Spondylitis	WS	+	+	+	-
44	55	W	D	TB	Lunge	+	+	+	+
45	30	M	PK	Spondylitis	WS	+	+	+	-
46	31	W	PK	Tumor	Becken	+	+	+	-
47	87	W	D	TB	Lunge	-	-	+	+
48	77	W	D	Spondylitis	WS	+	+	+	+
49	75	M	D	Bursitis, Abszess	Lumbal-WS	+	+	+	+
50	19	W		TB	Lunge	+	?	-	+
51	65	W	D	M. Wegener, TB	Lunge	-	-	+	-
52	63	M	D	Uro-TB	Prostata	-	-	+	-
53	69	M	D	Tumor	Urogenital-Trakt	+	+	+	-
54	67	W	RUS	TB	Axilla	+	-	+	-
55	74	W	TR	Tumor	Gl. Sub- mandibularis	+	+	-	-
56	59	W	D	TB, Tumor	re. Halsseite	-	-	-	-
57	47	M	E	Bronchialtumor	Bronchialsys- tem	+	+	+	-
58	33	M	D	Lymphadenitis, TB	re. Halsseite	+	+	+	-
59	69	M	D	bek. ProstataCa, V.a. Sekundärtumor	Lunge	-	-	+	
60	71	M	D	Tumor	Lunge	+	+	+	+
61	29	M	Un- bek	TB	LK	+	+	+	-
62	29	W	OE	TB	LK	+	?	-	-
63	22	W	Arab	Lymphadenitis	li. Halsseite	+	+	+	-
64	48	W	D	TB, Pneumonie	Lunge	+	-	+	+
65	44	M	D	TB	Supraclaviku- lär	+	+	+	

m - männlich, w – weiblich; Nekr. - Nekrosen, ZNF - Ziel-Neelsen-Färbung; LK Lymphknoten, RZ - Riesenzellen, Epithel. Gran. - epitheloid Granulom; Land der Herkunft; Legende:D -

Deutschland; HR - Kroatien; RUS - Russland; Arab - Arabien; PK - Pakistan; PL - Polen; VN - Vietnam; TR - Türkei; E - Spanien; OE - Osteuropa; unbek. – unbekannt

Tabelle 20: Molekulare Ergebnisse der IS6110 positiven Fälle der humanen Proben

Fall-Nr.	β-Aktin	IS 6110	Spoligotyping
1	+	+	<i>M. bovis</i>
2	+	+	Unvollständig
6	+	+	-
7	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
9	+	+	-
11	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
15	+	+	<i>M. bovis</i>
20	+	+	Unvollständig
21	+	+	<i>M. bovis</i>
25	+	+	Unvollständig
33	+	+	Unvollständig
36	+	+	Unvollständig
37	+	+	<i>M. bovis</i>
39	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
40	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
41	+	+	Unvollständig
44	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
47	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
48	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
49	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
50	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
51	+	+	Neu
52	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
53	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
54	+	+	Neu
55	+	+	Neu
56	+	+	Neu
57	+	+	-
58	+	+	Neu
59	+	+	-
60	+	+	-
61	+	+	<i>M. tuberculosis</i>
62	+	+	-
63	+	+	Neu
64	+	+	-
65	+	+	<i>M. tuberculosis</i>

Tabelle 21: Spoligotyping Ergebnisse der Paraffin eingebetteten Proben



<u>Fall-Nr.</u>	<u>Spoligotyping – binär</u>	<u>Spoligotyping – oktal</u>	<u>Familie</u>
39		577767437640771	<i>M. tuberculosis</i>
7		770000777760771	<i>M. tuberculosis</i>
48		77777777720771	<i>M. tuberculosis</i>
65		777777770020771	<i>M. tuberculosis</i>
47		77777777760771	<i>M. tuberculosis</i>
52		777761007760771	<i>M. tuberculosis</i>
50		777767757760771	<i>M. tuberculosis</i>
40		57756777760771	<i>M. tuberculosis</i>
49		77777777000771	<i>M. tuberculosis</i>
53		67676367777771	<i>M. tuberculosis</i>
11		777725000403771	<i>M. tuberculosis</i>
44		557567435660241	<i>M. tuberculosis</i>
61		703367400001600	<i>M. tuberculosis</i>
37		200003777377600	<i>M. bov. subsp. caprae</i>
21		476767477770600	<i>M. bovis</i>
1		030040012013000	<i>M. bovis</i>
15		404763773756200	<i>M. bovis</i>
51		770001677000771	neu
54		637767677760771	neu
55		774000673776771	neu
56		77676367777771	neu
58		770367773760671	neu
63		60000007760670	neu
2		00000035660000	unvollständig
36		000003434000000	unvollständig
41		1007434000000	unvollständig
20		00000000004000	unvollständig
25		00000014000000	unvollständig
33		00000004000000	unvollständig























Tabelle 22: Vergleich histologischer mit molekularbiologischer Untersuchung der porcinen Proben






<u>Prob-nr.</u>	<u>Organ</u>	<u>Histologischer Befund</u>						<u>Molekularer Befund</u>
		<u>Granulom</u>	<u>RZ</u>	<u>Nekr.</u>	<u>Kalk</u>	<u>Bakterien-nachweis in der ZNF</u>	<u>V. a.</u>	<u>Interpretation nach PCR</u>
1	Lunge	1+	1+	-	-	-	Fremdkörper-Granulom	*
2	Lunge	1+	-	-	-	-	"Pneumonie"	*
3	Leber	EZ 2+	2+	-	-	-	Mykobakteriose	*
4	Leber	EZ 1+	1+	1+	-	-	Mykobakteriose	*
5	LK	EZ 1+	-	-	-	-	Mykobakteriose	*
6	LK	EZ 1+	-	-	-	-	Follikuläre Hyperplasie	Mykobakterium unbekannter Herkunft
7	LK	EZ 1+	-	2+	-	-	Mykobakteriose	
8	LK	EZ 3+	3+	3+	3+	Paucibacillär	Mykobakteriose	Kein Nachweis auf Paratuberkulose, wahrscheinlich gleicher Erreger wie bei Geflügeltuberkulose
9	LK	EZ 1+	-	1+	3+	Paucibacillär	Pilze?	
10	LK	EZ 2+	-	2+	3+	Paucibacillär	Mykobakteriose	
11	LK	EZ 3+	-	3+	3+	Paucibacillär	Mykobakteriose	Paratuberkulose
12	LK	EZ 3+	2+	3+	3+	Paucibacillär	Mykobakteriose	*

Probnr. – Probennummer; RZ – Riesenzellen; Nekr. – Nekrosen; ZNF – Ziehl-Neelsen Färbung; Gran. – Granulom; EZ – Epitheloidzelle; LK – Lymphknoten; - negativ; * keine mykobakterielle DNA nachweisbar; V.a. – Verdachtsdiagnose der zuständigen Pathologin

Tabelle 24: Spoligotyping – Ergebnisse mit Unterteilung in Familien und Unterfamilien

<u>Fall -Nr.</u>	<u>Spoligotyping - binär</u>	<u>Spoligotyping - oktal</u>	<u>Familie</u>	<u>Unterfamilie</u>	<u>ST</u>
39		577767437640771	<i>M. tb</i>		0
7		770000777760771	<i>M. tb</i>	Houston T1-Russia /2	280

48		77777777720771	<i>M. tb</i>	H3	50
65		777777770020771	<i>M. tb</i>	H3	742
47		77777777760771	<i>M. tb</i>	T1	53
52		777761007760771	<i>M. tb</i>	T1	766
50		777767757760771	<i>M. tb</i>	T5	1913
40		57756777760771	<i>M. tb</i>		0
49		777777777000771	<i>M. tb</i>		2553
53		67676367777771	<i>M. tb</i>		695
11		777725000403771	<i>M. tb</i>		0
44		557567435660241	<i>M. tb</i>		0
61		703367400001600	<i>M. tb</i>	CAS1	1675
37		200003777377600	<i>M. bov.</i> subp. <i>caprae</i>		657
21		476767477770600	<i>M. bovis</i>		
1		030040012013000	<i>M. bovis</i>		
15		404763773756200	<i>M. bovis</i>		
51		770001677000771	neu		
54		637767677760771	neu		
55		774000673776771	neu		
56		77676367777771	neu		
58		770367773760671	neu		
63		600000007760670	neu		
2		000000035660000	unvollständig		

36		000003434000000	unvollständig
41		1007434000000	unvollständig
20		000000000004000	unvollständig
25		000000014000000	unvollständig
33		000000004000000	unvollständig

Unvollständig – unvollständiges Muster beim Spoligotyping; octal – Darstellung im Oktalcode; binary – Darstellung im binären Codesystem.

Eidesstattliche Versicherung

Petit, Isabelle

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
*Molekulare Untersuchungen zum Nachweis von M. tuberculosis-Komplex und deren Subtypen
an Paraffin eingebetteten humanen und tierischen Gewebeproben*

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum genau oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 23.10.2013

Datum

Unterschrift Doktorandin