

Nachweis und Charakterisierung aquatischer Mykobakterien

Inaugural-Dissertation

**zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von
Brita Ilg
aus
Santiago de Chile**

**Düsseldorf
2003**

Gedruckt mit der Genehmigung
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Priv.-Doz. Dr. R. Schulze-Röbbecke
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. W. Martin
Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2003

1. Einleitung:	3
1.1 Biologie der Mykobakterien	3
1.2 Ökologie der Mykobakterien	4
1.3 Methoden zum kulturellen Nachweis von Umwelt-Mykobakterien	5
1.4 Methoden zur Differenzierung von Umwelt-Mykobakterien	6
1.4.1 Chemotaxonomische Differenzierungsmethoden	7
1.4.2 Molekularbiologische Differenzierungs- und Typisierungsmethoden	7
1.5 Ziele der Arbeit	8
2. Material und Methoden	10
2.1 Probenmaterialien	10
2.1.1 Wasserproben	10
2.1.2 Biofilmproben aus Trinkwasser-Leitungsrohren	10
2.1.3 Biofilmproben von Aufwuchsträgern	10
2.2 Entnahme und Transport der Proben	12
2.2.1 Entnahme und Transport der Wasserproben	12
2.2.2 Entnahme und Transport der Biofilmproben aus Trinkwasser-Leitungsrohren	12
2.2.3 Entnahme und Transport der Biofilmproben von Aufwuchsträgern	12
2.3 Kulturelle Anzucht aquatischer Mykobakterien	12
2.3.1 Medien	12
2.3.2 Aliquotierung und Mehrfachansatz der Proben	13
2.3.3 Probendekontamination	14
2.3.4 Membranfiltration und Bebrütung der Ansätze	15
2.4 Ziehl-Neelsen-Färbung	15
2.5 Anlage einer Reinkultur, Stammhaltung	16
2.6 Bestimmung von Wachstumsgeschwindigkeit, Koloniemorphologie und Pigmentierung	16
2.7 Chemotaxonomische Differenzierungsmethoden	16
2.7.1 Mykolsäureanalyse mittels Dünnschichtchromatographie	16
2.7.2 Mykolsäureanalyse mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	17
2.8 Molekularbiologische Differenzierungsmethoden	17
2.8.1 Restriktionsanalyse des 65-kDa-Heatshockprotein-Gens (PRA)	17
2.8.2 Restriktionsanalyse des 16S-23S-rDNA-Spacers (Spacer-RFLP)	17
2.8.3 Partielle Sequenzierung der 16S-rDNA	18
2.9 Beschreibung neuer Mykobakterienspezies	18
2.10 Untersuchung einer Pseudoepidemie durch <i>M. xenopi</i>	19
2.10.1 Untersuchung der Wasserproben auf das Vorhandensein von <i>M. xenopi</i>	20
2.10.2 Genotypisierung der <i>M. xenopi</i> -Isolate mittels <i>random amplification of polymorphic DNA</i> (RAPD)	21
2.10.3 Maßnahmen zur Prävention weiterer Pseudoinfektionen	22
3. Ergebnisse	23
3.1 Einfluss des kulturellen Nachweisverfahrens auf Menge und Spektrum der isolierten Mykobakterien	23
3.2 Differenzierung	26
3.2.1 Mykobakterielle Referenzstämme	26
3.2.2 Mykobakterienisolate	30
3.2.2.1 Identifizierte Isolate	32
3.2.2.2 Isolate ohne eindeutige Spezieszuordnung mittels DC und PRA	34
3.3 Beschreibung neuer Mykobakterienspezies	39
3.3.1 „Spezies X“	40
3.3.2 „Spezies Y“	46
3.4 Vorkommen und Verhalten aquatischer Mykobakterien in Biofilmen	49

3.4.1 Biofilme in Rohrproben	49
3.4.2 Biofilme in Aufwuchsträger-Proben.....	51
3.5 Genotypisierung von <i>M. xenopi</i> im Rahmen einer Pseudoepidemie	56
3.5.1 Zeitlicher Verlauf der Pseudoepidemie	56
3.5.2 RAPD von <i>M. xenopi</i> -Isolaten	57
3.5.3 Interventionsmaßnahmen zur Beendigung der Pseudoepidemie	61
4. Diskussion	62
4.1 Kulturelle Nachweisverfahren.....	62
4.1.1 Einfluss der Temperatur auf die Anzucht von Mykobakterien.....	62
4.1.2 Einfluss des Dekontaminationsverfahrens	63
4.1.3 Einfluss des Mediums	63
4.2 Vergleich der Differenzierungsmethoden.....	64
4.2.1 Chemotaxonomische Methoden	64
4.2.2 Molekularbiologische Differenzierungsmethoden	64
4.2.3 Beurteilung der Kombination verschiedener Differenzierungsmethoden	65
4.3 Mykobakterienspektrum in den verschiedenen Probearten	66
4.4 Biofilm-Untersuchungen.....	67
4.5 <i>M.-xenopi</i> -Pseudoepidemie	68
5. Zusammenfassung	69
6. Literaturverzeichnis	70
7. Abkürzungsverzeichnis.....	82
8. Anhang	83
8.1 Anhang 1: Referenzchromatogramme der HPLC (s. Kap. 2.7.2, 3.2.1).....	83
8.2 Anhang 2: Referenzdaten der Spacer –RFLP (s. Kap. 2.8.2, 3.2.1).....	109
8.3 Anhang 3: HPLC-Muster der unbekannten Isolate aus Tabelle 9 (s. Kap.3.2.2.2)..	112
8.4 Partialesequenzen des 16S -rDNA-Gens von einigen ausgewählten Isolaten aus Tabelle 9 (s. Kap. 3.2.2.2).....	124

Nachweis und Charakterisierung aquatischer Mykobakterien

1. Einleitung:

1.1 Biologie der Mykobakterien

Die Gattung *Mycobacterium* ist die einzige Gattung der Familie *Mycobacteriaceae* und umfasst aerobe oder mikroaerophile, unbewegliche, langsamwachsende, stäbchenförmige Bakterien, deren GC-Gehalt der DNA zwischen 62 und 79 mol % liegt. Die geraden bis leicht gebogenen Stäbchen besitzen eine Größe von 0,2-0,6 x 1,0-10 µm, sind häufig leicht verzweigt und zeigen teilweise filamentöses bis myzelartiges Wachstum (WAYNE & KUBICA, 1986). Es wird jedoch kein Substrat- oder Luftmyzel wie bei Aktinomyzeten produziert. Mykobakterien bilden weder Sporen noch Kapseln und werden, obwohl sie mit der Gramfärbung nur sehr schlecht anfärbbar sind, den Gram-positiven Bakterien zugeordnet. Die starke Säure- und Alkoholfestigkeit (BROCK & MADIGAN, 1991) ist ein charakteristisches Merkmal der Mykobakterien, d.h. ein bereits aufgenommener Farbstoff ist durch Säure-Alkoholgemische nicht entfernbar (z.B. bei der Auraminfärbung oder Ziehl-Neelsen-Färbung, s. Kap. 2.4). Die Säure- und Alkoholfestigkeit beruht auf dem hohen Lipidgehalt der mykobakteriellen Zellwand, der bis zu 60% des Gesamtgewichtes der Zellhülle beträgt und den Zellen eine wachsartige, hydrophobe Oberfläche verleiht. Ganz entscheidend hierbei sind die kovalent mit der Arabinogalaktan-Matrix der Zellwand verbundenen Mykolsäuren, die den größten Teil der Zellwandlipide ausmachen (Kap. 1.4.1). Aufgrund ihrer stark hydrophoben Eigenschaften wirken die Mykolsäuren als strukturelle und funktionelle Permeabilitätsbarriere und beeinträchtigen u.a. die Nährstoffaufnahme der Zellen. Deshalb hält man Mykolsäuren für eine der Ursachen der außergewöhnlich geringen Wachstumsgeschwindigkeit von Mykobakterien (BARKSDALE & KIM, 1977). Die Fähigkeit verschiedener Spezies, gelbe bis orangefarbene, selten auch rosa oder rötliche Pigmente zu bilden, ist ein weiteres charakteristisches Merkmal der Mykobakterien. Es handelt sich bei diesen Pigmenten um Karotinoide, die in der Zytoplasmamembran lokalisiert sind und dem Schutz gegen Photooxidation dienen. Man bezeichnet einen Stamm als skotochromogen, wenn die Pigmentbildung ohne Lichteinwirkung erfolgt. Findet die Pigmentbildung nur nach einer Lichtexposition statt, handelt es sich um einen photochromogenen Stamm. Wird dagegen kein Farbstoff oder nur sehr wenig davon produziert, liegt ein nonchromogener Stamm vor (BROCK & MADIGAN, 1991).

Lange Zeit konzentrierte sich das Interesse an der Gattung *Mycobacterium* fast ausschließlich auf die im *M.-tuberculosis*-Komplex zusammengefassten Erreger der Tuberkulose (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* und *M. microti*) sowie auf den Erreger der Lepra, *M. leprae*. Diese Spezies sind obligat pathogene Bakterien, deren Nachweis beim Menschen in aller Regel mit einer Erkrankung verbunden ist. Diese Tatsache führte schon früh zu einer Abgrenzung der Tuberkulose- und Leprabakterien von den übrigen Mykobakterien, die zunächst pauschal als apathogene Saprophyten angesehen und deshalb als „nichttuberkulöse“ (d.h. keine Tuberkulose hervorrufoende) oder „atypische“ Mykobakterien bezeichnet wurden. (MARGO, 2000). Infolge des Anstiegs der Zahl immungeschwächter Menschen, z.B. durch HIV-Infektionen, immunsuppressive Behandlungen und onkologische Erkrankungen bzw. Therapien fiel jedoch in letzter Zeit das medizinische Interesse verstärkt auf die „atypischen“ Mykobakterien. Es wurde erkannt, dass diese Gruppe nicht nur harmlose Saprophyten (z.B. *M. gordonae*, *M.*

nonchromogenicum und *M. flavescens*), sondern auch fakultativ pathogene Spezies (z.B. *M. avium*, *M. intracellulare* und *M. kansasii*) beinhaltet, die bei abwehrgeschwächten Patienten Infektionen hervorrufen können (WOLINSKY, 1979; DU MOULIN & STOTTMEIER, 1986; LECHEVALLIER, 2000; SAUBOLLE, 1996; PLAUS, 1991).

Das Genus *Mycobacterium* lässt sich aufgrund einiger physiologischer, biochemischer und genetischer Merkmale in schnellwachsende und langsamwachsende Spezies unterteilen. Schnellwachsende Mykobakterien weisen eine Generationszeit von 2 bis 5 Stunden auf und benötigen bei optimalen Temperatur- und Nährstoffverhältnissen in der Subkultur ungefähr sieben Tage bis zur Bildung sichtbarer Kolonien aus hochverdünnten Inocula. Demgegenüber beträgt die Generationszeit langsamwachsender Mykobakterien 13 bis 20 Stunden, und ihre Kolonien werden frühestens nach 7-tägiger Inkubation sichtbar. Mit Hilfe der vergleichenden 16S-rDNA-Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass die Wachstumsgeschwindigkeit ein phänotypisches Merkmal phylogenetisch verwandter Gruppen darstellt, und dass schnell- und langsamwachsende Mykobakterien zwei Hauptentwicklungslinien innerhalb der Gattung bilden. Bei schnellwachsenden Mykobakterienarten ist eine Deletion von 12 Nukleotiden innerhalb der Helix 18 der 16S-rDNA (*E.-coli*-Position 451 bis 482) vorhanden, die in der Sekundärstruktur zur Ausbildung einer kurzen Helix 18 führt. Langsamwachsende Spezies weisen dagegen eine längere Sequenz mit einer charakteristischen Haarnadelstruktur auf. Ein gleiches Pigmentierungsverhalten ist dagegen nicht mit einer natürlichen Verwandtschaft korreliert. (STAHL & URBANCE, 1990; ROGALL et al., 1990b, BÖTTGER, 1991; WAYNE & KUBICA; 1986)

1.2 Ökologie der Mykobakterien

Im Gegensatz zu den obligat parasitär lebenden Lepra- und Tuberkuloseerregern leben viele „atypische“ Mykobakterien nach heutigen Erkenntnissen saprophytär und sind ubiquitär in der Umwelt verbreitet. Zu ihren natürlichen Habitaten werden vor allem Boden und Wasser gezählt (SCHULZE-RÖBBECKE; 1993). Daneben finden sie sich im Tierreich, z.B. bei Fischen, Arthropoden und Haustieren (BEERWERTH et al., 1979; TALAAT et al., 1997) sowie beim Menschen, wo sie sowohl als Kommensalen als auch als Krankheitserreger auftreten können (PORTAELS, 1988a). Eine Übertragung von Erkrankungen durch „atypische“ Mykobakterien von Mensch zu Mensch oder von Tieren zum Menschen ist – im Unterschied zu den obligat pathogenen Mykobakterienspezies – bisher nicht sicher nachgewiesen worden (PETERSEN, 1986; WAYNE & SRAMEK, 1992). Als Infektionsquelle muss daher die Umwelt angesehen werden. Auf welche Art und Weise jedoch die Mykobakterien aus der Umwelt in den menschlichen bzw. tierischen Organismus gelangen, ist weitgehend ungeklärt. Sowohl die Inhalation von bakterienhaltigen Aerosolen (GRUFT et al., 1979) als auch die orale Aufnahme von kontaminiertem Wasser oder Lebensmitteln werden als mögliche Infektionswege diskutiert (GOOD, 1985). Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass natürliche Oberflächengewässer (z.B. Bäche, Seen, Flüsse, Teiche und Sümpfe) eine Mykobakterienflora besitzen, die eine dem Boden der jeweiligen Region ähnliche Zusammensetzung aufweist. Zu den am häufigsten aus Wasser isolierten apathogenen Spezies gehören *M. gordonae*, *M. chelonae* und *M. flavescens*. Ebenso kommen in Oberflächengewässern auch fakultativ pathogene Arten wie z.B. *M. avium*, *M. intracellulare* und *M. scrofulaceum* vor (COLLINS et al., 1984; SCHULZE-RÖBBECKE, 1993).

Überraschend war für viele Fachleute in den 1970-er Jahren der Nachweis von Mykobakterien von – im Vergleich zu Oberflächengewässern meist erheblich nährstoffärmerem – Trinkwasser (COLLINS et al 1984). Überraschend war weiterhin, dass sich im Trinkwasser nicht nur fakultativ pathogene Mykobakterienarten wie *M. avium* und *M. intracellulare* fanden, sondern auch die fakultativ pathogenen Arten *M. kansasii* und *M. xenopi*, deren natürliche Habitate in der Umwelt bis heute weitgehend unbekannt sind (SCHULZE-RÖBBECKE, 1993). Daneben finden sich im Trinkwasser viele apathogene Mykobakterienarten wie *M. gordonae*, *M. chelonae*, *M. flavescens* und *M. fortuitum* (DU MOULIN & STOTTMEIER, 1986; FISCHEDER et al., 1991; KUBALEK & MYSAK, 1996).

Generell beobachtet man im Wasser zwei unterschiedliche Lebensformen von Mikroorganismen: Zum einen kommen sie dort als frei bewegliche („planktonische“) Zellen vor und zum anderen als sessile Zellen oder Zellverbände, die auf Oberflächen immobilisiert sind (FLEMMING, 1991 und 2003). Eine solche mikrobielle Oberflächenbesiedlung wird auch als „Biofilm“ bezeichnet. Biofilme bestehen in der Regel aus in mehreren übereinandergelagerten Schichten von Mikroorganismen, die zu einem großen Teil extrazelluläre polymere Substanzen produzieren, so dass die Einzelzellen meist in einer „Schleimmatrix“ eingebettet und vor zahlreichen Noxen geschützt sind. Jüngere Untersuchungen zeigten, dass auch Mykobakterien in großen Zahlen in Biofilmen vorkommen, und dass Biofilme vermutlich das eigentliche Habitat und der Vermehrungsort von Mykobakterien im aquatischen Milieu sind (LECHEVALLIER, 2000; SCHULZE-RÖBBECKE et al., 1992). Diese Tatsache könnte erklären, warum Mykobakterien in nährstoffarmen Umgebungen wie Trinkwasser vorkommen, obwohl sie bei der in-vitro-Anzucht hohe Nährstoffansprüche besitzen, denn zwischen den unterschiedlichen Mikroorganismen der mikrobiellen Konsortien von Biofilmen spielen sich offenbar zahlreiche symbiotische Vorgänge ab (FLEMMING, 1991 und 2003). Ebenso bieten Biofilme eine plausible Erklärung für die ausgeprägte Resistenz von Mykobakterien gegen die im Trinkwasser eingesetzten Desinfektionsmittel wie Chlor (RIDGWAY, 1984). Über die Akkumulationsdynamik von Mykobakterien in Biofilmen ist wenig bekannt. Man kennt weder genau die Parameter (Nährstoffe, Temperatur, pH-Wert, Begleitflora), die eine Akkumulation beeinflussen noch weiß man, ob sich Mykobakterien in allen Biofilmen, ungeachtet der Zusammensetzung des Substrats, in gleicher Weise entwickeln können. So ist es nicht auszuschließen, dass bestimmte Rohrmaterialien im Trinkwasserverteilungsnetz die Akkumulation von Mykobakterien in Biofilmen begünstigen. Durch eine geeignete Materialauswahl könnte möglicherweise der Mykobakteriengehalt des Trinkwassers beeinflusst werden (LECHEVALLIER, 2000).

1.3 Methoden zum kulturellen Nachweis von Umwelt-Mykobakterien

Da Mykobakterien wegen ihrer vergleichsweise langen Generationszeiten *in vitro* häufig von der wesentlich schneller wachsenden Begleitflora überwuchert werden, ist die kulturelle Anzucht oft schwierig. Zur Inaktivierung der Begleitflora ist in der Regel eine Dekontamination des Probenmaterials erforderlich. Meist werden den mykobakteriologischen Kulturmedien zu diesem Zwecke auch bestimmte antimikrobielle Substanzen wie z.B. Malachitgrün zugesetzt. Hierbei ist zu beachten, dass die Mykobakterien durch die antimikrobiellen Substanzen bei der Dekontamination und in den Mykobakterien-Medien möglichst wenig geschädigt werden. Hierbei macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass Mykobakterien aufgrund ihres hohen Zellwandlipidgehaltes im Vergleich zu anderen Mikroorganismen wesentlich unempfindlicher gegenüber

zahlreichen chemischen Noxen wie z.B. Säuren und Laugen sind. Es ist allerdings zu beachten, dass Mykobakterien zwar eine erhöhte, aber keine vollständige Resistenz gegenüber diesen Substanzen besitzen (BORGANS et al., 1973; FALKINHAM et al., 1980; MARTIN et al., 1987). Zur Dekontamination von Umweltpuben haben sich kationische Tenside wie Cetylpyridiniumchlorid (DUMOULIN & STOTTMEIER, 1988; SCHULZE-RÖBBECKE et al., 1991) und Säuren (SONGER, 1981) bewährt.

Um die Sensitivität der Isolierungsverfahren zu erhöhen, empfiehlt sich neben der Dekontamination auch eine Konzentrierung der Mykobakterien im Untersuchungsmaterial. Diese Anreicherung erfolgt in der Regel durch Zentrifugation oder Membranfiltration der Proben. Die Membranfiltration bietet gegenüber der Zentrifugation folgende Vorteile: Einerseits erfordert sie einen nur geringen Zeit-, Material- und apparativen Aufwand, andererseits treten auch keine Verluste an Biomasse durch Zellaggregation oder mechanische Zellschädigung auf. Außerdem ist bei partikelarmen Flüssigkeitsproben auch die Bearbeitung großer Probenvolumina möglich. Der Nachteil der Filtration besteht darin, dass die Poren der Filter bei stark verunreinigten Proben leicht verstopfen können, und dass die Filter bei direkter Inkubation auf Schrägmedien (häufigste Form der Kultivierung) in Streifen zurechtgeschnitten werden müssen. Zudem stellen die Filter eine Diffusionsbarriere für Nährstoffe zwischen heranwachsenden Kolonien und Nährmedium dar. (DU MOULIN et al., 1978, 1988)

Die kulturelle Anzucht der Mykobakterien erfolgt auf festen oder flüssigen Selektivmedien, d.h. Nährmedien, die durch Zugabe von Supplementen (Vitamine, Siderophore) speziell den Nährstoffansprüchen der Mykobakterien angepaßt sind. Zudem enthalten sie oft Substanzen wie Malachitgrün, Antibiotika oder Antimykotika, welche ähnlich den Dekontaminationsmitteln das Wachstum der Begleitflora möglichst selektiv inhibieren (s.o.). Zu den bei Umweltpuben am häufigsten benutzten Nährmedien zählen Eiermedien, wie beispielsweise das Löwenstein-Jensen Medium (LJ), aber auch Agarmedien wie z.B. der Middlebrook-7H10-Agar (SONGER, 1981) und Flüssigmedien wie Middlebrook-7H9-Medium und MB-Redox-Medium (LIU et al., 1999). Die Standard-Inkubationstemperatur zur Isolierung obligat pathogener Mykobakterien (*M. tuberculosis*-Komplex) beträgt wegen ihrer Adaption an die menschliche Körpertemperatur 37°C. „Atypische“-Mykobakterien besitzen jedoch je nach Spezies meist ein größeres Temperaturspektrum, das von 20°C über 30°C bis über 40°C reichen kann (PORTAELS et al., 1988b; FISCHER et al., 1991; KAMALA et al., 1994; TORKKO et al., 2000).

1.4 Methoden zur Differenzierung von Umwelt-Mykobakterien

Bis heute existiert kein einheitliches System zur Differenzierung von Umwelt-Mykobakterien. Allgemein steht für die Differenzierung von Mykobakterien eine Vielzahl von biochemischen, chemotaxonomischen und molekularbiologischen Methoden zur Verfügung. Für die routinemäßige Differenzierung eignen sich insbesondere solche Verfahren, die bei möglichst großem Differenzierungsvermögen einen geringen Arbeits- und Kostenaufwand erfordern. Biochemische Verfahren erfordern viel Erfahrung und einen relativ hohen Arbeitsaufwand und führen bei mykobakteriellen Umweltisolaten nicht selten zu unbrauchbaren Ergebnissen (PORTAELS et al., 1988b; BÖTTGER, 1991). Weitaus genauer und auch für Umweltisolate sinnvoller sind chemotaxonomische und molekularbiologische Differenzierungsmethoden, die in den folgenden Teilkapiteln näher erläutert werden.

1.4.1 Chemotaxonomische Differenzierungsmethoden

Ein einfaches chemotaxonomisches Differenzierungsverfahren stellt die Analyse der Mykolsäuren dar. Anhand der Mykolsäuren können Mykobakterien sowohl untereinander als auch von nahe verwandten, Mykolsäure-haltigen Genera, wie *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* und *Tsukamurella* unterschieden werden. Bei den Mykolsäuren handelt es sich um langkettige, alpha-verzweigte, beta-hydroxy-Fettsäuren, die über das Arabinogalactan kovalent mit dem Peptidoglycangerüst der Zellwand verestert sind und durch pallisadenartige Aneinanderlagerung eine dicht gepackte, hydrophobe Schicht bilden (BARKSDALE et al., 1977; PETIT & LEDERER, 1984; GOODFELLOW & MINNIKIN, 1984). Mykobakterielle Mykolsäuren unterscheiden sich von den Mykolsäuren verwandter Bakteriengattungen dadurch, dass sie aus 60 bis 90 Kohlenstoffatomen bestehen (z.B. weisen die Mykolsäuren der Gattung *Corynebacterium* nur 22 bis 38 Kohlenstoffatome auf (GOODFELLOW & MINNIKIN, 1984; HINRIKSON & PFYFFER, 1994). Außerdem können mykobakterielle Mykolsäuren zusätzlich zu der stets vorhandenen Carboxyl- und Hydroxylgruppe weitere sauerstoffhaltige, funktionelle Gruppen besitzen, die sich bei anderen Bakterien nicht finden (DAFFÉ et al., 1983). Folglich werden bei Mykobakterien neben α - und α' -Mykolsäuren, die keine zusätzliche, sauerstoffhaltige funktionelle Gruppe aufweisen, weitere Mykolsäuretypen nachgewiesen, die entsprechend ihren funktionellen Gruppen als Methoxy-, Keto-, Epoxy-, ω -Carboxy oder ω -Methoxy-Mykolsäuren bezeichnet werden (DAFFÉ et al., 1983; MINNIKIN et al., 1984; LUQUIN et al., 1991). Von den verschiedenen Verfahren der Mykolsäureanalyse soll hier nur auf die Dünnschichtchromatographie (DC) und die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) eingegangen werden:

Die Dünnschichtchromatographie (DC) erlaubt eine qualitative Unterscheidung der Mykolsäuretypen auf Grund ihrer sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen und somit auf Grund ihrer Polarität (LÉVY-FRÉBAULT et al., 1986). Bedingt durch die diskontinuierliche Verteilung der Mykolsäuretypen innerhalb der Gattung *Mycobacterium* liefert die DC charakteristische Mykolsäuremuster, mit deren Hilfe die Mykobakterien in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden können, die ihrerseits meist aus mehreren Mykobakterienspezies bestehen. Da die Zusammensetzung der in der Zellwand vorkommenden Mykolsäuretypen bei allen Stämmen einer Spezies konstant ist, ist jede Spezies einem bestimmten Mykolsäuremuster zuzuordnen (s. Kap. 2.7.1) (DAVID et al., 1989).

Eine weitere Methode der Mykolsäureanalytik ist die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Bei dieser Methode werden die Mykolsäuren sowohl nach ihrer Hydrophobizität als auch nach ihrer Kettenlänge aufgetrennt. Jede Mykobakterienspezies besitzt ein charakteristisches HPLC-Chromatogramm, das sich in aller Regel von den Chromatogrammen anderer Spezies eindeutig unterscheidet (s. Kap. 2.7.2) (BUTLER et al., 1991; 1995).

1.4.2 Molekularbiologische Differenzierungs- und Typisierungsmethoden

Infolge der rasanten Entwicklung der Molekularbiologie wurden in den letzten 10 Jahren verschiedene molekularbiologische Methoden zur genotypischen Differenzierung von Mykobakterien entwickelt, die eine schnelle und sichere Identifizierung bis zur Speziesebene (z.T. auch darunter) erlauben. Insbesondere durch die Einführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR: Polymerase Chain Reaction) durch MULLIS &

FALOONA (1987) wurde die Mykobakteriendiagnostik wesentlich vereinfacht. Die PCR-Produkte werden anschließend z.B. mittels Sequenzierung oder Restriktionsanalyse auf Spezies-spezifische Nukleotidsequenzen hin untersucht. Bei Mykobakterien hat sich die 16S-rDNA bewährt (BÖDDINGHAUS et al., 1990a; ROGALL et al., 1990b) und das Gen, welches für das 65 kDa-Heat-shock-Protein codiert (HANCE et al., 1989; PLIKAYTIS et al., 1992; RODRIGO et al., 1992; TELENTI et al., 1993). Daneben werden z.B. auch das Superoxid-Dismutase-Gen (ZOLG & PHILIPPI-SCHULZ, 1994), das *dnaJ*-Gen (TAKEWAKI et al., 1994) und das 32-kDa-Protein-Gen (SOINI et al., 1994) zu Differenzierungszwecken untersucht. In der Literatur finden sich sehr unterschiedliche Methoden zur Analyse der variablen Bereiche des amplifizierten DNA-Fragmentes. Beispielsweise erlaubt die direkte Sequenzierung eines 16S-rDNA Gen-Abschnittes (ROGALL et al., 1990a; KIRSCHNER et al., 1993) in den meisten Fällen eine sichere Speziesdifferenzierung. Dieses Verfahren wird insbesondere bei phylogenetischen Studien genutzt (STAHL & URBANCE, 1990; BÖDDINGHAUS et al., 1990b; SPRINGER et al., 1996).

Zur Typisierung insbesondere von schnellwachsenden Mykobakterien wie *M. abscessus* hat sich z.B. die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) bewährt (LIN-HUI, 2000).

Eine in der Tuberkulosedagnostik verbreitete DNA-Fingerprinting Methode ist z.B. die Hybridisierung von mittels RFLP erhaltenen Fragmenten mit (GTG)-Oligo-Sonden via Southernblot (CILLIERS, 1997). Auch die *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD) ist eine sinnvolle Methode zur Genotypisierung von Mykobakterienisolaten insbesondere bei der Aufklärung von Infektionsketten, bzw. Infektionsquellen und wird in Kapitel 2.10.2 an Hand des Zielorganismus *M. xenopi* näher erläutert (GÜRTLER & MAYALL, 2001).

1.5 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte zum einen die Optimierung kultureller, chemotaxonomischer und molekularbiologischer Methoden zum Nachweis von Mykobakterien aus aquatischen Habitaten zum Ziel und zum anderen die Anwendung und Validierung dieser Methoden bei konkreten praktischen Fragestellungen.

Der methodologische Teil umfasste folgende Ziele:

- Optimierung von Methoden zum kulturellen Nachweis aquatischer Mykobakterien durch parallelen Einsatz verschiedener Anzuchtverfahren, in denen die Parameter Medium, Temperatur, Dekontamination variiert wurden und ihr Einfluss auf Menge und Spektrum der isolierten Mykobakterien analysiert wurde
- Vergleich der Eignung verschiedener chemotaxonomischer (Mykolsäureanalytik mittels DC und HPLC) und molekularbiologischer (PCR-RFLP, DNA-Sequenzierung) Methoden zur Differenzierung aquatischer Mykobakterien
- Die Schaffung und Vervollständigung chemotaxonomischer und molekularbiologischer Referenzdaten zur Differenzierung von Umwelt-Mykobakterien war sinnvoll, um gefundene Isolate identifizieren zu können

Der praktische Teil umfasste folgende Ziele:

- Anwendung der chemotaxonomischen und molekularbiologischen Differenzierungsverfahren zur Identifizierung von Mykobakterien-Umweltisolaten, die keiner bekannten Spezies zuzuordnen sind und Versuch der Beschreibung neuer Mykobakterienspezies und deren Ökologie
- Entwicklung und Optimierung eines molekularbiologischen Typisierungsverfahrens zur Aufklärung der Ursache einer *M.-xenopi*-Pseudoepidemie
- Untersuchung des Vorkommens und Verhaltens von Mykobakterien in Biofilmen zweier Systeme:
 - Rohre der zentralen Trinkwasserverteilung
 - Aufwuchsträger aus unterschiedlichen Materialien (Kupfer, Edelstahl, Polyethylen, PVC), die im Bereich von drei Wasserwerken zwei Jahre lang dem Trinkwasser exponiert waren

2. Material und Methoden

2.1 Probenmaterialien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Mykobakterien sowohl in Wasser- als auch in Biofilmproben untersucht. Die Entnahme der Wasserproben erfolgte aus eigener Initiative. Die Biofilmproben wurden dagegen im Rahmen des vom BMBF geförderten Verbundprojektes „Erfassung des Kontaminationspotentials von Biofilmen in Aufbereitung und Verteilung von Trinkwasser“ untersucht. Ziel von Teilprojekt 1 (Förderkennzeichen 02WT9860) des Verbundvorhabens war die Untersuchung von pathogenen und fakultativ pathogenen Mikroorganismen (Mykobakterien, *Cryptosporidium*, *Giardia*, Aeromonaden, *Campylobacter*, *Yersinia*, Viren, und Amöben) in Biofilmen von Trinkwasser-Verteilungssystemen. Teilweise stammten die Biofilmproben aus unterirdisch verlegten Leitungsrohren, teilweise aus Aufwuchsträgern unterschiedlicher Materialien, die zwei Jahre lang dem aufbereiteten Trinkwasser von drei Wasserwerken exponiert waren.

2.1.1 Wasserproben

Insgesamt wurden 80 Wasserproben untersucht, davon stammten 8 aus Oberflächengewässern und 72 aus dem Trinkwasserbereich (meist Kalt- oder Warmwasserproben aus Hausinstallationssystemen). Zusätzlich wurden die in Kapitel 2.10.1 beschriebenen Wasserproben untersucht.

2.1.2 Biofilmproben aus Trinkwasser-Leitungsrohren

Mit freundlicher Unterstützung der Stadtwerke Duisburg wurden insgesamt 18 Wasserrohr-Abschnitte des Trinkwasserverteilungsnetzes ausgegraben und herausgetrennt, und der Biofilm wie unter 2.2 beschrieben entnommen, verschickt und bearbeitet. Die Rohre stammten von unterschiedlichen Orten und waren unterschiedlichen Alters und Materials. Die einzelnen Entnahmeorte und -termine sind der Tabelle 12 in Kapitel 3.4.1 zu entnehmen.

2.1.3 Biofilmproben von Aufwuchsträgern

Dem Trinkwasser wurden Aufwuchsträger aus verschiedenen Materialien (PVC, Edelstahl, Kupfer und Polyethylen) in einem „Bioreaktor“ (Abb. 1) exponiert, um die Bildung des Biofilms über die Dauer von zwei Jahren durch mehrmalige Beprobung zu verfolgen. Hierdurch sollte eine Aussage getroffen werden, in welchem Ausmaß das Material, auf dem sich der Biofilm bildet („Substratum“), und/oder die Expositionszeit die Akkumulation und mikrobielle Zusammensetzung von Biofilmen beeinflussen. Die dem Wasser exponierte Oberfläche der Aufwuchsträger betrug 18,75 cm². Insgesamt wurden 48 Biofilmproben von Aufwuchsträgern untersucht.

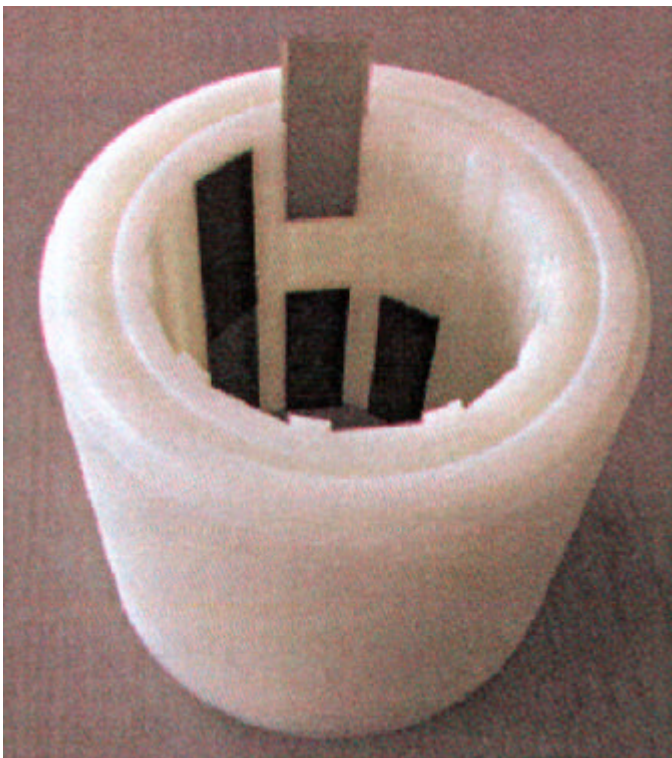
Es wurden drei Bioreaktor-Anlagen in Wasserwerken in den Städten Dorsten-Holsterhausen, Gladbeck und Berlin in Betrieb genommen. Vor Expositionsbeginn wurden die Bioreaktoren und die darin befindlichen Aufwuchsträger mit Methanol desinfiziert und vor Ort unter sterilen Bedingungen in die Anlage eingebaut (Abb. 2) (WINGENDER et al.,

2003). Die Entnahmeorte und -termine sind im Einzelnen der Tabelle 13 in Kapitel 3.4.2 zu entnehmen.

Abbildung 1: „Bioreaktoren“ in denen die Aufwuchsträger exponiert wurden. Linkes Bild zeigt die Anlage in Berlin, rechtes Bild zeigt die Anlage in Dorsten.



Abbildung 2: Einbau der Aufwuchsträger in den „Bioreaktor“



2.2 Entnahme und Transport der Proben

2.2.1 Entnahme und Transport der Wasserproben

Die Wasserproben mit einem Volumen von mindestens 1,2 l wurden in sterilen Probengefäßen auf schnellstem Wege ins Labor gebracht und dort möglichst umgehend verarbeitet. Falls die Verarbeitung nicht umgehend möglich war, wurden die Proben bei 4°C gelagert und innerhalb einer Woche verarbeitet.

2.2.2 Entnahme und Transport der Biofilmproben aus Trinkwasser-Leitungsrohren

Zunächst mit einem Bagger und dann mit Schaufeln wurde das Trinkwasserverteilungsnetz an entsprechenden Stellen freigelegt. Der freigelegte Rohrabschnitt wurde äußerlich mit 10% Wasserstoffperoxid desinfiziert und anschließend je nach Rohrmaterial mit desinfizierten Rohrschneidern, Trennjägern oder Handsägen herausgetrennt. Die ca. 1 m langen, herausgetrennten Rohrabschnitte wurden sofort mit steriler Aluminiumfolie verschlossen und auf schnellstem Weg ins Labor transportiert. Der Biofilm an inneren Oberfläche des Rohres wurde mit sterilen Schabern oder Glasperlen abgelöst, in sterilem Wasser suspendiert, homogenisiert, aliquotiert und noch am selben Tag mit einem Kurierdienst an die einzelnen Teilnehmer des Verbundprojektes verschickt, so dass die Suspensions-Teilproben am nächsten Tag sogleich verarbeitet werden konnten. Zu jeder Teilprobe der Biofilmsuspension wurden Entnahmedatum, Entnahmeort, Rohrmaterial, Rohrdurchmesser, Volumen der Gesamtprobe und die Gesamtfläche, von der der Biofilm abgelöst worden war, mitgeteilt (WINGENDER et al., 2003).

2.2.3 Entnahme und Transport der Biofilmproben von Aufwuchsträgern

Über einen Zeitraum von 2 Jahren wurden in halbjährlichen Abständen die Aufwuchsträger unterschiedlichen Materials unter sterilen Bedingungen entnommen, in mit feuchter Watte ausgekleidete, sterile Falcon-tubes gegeben und sofort via UPS an die verschiedenen Verbundteilnehmer geschickt. Jedes halbe Jahr wurden somit aus jedem der drei Bioreaktor-Standorte jeweils ein Aufwuchsträger aus Kupfer, Edelstahl, PVC und Polyethylen verarbeitet (s.Kap. 2.1.3). Die exponierten Oberflächen der Aufwuchsträger wurden mit sterilen Gummischabern vorsichtig abgeschabt und in ein Becherglas mit 80 ml sterilem Wasser gegeben. Das an den Gummischabern haftende Biofilmmaterial wurde anschließend durch Rühren und Schütteln in dem Wasser suspendiert.

2.3 Kulturelle Anzucht aquatischer Mykobakterien

2.3.1 Medien

Middlebrook-7H10-Agar: Der vollsynthetische Middlebrook 7H10-Agar stellt eine von MIDDLEBROOK und COHN (1958) entwickelte Modifikation des Dubos-Mediums dar. Der Agar enthält verschiedene Wachstumsfaktoren (Vitamine, L-Glutaminsäure) und wird durch Zusatz des OADC-Wachstumssupplement, bestehend aus Oleinsäure, Albumin, Dextrose und Katalase, ergänzt. Der in Petrischalen gegossene 7H10-Agar wurde sowohl zur Primärisolierung als auch zur Vereinzelung und Anzucht von Reinkulturen eingesetzt. Kommerziell erhältlich ist sowohl der 7H10-Agar (Kat. Nr. 0627-17-4), als auch das

OADC-Supplement (Kat. Nr. 0722-72) von der Fa. Difco, Augsburg. Die Herstellung des gebrauchsfertigen-Agars erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Löwenstein-Jensen Medium mit Glycerin (LJ): Dieses Volleimedium wurde gebrauchsfertig als Schrägmedium in Röhrchen von der Firma Biotest, Heidelberg, (Kat. Nr. 913013) bezogen.

MB-Redox-Flüssigmedium: Dieses Medium wurde gebrauchsfertig von der Firma Heipha Diagnostika, Heidelberg, (Kat. Nr. 5392r) bezogen. Ein Farbindikator färbt das ursprünglich gelbe Medium rosa, was auf das Vorhandensein von Mykobakterien hinweist.

2.3.2 Aliquotierung und Mehrfachansatz der Proben

Da eines der Ziele der vorliegenden Arbeit darin bestand, den kulturellen Nachweis aquatischer Mykobakterien zu optimieren, wurden alle Proben aliquotiert und parallel im Mehrfachansatz mit verschiedenen Anzuchtverfahren untersucht. Die unterschiedlichen Anzuchtverfahren bestanden jeweils aus einer spezifischen Kombination eines Dekontaminationsverfahrens (CPC, KCl/HCl-Puffer, s. Kap. 2.3.3), eines Nährmediums (LJ, 7H10, MB-Redox, s. Kap. 2.3.1) und einer Inkubationstemperatur (20, 30, 37, 44°C, s. Kap. 2.3.4). Die 24 verschiedenen Anzuchtverfahren und ihre Abkürzungen A-X sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Bezeichnung kulturellen Nachweismethoden

Nachweis- verfahren	Medium	Dekontamination	Inkubations- temperatur
A	7H10-Agar	HCl/KCl-Puffer	20°C
B	7H10-Agar	HCl/KCl-Puffer	30°C
C	7H10-Agar	HCl/KCl-Puffer	37°C
D	7H10-Agar	HCl/KCl-Puffer	44°C
E	LJ-Medium	HCl/KCl-Puffer	20°C
F	LJ-Medium	HCl/KCl-Puffer	30°C
G	LJ-Medium	HCl/KCl-Puffer	37°C
H	LJ-Medium	HCl/KCl-Puffer	44°C
I	MB-Redox	HCl/KCl-Puffer	20°C
J	MB-Redox	HCl/KCl-Puffer	30°C
K	MB-Redox	HCl/KCl-Puffer	37°C
L	MB-Redox	HCl/KCl-Puffer	44°C
M	7H10-Agar	CPC 0,01%	20°C
N	7H10-Agar	CPC 0,01%	30°C
O	7H10-Agar	CPC 0,01%	37°C
P	7H10-Agar	CPC 0,01%	44°C
Q	LJ-Medium	CPC 0,01%	20°C
R	LJ-Medium	CPC 0,01%	30°C
S	LJ-Medium	CPC 0,01%	37°C
T	LJ-Medium	CPC 0,01%	44°C
U	MB-Redox	CPC 0,01%	20°C
V	MB-Redox	CPC 0,01%	30°C
W	MB-Redox	CPC 0,01%	37°C
X	MB-Redox	CPC 0,01%	44°C

Da die Anzuchtverfahren A-L, die KCl/HCl-Puffer zur Dekontamination verwenden, erst zu einem späteren Zeitpunkt in die Untersuchungen mit aufgenommen wurden, ist die Zahl der mit ihnen untersuchten Proben durchweg geringer als die Zahl der mit CPC dekontaminierten Proben (Anzuchtverfahren M-X in Tabelle 1). Die geringsten Probenzahlen wurden mit den Verfahren A, B, E, F, I und J (Dekontamination mit KCl/HCl-Puffer, Inkubationstemperaturen 20 und 30°C) untersucht, da von vielen Proben keine ausreichende Anzahl von Aliquots hergestellt werden konnte und sich bei diesen Verfahren schon relativ früh eine niedrige Positivitätsrate und eine hohe Kontaminationsrate abzeichnete (s. Kap. 3.1, Tabelle 3). Weiterhin erklären sich die unterschiedlichen Zahlen in der 5. Spalte von Tabelle 3 dadurch, dass während der anfänglichen Orientierungsphase der Arbeit noch nicht alle Anzuchtverfahren angewandt und einige Verfahren erst nach und nach mit zunehmenden Erfahrungen in die Untersuchungen mit aufgenommen wurden. Die in Kapitel 2.10.1 beschriebenen, speziell zur Isolierung von *M. xenopi* untersuchten Wasserproben wurden nicht in der Tabelle 1 wiedergegebenen Vergleich kultureller Nachweisverfahren mit einbezogen.

2.3.3 Probendekontamination

Da Mykobakterien bei ihrer Isolierung aus Wasserproben von der schneller wachsenden Begleitflora, insbesondere von Gram-positiven Sporenbildnern und Schimmelpilzen überwuchert werden (KUBIN, 1984), ist eine geeignete Probendekontamination entscheidend (s. Kap. 1.3). Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Dekontaminationsverfahren verwendet:

Dekontamination mit Cetylpyridiniumchlorid (CPC): CPC ist ein kationisches Tensid und gehört zu den quaternären Ammoniumverbindungen, welche in höheren Konzentrationen eine Denaturierung von Proteinen und Enzymen bewirkt und in niedrigeren Konzentrationen eine Schädigung der Zellmembran mit nachfolgender Zelllyse bewirken kann (HAMILTON (1971). Von DU MOULIN und STOTTMEIER (1978) sowie von SCHULZE-RÖBBECKE et al., (1991) wird Cetylpyridiniumchlorid wegen seiner Effizienz und seiner geringen Toxizität für den Menschen zur Dekontamination von Wasserproben empfohlen.

Durchführung: Das Wasservolumen, das für jedes Anzuchtverfahren zu untersuchen war, wurde in ein steriles Glasgefäß mit Schraubverschluss gegeben. (Bei Wasserproben betrug das Volumen je Ansatz stets 100 ml, bei Biofilmsuspensionen wurden je Ansatz 1 oder 10 ml der ursprünglichen Suspension mit sterilem Wasser auf 100 ml Endvolumen aufgefüllt). Anschließend wurde unter sterilen Bedingungen CPC-Pulver (Merck, Darmstadt, Kat. Nr. 59116) entsprechend der gewünschten Endkonzentration von 0,01% zugegeben. Das verschlossene Gefäß wurde dann 15 sek lang geschüttelt, anschließend stehen gelassen und nach einer Einwirkzeit von 30 min membranfiltriert.

Dekontamination mit KCl/HCl-Puffer („Legionellenpuffer“): Dieser Puffer wird häufig zur Inaktivierung der Begleitflora bei der Isolierung von Legionellen verwendet und wurde hier erstmals zum kulturellen Nachweis von Mykobakterien eingesetzt.

Herstellung des Puffers:

- 0,2 molare HCl.....1 Teil
- 0,2 molare KCl18 Teile

Durchführung bei Wasserproben: Das jeweils zu untersuchende Wasservolumen (100 ml) wurde in ein steriles Glasgefäß mit Schraubverschluss gefüllt und membranfiltriert. Danach wurden 100 ml HCl/KCl-Puffer unter sterilen Bedingungen auf den Filter gegeben

und nach einer Einwirkzeit von 5 min durch den Filter abgesaugt. Anschließend wurde der Filter mit 100 ml sterilem Wasser nachgespült, um dann mit einer sterilen Pinzette auf/in das entsprechende Medium gelegt zu werden.

Durchführung bei Biofilmpuben (Rohr- und Aufwuchsträger-Proben): Die zu untersuchende Biofilmsuspension (in der Regel 10 ml) wurde in einem sterilen Glasgefäß mit Schraubverschluss mit 100 ml HCl/KCl-Puffer vermischt. Nach einer Einwirkzeit von 5 min wurde die Probe membranfiltriert, mit 100 ml sterilem Wasser nachgespült und mit einer sterilen Pinzette auf/in das entsprechende Medium gelegt.

2.3.4 Membranfiltration und Bebrütung der Ansätze

Die Wasser- bzw. Biofilmpuben wurden direkt im Anschluß an die Dekontamination durch sterile Celluloseacetat-Membranfilter (Durchmesser 50 mm, Porengröße 0,45 µm, Sartorius, Göttingen, Kat. Nr. 11306-50-ACN) filtriert. Nach der Filtration wurden nochmals 100 ml steriles Wasser durch die Filter gesaugt („Nachspülung“), um im Filter verbleibende Dekontaminationsmittelreste zu entfernen.

Bei Inkubation auf 7H10-Agar in Petrischalen wurden die ganzen Filter unter sterilen Bedingungen auf die Oberfläche gelegt. Bei Verwendung von LJ-Medium wurde unter sterilen Bedingungen ein 1 cm breiter Streifen aus der Mitte des Filters herausgeschnitten und auf die Oberfläche des Schrägmediums im Glasröhrchen gelegt. Die Reste des zerschnittenen Filters wurden mit einer sterilen Pinzette in das Glasröhrchen mit MB-Redox-Flüssigmedium überführt.

Die inokulierten Nährmedien wurden insgesamt 3 Monate lang bei Normalatmosphäre bei 20°C, 30°C, 37°C und 44°C bebrütet und alle 14 Tage auf mikrobielles Wachstum überprüft. In aller Regel wurden die angezüchteten Kolonien erst nach Ablauf von 3 Monaten vereinzelt (s. Kap. 2.5). Nur für den Fall, dass während der Primärisolierung vor Ablauf der 3 Monate einzelne Mykobakterien-ähnliche Kolonien im Begriff waren, von schnellerwachsenden Kontaminanten überwuchert zu werden, wurden die Kolonien schon vor Ablauf der dreimonatigen Bebrütung auf 7H10-Agar vereinzelt. Bei Verwendung von LJ-Medium wurde zum Gasaustausch der Schraubverschluß des Glasröhrchens in leicht geöffnetem Zustand belassen, bis die Flüssigkeitsansammlung am Röhrchenboden verdunstet war (in Abhängigkeit von der Temperatur nach etwa 2-5 Wochen). Agarplatten wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Kreppband abgeklebt und in Polyethylenbeuteln inkubiert.

2.4 Ziehl-Neelsen-Färbung

Nach dreimonatiger Bebrütung wurde aus jedem Ansatz mindestens eine Kolonie jedes gewachsenen Kolonietyps mittels Ziehl-Neelsen-Färbung (BURKHARDT, 1992) auf Säure- und Alkoholfestigkeit überprüft (s. Kap. 1.1). Nur Ziehl-Neelsen-positive Stämme wurden als Mykobakterien betrachtet und den weiteren Differenzierungsschritten zugeführt.

2.5 Anlage einer Reinkultur, Stammhaltung

Zur Herstellung von Reinkulturen wurden nach der Primärisolation Ziehl-Neelsen-positive Kolonien auf Middlebrook 7H10-Agar vereinzelt. In aller Regel ließen sich auf diesem Medium bei 30°C Einzelkolonien subkultivieren. Von der Subkultur wurde anschließend eine Einzelkolonie LJ-Medium überimpft, subkultiviert und gekühlt aufbewahrt. Für diese Vereinzelnungs- und Subkultivierungsschritte waren meist 4 bis 8 Wochen erforderlich.

2.6 Bestimmung von Wachstumsgeschwindigkeit, Koloniemorphologie und Pigmentierung

Die Bestimmung von Wachstumsgeschwindigkeit, Koloniemorphologie und Pigmentierung wurde nur bei den unter 2.9 aufgeführten Isolaten durchgeführt, da zur Anerkennung einer neuen Mykobakterienpezies die Analyse dieser phänotypischen Merkmale obligatorisch ist (Vgl. Kap 2.9). Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit wurden Einzelkolonien der zu untersuchenden Isolate auf LJ-Medium bei 30°C inkubiert und die Zeit notiert, bis Kolonienwachstum festgestellt werden konnte. Die Analyse der Koloniemorphologie (schleimige, rauhe, glatte Kolonien), wurde ebenfalls auf LJ-Medium bei 30°C durchgeführt. Die Untersuchung des Pigmentierungsverhalten wurde wie folgt durchgeführt. Eine Einzelkolonie wurde auf zwei LJ-Röhrchen überimpft. Dabei wurde ein Röhrchen zum Lichtschutz in Aluminiumfolie eingewickelt und beide Röhrchen bei 30°C bebrütet. Nach sichtbarem Koloniewachstum (>2 mm) erfolgte eine eintägige Lichtexposition des nicht mit Aluminiumfolie bedeckten Röhrchens am Fenster. Nach einer anschließend nochmaligen Inkubation (3 d) bei 30°C wurde das belichtete Röhrchen mit dem unbelichteten Röhrchen verglichen. Ein Isolat, welches keine Pigmente bildet bezeichnet man als „nonchromogen“. Bildet es Pigmente bei Belichtung bezeichnet man es als „photochromogen“. Erfolgt die Pigmentbildung ohne Lichteinwirkung, wird der betreffende Stamm als scotochromogen bezeichnet.

2.7 Chemotaxonomische Differenzierungsmethoden

2.7.1 Mykolsäureanalyse mittels Dünnschichtchromatographie

Wie schon in Kapitel 1.4.1 erwähnt wurde, ist die Dünnschichtchromatographie (DC) ein etabliertes Verfahren zur chemotaxonomischen Abgrenzung von Mykobakterien zu anderen Genera und zu ihrer groben Differenzierung. Die alkalische Hydrolyse der Mykolsäuren aus der Mycolyl-Arabinogalactan-Wachsmatrix der Zellwand und anschließende katalytische Methylierung der Fettsäuren mit Hilfe von Jodmethan erfolgte nach DOBSON et al. (1985). Die darauf folgende dünnschichtchromatographische Auftrennung der Mykolsäure-Methylester wurde entsprechend den Angaben von VALERO-GUILLÉN et al. (1986) mit zwei Laufmittelsystemen (Petroleumether/Aceton und Dichlormethan) durchgeführt. Bei Anwendung dieser Methodik reichte in aller Regel eine eindimensionale Auftrennung aus; nur bei Isolaten mit α -, α' -, und Keto-Mykolsäuren wurde zum Nachweis ggf. zusätzlich vorhandener Methoxy-Mykolsäuren ebenfalls eine zweidimensionale Auftrennung vorgenommen.

2.7.2 Mykolsäureanalyse mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Mykolsäure-Analytik mittels HPLC folgte dem von BUTLER et al. (1991, 1995) beschriebenen Standardprotokoll. Auch bei diesem Verfahren erfolgt die Mykolsäure-Extraktion aus der Zellwand mittels alkalischer Hydrolyse. Anschließend werden die Mykolsäuren mit p-Bromophenacyl verestert („derivatisiert“) und in einer Umkehrphasen-Chromatographie mit einer unpolaren C-18 Säule als stationärer Phase und mit einem relativ polaren (über einen Gradienten eingesetzten) Methanol-Dichlormethan-Gemisch als mobiler Phase aufgetrennt. Die Mykolsäure- p-Bromophenacyl-Ester absorbieren UV-Licht und lassen sich mit Hilfe eines UV-Detektors nachweisen.

2.8 Molekularbiologische Differenzierungsmethoden

2.8.1 Restriktionsanalyse des 65-kDa-Heatshockprotein-Gens (PRA)

Die hier verwendete Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) eines PCR-Produkts des 65-kDa-Heatshockprotein- (*hsp65*-) Gens wurde von seinen Beschreibern (TELENTI et al., 1993) auch als PCR-Restriktionsanalyse (PRA) bezeichnet. Die PRA stellt eine einfach und schnell durchzuführende molekularbiologische Differenzierungsmethode dar und ermöglicht innerhalb von ein bis zwei Tagen eine genotypische Identifizierung von Mykobakterien bis zur Speziesebene, bei einigen Spezies auch unterhalb dieser Ebene.

Im Wesentlichen wurde die PRA in folgenden Schritten durchgeführt: Die Mykobakterien-DNA wurde aus dem Überstand zentrifugierter Zellsuspensionen entnommen. Mit Hilfe der PCR-Primer Tb11 (5' ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT 3') und Tb12 (5' CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT 3') wurde ein 439 bp Abschnitt des *hsp65*-Gens amplifiziert. Folgendes Reaktionsprofil wurde verwendet: Prä-Denaturierung 5 min bei 94°C, 38 mal Amplifikationszyklus bestehend aus Denaturierung (1 min bei 94°C), Anlagerung der Primer (1 min bei 56°C) und Extension (1 min. bei 72°C); abschließende Extension 10 min bei 72°C. Danach wurde das PCR-Produkt mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Bst*EII, *Hae*III und *Cfo*I (Boehringer, Mannheim, Kat. Nr. 567612, 693944 und 688541) sowie unter Zusatz von 25 mM Spermidin (Sigma, Steinheim, Kat. Nr. S 2626) verdaut. Die bei der Restriktion entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese in einem 3%-igen NuSieve GTG Agarose-Gel (Biozym, Nr. 850084) aufgetrennt. Die DNA-Fragmentmuster wurden anschließend in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht auf Polaroid-Filmen (665 pos./neg.) dokumentiert. Die Längenbestimmung der Restriktionsfragmente erfolgte durch visuellen Vergleich mit einem Längenstandard (pUC 19 DNA/*Msp*I: Fermentas, St.Leon-Rot, Kat. Nr. SM0221). Fragmente, deren Länge weniger als 60 Basenpaare betrug, wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen, da sie großenteils Primer- bzw. Primer-Dimer-Banden darstellen. Die Spezieszuordnung der Isolate wurde mit Hilfe von Referenztabelle der Fragmentmuster bekannter Stämme vorgenommen (s. Tabelle 6).

2.8.2 Restriktionsanalyse des 16S-23S-rDNA-Spacers (Spacer-RFLP)

Diese Methode wurde von ROTH et al. (1999) entwickelt und ist ebenfalls eine PCR-RFLP-Methode, mit dem Unterschied, dass statt des in der PRA (s. Kap.2.7.1) untersuchten *hsp65*-Gens ein Bereich des 16S-23S-Spacers der rDNA amplifiziert und

untersucht wird. Da die sich Größe des PCR-Produkts verschiedener Mykobakterien-spezies unterscheidet, lässt sich oft schon an Hand der PCR-Produktgröße eine grobe Differenzierung der untersuchten Mykobakterienisolate vornehmen. Die Fragmentmuster erlauben in der Regel eine klare Spezieszuordnung. Der Nachweis mehrerer Fragmentmuster bei verschiedenen Angehörigen einer Spezies ist bisher nicht beschrieben.

Die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) erfolgte mit Hilfe der beiden Mykobakterien-spezifischen Oligonukleotide Sp1 (5`ACCTCCTTTCTAAGGAGCACC3`) und SP2 (5`GATGCTCGCAACCACTATCCA3`). Folgendes Reaktionsprofil wurde verwendet: Prä-Denaturierung 5 min bei 94°C, 38 mal Amplifikationszyklus bestehend aus Denaturierung (50 sek bei 94°C), Anlagerung der Primer (50 sek bei 58°C) und Extension (50 sek bei 72°C); abschließende Extension 10 min bei 72°C. Der Nachweis des amplifizierten PCR-Produkts erfolgte durch elektrophoretisch in einem 3%-igen NuSieve GTG Agarose-Gel (Biozym, Hameln, Kat. Nr. 850084). Die Restriktionsanalyse wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Hae*III und *Cfo*I (Boehringer, Mannheim, Kat. Nr. 693944 und 688541) durchgeführt, in einem einem 4%-igen NuSieve GTG Agarose-Gel (s.o.) aufgetrennt und auf Polaroid-Filmen dokumentiert.

2.8.3 Partielle Sequenzierung der 16S-rDNA

In der vorliegenden Arbeit wurde in Anlehnung an das Protokoll von KIRSCHNER et al., (1993) ein 452 bp langes PCR-Produkt der 16S-rDNA sequenziert. Das Produkt umfasst die beiden hypervariablen Regionen A (*E.-coli*-Positionen 129-267) und B (*E.-coli*-Positionen 430-500). Die Primer werden als „P 285“ (universeller Primer: 5` GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3`) und „P 259“ (Mykobakterien-spezifischer Primer: 5` TTT CAC GAA CAA CGC GAC AA 3`) bezeichnet. Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe eines zweistufigen Temperaturprofils und wurde durch eine 5-minütige Denaturierung bei 94°C eingeleitet. Anschließend folgten 40 Temperaturzyklen (1 min Denaturierung bei 94°C, 3 min Primer-Anlagerung und Extension bei 68°C) sowie eine abschließende 3-minütige Extension bei 68°C. Die erfolgreiche Amplifikation des 16S-rDNA-Genfragmentes wurde elektrophoretisch bestätigt. Das Amplifikat wurde anschließend mit einem DNA-Purification-Kit der Firma Quiagen, Hilden, (Kat. Nr. 28104) aufgereinigt und zusammen mit den Primern zur Sequenzierung an das BMFZ weitergereicht. Die Auswertung der erzielten Sequenzen erfolgte durch Vergleich mit den Online-Datenbanken GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), und Ridom (www.ridom.de) und EMBL (<http://www.embl-heidelberg.de/>).

2.9 Beschreibung neuer Mykobakterienspezies

Maßgeblich für die offizielle Anerkennung einer neuen Bakterienspezies sind die im *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* beschriebenen Anforderungen (<http://ijs.sgmjournals.org/misc/subonline.shtml>). Um als neue Spezies anerkannt zu werden, muss der Organismus über eine Anzahl phänotypischer und genotypischer Merkmale verfügen, von denen einige wesentliche in bislang unbeschriebener Ausprägung vorzuliegen haben. Als obligatorisch zu beschreibende phänotypische Merkmale gelten bei Mykobakterien zur Zeit Wachstumsgeschwindigkeit, Pigmentierung, biochemisch/physiologische Merkmale sowie die Mykolsäure-Zusammensetzung der Zellwand (s. Kap. 2.7). Als obligatorisch zu beschreibendes genotypisches Merkmal gilt die Sequenz der 16S-rDNA (s. Kap. 2.8.3). Zusätzlich können weitere

phänotypische und genotypische Merkmale beschrieben werden, wie z.B. das PRA-Muster (s. Kap. 2.8.1) und die Restriktionsanalyse des 16S-23S-rDNA-Spacers (s. Kap. 2.8.2). Darüber hinaus muss ein Stamm der neuen Spezies in zwei öffentlich zugänglichen Stammsammlungen hinterlegt und die neue Spezies gültig publiziert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwölf nicht identifizierbare Mykobakterien-isolate als vermutlich neue Spezies näher untersucht, von denen elf Stämme (s. Tabelle 11) vorläufig als „Spezies X“ und ein Stamm (BN 3151) vorläufig als „Spezies Y“ bezeichnet wurden. Zum Zwecke der gültigen Beschreibung neuer Spezies wurden die genannten Stämme in Zusammenarbeit mit Frau Dr. L. Naumann und Herrn Dr. U. Reischl (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg) folgenden Untersuchungen unterzogen:

Phänotypische Merkmale:

- Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit (s. Kap. 2.6)
- Bestimmung der Pigmentbildung (s. Kap. 2.6)
- Untersuchung von biochemischen und physiologischen Merkmalen (nach: (DEUTSCHES ZENTRALE KOMITEE ZUR BEKÄMPFUNG DER TUBERKULOSE, 1991; DIN, 1991)*
 - Arylsulfatase
 - Brenzschleimsäure (= 2-Furancarbonsäure)
 - Wachstum auf 5% NaCl
 - Wachstum auf Toluidinblau
 - Niazin-Akkumulation
 - Nitratreduktion
 - Katalase semiquantitativ
 - Katalase bei 68°C
 - Amidasen (Acetamid, Benzamid, Harnstoff, Nicotinamid, Pyracinamid, Succinamid, Allantoin, Sulfonamid)
 - Resistenzbestimmungen (u.a. Ciprofloxacin, Doxycyclin und Clarithromycin)
- Dünnschichtchromatographische Analyse der Mykolsäuren (s. Kap. 2.7.1)
- HPLC-Analyse der Mykolsäuren (s. Kap. 2.7.2)

Genotypische Merkmale:

- PRA (s. Kap. 2.8.1)
- Spacer-RFLP (s. Kap. 2.8.2)
- Partielle Sequenzierung der 16S-rDNA (s. Kap. 2.8.3)
- Sequenzierung der gesamten 16S-rDNA (nach KIRSCHNER et al., 1993)*

2.10 Untersuchung einer Pseudoepidemie durch *M. xenopi*

M. xenopi ist ein langsam wachsendes, hitzetolerantes Mykobakterium, das bei 42°C die optimale Wachstumstemperatur aufweist (TORRKO et al., 2000). *M. xenopi* zählt auch zu den fakultativ pathogenen Mykobakterien. Es ist ein Umweltmykobakterium, das sowohl im Wasser als auch in Biofilmen vorkommt und gegebenenfalls Infektionen bei z.B. immun-

• Untersuchungen wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt

supprimierten Patienten auslösen kann. Der zwischen 1994 und 2000 gehäufte Nachweis von *M. xenopi* bei 220 überwiegend bronchoskopisch gewonnenen Proben von Patienten eines Düsseldorfer Krankenhauses wurde nach genauerer Datenanalyse als „Pseudoepidemie“ interpretiert. Hinweise auf eine Pseudoepidemie ergaben sich dadurch, dass zum einen oftmals Isolationen ohne klinische Infektionszeichen gefunden worden waren, zum anderen das Warmwassersystem der Klinik mit *M. xenopi* kolonisiert war. Als Pseudoinfektion bezeichnet man eine durch einen Diagnosefehler irrtümlicherweise festgestellte Infektion bei einem in Wirklichkeit nicht infizierten Patienten; als Pseudoepidemie die zeitliche und räumliche Häufung von Pseudoinfektionen. Die Folgen für den Patienten sind unnötige Behandlungen, unnötige verlängerte Liegezeiten, unnötige Verhandlungskomplikationen, unnötige Kosten und eine unnötige psychische Belastung der Patienten. Die Ursache für Pseudoinfektionen ist oftmals die Kontamination des Untersuchungsmaterials, z.B. bei der Probennahme, beim Transport, bei der Verarbeitung im Labor, oder auch die falsche Interpretation eines Befundes. Es gibt verschiedene Erreger, die Pseudoepidemien auslösen können, z.B. die Gattungen *Mycobacterium*, *Bacillus* und *Legionella*. Gemeinsam ist diesen Mikroorganismen, dass sie teilweise in großen Zahlen in der Umwelt vorkommen und (insbesondere bei Immunsupprimierten) Infektionskrankheiten verursachen können. Auffällig ist, dass in der Fachliteratur Mykobakterien am häufigsten als Ursache von Pseudoinfektionen beschrieben wurden (SZABO et al., 1982).

Als Ursache der Pseudoepidemie wurde in dem Düsseldorfer Krankenhaus die Kontamination des Patienten-Untersuchungsmaterials mit Leitungswasser des Krankenhauses verdächtigt. Ebenso wurde vermutet, dass die Kontamination des Untersuchungsmaterials dadurch zu Stande kam, dass die Bronchoskope zum Abschluss der automatischen Aufbereitung in einem Endoskop-Reinigungs- und Desinfektionsautomaten (ERDA) mit unbehandeltem Leitungswasser aus dem Warmwassersystem des Krankenhauses nachgespült wurden.

Ziel der Untersuchungen war es zunächst, die Hypothese einer durch Leitungswasser verursachten Pseudoepidemie zu bestätigen bzw. zu widerlegen und (bei Bestätigung) die Pseudoepidemie zu beenden. Hierzu mussten zunächst Warmwasserproben auf *M. xenopi* untersucht werden und die Wasserisolate mit Hilfe eines geeigneten Genotypisierungsverfahrens mit den Patientenisolaten verglichen werden. Bei klonaler Verwandtschaft der Isolate waren Maßnahmen zur Prävention weiterer Pseudoinfektionen durchzuführen.

2.10.1 Untersuchung der Wasserproben auf das Vorhandensein von *M. xenopi*

Im Rahmen der *M. xenopi*-Pseudoepidemie wurden 48 Warmwasserproben des Düsseldorfer Krankenhauses auf das Vorhandensein von *M. xenopi* untersucht. Die Wasserproben wurden wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben mit KCl/HCl-Puffer dekontaminiert und wie unter 2.3.4 erläutert membranfiltriert. Die Filter wurden 3 Monate lang bei 42°C (der optimalen Vermehrungstemperatur von *M. xenopi*) auf LJ-Medium bebrütet. Alle Isolate wurden anschließend mit Hilfe der in Kapitel 2.7 und 2.8 beschriebenen Methoden differenziert und die als *M. xenopi* bestätigten Isolate wurden in die weiteren Untersuchungen aufgenommen.

2.10.2 Genotypisierung der *M.-xenopi*-Isolate mittels *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD)

Folgende *M.-xenopi*-Isolate wurden der Genotypisierung unterzogen:

- 11 Wasserisolate des Düsseldorfer Krankenhauses, die wie unter 2.10.1. beschrieben aus dem Warmwassersystem des betroffenen Krankenhauses isoliert wurden
- 30 Patientenisolate, die vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurden, welches das betroffene Düsseldorfer Krankenhaus betreut
- 3 Patientenisolate aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg als externe Vergleichsstämme

Die *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD) ist eine Methode zur Genotypisierung von Organismen (GÜRTLER & MAYALL, 2001) und wurde im vorliegenden Fall auf die oben genannten *M.-xenopi*-Isolate angewandt. Das Prinzip der RAPD beruht auf der Amplifikation von DNA-Fragmenten aus dem Genom der Testorganismen mit Hilfe eines kurzen (ca. 10 bp), willkürlich (ohne Kenntnis der Zielsequenzen) ausgewählten Oligonukleotids (RAPD-Primers). Im vorliegenden Falle wurden die *M.-xenopi*-Isolate mit Hilfe der in Tabelle 2 aufgelisteten RAPD-Primer untersucht.

Tabelle 2: RAPD-Primer zur Typisierung der *M.-xenopi*-Isolate

Bezeichnung des Primers	Sequenz
ZA	5` CCGCAGACAC 3`
ZAP40	5` CCGCAGCCAA 3`
ZAP40m	5` CCGCAGCCAC 3`
Stenmal 270	5` TGCGCGCGGG 3`
Stenmal 272	5` AGCGGGCCAA 3`

Das PCR-Reaktionsprofil für die Primer ZA, ZAP40, ZAP40m sah wie folgt aus: Prä-Denaturierung 5 min bei 94°C, 40 mal Amplifikationszyklus bestehend aus Denaturierung (1 min bei 94°C), Anlagerung der Primer (1 min bei 36°C) und Extension (1 min bei 72°C), abschließende Extension 5 min bei 72°C. Der Nachweis der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte durch Gel-Elektrophorese in einem 2%-igen Agarose-Gel (Serva, Heidelberg, Kat.-Nr. 11404).

Der PCR-Zyklus für die Primer Stenmal 270, und 272 sah wie folgt aus: Nach einer Prä-Denaturierung (15 min bei 94°C) wurde der Temperaturzyklus [Denaturierung (5 min bei 94°C), Anlagerung der Primer (5 min. bei 36°C) und Extension (5 min bei 72°C)] 4 mal wiederholt. Im Anschluss daran erfolgte ein erneuter Temperaturzyklus [Denaturierung (1 min. bei 94°C), Anlagerung der Primer (1 min. bei 36°C) und Extension (1 min. bei 72°C)] 31 mal wiederholt. Im Anschluss daran erfolgte eine Extension von 10 min bei 72°C. Der Nachweis der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte durch Gel-Elektrophorese in einem 2%-igen Agarose-Gel (Serva, Heidelberg, Kat.-Nr. 11404).

2.10.3 Maßnahmen zur Prävention weiterer Pseudoinfektionen

Als vordringliche Maßnahme zur Prävention weiterer Pseudoinfektionen erschien nach Auswertung der in den Kapiteln 2.10.1 und 2.10.2 erzielten Ergebnisse der Ersatz des in dem betroffenen Krankenhaus benutzten Endoskop-Reinigungs/Desinfektionsautomaten (ERDA) durch einen neuen ERDA (EDT2, Fa. Olympus, Hamburg), in dem die Bronchoskope nach der Desinfektion mit UV-behandeltem Leitungswasser nachgespült werden.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss des kulturellen Nachweisverfahrens auf Menge und Spektrum der isolierten Mykobakterien

Um die Effizienz verschiedener Methoden zum kulturellen Nachweis aquatischer Mykobakterien zu vergleichen, wurden die untersuchten Proben (wie in Kapitel 2.3. beschrieben) parallel mit den in Tabelle 1 (Kap. 2.3.2) beschriebenen Nachweisverfahren untersucht. In Tabelle 1 sind die für jedes Nachweisverfahren verwendeten Medien, Dekontaminationsverfahren und Inkubationstemperaturen aufgelistet. Die für die Nachweisverfahren gewählten Abkürzungen A-X werden auch in den nachfolgenden Tabellen verwendet.

Die quantitativen Ergebnisse des kulturellen Mykobakteriennachweises sind in Tabelle 3 zusammengefasst. In den verschiedenen Spalten der Tabelle 3 werden folgende Begriffe verwendet:

- In der Spalte „Nachweisverfahren“ werden die Abkürzungen der Nachweisverfahren von Tabelle 1 beibehalten.
- Die Positivitätsrate beschreibt den prozentualen Anteil der Proben, aus denen Mykobakterien isoliert werden konnten.
- Die Kontaminationsrate beschreibt (ebenfalls prozentual) den Anteil der Proben, bei denen es auf Grund von Kontaminationen nicht möglich war, Mykobakterien zu isolieren.
- Die Negativitätsrate beschreibt den prozentualen Anteil der Proben, bei denen keine Mikroorganismen (weder Mykobakterien noch Kontaminanten) nachgewiesen wurden.
- Die „durchschnittliche Anzahl mykobakterieller KBE/ml“ bezeichnet den Mittelwert der mit Hilfe der jeweiligen Isolationsmethode je Probe nachgewiesenen Mykobakterienkolonien. Sie errechnet sich durch Division der mit dem jeweiligen Verfahren insgesamt angezüchteten Mykobakterienkolonien durch die Anzahl n (Anzahl aller Proben). Auch die angezüchtete Mykobakteriendichte der Biofilmpuben wurde bei dieser Berechnung als KBE/ml (nicht als KBE/cm²) berücksichtigt, das heißt in der Konzentration, in der die Mykobakterien in der Biofilmsuspension nachgewiesen wurden.
- Die Spalte „durchschnittliche Anzahl verschiedener Mykobakterienisolate je Probe“ bezeichnet die mit dem jeweiligen Nachweisverfahren je Probe durchschnittlich angezüchtete Anzahl der koloniemorphologisch (d.h. anhand von Pigmentierung, Form und Oberfläche) makroskopisch unterscheidbaren Mykobakterienkolonien. Die Werte errechneten sich durch Division der mit dem jeweiligen Verfahren bei allen Proben insgesamt isolierten, makroskopisch unterscheidbaren Mykobakterienkolonien durch die Anzahl n (Anzahl aller Proben).

Tabelle 3: Quantitative Ergebnisse der verschiedenen kulturellen Verfahren zum Nachweis von Mykobakterien

Nachweis- verfahren	Positivi- tätsrate in %	Kontami- nationsrate in %	Negativitäts- rate in %	n	Durchschnittliche Anzahl	
					mykobakterieller KBE/ml	verschiedener Mykobakterien- isolate je Probe
A	35,3	41,2	23,5	17	74	0,64
B	29,4	47,1	23,5	17	599	0,53
C	15,0	20,0	65,0	40	18	0,2

Fortsetzung Tabelle 3

D	14,8	0	85,2	37	0,9	0,03
E	47,0	41,0	12,0	17	57	0,46
F	76,5	11,7	11,8	17	2090	0,8
G	10,0	10,0	80,0	40	16	0,18
H	0	0	100,0	37	0	0
I	5,8	17,6	76,6	17	--	0,06
J	35,3	11,7	53,0	17	--	0,466
K	0	0	100,0	40	--	0
L	0	0	100,0	37	--	0
M	56,4	24,8	18,8	117	1078	1,06
N	38,7	27,2	34,1	147	442	0,5
O	3,8	10,7	85,5	131	2,0	0,05
P	0	0	100,0	108	0	0
Q	67,3	14,2	18,5	113	1241	1,08
R	58,9	11,5	29,6	139	1322	0,83
S	4,3	3,6	92,1	138	0,24	0,05
T	0,9	0	99,1	107	2,7	0,01
U	39,5	1,8	58,7	114	--	0,34
V	32,3	5,6	62,1	124	--	0,33
W	1,7	0	98,3	112	--	0,017
X	1,0	0	99,0	104	--	0,01

KBE/ml = koloniebildende Einheiten pro Milliliter

n = Anzahl der untersuchten Proben pro Nachweisverfahren

-- = nicht bestimmbar in Flüssigmedien

In der folgenden Abbildung 3 ist ein Celluloseacetat-Filter auf einer 7H10-Agar-Platte nach der Primärkultur zu sehen, auf dem nach Ablauf der 3 monatigen Bebrütungsdauer makroskopisch unterscheidbare Kolonien sichtbar sind.

Abbildung 3: Membranfilter mit morphologisch unterschiedlichen Mykobakterienkolonien in der Primärkultur auf 7H10-Agar-Medium



Die Tabelle 4 listet die mit den verschiedenen kulturellen Nachweisverfahren identifizierten Mykobakterienspezies und -subtypen auf. Als „unbekannt“ werden solche Isolate bezeichnet, die mit den in Kapitel 2.8 und 2.9 beschriebenen Differenzierungs-

verfahren nicht identifiziert werden konnten. Als „nicht subkultivierbar“ werden solche Isolate bezeichnet, die bei der Primärkultur ein Koloniewachstum auf Festmedien oder eine Trübung des Flüssigmediums zeigten, sich zur Vereinzelung aber nicht auf Middlebrook-7H10-Agar subkultivieren ließen. Bei Spezies, bei denen sich mit Hilfe der PRA (s. Kap. 2.8.1) mehrere Subtypen unterscheiden lassen, wird zusätzlich zur Speziesbezeichnung auch der PRA-Subtyp in Form einer römischen Zahl angegeben.

Tabelle 4: Mit den verschiedenen kulturellen Nachweisverfahren erhaltene Mykobakterienspezies und PRA-Subtypen

Nachweis- verfahren	Identifizierte Mykobakterienspezies und -subtypen
A	Unbekannte bzw. nicht subkultivierbare Isolate
B	Unbekannte bzw. nicht subkultivierbare Isolate
C	Unbekannte bzw. nicht subkultivierbare Isolate
D	Unbekanntes Isolat
E	Unbekannte bzw. nicht subkultivierbare Isolate
F	Unbekannte bzw. nicht subkultivierbare Isolate
G	Unbekannte bzw. nicht subkultivierbare Isolate
H	K. N.
I	Unbekannte bzw. nicht subkultivierbare Isolate
J	<i>M. aurum</i> II, „Spezies X“,
K	K. N.
L	K. N.
M	<i>M. chelonae</i> I, <i>M. chelonae</i> II, <i>M. chelonae</i> III, <i>M. flavescens</i> , <i>M. gilvum</i> , <i>M. gordonae</i> I, <i>M. gordonae</i> IV, <i>M. mucogenicum</i> I, „Spezies X“, „Spezies Y“, unbekannte Isolate
N	<i>M. chelonae</i> I, <i>M. chelonae</i> II, <i>M. chelonae</i> III, <i>M. flavescens</i> , <i>M. gilvum</i> , <i>M. gordonae</i> I, <i>M. gordonae</i> III, <i>M. hassiacum</i> , <i>M. lentiflavum</i> , <i>M. mucogenicum</i> , „Spezies X“, <i>M. peregrinum</i> I, unbekannte Isolate
O	<i>M. intracellulare</i> , <i>M. peregrinum</i> I
P	K. N.
Q	<i>M. abscessus</i> , <i>M. brumae</i> , <i>M. chelonae</i> I, <i>M. chelonae</i> II, <i>M. chelonae</i> III, <i>M. flavescens</i> , <i>M. gordonae</i> VIII, <i>M. mucogenicum</i> I, <i>M. mucogenicum</i> II, „Spezies X“, <i>M. porcinum</i> , unbekannte bzw. nicht subkultivierbare Isolate
R	<i>M. aurum</i> I, <i>M. chelonae</i> I, <i>M. chelonae</i> II, <i>M. chelonae</i> III, <i>M. gilvum</i> , <i>M. gordonae</i> I, <i>M. gordonae</i> III, <i>M. gordonae</i> XI, <i>M. gordonae</i> XIV, <i>M. gordonae</i> XV, <i>M. mucogenicum</i> I, <i>M. mucogenicum</i> II, <i>M. lentiflavum</i> , <i>M. „Spezies X“</i> , <i>M. peregrinum</i> I, <i>M. xenopi</i> , unbekannte bzw. nicht subkultivierbare Isolate
S	„Spezies X“
T	Nicht subkultivierbare Isolate
U	<i>M. chelonae</i> I, <i>M. chelonae</i> II, <i>M. chelonae</i> III, unbekannte bzw. nicht subkultivierbare Isolate
V	<i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> I, <i>M. chelonae</i> II, <i>M. chelonae</i> III, <i>M. peregrinum</i> II, nicht subkultivierbare Isolate
W	<i>M. chelonae</i> I
X	Nicht subkultivierbare Isolate

Römische Zahlen bezeichnen PRA-Subtypen (s. Kap. 3.2, Tabelle 7)

K. N. = Kein Nachweis von Mykobakterien

Abkürzungen der Nachweisverfahren: s. Tabelle 1

3.2 Differenzierung

3.2.1 Mykobakterielle Referenzstämme

Um die bei unbekannten Isolaten erhaltenen Differenzierungsergebnisse zuordnen zu können, sind Referenzdaten erforderlich. In Tabelle 6 sind alle bis zum Stichdatum 01.02.2003 bekannten Mykobakterienspezies aufgelistet. Sofern Differenzierungsergebnisse vorliegen, die mittels PRA (s. Kap. 2.8.1) und DC (s. Kap. 2.7.1) erzielt wurden, werden diese ebenfalls in Tabelle 6 wiedergegeben. Hierbei handelt es sich um eigene Ergebnisse, wenn dies nicht anders vermerkt ist. Die Ergebnisse der HPLC-Analyse (s. Kap. 2.7.2) und der RFLP des 16S-23S-Spacers (s. Kap. 2.8.2) finden sich in Anhang 1 (s. Kap. 8.1) bzw. Anhang 2 (s. Kap. 8.2).

Wie in Kap. 1.4 beschrieben erlaubt die Dünnschichtchromatographie Mykobakterienspezies anhand ihrer charakteristischen Zusammensetzung der Mykolsäuretypen in der Zellwand in unterschiedliche Gruppen einzuteilen. Eine Übersicht welche Mykolsäurezusammensetzung zu welcher Gruppe gehört findet sich in Tabelle 5 wieder.

Tabelle 5: Für verschiedene Mykobakterienspezies publizierte Mykolsäuremuster.

Bezeichnung des Mykolsäuremusters	Mykolsäuretypen							Sekundäre Alkohole
	a	a`	? - 17- (? -18-) Methoxy	Keto	Epoxy	- ? carboxy **	? -1- Methoxy	
A	+							
B	+	+						
C	+			+				
D	+		+	+				
E	+	+		+				
F	+	(+)*			+			
G	+					+		+
H	+			+		+		+
I	+	+		+		+		+
J	+		+	+		+		+
K	+	+	+					
L	+	+				+		+
M	+	+	+	+				
N		+				+		+
O	+	+			+		+	
P	+	+					+	
Q	+				+			
R	+						+	
S	+				+	+		+

* Bei Mykobakterien mit dem Mykolsäuremuster „F“ können a`-Mycolate in sehr geringen Mengen vorkommen

** ?-Carboxy-Mycolate (=Dicarboxy-Mycolate) können mit Eicosanol und anderen homologen sekundären Alkoholen Mykolsäure-Wachsester bilden. Diese sind chromatographisch eng mit den ?-Carboxy-Mycolaten assoziiert und werden mit den meisten Laufmitteln kaum oder nur unvollständig voneinander getrennt, so dass sie in der DC sowohl einen als auch zwei Flecken bilden können.

Tabelle 6: Ergebnisse der PCR-Restriktionsanalyse des *hsp65*-Gens (PRA) und der Mykolsäure-Dünnschichtchromatographie (DC) der mykobakteriellen Referenzstämme

Stamm Nr.	Mykobakteriensezies	Restriktionsfragmente in bp nach Verdau mit			DC
		<i>Bst</i> EI	<i>Hae</i> III	<i>Cfo</i> I	
ATCC 19977 ^t	<i>M. abscessus</i>	245/220	145/70/60	200/120/60	B
ATCC 27406 ^t	<i>M. agri</i>	245/135/55	165/150/60	n.u.	K
ATCC 27280 ^t	<i>M. aichiense</i>	335/125	200/70/60	200/105/65	H
CIP 103464 ^t	<i>M. alvei</i>	245/135/85	150/100/60	n.u.	R
ATCC 25276 ^t	<i>M. asiaticum</i>	245/220	110/105	n.u.	D
ATCC 23366 ^t	<i>M. aurum</i> I	Keine Restriktion	135/115/70/60	245/105/65	H
ATCC 33464 ^t	<i>M. austroafricanum</i>	335/125	165/60/55	n.u.	I
ATCC 25291 ^t	<i>M. avium</i>	245/220	130/105	245/110/65	H
DSM 44277 ^t	<i>M. bohemicum</i>	245/220	160/110/60	245/90/65	J
DSM 44537 ^t	<i>M. botniense</i>	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
DSM 44624 ^t	<i>M. branderi</i>	240/220	170/100/70/60	200/70/60	H
CIP 103465 ^t	<i>M. brumae</i>	Keine Restriktion	145/70/60	245/105/65	A
ATCC 51131 ^t	<i>M. celatum</i>	245/220	135/90	200/105/70	H
DSM 43804 ^t	<i>M. chelonae</i>	325/140	200/70	245/125/70	B
ATCC 19627 ^t	<i>M. chitae</i>	325/125	140/85/60	245/90/65	F
DSM 43826 ^t	<i>M. chlorophenolicum</i>	245/220	147/80/70/60	245/105/65	I
ATCC 27278 ^t	<i>M. chubuense</i>	245/220	140/85/60	n.u.	I
DSM 44017 ^t	<i>M. confluentis</i>	Keine Restriktion	195/85/60	245/105/65	H
DSM 44136 ^t	<i>M. conspicuum</i>	245/220	150/100	245/90/65	H
ATCC 49103 ^t	<i>M. cookii</i>	325/125	145	n.u.	L
ATCC 19340 ^t	<i>M. diernhoferi</i>	325/125	145/140	245/105/65	H
DSM 44339 ^t	<i>M. doricum</i>	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
NCTC 358 ^t	<i>M. duvalii</i>	Keine Restriktion	135/130/65	200/80/65	I
DSM 44368 ^t	<i>M. elephantis</i>	325/140	140/(70)	250/70/60	H
CIP 8139 ^t	<i>M. fallax</i>	335/125	190/145	245/105/65	A
NCTC1955 ^t	<i>M. farcinogenes</i>	245/135/85	180/140	200/120/65	F
ATCC14474 ^t	<i>M. flavescens</i>	Keine Restriktion	140/60	245/90/65	H
ATCC 6841 ^t	<i>M. fortuitum</i>	245/120/85	145/125/65/60	185/105/70	F
DSM 44346 ^t	<i>M. frederiksbergense</i>	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
DSM 44077 ^t	<i>M. gadium</i>	n.u.	n.u.	n.u.	H
ATCC 15754 ^t	<i>M. gastri</i>	245/140/85	135/105/70	190/80/65	D
ATCC 51234 ^t	<i>M. genavense</i> *	330/120	135/100	n.u.	E
NCTC 10742 ^t	<i>M. gilvum</i>	Keine Restriktion	165/90/60	245/65	I
DSM 44492 ^t	<i>M. goodii</i>	245/140/70	150/130/70	245/100/65	F
DSM 44160 ^t	<i>M. gordonae</i>	325/125	150/130/95	n.u.	D
DSM 44199 ^t	<i>M. hassiacum</i>	245/220	190/90/60	245/90/65	H
DSM 44634 ^t	<i>M. haemophilum</i>	n.u.	n.u.	n.u.	D
DSM 44428 ^t	<i>M. heckeshornense</i>	245/125/70	170/110/70/60	245/70/60	n.u.
DSM 44471 ^t	<i>M. heidelbergense</i>	245/220	135/115	245/90/70	n.u.
ATCC 49874 ^t	<i>M. hiberniae</i>	245/125/100	150/60	240/110/65	H
DSM 44183 ^t	<i>M. hodleri</i>	245/140/85	147/80/60	245/90/65	H
DSM 44478 ^t	<i>M. holsaticum</i> *	Keine Restriktion	140/100/60	n.u.	D
ATCC 700505 ^t	<i>M. immunogenicum</i> *	325/140	145/70/60	n.u.	n.u.
DSM 44064 ^t	<i>M. interjectum</i>	n.u.	n.u.	n.u.	H
DSM 44064 ^t	<i>M. intermedium</i>	245/220	150/135	n.u.	D
ATCC 13950 ^t	<i>M. intracellulare</i>	245/125/100	150/135/60	245/130/65	H
ATCC 12478 ^t	<i>M. kansasii</i>	245/220	135/105/70	190/80/65	D
DSM 44078 ^t	<i>M. komossense</i>	n.u.	n.u.	n.u.	J
DSM 44627 ^t	<i>M. kubicae</i>	245/220	150/100/70/60	245/70/60	D
DSM 44577 ^t	<i>M. lacus</i> *	325/135	125/95/70	n.u.	n.u.
DSM 44195 ^t	<i>M. lentiflavum</i>	Keine Restriktion	150/135	245/90/65	E
ATCC 49865 ^t	<i>M. madagascariense</i>	325/140	165/125/65	245/90/65	H

Fortsetzung Tabelle 6

CIP 104973 ^t	<i>M. mageritense</i>	245/140/70	170/130/60	n.u.	F
NCTC 11298 ^t	<i>M. malmoense</i>	245/125/100	155/110/80	245/80/65	E
ATCC 927 ^t	<i>M. marinum</i>	245/220	155/110/80	245/80/65	D
ATCC 43059 ^t	<i>M. morioacaense</i>	335/125	200/90/60	245/90/65	H
DSM 44625 ^t	<i>M. mucogenicum</i>	325/125	140/60	245/105/65	H
DSM 44340 ^t	<i>M. murale</i>	245/140/85	155/80/60	200/105/65	H
ATCC 25795 ^t	<i>M. neoaurum</i>	325/140	170/140	110/105/100	H
ATCC 19530 ^t	<i>M. nonchromogenicum</i>	245/125/85	150/60	240/110/60	H
DSM 44203 ^t	<i>M. novocastrense</i> *	Keine Restriktion	140/60	245/90/70	n.u.
ATCC 27023 ^t	<i>M. obuense</i>	245/220	140/80/60	n.u.	I
DSM 44572 ^t	<i>M. palustre</i>	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
ATCC 196686 ^t	<i>M. parafortuitum</i>	Keine Restriktion	155/80/60	245/100/40	I
ATCC 14467 ^t	<i>M. peregrinum</i>	245/220	145/140/100/65	245/105/65	F
ATCC 11758 ^t	<i>M. phlei</i>	245/220	140/80/60	245/90/65	H
ATCC 33776 ^t	<i>M. porcinum</i>	245/220	140/100	245/100/65	F
ATCC 35087 ^t	<i>M. poriferae</i>	335/125	165/100	245/90/65	I
ATCC 35154 ^t	<i>M. pulveris</i>	325/140	140/60	280/90/65	I
ATCC 27024 ^t	<i>M. rhodesiae</i>	335/125	160/125/60	200/105/65	H
NCTC 10803 ^t	<i>M. scrofulaceum</i>	245/220	200/135	245/85/65	H
NCTC 10956 ^t	<i>M. senegalense</i>	325/140	180/140	200/125/60	F
DSM 44393 ^t	<i>M. septicum</i>	245/220	150/130/100/70	245/70/60	n.u.
ATCC 27962 ^t	<i>M. shimodei</i>	245/140/100	140/105	200/90/70	I
ATCC 25275 ^t	<i>M. simiae</i>	245/220	200/135	240/85/65	E
ATCC19420 ^t	<i>M. smegmatis</i>	245/135/80	145/125/60	245/170	F
ATCC 33027 ^t	<i>M. sphagni</i>	325/140	180/90/60	200/90/80/65	H
NCTC 10831 ^t	<i>M. szulgai</i>	Keine Restriktion	130/100	n.u.	D
DSM 43227 ^t	<i>M. terrae</i>	325/125	190/140	240/85/65	H
ATCC19627 ^t	<i>M. thermoresistibile</i>	335/125	180/135/70	n.u.	M
ATCC 27282 ^t	<i>M. tokaiense</i>	245/120/85	140/80	245/170	H
ATCC 23292 ^t	<i>M. triviale</i>	Keine Restriktion	175/135	n.u.	A
S39 ^a	<i>M. triplex</i>	325/120	150/135/67	245/90/65	E
DSM 44338 ^t	<i>M. tusciae</i>	Keine Restriktion	200/90/70	245/105/70	H
ATCC15483 ^t	<i>M. vaccae</i>	Keine Restriktion	165/90/60	265/105/65	I
DSM 7251 ^t	<i>M. vanbaalenii</i>	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
DSM 44493 ^t	<i>M. wolynskyi</i>	245/140/70	160/130/70/60	245/160	F
NCTC 10042 ^t	<i>M. xenopi</i>	245/125/80	175/105	n.u.	H

* Stämme, die nicht selbst untersucht wurden. Falls Ergebnisse angegeben werden, wurden diese aus der Erstbeschreibung der jeweiligen Spezies entnommen. Die Literaturstellen der Erstbeschreibungen finden sich z.B. im Internet (www.dsmz.de/bactnom/nam1932.htm#1938) sowie im Literaturverzeichnis dieser Arbeit.

^a Patientenisolat, zur Verfügung gestellt von Dr. Andreas Roth, Lungenklinik Heckeshorn, Zum Heckeshorn 33, 14109 Berlin

^t = Typenstamm („type strain“)

n.u. = nicht untersucht

Zusätzlich zu den Referenzstämmen wurden die erhaltenen Daten mit einer hauseigenen Bibliothek von PRA-Subtypen verglichen. Von mehreren Mykobakterienspezies lassen sich mit Hilfe der PRA (vgl. Kap. 2.8) wiederum mehrere Subtypen unterscheiden. Zum Beispiel fanden DEVALLOIS et al. bei der Untersuchung von *M. abscessus*-Isolaten sowohl das von TELENTI et al. (1993) für *M. abscessus* (Subtyp I) publizierte als auch ein zweites, bisher nicht für *M. abscessus* beschriebenes HaeIII-Muster (DEVALLOIS et al., 1997). In Tabelle 7 sind die Subtypen derjenigen Mykobakterienspezies aufgeführt, die auch in dieser Arbeit gefunden wurden. Hierbei entspricht die römische Zahl I immer dem Subtyp des *type strains*. Alle abweichenden Subtypen werden mit den weiterführenden römischen Zahlen II, III, etc. bezeichnet.

Tabelle 7: PRA-Subtypen nachgewiesener Mykobakterienspezies

Spezies-Subtypen	Restriktionsfragmente (in bp) nach Verdau mit		
	<i>Bst</i> EII	<i>Hae</i> III	<i>Cfo</i> I
<i>M. aurum</i> I	Keine Restriktion	135/115/70/60	245/105/65
<i>M. aurum</i> II	325/125	180/140	110/70
<i>M. aurum</i> III*	325/140	180/140	110/70
<i>M. chelonae</i> I	325/140	200/70	245/125/70
<i>M. chelonae</i> II	325/140	200/125/70	200/120/65
<i>M. chelonae</i> III	325/140	200/70	200/120/65
<i>M. chelonae</i> IV*	325/140	190/125/70	170/120/70
<i>M. chelonae</i> V*	Keine Restriktion	200/70	200/125/70
<i>M. chelonae</i> VI*	325/125/110	110/80	245/125/65
<i>M. chelonae</i> VII*	325/140	200/140	200/125/65
<i>M. gordonae</i> I	325/125	150/130/95	n.u.
<i>M. gordonae</i> II	325/125	135/115/70	n.u.
<i>M. gordonae</i> III	325/125	135/115	n.u.
<i>M. gordonae</i> IV	245/220	135/120	n.u.
<i>M. gordonae</i> V	245/125/100	230/115	n.u.
<i>M. gordonae</i> VI	240/120/100	170/130/110	n.u.
<i>M. gordonae</i> VII	245/125/100	170/115/55	n.u.
<i>M. gordonae</i> VIII	245/125/100	140/120	245/90/65
<i>M. gordonae</i> IX	240/120/100	130/15/70	n.u.
<i>M. gordonae</i> X	245/125/85	230/115	n.u.
<i>M. gordonae</i> XI	245/125/80	170/110/69	n.u.
<i>M. gordonae</i> XII	325/125	170/115	n.u.
<i>M. gordonae</i> XIV	245/135/85	140/100	245/65
<i>M. gordonae</i> XV	245/125/90	150/135	245/70
<i>M. gordonae</i> XVI*	Keine Restriktion	140/120	245/70
<i>M. gordonae</i> XVII*	245/220	170/118	245/90/65
<i>M. mucogenicum</i> I	325/125	140/60	245/105/65
<i>M. mucogenicum</i> II	325/140	150/70/60	245/100
<i>M. mucogenicum</i> III*	325/125	160/140/70	245/105/65
<i>M. mucogenicum</i> IV*	325/125	150/90/70	245/105/65
<i>M. mucogenicum</i> V*	325/125	150/70	200/110/65
<i>M. mucogenicum</i> VI*	325/125	150/70	245/105/65
<i>M. peregrinum</i> I	245/220	145/140/100/65	245/105/65
<i>M. peregrinum</i> II	245/220	140/100	190/110/70

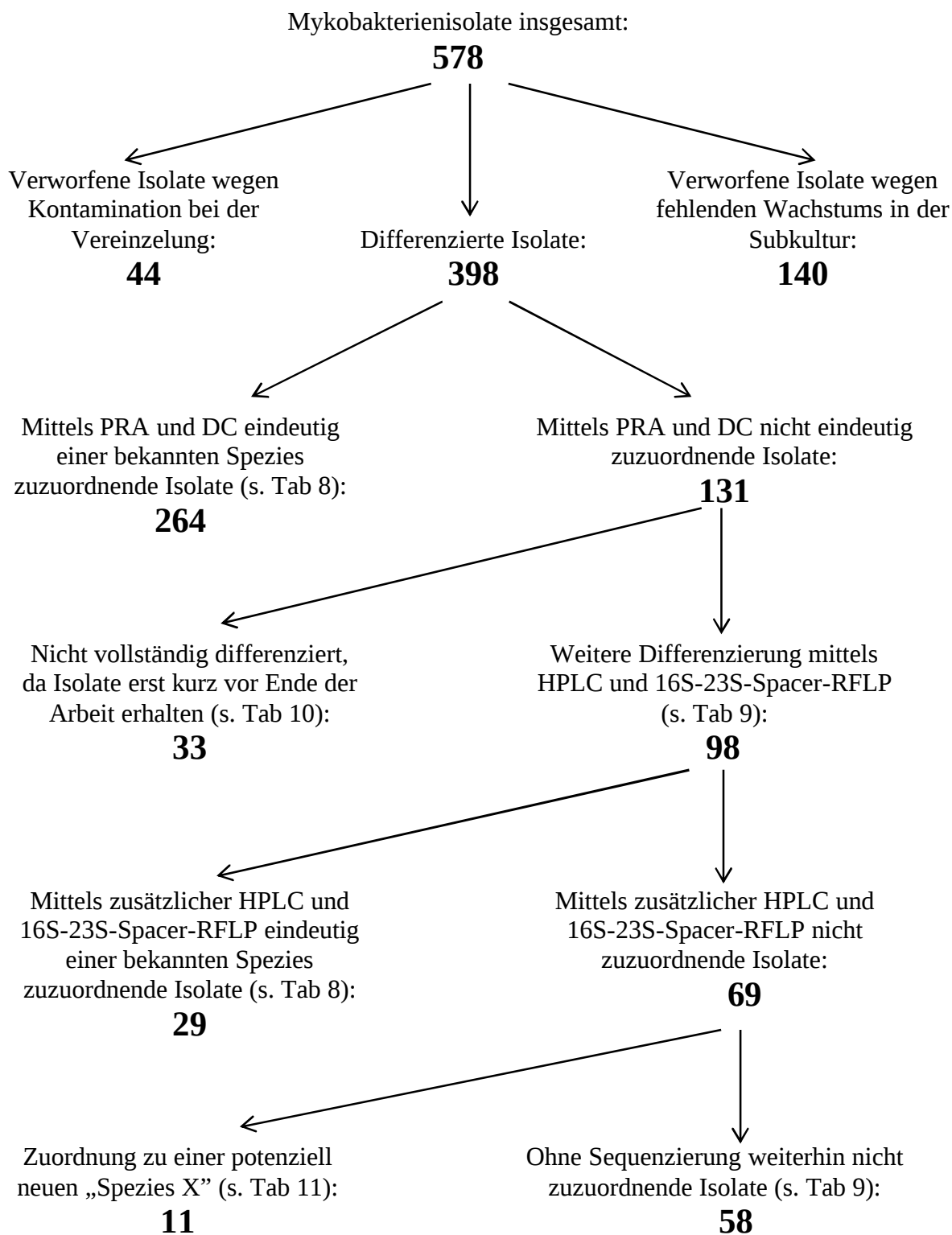
* = PRA-Subtypen die mit einem * gekennzeichnet sind, wurden erstmals in der vorliegenden Arbeit definiert.

3.2.2 Mykobakterienisolate

Im folgenden werden nun die Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Mykobakterienstämme näher behandelt. Alle Isolate wurden wie in Kapitel 2 beschrieben subkultiviert und differenziert. Anhand der vorhandenen Referenzdaten (s. Kap. 3.2.1) wurde versucht, das Isolat einer bekannten Spezies zuzuordnen oder festzustellen, dass es unbekannte Merkmale aufweist und es sich eventuell um eine neue Spezies bzw. einen neuen Subtyp einer bekannten Spezies handelt. Eine zusammenfassende Darstellung der gewonnenen Isolate und der Differenzierungsergebnisse findet sich in Abbildung 4.

Abbildung 4: Übersicht von Anzahl und Differenzierungsergebnissen der aus Wasser- und Biofilmprouben isolierten Mykobakterienstämme

Aus **146** Wasser- bzw. Biofilmprouben wurden folgende Isolate gewonnen:



3.2.2.1 Identifizierte Isolate

In der nachfolgenden Tabelle 8 sind alle Mykobakterienisolate aufgelistet, bei denen eine eindeutige Spezieszuordnung möglich war.

Tabelle 8: Übersicht über alle Mykobakterienisolate mit eindeutiger Spezieszuordnung

Isolate (BN)	Spezies
3631, 3639	<i>M. abscessus</i>
3145	<i>M. aurum</i> I
3478	<i>M. aurum</i> II
3327	<i>M. aurum</i> III
3217	<i>M. brumae</i>
3178, 3179, 3180, 3188, 3192, 3195, 3197, 3198, 3203, 3205, 3206, 3207, 3212, 3213, 3234, 3250, 3264, 3287, 3335, 3336, 3344, 3345, 3641, 3667	<i>M. chelonae</i> I
3218, 3219, 3289, 3298, 3302, 3315, 3321, 3326, 3355, 3356, 3357, 3387, 3155, 3177, 3229, 3237, 3247, 3248, 3254, 3277, 3312, 3392, 3393, 3394, 3459, 3462, 3466, 3511, 3527, 3595, 3636, 3642, 3644, 3647, 3648, 3658, 3660, 3674	<i>M. chelonae</i> II
3143, 3156, 3157, 3158, 3159, 3160, 3161, 3162, 3163, 3164, 3165, 3166, 3167, 3168, 3169, 3170, 3171, 3172, 3173, 3174, 3175, 3176, 3181, 3184, 3187, 3199, 3200, 3201, 3215, 3221, 3239, 3241, 3251, 3252, 3262, 3265, 3266, 3268, 3275, 3284, 3299, 3301, 3316, 3328, 3348, 3347, 3349, 3354, 3362, 3368, 3371, 3372, 3377, 3378, 3406, 3447, 3448, 3453, 3454, 3455, 3460, 3463, 3464, 3465, 3474, 3475, 3477, 3484, 3485, 3487, 3489, 3490, 3492, 3493, 3503, 3516, 3524, 3532, 3534, 3536, 3541, 3559, 3580, 3585, 3600, 3606, 3607, 3609, 3611, 3617, 3619, 3621, 3630, 3637, 3640, 3643, 3652, 3663, 3665, 3698	<i>M. chelonae</i> III
3230	<i>M. chelonae</i> IV
3386	<i>M. chelonae</i> V
3608	<i>M. chelonae</i> VI
3628	<i>M. chelonae</i> VII
3113, 3118, 3127, 3128, 3655, 3661	<i>M. gilvum</i>
3129, 3114, 3115, 3116, 3117	<i>M. gordonae</i> I
3130, 3182	<i>M. gordonae</i> III
3246	<i>M. gordonae</i> VIII
3125, 3126	<i>M. gordonae</i> XI
3191	<i>M. gordonae</i> XIV
3586	<i>M. gordonae</i> XV
3531	<i>M. gordonae</i> XVI
3112	<i>M. gordonae</i> XVII
3543, 3588	<i>M. flavescens</i>
3119, 3120	<i>M. hassiacum</i>
3138	<i>M. intracellulare</i>
3243, 3260	<i>M. lentiflavum</i>
3186, 3272, 3279, 3306, 3317, 3332, 3333, 3334, 3359, 3360, 3364, 3365, 3446, 3476, 3523, 3547, 3598, 3599, 3614, 3620, 3625, 3626, 3632, 3634, 3645, 3646, 3649, 3657	<i>M. mucogenicum</i> I
3309, 3310, 3481, 3483	<i>M. mucogenicum</i> II

Fortsetzung Tabelle 8

3159	<i>M. mucogenicum</i> III
3183	<i>M. mucogenicum</i> IV
3405, 3331	<i>M. mucogenicum</i> V
3560, 3530	<i>M. mucogenicum</i> VI
3236, 3369	<i>M. neoaurum</i>
3193, 3194, 3295	<i>M. peregrinum</i> I
3290, 3367	<i>M. peregrinum</i> II
3225, 3226	<i>M. porcinum</i>
3131, 3132, 3133, 3235, 3329, 3408, 3409, 3410, 3411, 3412, 3413, 3414, 3415, 3416, 3417, 3418, 3419, 3420, 3421, 3422, 2423, 3424, 3425, 3426, 3427, 3428, 3429, 3430, 3431, 3432, 3433, 3434, 3435, 3436, 3437, 3438, 3439, 3440, 3441, 3442, 3443, 3444, 3445, 3576, 3577, 3578, 3579	<i>M. xenopi</i>

In den nachfolgenden Abbildungen 5 und 6 sind zur Veranschaulichung die Ergebnisse der DC und PRA einiger Isolate dargestellt.

Abbildung 5: Ergebnisse einer Mykolsäure-Dünnschichtchromatographie.

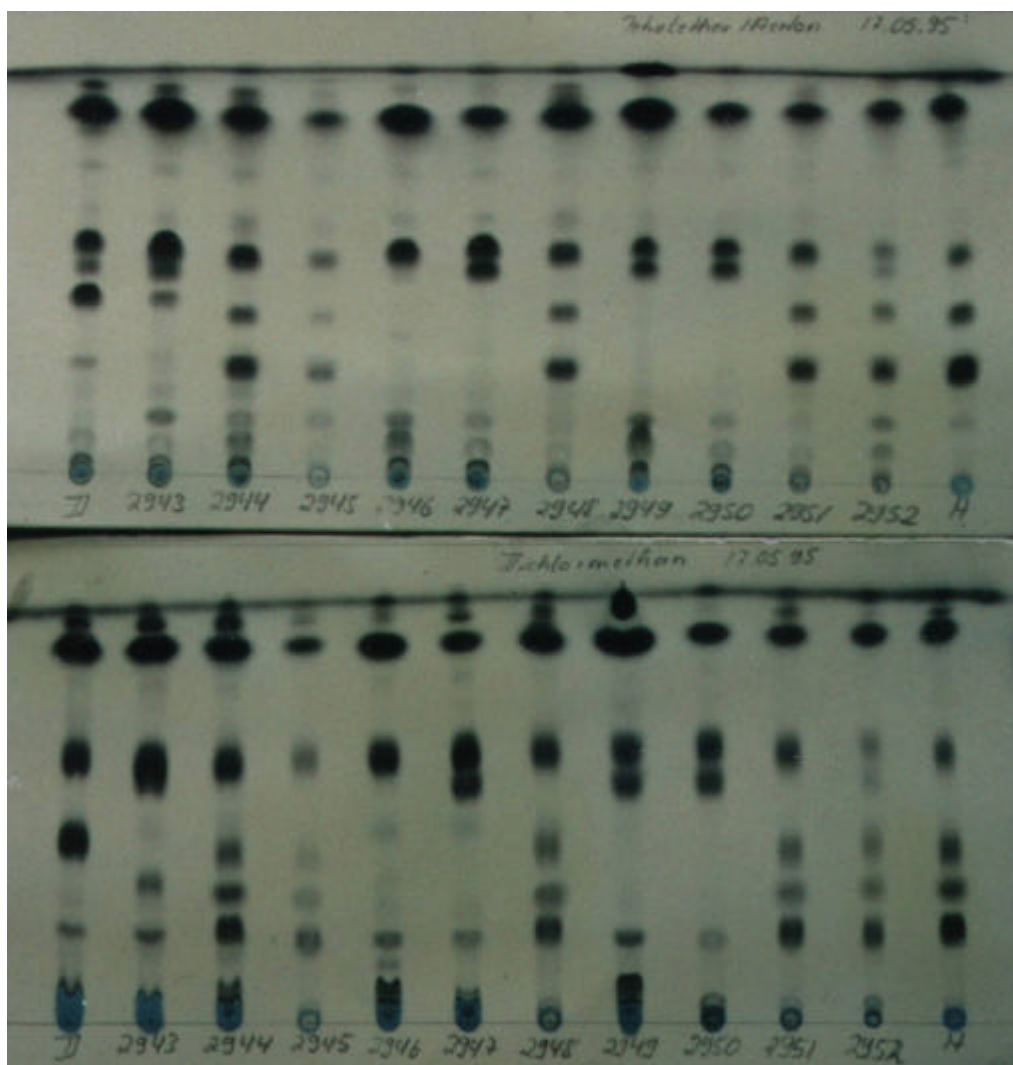
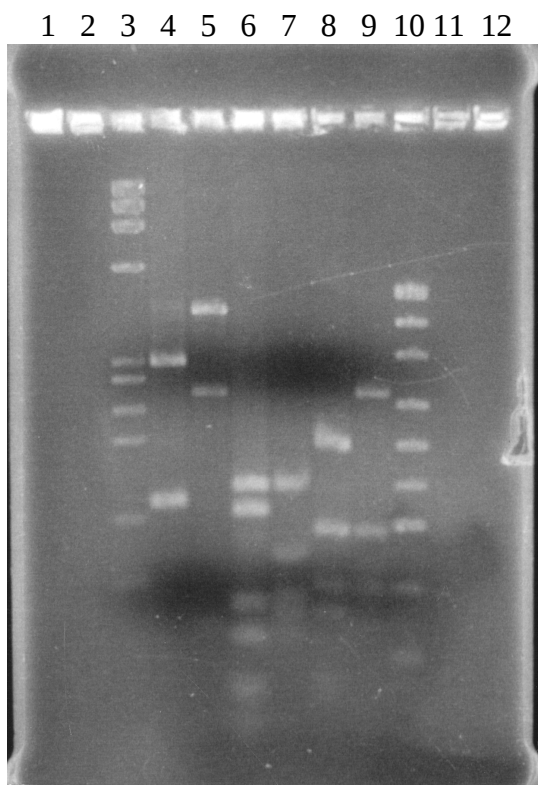


Abbildung 6: Gelelektrophoresefoto folgender Isolate nach Applikation der PRA:



In obigen Gel sind folgende Proben aufgetragen:

Spur 3: Längenstandard ϕ X174 DNA/*Hae*III

Spur 4: RFLP-Fragmente vom BN 3139 PCR-Produkt nach Verdau mit *Bst*EII

Spur 5: RFLP-Fragmente vom *M. parafortuitum* PCR-Produkt nach Verdau mit *Bst*EII

Spur 6: RFLP-Fragmente vom BN 3139 PCR-Produkt nach Verdau mit *Hae*EII

Spur 7: RFLP-Fragmente vom *M. parafortuitum* PCR-Produkt nach Verdau mit *Hae*III

Spur 8: RFLP-Fragmente vom BN 3139 PCR-Produkt nach Verdau mit *Cfo*I

Spur 9: RFLP-Fragmente vom *M. parafortuitum* PCR-Produkt nach Verdau mit *Cfo*I

Spur 10: Längenstandard pUC19

3.2.2.2 Isolate ohne eindeutige Spezieszuordnung mittels DC und PRA

In der nachfolgenden Tabelle 9 sind die 98 Isolate aufgeführt, die zusätzlich zu Mykolsäure-DC und PRA mit der 16S-23S-Spacer-RFLP und Mykolsäure-HPLC untersucht wurden, um eine Spezieszugehörigkeit zu ermitteln (s. Abb. 4). Aufgelistet sind die molekularbiologischen Daten und die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie. Die Ergebnisse der HPLC befinden sich in Anhang 3 (Kap. 8.3). In der Spalte „Bemerkungen“ ist bei 29 Isolaten die Zuordnung zu einer bekannten Spezies vermerkt. In den meisten Fällen gelang diese Zuordnung ausschließlich mittels HPLC und/oder Spacer-RFLP. Nur bei den mit einem Sternchen (*) markierten Isolaten war für die Spezieszuordnung zusätzlich eine partielle 16S-rDNA-Sequenzierung (s. Kap. 2.8.3) erforderlich. In Anhang 4 (Kap. 8.4, Abbildung 15) finden sich die 16S-rDNA-Sequenzen dieser Isolate. Die Abkürzung n.u. bezeichnet diejenigen molekularbiologischen Daten, die aus Zeitmangel oder wegen des Fehlens ausreichender Mengen von Bakterienbiomasse nicht untersucht werden konnten.

Tabelle 9: Übersicht über die 98 Isolate, die mit HPLC und 16S-23S-Spacer-RFLP näher untersucht wurden.

Isolat	Restriktionsfragmente (bp) in der PRA nach Verdau mit			DC	Spacer-RFLP			Bemerkungen
					PCR-Produkt (bp)	Restriktionsfragmente (bp) nach Verdau mit		
	<i>Bst</i> EII	<i>Hae</i> III	<i>Cfo</i> I			<i>Hae</i> III	<i>Cfo</i> I	
BN 3112	245/220	170/118	245/90/65	D	230	Keine Restriktion	Keine Restriktion	<i>M. gordonae</i> XVII
BN 3113	Keine Restriktion	185/100	245/90/65	I	325	245/180/130/125	Keine Restriktion	<i>M. gilvum</i>
BN 3119	245/220	170/80/60	245/90/65	H	280	185/110	150/80/70	<i>M. hassiacum</i>
BN 3120	245/220	170/125/70	245/90/65	H	280	185/110	150/80/70	<i>M. hassiacum</i>
BN 3121	325/125	160/110/60	245/90/65	H	325	170/135/70	245/80	
BN 3122	Keine Restriktion	190/90	245/105/65	H	340/330	245/135/110/70	Keine Restriktion	„Spezies X“
BN 3123	Keine Restriktion	190/90	245/105/65	H	340/330	245/135/110/70	Keine Restriktion	„Spezies X“
BN 3124	325/125	160/110/60	245/105/65	H	325	170/135/70	245/80	
BN 3127	Keine Restriktion	185/100	245/90/65	I	325	135/110	Keine Restriktion	<i>M. gilvum</i>
BN 3128*	Keine Restriktion	185/100	245/90/65	I	325	135/110	Keine Restriktion	<i>M. gilvum</i>
BN 3137	Keine Restriktion	200/70	245/170	H	330	150/125	Keine Restriktion	
BN 3146	Keine Restriktion	200/90	245/105/65	H	230	160/60	Keine Restriktion	
BN 3148	Keine Restriktion	200/90	245/105/65	H	350	150/125	250/90	„Spezies X“
BN 3149	Keine Restriktion	200/90	245/105/65	H	325	150/125	250/90	„Spezies X“
BN 3150	Keine Restriktion	200/90	245/105/65	H	340/245	150/135	245/90	„Spezies X“
BN 3151	325/125	190/140	120/105/95/65	H	325	150/110	Keine Restriktion	„Spezies Y“
BN 3152	Keine Restriktion	190/90	245/105/65	H	330	150/125	245/90	„Spezies X“
BN 3153	325/125	200/70/60	200/125/70	H	280	110/90/ kleine	Keine Restriktion	
BN 3154	Keine Restriktion	190/90	245/105/65	H	330	150/125	250/90	„Spezies X“
BN 3159**	325/125	160/140/70	245/105/65	H	325	170/135/70	245/80	<i>M. mucogenicum</i> III
BN 3183**	325/125	150/90/70	245/105/65	H	325	135/110/70	245/80	<i>M. mucogenicum</i> IV
BN 3185	Keine Restriktion	190/90/70	245/105/65	H	340/325	Keine Restriktion	340/325	„Spezies X“
BN 3189	Keine Restriktion	150/(130)/70	245/85/60	n.u.	240	147/135/70	Keine Restriktion	
BN 3202	325/125	140/60	245/110/65	I	325	150/135/70	245/80	

Fortsetzung Tabelle 9

BN 3214*	325/125	140/120	245/90/65	E/M	240	147/135/70	Keine Restriktion	
BN 3216	Keine Restriktion	150/60	200/100/70	H	280	150/110	Keine Restriktion	
BN 3222	Keine Restriktion	200/90/70	245/105/65	H	330	150/125	250/90	„Spezies X“
BN 3223	Keine Restriktion	200/90/70	245/105/65	H	330	150/125	250/90	„Spezies X“
BN 3230	325/140	190/125/70	170/120/70	B	250	Keine Restriktion	Keine Restriktion	<i>M. chelonae</i> IV
BN 3231	325/125	200/70/60	200/180	n.u.	325	110/90/ kleine	Keine Restriktion	
BN 3232	325/125	200/90/70	200/180/70	n.u.	280	110/90/ kleine	Keine Restriktion	
BN 3234	325/125	200/110/70	170/120/70	H	250	Keine Restriktion	Keine Restriktion	
BN 3240	Keine Restriktion	200/70	245/125/65	B	250	Keine Restriktion	Keine Restriktion	
BN 3245	Keine Restriktion	200/70	245/105/70	n.u.	340	280/150/135	250/90	
BN 3260*	Keine Restriktion	150/140	200/70	E/M	245	90/70	Keine Restriktion	<i>M. lentiflavum</i>
BN 3261	325/125	200/150	245/110/70	B	280	n.u.	Keine Restriktion	
BN 3271	325/125	140/70	245/100/70	D	n.u.	n.u.	n.u.	
BN 3273	325/125	140/120	245/90/65	H	240	135/90	Keine Restriktion	
BN 3274	325/140	200/180	140/110/70	H	280	110/100	190/170/140	
BN 3276	325/125	140/60	245/110/70	I	280	135/90	245/80	
BN 3280	325/140	150/135	200/110/70	I	275	110/90/ kleine	Keine Restriktion	
BN 3282	325/125	200/90/70	n.u.	I	275	110/90/ kleine	Keine Restriktion	
BN 3283	325/140	200/70	125/70	H	330	110/ viele kleine	Keine Restriktion	
BN 3285	325/125	200/110/70	245/100	n.u.	325	135/90	245/80	
BN 3295	325/125	190/70	245/105/70	F	n.u.	n.u.	n.u.	
BN 3303	245/220	150/90	200/110/60	n.u.	280	180/125/90	Keine Restriktion	
BN 3304	325/125	150/70	245/65	H	325	130/80	245/80	
BN 3305	325/125	150/130	200/125/70	H	280	135/90	Keine Restriktion	
BN 3307	325/125	200/180	110/90/65	H	330	125/50/40	Keine Restriktion	
BN 3319	325/125	180/140	200/110/70	H	325	125/90	Keine Restriktion	
BN 3320	325/125	200/70	245/110/70	n.u.	340/330	180/125	Keine Restriktion	
BN 3327	325/140	180/140	110/70	H	340/330	125/100	Keine Restriktion	<i>M. aurum</i> III
BN 3331**	325/125	150/70	200/110/65	H	325	135/80	245/80	<i>M. mucogenicum</i> V

Fortsetzung Tabelle 9

BN 3337	325/125	200/110/70	245/105/65	H	330	200/135	245/90	
BN 3338	325/125	190/70/60	245/105/65	H	330	200/135	245/90	
BN 3339	325/125	200/110/70	245/105/65	H	330	200/135	245/90	
BN 3340*	325/125	190/70/60	245/105/65	H	330	200/135	245/90	
BN 3341	325/125	190/70/60	245/105/65	H	330	200/135	245/90	
BN 3342	325/125	200/110/70	245/105/65	H	330	200/135	245/90	
BN 3343	325/125	190/70/60	245/105/65	H	330	200/135	245/90	
BN 3346	326/125	200/180/70	110/70	H	330	125/70/60	Keine Restriktion	
BN 3361	325/140	200/70	245/70/60	H	330	125/70/60	Keine Restriktion	
BN 3365**	325/125	140/60	245/105/65	H	325	135/70	245/80	<i>M. mucogenicum</i> I
BN 3369	325/125	180/140	200/70	H	340/330	125/100/70/60	190/170/140	<i>M. neoaurum</i>
BN 3373	325/125	140/80/70	245/110/70	n.u.	340/330	245/147/135	245/90	
BN 3374	325/125	180/140	200/70	H	330	125/70/60	Keine Restriktion	
BN 3384	325/125	200/180	110/70/60	n.u.	280	n.u.	n.u.	
BN 3385	325/125	200/70	n.u.	H	325	110/90	Keine Restriktion	
BN 3386**	Keine Restriktion	200/70	200/125/70	B	250	Keine Restriktion	180/90	<i>M. chelonae</i> V
BN 3388	325/125	135/110	245/70	B	230	Keine Restriktion	Keine Restriktion	
BN 3389	Keine Restriktion	200/90/70	245/110	H	330	150/130	250/80	„Spezies X“
BN 3390	325/125	200/125/70	140/110/70	H	350	110/70/60	190/130	
BN 3391	325/125	200/180	110/70/60	H	245	125/70/60	Keine Restriktion	
BN 3392**	325/140	200/120/60	200/125/70	n.u.	280	Keine Restriktion	245/90	<i>M. chelonae</i> II
BN 3396	325/125	200/110/90	190/180	n.u.	280	125/90/ kleine	n.u.	
BN 3398	245/220	150/90/70	200/110/70	n.u.	230	125/90/70/60	n.u.	
BN 3400	245/220	135/125	245/105/65	n.u.	325	230	Keine Restriktion	
BN 3405**	325/125	150/70	200/110/70	H	n.u.	n.u.	n.u.	<i>M. mucogenicum</i> V
BN 3406**	325/140	200/70	200/110/70	B	325	n.u.	n.u.	<i>M. chelonae</i> III
BN 3456	325/125	200/140	140/110/60	H	245	125/ kleine	200/90	
BN 3459**	325/140	200/110/70	200/125/70	B	325/245	Keine Restriktion	Keine Restriktion	<i>M. chelonae</i> II
BN 3522	325/140	150/70/60	145/110770	H	325/245	135/90	Keine Restriktion	

Fortsetzung Tabelle 9

BN 3530**	325/125	150/70/60	245/110/70	H	245	135/90	Keine Restriktion	<i>M. mucogenicum</i> VI
BN 3531	Keine Restriktion	140/120	245/70	D	230	Keine Restriktion	Keine Restriktion	<i>M. gordonae</i> XVI
BN 3538	Keine Restriktion	200/70	200/125/70	n.u.	325/245	135/80	180/90	
BN 3560**	325/125	150/70	245/110/70	H	330	125/90	245/80	<i>M. mucogenicum</i> VI
BN 3572	325/125	200/140/60	110/70/60	n.u.	325/245	Keine Restriktion	Keine Restriktion	
BN 3582	325/125	150/70/60	n.u.	I	325/245	125/ kleine	245/80	
BN 3588**	Keine Restriktion	140/60	245/70	H	n.u.	n.u.	n.u.	<i>M. flavescens</i>
BN 3594	325/140	200/140	200/110/70	I	280	Keine Restriktion	Keine Restriktion	
BN 3608	325/125/110	110/80	245/125/65	B	250	Keine Restriktion	Keine Restriktion	<i>M. chelonae</i> VI
BN 3624*	325/125	180/140	140/60	H	330	230	Keine Restriktion	
BN 3628	325/140	200/140	200/125/65	B	250	Keine Restriktion	Keine Restriktion	<i>M. chelonae</i> VII
BN 3631**	325/140	180/70	245/125/70	B	250/230	135/110	Keine Restriktion	<i>M. abscessus</i>
BN 3638	245/220	n.u.	200/70	D	230	Keine Restriktion	Keine Restriktion	
BN 3639**	325/140	180/70	245/125/65	B	250	135/80	Keine Restriktion	<i>M. abscessus</i>
BN 3654	325/125	135/115	110790	H	n.u.	n.u.	n.u.	
BN 3655**	Keine Restriktion	170/90/70	245/70	I	325	125	Keine Restriktion	<i>M. gilvum</i>
BN 3661**	Keine Restriktion	170/90/70	245/105/70	I	330	150/130	Keine Restriktion	<i>M. gilvum</i>

* Die partiellen 16S-rDNA-Sequenzen dieser Isolate befinden sich in Anhang 4 (vgl. Kap 8.4).

Die HPLC-Chromatogramme der unbekannten Isolate dieser Tabelle befinden sich in Anhang 3 (vgl. Kap.8.3).

Die partiellen 16S-rDNA-Sequenzen von „Spezies X“ sind in Kapitel 3.3.1 aufgeführt.

n.u. = Nicht untersucht

** = Spacer PCR-Produkt und / oder-RFLP ist nicht vorhanden oder stimmt nicht mit bekannten Daten der genannten Spezies überein; die anderen Parameter (HPLC, DC, ggf.Sequenzierung) lassen dennoch eine Zuordnung zu.

Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die 33 Isolate, die nicht näher analysiert werden konnten, da der Erhalt des Isolats als Reinkultur zu einem sehr späten Zeitpunkt erfolgte.

Tabelle 10: Folgende 33 Isolate konnten nur bedingt ausgewertet werden. Die bisherigen Ergebnisse sind hier zusammengefasst

Isolate	DC	Restriktionsfragmente (bp) in der PRA nach Verdau mit		
		BstEII	HaeIII	CfoI
BN 3134	I	325/140	160/140	200/105/65
BN 3135	D	Keine Restriktion	130/115/60	245/90/65
BN 3136	D	Keine Restriktion	130/115/60	245/90/65
BN 3139	I	325/140	160/140	200/105/65
BN 3196	I	325/125	140/60	245/100/70
BN 3285	n.u.	325/125	200/110/70	245/100
BN 3288	H	325/140	200/70/60	245/100
BN 3293	I	325/125	180/70	245/70
BN 3294	D	245/220	150/130	245/70
BN 3296	H	325/140	200/70	245/125/70
BN 3325	B	n.v.	200/90/70	245/125/70
BN 3353	D	245/125/70	140/120	245/105/70
BN 3370	n.u.	245/220	140/60	245/105/70
BN 3449	n.u.	245/220	150/105	245/105/70
BN 3451	n.u.	325/140	200/70	200/125/70
BN 3461	I	325/140	180/140	245/105/70
BN 3584	H	325/140	180/140	110/70
BN 3615	n.u.	325/140	140/60	245/105/70
BN 3653	F?	325/140	200/105/70	200/125/70
BN 3666	F	325/140	200/125/70	200/125/70
BN 3670	F	325/140	200/125/70	n.v.
BN 3671	E	325/140	150/60	245/105/70
BN 3677	n.u.	325/140	200/70	200/125/70
BN 3678	E/M	Keine Restriktion	140/70/60	245/125/70
BN 3679	n.u.	Keine Restriktion	140/70/60	245/125/70
BN 3680	n.u.	Keine Restriktion	140/70/60	245/125/70
BN 3681	n.u.	Keine Restriktion	140/70/60	245/125/70
BN 3682	E/M	Keine Restriktion	140/70/60	245/125/70
BN 3688	B	Keine Restriktion	200/90/70	n.v.
BN 3689	A?	245/220	125/90	245/105/70
BN 3692	n.u.	325/140	150/130	245/70
BN 3694	H	Keine Restriktion	200/70	n.v.
BN 3695	n.u.	325/125	190/170	110/60

n.u. = nicht untersucht

3.3 Beschreibung neuer Mykobakterienspezies

Wie in Kapitel 2.9 erwähnt sind die Anforderungen an die Beschreibung und Anerkennung einer neuen Spezies recht umfangreich. Zum Zeitpunkt des Abschlusses der vorliegenden Arbeit lagen daher noch nicht alle Daten vor, die zur gültigen Beschreibung einer neuen

Spezies erforderlich sind. Auf Grund des langsamen Wachstums von Mykobakterien spielt hierbei der Zeitfaktor eine entscheidende Rolle. Daneben ist auch der damit verbundene administrative Aufwand zu beachten (Einreichung und Kontrolle durch öffentlich zugängliche Stammsammlungen, Annahme einer Publikation etc.). In den folgenden Unterkapiteln werden die zur Zeit (April 2003) vorliegenden Untersuchungsergebnisse der vorläufig noch als “Spezies X” und “Spezies Y” bezeichneten neuen Taxa aufgeführt.

3.3.1 „Spezies X”

Als „Spezies X“ werden hier 21 Isolate zusammengefasst, die im Zeitraum 1993 bis 2000 ausnahmslos aus kaltem Leitungswasser oder aus Biofilmen im Bereich von kaltem Leitungswasser isoliert wurden. Die geographische Herkunft der Isolate erstreckt sich von Orten in Nordrhein-Westfalen, Baden-Württemberg, Bayern, Sachsen und Berlin bis hin zu Peru (s. Tab 11).

Pigmentierung und Wachstumsgeschwindigkeit (s. Kap. 2.6): Es handelt sich sowohl um skotochromogene als auch um nonchromogene schnellwachsende Isolate.

Biochemische und physiologische Merkmale (s. Kap 2.9): Die Ergebnisse liegen noch nicht vor.

Dünnschichtchromatographische Mykolsäure-Analyse (s. Kap. 2.7.1): Alle Isolate verfügen über α -, Keto- und ω -Carboxy-Mykolsäuren und sind daher der DC-Gruppe H zuzuordnen.

PRA (s. Kap. 2.8.1): Bei allen Isolaten fand sich keine Restriktion mit *BstEII* und Fragmente in der Größe von 195 und 85 bp nach Verdau mit *HaeIII*. Falls eine Untersuchung mit *CfoI* erfolgte (s. Tab 11) ergaben sich Fragmente in der Größe von 245, 105 und 65 bp.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse der einzelnen Isolate einschließlich der bei der Primärisolation verwendeten Nachweisverfahren gehen aus Tabelle 11 hervor.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Analyse des *hsp-65*-gens-RFLP (PRA) und Dünnschichtchromatographie (DC) von „Spezies X“ als auch Angaben über den Isolations-Ort bzw. der Isolationsmethode.

Stamm-Nr.	Herkunft/Ort	Proben-material	Proben-entnahme-datum	DC	Restriktionsfragmente (bp) in der PRA nach Verdau mit			Kulturelles Nachweisverfahren		
					<i>Bst</i> EI	<i>Hae</i> III	<i>Cfo</i> I	Proben-dekon-tamina-tion	Medium	Inkuba-tions-tempe-ratur
BN 2140*	Einzugsbereich der Dhünnthalsperre, NRW	Kaltes Leitungswasser	14.01.1994	H	Keine Restriktion	195/85	n.u.	CPC	OEY	30°C
BN 2176*	Einzugsbereich der Dhünnthalsperre, NRW	Kaltes Leitungswasser	08.10.1993	H	Keine Restriktion	195/85	n.u.	CPC	OEY	30°C
BN 2179*	Einzugsbereich der Dhünnthalsperre, NRW	Kaltes Leitungswasser	30.01.1994	H	Keine Restriktion	195/85	n.u.	CPC	OEY	30°C
BN 2184*	Einzugsbereich der Dhünnthalsperre, NRW	Kaltes Leitungswasser	30.01.1994	H	Keine Restriktion	195/85	n.u.	CPC	OEY	30°C
BN 2205*	Freiburg i. Br.	Kaltes Leitungswasser	30.01.1994	H	Keine Restriktion	195/85	n.u.	CPC	LJ	30°C
BN 2298*	Haßfurt, Bayern	Kaltes Leitungswasser	09.12.1993	H	Keine Restriktion	195/85	n.u.	CPC	OEY	30°C
BN 2311*	Freiburg i. Br.	Kaltes Leitungswasser	30.01.1994	H	Keine Restriktion	195/85	n.u.	CPC	LJ	30°C
BN 2512*	Mülheim a. d. Ruhr	Kaltes Leitungswasser	31.05.1994	H	Keine Restriktion	195/85	n.u.	CPC	OEY	30°C

Fortsetzung Tabelle 11

BN 3056*	Dresden	Kaltes Leitungswasser	09.12.1994	H	Keine Restriktion	195/85	n.u.	CPC	LJ	30°C
BN 3060*	Dresden	Kaltes Leitungswasser	09.12.1994	H	Keine Restriktion	195/85	n.u.	CPC	OEY	30°C
BN 3123	Düsseldorf	Kaltes Leitungswasser	11.06.1999	H	Keine Restriktion	190/90	245/105/65	CPC	LJ	37°C
BN 3122	Düsseldorf	Biofilm	11.06.1999	H	Keine Restriktion	190/90	245/105/65	CPC	LJ	37°C
BN 3148	Duisburg	Biofilm	14.09.1999	H	Keine Restriktion	200/90	245/105/65	CPC	LJ	20°C
BN 3149	Duisburg	Biofilm	14.09.1999	H	Keine Restriktion	200/90	245/105/65	CPC	LJ	30°C
BN 3150	Duisburg	Biofilm	14.09.1999	H	Keine Restriktion	200/90	245/105/65	CPC	LJ	20°C
BN 3152	Duisburg	Biofilm	14.09.1999	H	Keine Restriktion	190/90	245/105/65	CPC	7H10	20°C
BN 3154	Duisburg	Biofilm	14.09.1999	H	Keine Restriktion	190/90	245/105/65	CPC	7H10	30°C
BN 3185	Lima, Perú	Kaltes Leitungswasser	10.01.2000	H	Keine Restriktion	190/90	245/105/65	CPC	LJ	30°C

Fortsetzung Tabelle 11

BN 3222	Berlin	Biofilm	05.06.2000	H	Keine Restriktion	190/90	245/105/65	CPC	LJ	20°C
BN 3223	Berlin	Biofilm	05.06.2000	H	Keine Restriktion	190/90	245/105/65	CPC	LJ	20°C
BN 3389	Aachen	Kaltes Leitungswasser	18.04.2000	H	Keine Restriktion	200/90	245/105/65	CPC	LJ	20°C

n.u. = nicht untersucht

* = Diese Isolate stammen aus Proben die nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, aber auf Grund der Ähnlichkeit ihrer Ergebnisse in der DC, HPLC und PRA mit in die Gruppe "Spezies X" aufgenommen wurden. Von diesen Isolaten wurde keine Analyse des 16S-23S-Spacers mittels RFLP durchgeführt.

CPC = Cetylpyridiniumchlorid (Dekontaminationsmittel, vgl. Kap. 2.3.3)

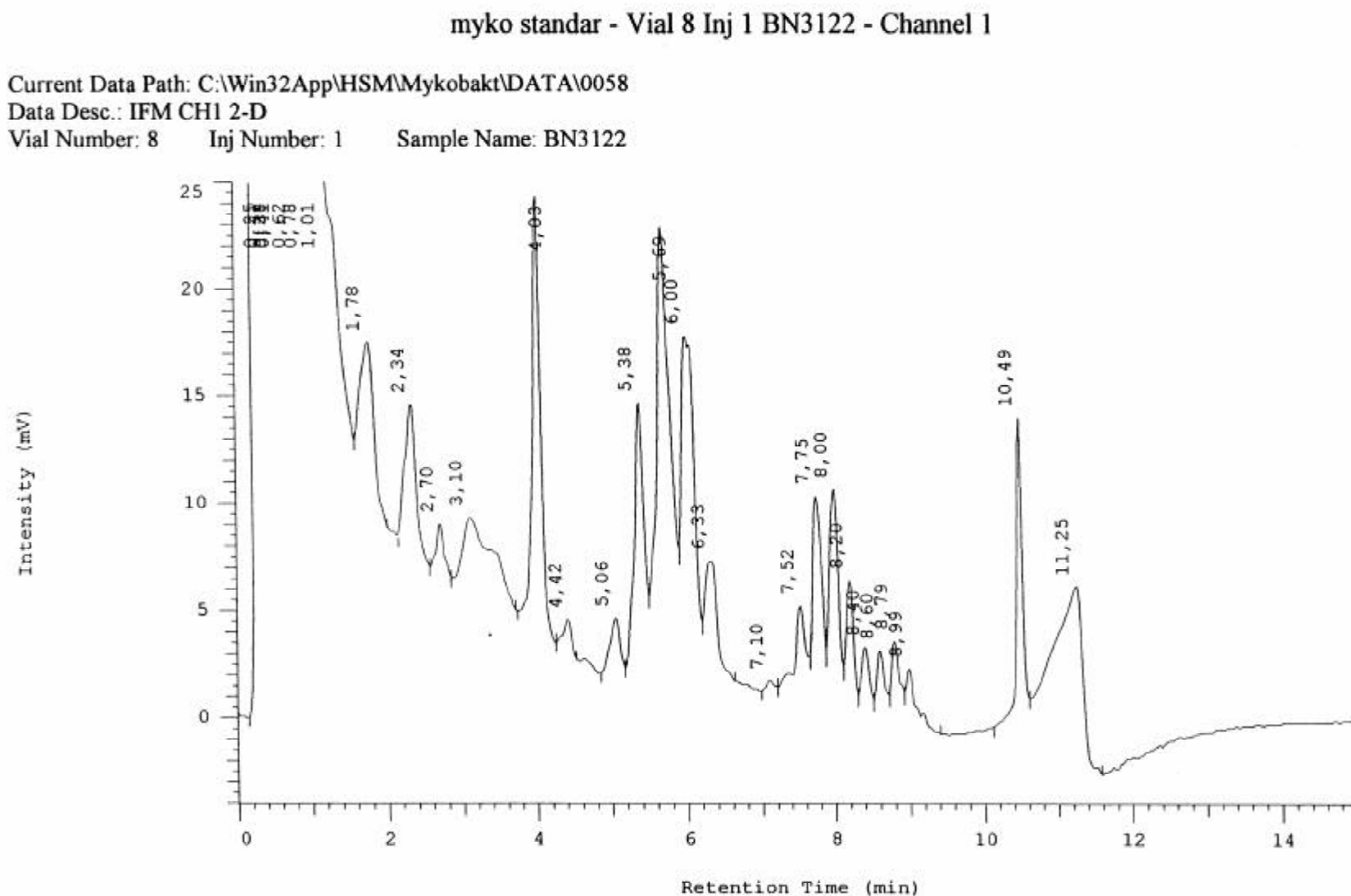
OEY = Ogawa-Eigelbmedium

7H10 = Middlebrook 7H10-Agar (vgl Kap 2.3.1)

LJ = LJ-Schrägagarmedium (vgl Kap 2.3.1)

HPLC-Analyse der Mykolsäuren (s. Kap. 2.7.2): Das HPLC-Muster von "Spezies X" wird in Abbildung 7 wiedergegeben. Als Beispiel wird das HPLC-Muster des Stammes BN 3122 aufgeführt.

Abbildung 7: zeigt das HPLC-Muster von „Spezies X“. Die Peaks bei 4,03 und 10,49 min wurden durch den High-molecular-weight- und den Low-molecular-weight-Standard hervorgerufen.



RFLP-Analyse des 16S-23S-Spacers (s. Kap. 2.8.2): Die nach Anwendung der Spacer-RFLP erhaltenen Fragmentlängen in bp sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Partielle Sequenz der 16S-rDNA (s. Kap. 2.8.3): Die partielle Sequenzanalyse der 16S-rDNA von vier Vertretern der „Spezies X“ sind in Abbildung 8 zusammengefasst. Der sequenzierte Bereich umfasst die hypervariablen Regionen A und B.

Abbildung 8: Partielle 16S-rDNA-Sequenzen verschiedener Vertreter von „Spezies X“

BN 2140:

```
CTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTNCGAACGGNAAAGGCCCTTTCGGGGGTACTCGAG
TGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGAAA
CTGGGTCTAATACCGGATAGGACTACGCGATGCATGTCGTGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGT
GTGGGATGGGCCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGAC
GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
GAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCTCCGACGAAGCGCAAGTGACGGT
AGGGGTAGAAGAAGGACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCGA
GCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTCTGGTGTNNNNNGGNA
AAAA
```

BN 2205:

```
GCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTNCGAACGGAAAGGCCCTTTCGGGGTACTCGAGT
GGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGTAAA
CTGGGTCTAATACCGGATATACCTCATGGACTGCATGGTTTGTGGGGGAAAGCTTTTGCGG
TGTGGGATGGGCCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTTATGGCTTACCAAGGCGACGA
CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGG
TACCTGTAGAAGAAGGACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCG
AGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTCTGCGTGTNNCCNGN
AAA
```

BN 2298:

```
GCTGGCGGCGTGCTTAACACATGNCAAGTNCGAACGGNAAAGGCCCTTTCGGGGTACTCGAG
TGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGTAA
ACTGGGTCTAATACCGGATATACCTCATGGACTGCATGGTTTGTGGGGGAAAGCTTTTGCG
GTGTGGGATGGGCCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTTATGGCTTACCAAGGCGACG
ACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGC
GTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACG
GTACCTGTAGAAGAAGGACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCC
GAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTCTGCGTTGTCCGGT
GAAA
```

Fortsetzung Abbildung 8

BN 3185:

```
CCNCGGCGTGCTTNACACATGCAAGTACGTAACGGAAAGGCTCCTTTACGGGGGTA
CTCGA
GCTGGCGAACGGGTGAGTNACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTTGGGCATAAGCCTGGG
AAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACTACGCTGATGCATGTCGTGTGGTGGAAAGCTTTCT
GCGGTGTGGTGATGGGCCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGC
GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACG
CCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCTCCGACGAAGCGCAAGT
GACGGTAGGGGTAGAAGAAGGACCGGCCAACTACGTGCCANCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GTCCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGGTGTNN
CNGGNAAA
```

Sequenz der gesamten 16S-rDNA (s. Kap. 2.9): Die Sequenz der gesamten 16S-rDNA liegt zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vor. Wie unter Kapitel 3.3 erwähnt, liegen aus zeittechnischen Gründen einige Ergebnisse von „Spezies X“ nicht vor.

3.3.2 „Spezies Y“

Der einzige Vertreter von „Spezies Y“ ist Isolat BN 3151, welches aus einer Biofilmprobe isoliert wurde. Das Medium der Primärisolation war 7H10-Agar, die Isolationstemperatur betrug 20 °C.

Pigmentierung und Wachstumsgeschwindigkeit (s. Kap. 2.6): Der Stamm bildet auf LJ bei 30°C gelbe, glatte Kolonien; erste Kolonien sind unter diesen Bedingungen nach 14 Tagen sichtbar.

Biochemische und physiologische Merkmale (s. Kap. 2.9): Zum jetzigen Zeitpunkt liegen folgende Untersuchungsergebnisse für „Spezies Y“ vor:

- Brenzschleimsäure: negativ
- Arylsulfat: negativ nach 3 Tagen sowie 2 und 3 Wochen
- Wachstum auf 5%NaCl: nach 3 Wochen zartes Wachstum +++
- Toluidinblau: nach 3 Wochen kein Wachstum
- Niazinakkumulation: negativ
- Nitratreduktion: negativ
- Katalase semiquantitativ und bei 68°C: negativ
- Sulfonamide: sensibel
- Ciprofloxacin: sensibel
- Doxycyclin: sensibel

Dünnschichtchromatographische Mykolsäure-Analyse (s. Kap. 2.7.1): Isolat BN 3151 verfügt über α -, Keto- und ω -Carboxy-Mykolsäuren und ist daher der DC-Gruppe H zuzuordnen.

HPLC-Analyse der Mykolsäuren (s. Kap. 2.7.2): Das HPLC-Muster von Isolat BN 3151 ist in Abbildung 9 wiedergegeben.

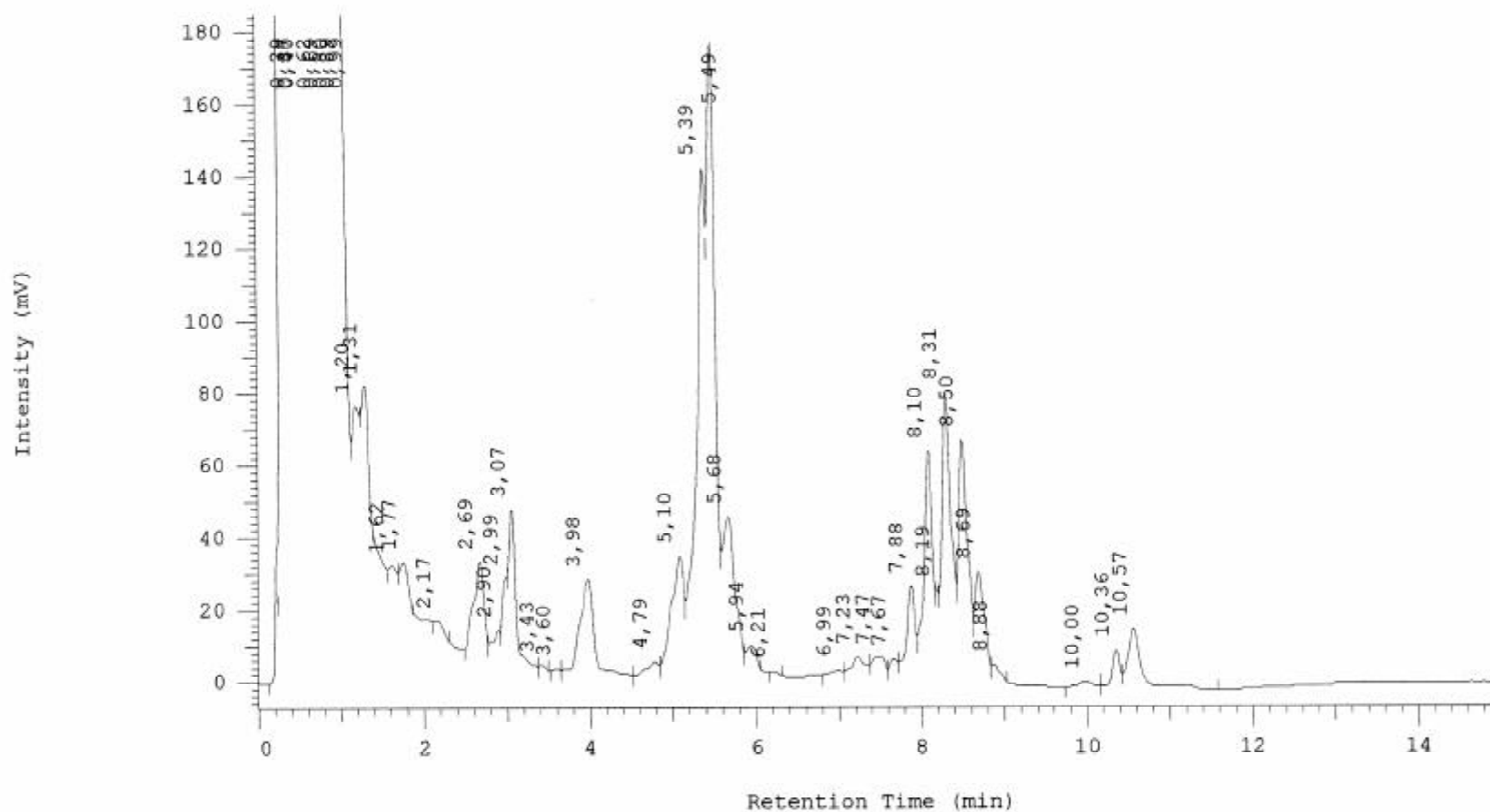
Abbildung 9 HPLC-Muster von „Spezies Y“. Die Peaks bei 3,98 und 10,36 min wurden durch den High-molecular-weight- und den Low-molecular-weight-Standard hervorgerufen.

myko standar - Vial 2 Inj 1 BN3151 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0043

Data Desc.: IFM CH1 2-D

Vial Number: 2 Inj Number: 1 Sample Name: BN3151



PRA (s. Kap. 2.8.1): Folgende Fragmente (Länge in bp) fanden sich nach Anwendung der PRA:

Fragmente nach Verdau mit *Bst*EII: 325/125
 Fragmente nach Verdau mit *Hae*III: 190/140
 Fragmente nach Verdau mit *Cfo*I: 120/105/95/65

RFLP-Analyse des 16S-23S-Spacers (s. Kap. 2.8.2): Folgende Fragmente (Länge in bp) fanden sich nach Anwendung der Spacer-RFLP:

Länge des PCR-Produkts: 325
 Fragmente nach Verdau mit *Hae*III: 150/110
 Fragmente nach Verdau mit *Cfo*I: Keine Restriktion

Sequenz der gesamten 16S-rDNA (s. Kap. 2.9): Die Sequenz der gesamten 16S-rDNA von "Spezies Y" befindet sich in Abbildung 10.

Abbildung 10: Sequenz der gesamten 16S-rDNA von Spezies Y

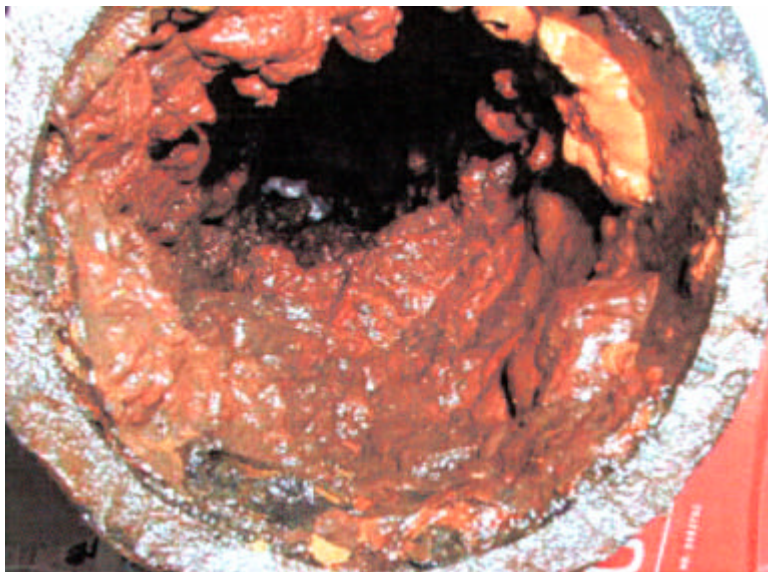
```
GATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGC
CCTTCGGGGTACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTT
GGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGAATATGACCATGCGCCTCCTGGTGTGTGG
TGGAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGG
CCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
TACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTG
ATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCACAGAC
GAAGCGCAAGTGACGGTATGTGCAGAAGAAGGACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTT
GTCGCGTTGTTTCGTGAAAACCTCACAGCTTAACCTGTGGGCGTGCGGGCGATACGGGCAGACT
TGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAG
GAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG
GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGG
GTTTCCTTCCTTGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACG
GCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGA
TTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGCACAGGACGACTGCAGAG
ATGTGGTTTTCCCTTGTGGCCTGTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTATGTTGCCAGCGGGTTATG
CCGGGGACTCGTAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
ATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGA
TGCCGTGAGGTGGAGCGAATCCTTGTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACT
CGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGG
CCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTGCAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAAGTCGTAA
CAAGGTAGCCGTACCGGAAGG
```

3.4 Vorkommen und Verhalten aquatischer Mykobakterien in Biofilmen

3.4.1 Biofilme in Rohrproben

Wie in Kapitel 2.1 erwähnt, wurden Biofilmproben aus unterirdischen Rohren des Trinkwasserverteilungsnetzes auf Mykobakterien untersucht. Die innere Oberfläche eines untersuchten Rohrsegments ist in Abbildung 11 zu sehen.

Abbildung 11: Innere Oberfläche eines untersuchten Rohrsegments vor der Ablösung des Biofilms



Die quantitativen und qualitativen Ergebnisse der Rohrproben finden sich in Tabelle 12. Die Mykobakteriendichten der Rohrproben-Biofilme lagen zwischen 0 und 10 KBE/cm² (KBE = koloniebildende Einheiten). Das Artenspektrum der in den Rohrbiofilmen nachgewiesenen Mykobakterien umfasste die schnellwachsende Spezies *M. abscessus*, *M. aurum*, *M. brumae* und *M. chelonae* (zwei Subtypen). Darüber hinaus wurden eine Reihe von Mykobakterienstämmen isoliert, die bisher unbekannte Eigenschaften aufwiesen und über deren Identität zur Zeit keine Aussagen gemacht werden können (vgl. Tabelle 9), unter anderem "Spezies X" (s. Kap. 3.2.2.2).

Tabelle 12: Dichte und Spektrum der in Biofilmen aus Rohrproben nachgewiesenen Mykobakterien

Probe Nr. ^a	Entnahme-Datum	Herkunftsort des Rohres	Material (Alter) des Rohres	Mykobakterien-dichte (KBE/cm ²) ^b	Identifizierte Mykobakterien
1	08.03.99	Mülheim-Styrum	Grauguss, DN80 (1950)	0	--
2	08.06.99	Duisburg-Rheinhausen	PVC, DN100 (1971)	0	--
3	13.07.99	Mülheim-Raadt	Grauguss, DN125 (1962)	0,174	Unbekanntes Isolat

Fortsetzung Tabelle 12

4	10.08.99	Oberhausen	Grauguss, DN100 (1900)	0,138	„Spezies X“, nicht identifiziertes Isolat
5	14.09.99	Duisburg- Neudorf	Grauguss, DN100 (1969)	1,35	„Spezies X“
6	19.10.99	Rhade	PVC, DN100 (1987)	2,28	<i>M. aurum</i> I, <i>M. chelonae</i> II, <i>M. chelonae</i> III
7	09.11.99	Duisburg- Friemersheim	PVC, DN100 (1965)	0,81	<i>M. chelonae</i> III
8	02.02.00	Berlin- Lichtenberg	PVC, DN200 (1974)	0,189	<i>M. chelonae</i> III
10	14.03.00	Mülheim	Grauguss, DN100 (1919)	0	--
11	17.04.00	Berlin- Lichtenberg	PVC, DN150 (1976)	10,5	<i>M. chelonae</i> III
12	05.06.00	Brandenburg	Gusseisen, DN100 (1927)	0,96	„Spezies X“, <i>M. brumae</i> , unbekannte Isolate
15	10.10.00	Duisburg	Stahl, DN50 (1990)	0,24	Nicht anzüchtbares Isolat
16	17.10.00	Duisburg	Kugelgraphit- guss, DN100 (1973)	1,68	Nicht anzüchtbare Isolate
17	17.10.00	Duisburg	Kugelgraphit- guss, DN100 (1974)	0,33	Nicht identifiziertes Isolat, nicht anzüchtbares Isolat
21	06.03.01	Duisburg- Buchholz	Grauguss, DN100 (1939)	0,10	Nicht identifiziertes Isolat
22	23.04.01	Berlin- Grunewald	Gusseisen, 66DN100, Inlinebeschich- tung (1999)	3,52	<i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> II, <i>M. chelonae</i> III, nicht identifiziertes Isolat, nicht anzüchtbares Isolat
26	11.09.01	Duisburg- Ungelsheim	Zementmörtel ausgekleidet, DN100 (1993)	0,30	Nicht anzüchtbares Isolat
27	09.10.01	Duisburg- Wanheim	Zementmörtel ausgekleidet, DN100 (1981)	0,40	<i>M. chelonae</i> III

^a Angegeben sind die innerhalb des Projektes vereinbarten Probennummern

^b Angegeben sind die Werte, die durch Probeninkubation bei 30°C auf Löwensten-Jensen-Medium erzielt wurden

-- Keine Mykobakterien isoliert

Römische Zahlen bezeichnen PRA-Subtypen (s. Tab.7, Kap 3.2.1)

3.4.2 Biofilme in Aufwuchsträger-Proben

Die quantitativen und qualitativen Ergebnisse der Aufwuchsträgerproben finden sich in Tabelle 13. Die Mykobakteriendichte der Aufwuchsträger-Biofilme stieg im Verlauf der zweijährigen Expositionszeit allmählich auf Werte von teilweise über 1000 KBE/cm². Auch war das Artenspektrum hierbei größer als es bei den Rohrproben der Fall war und umfasste die Spezies *M. abscessus*, *M. aurum*, *M. chelonae*, *M. flavescens*, *M. gilvum*, *M. gordonae*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum* und *M. porcinum*, teilweise mit mehreren genetischen Subtypen. Auch von den Aufwuchsträgern wurden eine Reihe von bisher nicht identifizierten Mykobakterienstämmen isoliert.

Tabelle 13: Dichte und Spektrum der in Biofilmen der Aufwuchsträger nachgewiesenen Mykobakterien

Probe Nr. ^a	Reaktor-Standort	Ent-nahme-datum	Exposi-tions-zeit	Auf-wuchs-träger-Material	Myko-bakterien-dichte (KBE/cm2) ^b	Identifizierte Mykobakterien ^c
9	Gladbeck	20.02.00	ca. 6 Wochen	PVC	0	--
				PE	0	--
				ED	0	--
				Cu	0	--
18	Gladbeck	13.11.00	ca. 6 Monate	PVC	66	<i>M. chelonae</i> I, <i>M. chelonae</i> II, <i>M. chelonae</i> III, <i>M. flavescens</i> , nicht identifizierte Isolate, nicht anzüchtbare Isolate
				PE	177	<i>M. chelonae</i> II, <i>M. chelonae</i> III, <i>M. peregrinum</i> II, nicht identifizierte Isolate, nicht anzüchtbare Isolate
				ED	51	<i>M. chelonae</i> III, nicht identifizierte Isolate, nicht anzüchtbare Isolate
				Cu	21	<i>M. mucogenicum</i> I nicht identifizierte Isolate

Fortsetzung Tabelle 13

23	Gladbeck	05.06.01	ca.12 Monate	PVC	384	<i>M. chelonae</i> III, <i>M. chelonae</i> II, nicht identifizierte Isolate, nicht anzüchtbare Isolate
				PE	576	<i>M. mucogenicum</i> I nicht identifizierte Isolate, nicht anzüchtbare Isolate
				ED	1062	<i>M. flavescens</i> , <i>M. mucogenicum</i> , nicht identifizierte Isolate, nicht anzüchtbare Isolate
				Cu	640	<i>M. gordonae</i> XV, <i>M. chelonae</i> II, <i>M. chelonae</i> III, nicht identifizierte Isolate, nicht anzüchtbare Isolate
28	Gladbeck	06.11.01	ca.18 Monate	PVC	1920	<i>M. chelonae</i> III, <i>M. chelonae</i> II, nicht identifizierte Isolate
				PE	384	<i>M. mucogenicum</i>
				ED	768	<i>M. chelonae</i> III, <i>M. mucogenicum</i> , nicht anzüchtbare Isolate
				Cu	1280	<i>M. chelonae</i> III, <i>M. mucogenicum</i>
13	Dorsten	27.06.00	ca. 6 Monate	PVC	18	<i>M. chelonae</i> II, <i>M. chelonae</i> III
				PE	14	<i>M. chelonae</i> III, <i>M. chelonae</i> II, <i>M. porcinum</i>
				ED	16	<i>M. chelonae</i> II
				Cu	3	<i>M. gordonae</i> VIII
19	Dorsten	12.12.00	ca.12 Monate	PVC	28	<i>M. chelonae</i> III, <i>M. flavescens</i> , <i>M. chelonae</i> II, nicht identifizierte Isolate
				PE	256	<i>M. chelonae</i> II, nicht identifizierte Isolate
				ED	n.v.	--
				Cu	97	<i>M. chelonae</i> III, <i>M. mucogenicum</i> I, nicht anzüchtbare Isolate, nicht identifizierte Isolate

Fortsetzung Tabelle 13

24	Dorsten	26.06.01	ca.18 Monate	PVC	26	<i>M. chelonae</i> II, <i>M. chelonae</i> III, nicht identifizierte Isolate, nicht anzüchtbare Isolate
				PE	512	nicht identifiziertes Isolat, nicht anzüchtbares Isolat
				ED	162	<i>M. mucogenicum</i> , nicht identifizierte Isolate
				Cu	38	<i>M. chelonae</i> III, <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. flavescens</i>
29	Dorsten	04.12.01	ca.24 Monate	PVC	1024	<i>M. chelonae</i> II, <i>M. chelonae</i> III, <i>M. gilvum</i> , nicht identifizierte Isolate, nicht anzüchtbare Isolate
				PE	1280	<i>M. chelonae</i> II, nicht identifiziertes Isolat
				ED	384	<i>M. chelonae</i> II, <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. chelonae</i> III, nicht anzüchtbares Isolat
				Cu	256	<i>M. abscessus</i> , <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. gordonae</i> , nicht identifiziertes Isolat
14	Berlin	07.08.00	ca. 6 Monate	PVC	7	<i>M. chelonae</i> III, nicht anzüchtbare Isolate
				PE	2	<i>M. chelonae</i> III
				ED	2	nicht anzüchtbare Isolate
				Cu	2	<i>M. chelonae</i> III
20	Berlin	23.01.01	ca.12 Monate	PVC	43	<i>M. chelonae</i> III, <i>M. mucogenicum</i> , nicht identifiziertes Isolat, nicht anzüchtbare Isolate
				PE	128	<i>M. mucogenicum</i> , <i>M. aurum</i> II, <i>M. chelonae</i> III, nicht identifizierte Isolate, nicht anzüchtbare Isolate
				ED	256	<i>M. chelonae</i> III, <i>M. mucogenicum</i> , nicht identifizierte Isolate, nicht anzüchtbare Isolate
				Cu	n.e.	--

Fortsetzung Tabelle 13

25	Berlin	24.07.01	ca.18 Monate	PVC	0,4	<i>M. chelonae</i> III
				PE	269	<i>M. chelonae</i> I, <i>M. chelonae</i> II, nicht identifizierte Isolate nicht anzüchtbare Isolate
				ED	896	--
				Cu	162	<i>M. chelonae</i> III
30	Berlin	28.01.02	ca.24 Monate	PVC	6407	<i>M. chelonae</i> II, nicht identifizierte Isolate, nicht anzüchtbares Isolat
				PE	3582	nicht identifizierte Isolate, nicht anzüchtbares Isolat
				ED	2306	<i>M. chelonae</i> II, nicht identifizierte Isolate, nicht anzüchtbares Isolat
				Cu	2388	<i>M. chelonae</i> III nicht identifiziertes Isolat, nicht anzüchtbare Isolate

^a Angegeben sind die innerhalb des Projektes vereinbarten Probennummern

^b Angegeben sind die Werte, die nach Probendekontamination mit CPC und durch Probeninkubation bei 30°C auf Löwensten-Jensen-Medium erzielt wurden

^c Angegeben sind nur solche Isolate, die nach Probendekontamination mit CPC erhalten wurden.

Römische Zahlen bezeichnen PRA-Subtypen (s. Tab.7, Kap 3.2.1)

-- Keine Mykobakterien isoliert

n.v. = Probe nicht verwertbar

n.e. = Probe nicht erhalten

PVC = Polyvinylchlorid

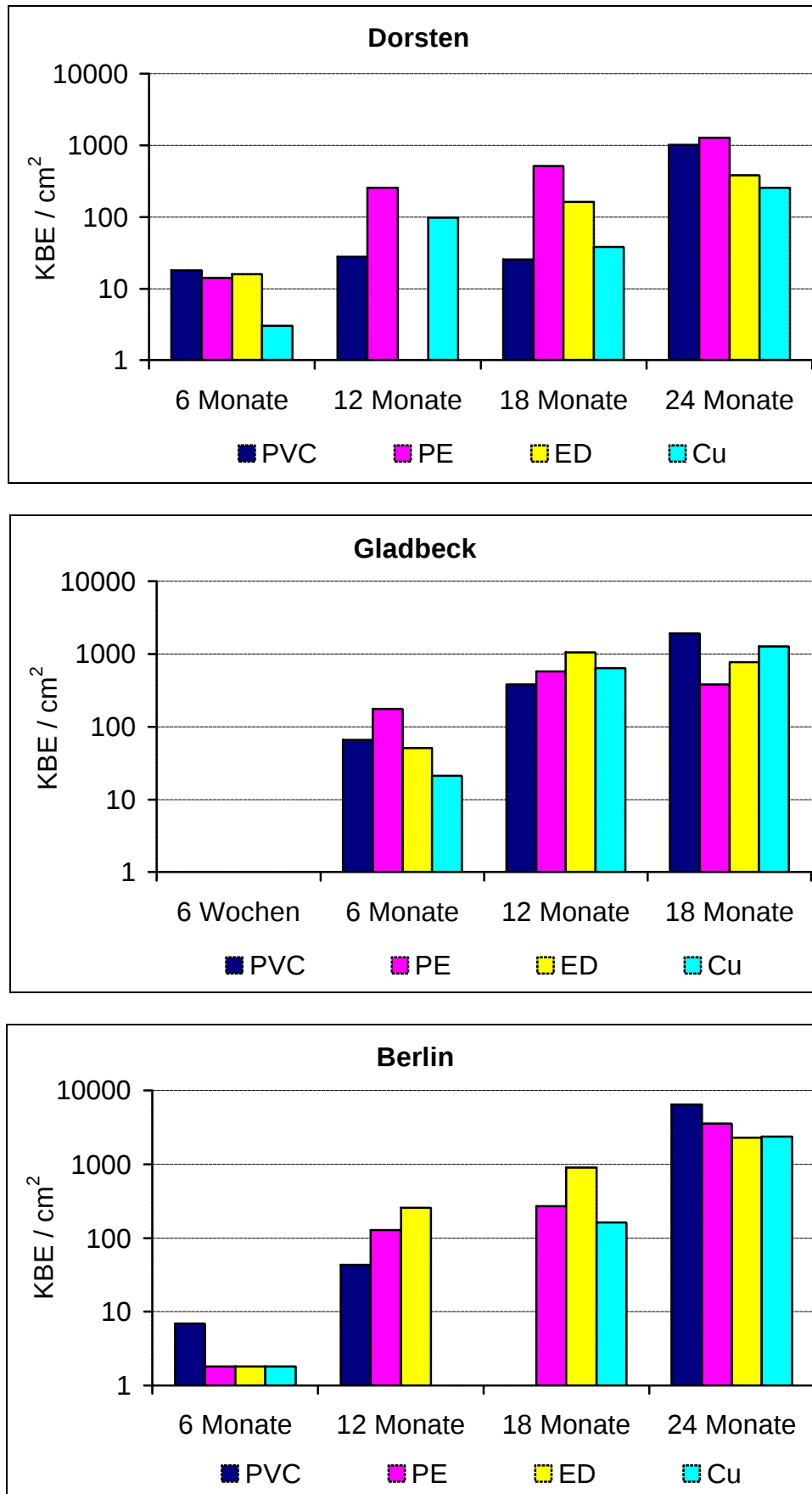
PE = Polyethylen

ED = Edelstahl

Cu = Kupfer

Eine graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Mykobakterien-Akkumulation auf den verschiedenen Aufwuchsträgern der Standorte Dorsten, Gladbeck und Berlin wird in Abbildung 12 wiedergegeben.

Abbildung 12: Mykobakteriendichte auf Aufwuchsträgern der Standorte Dorsten, Gladbeck und Berlin. Die Aufwuchsträger bestanden aus den Materialien Polyvinylchlorid (PVC), Polyethylen (PE), Edelstahl (ED) und Kupfer (Cu).



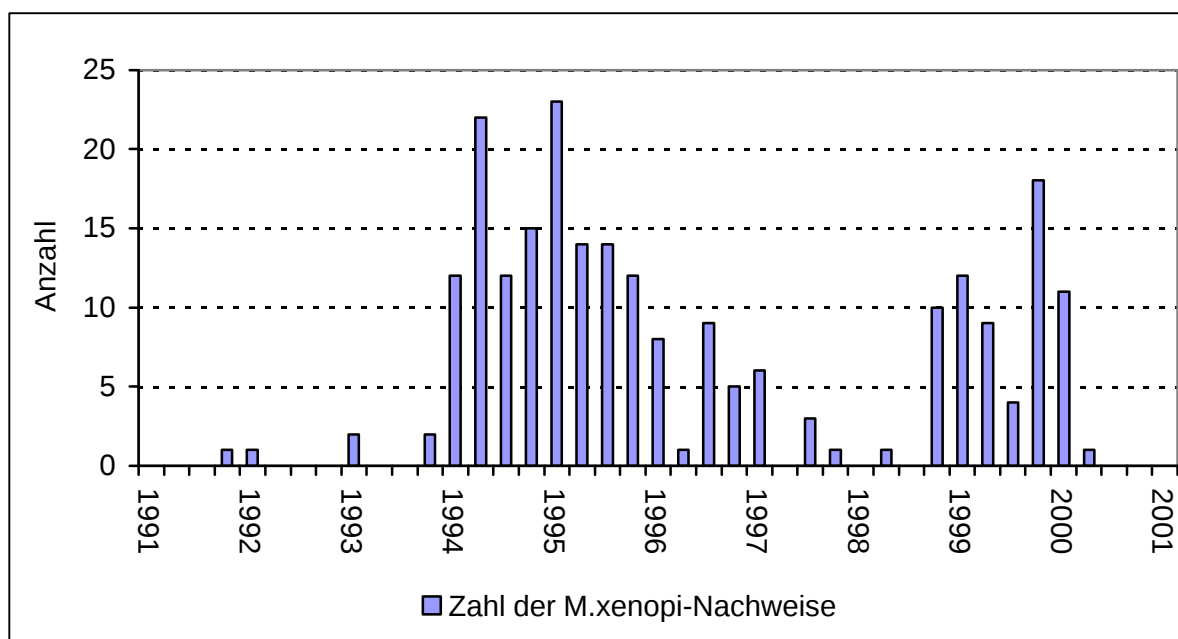
3.5 Genotypisierung von *M. xenopi* im Rahmen einer Pseudoepidemie

Wie in Kapitel 2.10 erwähnt, wurde versucht der Hypothese nachzugehen, dass es sich bei dem gehäuften Nachweis von *M. xenopi* im Patientenmaterial eines Krankenhauses um eine Pseudoepidemie handelt. Es wurde zunächst versucht, *M. xenopi* aus dem Wasser des betroffenen Krankenhauses zu isolieren (s. Kap. 2.10.1) und anschließend sowohl die Wasser- als auch die Patientenisolat mittels RAPD zu genotypisieren (s. Kap. 2.10.2). Eine klonale Verwandtschaft der Wasser- und Patientenisolat und deren genetische Abweichung von den externen Vergleichsstämmen aus Regensburg würde für die Hypothese einer durch Leitungswasser verursachten Pseudoepidemie sprechen.

3.5.1 Zeitlicher Verlauf der Pseudoepidemie

Wie in Kapitel 2.10 beschrieben, wurden in einem Krankenhaus zwischen 1994 und 2000 in 220 klinische (überwiegend bronchoskopisch gewonnene) Proben *M. xenopi* nachgewiesen. Eine Darstellung des zeitlichen Verlaufs des *M.-xenopi*-Nachweises im Patientenmaterial findet sich in Abbildung 13¹.

Abbildung 13: Nachweis von *Mycobacterium xenopi* in Patientenmaterial



¹ Die Daten wurden dankenswerterweise vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

3.5.2 RAPD von *M. xenopi*-Isolaten

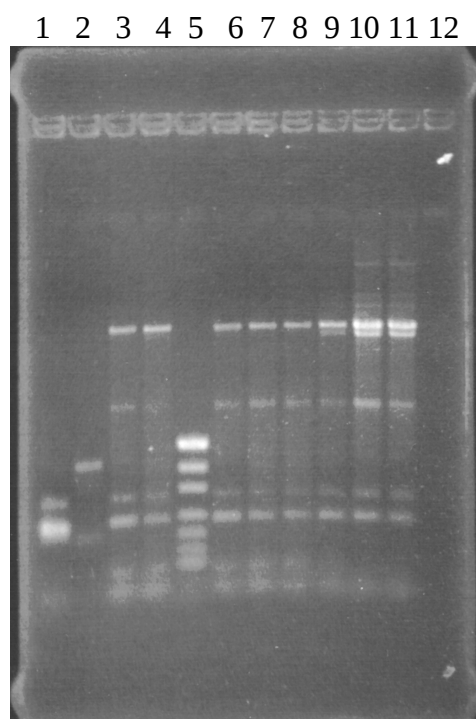
Wie in Kapitel 2.10.2 beschrieben, wurden 44 *M. xenopi*-Isolate mittels RAPD genotypisiert. Alle Isolate wurden jeweils mit den dort beschriebenen fünf Primern untersucht. Hierbei zeigte sich, dass alle Isolate der Gruppen “Düsseldorfer Wasserisolate” und “Düsseldorfer Patientenisolat” klonal eng miteinander verwandt waren. Die drei Regensburger Patientenisolat unterschieden sich dagegen sowohl von den Düsseldorfer Wasser- und Patientenisolaten als auch untereinander.

Repräsentative Ergebnisse der mit den Primern ZA, ZAP40, ZAP40m, Stenmal 270 und Stenmal 272 erzielten RAPD-Bandenmuster sind in den Abbildungen 14a-14e wiedergegeben. Aufgetragen sind in den dort abgebildeten Agarose-Gelen die Bandenmuster jeweils der selben Isolate, untersucht mit den unterschiedlichen Primern. Tabelle 14 zeigt das Beladeschema der in den Abbildungen 14a-e wiedergegebenen Gele.

Tabelle 14 Probenbeladungsschema für die jeweiligen Agarosegele der RAPD.

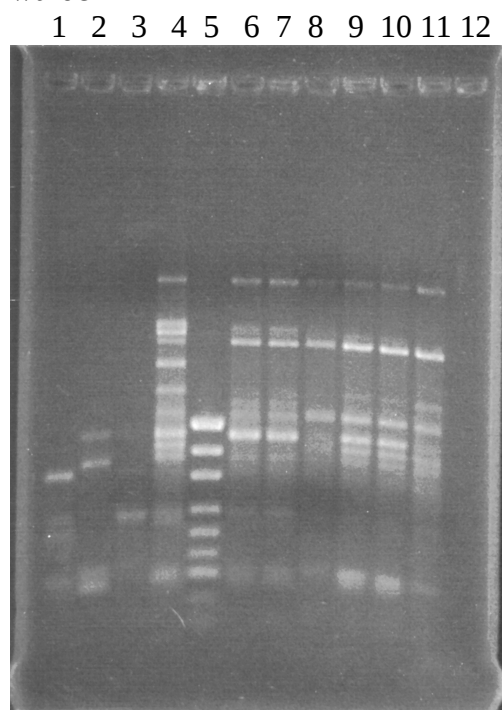
Gelspur	Herkunft der <i>M. xenopi</i> Isolate	Bezeichnung der <i>M. xenopi</i> -Isolate
1	Patientenisolat Regensburg	219
2	Patientenisolat Regensburg	185
3	Patientenisolat Regensburg	192
4	Referenzstamm	NCTC 10042 ^t
5	Längenstandard	pUC19
6	Wasserisolat Düsseldorf	BN 3131
7	Wasserisolat Düsseldorf	BN 3132
8	Wasserisolat Düsseldorf	BN 3579
9	Patientenisolat Düsseldorf	BN 3409
10	Patientenisolat Düsseldorf	BN 3412
11	Patientenisolat Düsseldorf	BN 3415
12	Negativ-Kontrolle	Negativ-Kontrolle

Abbildung 14a Gel mit den RAPD-Bandenmustern, die mit Primer ZA erhalten wurden



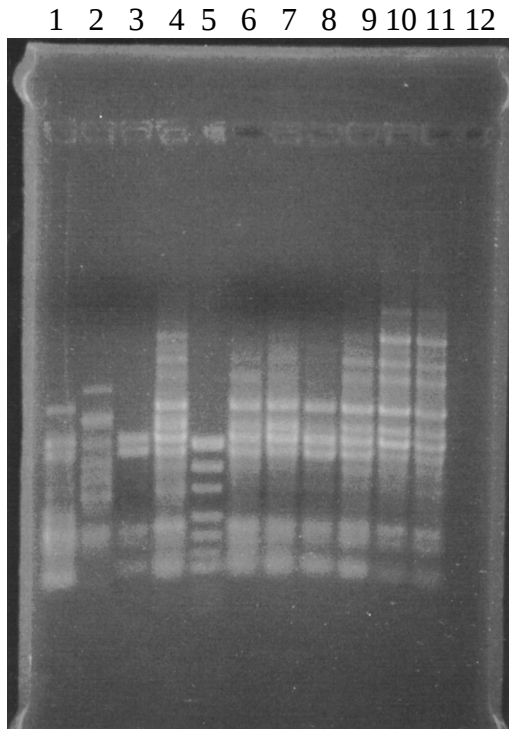
Bei der Betrachtung des Gels sieht man, dass sich die RAPD-Bandenmuster von zwei der Regensburger Patienten isolate (Gelspur 1 und 2) deutlich von den anderen Mustern unterscheiden. Das Regensburger-Isolat 192 (Gelspur 3) und die Düsseldorfer Isolate (Gelspuren 6-11) zeigen dagegen keine wesentlichen Unterschiede zum Referenzstamm (Gelspur 4).

Abbildung 14b Gel mit den RAPD-Bandenmustern, die mit Primer ZAP40 erhalten wurden



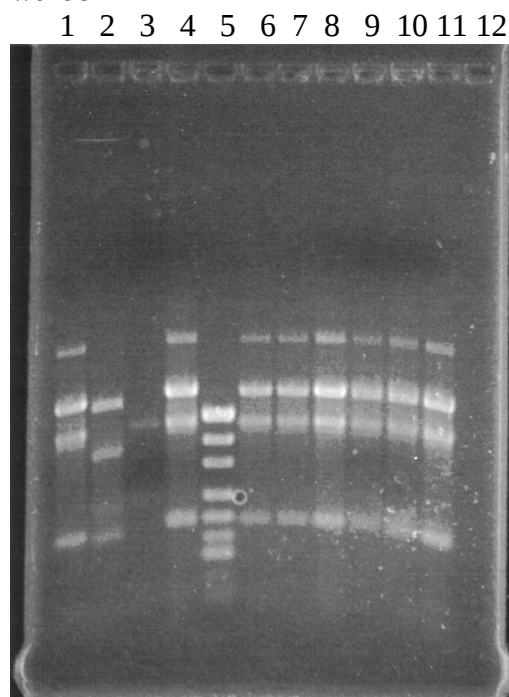
Bei der Betrachtung des Gels sieht man, dass sich die RAPD-Bandenmuster der drei Regensburger Patienten isolate (Gelspur 1, 2 und 3) deutlich von den anderen Mustern unterscheiden. Gleiches betrifft auch den Referenzstamm (Gelspur 4), der sich ebenfalls durch eine zusätzliche Bande von den anderen Mustern abgrenzt. Die Düsseldorfer Isolate (Gelspuren 6-11) weisen keine wesentlichen Unterschiede untereinander auf, grenzen sich aber von den anderen Mustern (Gelspuren 1,2,3 und 4) deutlich ab.

Abbildung 14c Gel mit den RAPD-Bandenmustern, die mit Primer ZAP40m erhalten wurden



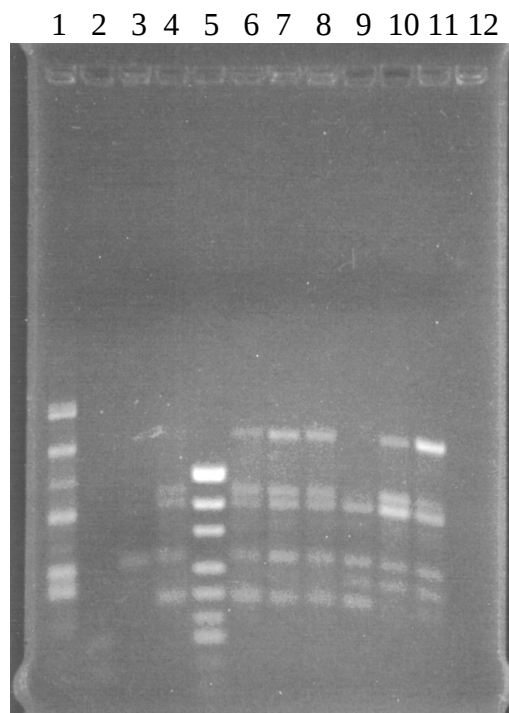
Bei der Betrachtung des Gels sieht man, dass sich die RAPD-Bandenmuster der drei Regensburger Patienten isolate (Gelspur 1, 2 und 3) deutlich von den anderen Mustern unterscheiden. Die Düsseldorfer Isolate (Gelspuren 6-11) zeigen dagegen keine wesentlichen Unterschiede zum Referenzstamm (Gelspur 4).

Abbildung 14d Gel mit den RAPD-Bandenmustern, die mit Primer Stenmal 270 erhalten wurden



Bei der Betrachtung des Gels sieht man, dass sich das RAPD-Bandenmuster von dem Regensburger-Isolat 192 (Gelspur 3) deutlich von den anderen Mustern unterscheidet. Die zwei weiteren Regensburger Patienten isolate (Gelspur 1 und 2) unterscheiden sich nur geringfügig von den anderen Mustern. Die Düsseldorfer Isolate (Gelspuren 6-11) zeigen keine Unterschiede zum Referenzstamm (Gelspur 4).

Abbildung 14e Gel mit den RAPD-Bandenmustern, die mit Primer Stenmal 272 erhalten wurden



Bei der Betrachtung des Gels sieht man, dass sich die RAPD-Bandenmuster der drei Regensburger Patientenisolat (Gelspur 1, 2 und 3) deutlich von den anderen Mustern unterscheiden. Die Düsseldorfer Isolate (Gelspuren 6-11) zeigen dagegen keine wesentlichen Unterschiede zum Referenzstamm (Gelspur 4).

3.5.3 Interventionsmaßnahmen zur Beendigung der Pseudoepidemie

Auf Grund der im vorangegangenen Kapitel geschilderten Ergebnisse konnte der Verdacht auf das Vorliegen einer Pseudoepidemie erhärtet werden. Es wurden daher einige Maßnahmen zur Beendigung der Pseudoepidemie durchgeführt, deren Auswirkungen auf die Häufigkeit des Nachweises von *M. xenopi* bei Patienten des betroffenen Düsseldorfer Krankenhauses aus Abbildung 13 hervorgeht. Im Einzelnen handelt es sich um folgende Interventionsmaßnahmen:

- a) 1997 (bereits vor den in Kapitel 2.10.2 und 3.5.2 geschilderten Untersuchungen zur Genotypisierung) wurde das Warmwassersystem saniert, indem die Sedimente in den Warmwasserspeichern entfernt und die Warmwasser-Temperatur angehoben wurde. Die Zahl der Pseudoinfektionen nahm zunächst leicht ab, allerdings wurde 1999 ein erneuter Anstieg beobachtet.
- b) Daher wurde Mitte 1999 vom zuständigen Krankenhaushygieniker eine Ethanolspülung aller Bronchoskope nach automatischer Aufbereitung empfohlen. Diese Maßnahme zeigte jedoch keinen anhaltenden Erfolg.
- c) Zu Beginn des Jahres 2000 wurde dem betroffenen klinischen Personal in einer Informationsveranstaltung mitgeteilt, dass Spuren von Leitungswasser in klinischen Proben zu Kontaminationsproblemen führen kann. Gleichzeitig wurden die alten Endoskop-Reinigungs- und Desinfektionsautomaten (ERDA) durch neue Geräte ausgetauscht, in denen das zur letzten Nachspülung der Bronchoskope verwendete Leitungswasser mit Hilfe von UV-Strahlen (254nm) aufbereitet wurde. Wie man Abbildung 13 entnehmen kann, zeigte diese Maßnahme nachhaltige Wirkung, da seitdem keine weiteren Fälle aufgetaucht sind.

Zur Kontrolle der Effektivität von Interventionsmaßnahme c) wurden in dem betroffenen Krankenhaus zu Beginn der Maßnahme folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Verfolgung aller mykobakteriologischen klinischen Untersuchungen seit Interventionsbeginn
- Mykobakteriologische Untersuchung aller bronchoskopisch gewonnenen Proben (6 Monate lang)
- Wöchentliches Monitoring des warmen Leitungswassers auf *M. xenopi* (6 Monate)
- Wöchentliches Monitoring des ERDA-Nachspülwassers auf *M. xenopi* (6 Monate)
- Wöchentliches Monitoring von jeweils zwei aufbereiteten Bronchoskopen auf *M. xenopi* (6 Monate)

Mit Ausnahme elf weiterer Fälle im ersten Quartal und einem weiteren Fall im zweiten Quartal 2000 wurden bis Ende 2002 bei keinem weiteren Patienten des betroffenen Krankenhauses *M. xenopi* nachgewiesen.

4. Diskussion

4.1 Kulturelle Nachweisverfahren

Wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, wurden insgesamt 146 Wasser- und Biofilmproben parallel mit 24 verschiedenen kulturellen Nachweisverfahren untersucht. Jedes Verfahren bestand aus einer speziellen Kombination von Inkubationstemperatur (20°C, 30°C, 37°C, 44°C), Dekontaminationsverfahren (CPC und HCl/KCl-Puffer) und Kulturmedium (7H10-Agar, LJ-Medium, MB-Redox-Flüssigmedium). Wie ein Vergleich zwischen mikroskopisch sichtbaren und kulturell angezüchteten Mykobakterien zeigt (SCHULZE-RÖBBECKE et al., 1989), gelingt mit Hilfe der hier verwendeten kulturellen Verfahren wahrscheinlich nur der Nachweis eines Teils der in den Biofilmen tatsächlich vorhandenen Mykobakterien. Dennoch wurde in der vorliegenden Arbeit entschieden, Mykobakterien mittels kultureller Verfahren nachzuweisen, da diese auch in der klinischen Mykobakteriologie nach wie vor als „Goldstandard“ gelten. Zudem garantiert die Kultur im Gegensatz zu ausschließlich molekularbiologischen Nachweisverfahren, dass auf jeden Fall vermehrungsfähige („lebende“) Mykobakterien erfasst werden. Durch den hier bei jeder Probe durchgeführten parallelen Mykobakteriennachweis mittels 24 unterschiedlicher kultureller Nachweisverfahren und einer dreimonatigen Inkubationsdauer bei der Primärkultur ist es sehr unwahrscheinlich, dass gesundheitlich relevante Mykobakterien nicht erfasst wurden.

4.1.1 Einfluss der Temperatur auf die Anzucht von Mykobakterien

Wie der Tabelle 3 (Kap. 3.1) zu entnehmen ist, lassen sich bei einer primären Inkubationstemperatur von 44°C (Nachweisverfahren D, H, L, P, T, X in Tabelle 1, Kap. 2.3.2) nur wenige Umweltmykobakterien anzüchten. Mit einer Ausnahme erwiesen sich diese Isolate als nicht subkultivierbar; lediglich Isolat BN 3473 (isoliert mit Verfahren D) konnte subkultiviert werden, konnte aber bis Februar 2003 nicht differenziert werden. Nur bei Nachweisverfahren D (7H10, HCl/KCl-Puffer, 44°C) fand sich eine höhere Positivitätsrate von 14,8%. Im übrigen zeigte bei 44°C weder die Wahl des Mediums noch die Wahl des Dekontaminationsverfahrens einen nennenswerten Einfluss auf die Positivitätsrate des Verfahrens. Die Ursachen für den seltenen Nachweis von Mykobakterien bei einer primären Inkubationstemperatur von 44°C mag zunächst darin begründet liegen, dass derart hohe Temperaturen in der natürlichen Umwelt nur sehr selten (z.B. in Thermalquellen) vorkommen und sich nur sehr wenige Mykobakterien im Laufe der Evolution an solche Temperaturen adaptiert haben. Erst der Mensch hat in jüngster Zeit ausgedehnte künstliche aquatische Habitate (Warmwassersysteme) mit solchen Temperaturen geschaffen, in denen sich mit Hilfe primärer Inkubationstemperaturen zwischen 40 und 45°C regelmäßig *M. xenopi* nachweisen lässt (SZÁBÓ et al., 1982; GROSS et al., 1976), so auch in den oben beschriebenen Untersuchungen zur Aufklärung der *M. xenopi*-Pseudoepidemie (s. Kap. 2.10 und 3.5). Möglicherweise spiegelt der seltene Nachweis von Mykobakterien bei 44°C aber auch eine beschleunigte Veränderung der chemischen Zusammensetzung der Kulturmedien wieder. Andererseits gab es bei 44°C auch keine Kontaminationsprobleme, so dass man bei dieser Bebrütungstemperatur die Mykobakterien-Ausbeute durch Verwendung milderer Dekontaminationsverfahren wahrscheinlich erhöhen könnte.

Bei einer primären Inkubationstemperatur von 37°C lassen sich zwar mehr Mykobakterien anzüchten als bei 44°C, jedoch immer noch weit weniger als dies bei Temperaturen von

30°C und 20°C der Fall ist. Bei 37°C machen sich jedoch auch schon gewisse Kontaminationsprobleme bemerkbar, die in Tabelle 3 als Kontaminationsraten bis zu 20% in Erscheinung treten.

Der Befund, dass bei primären Inkubationstemperaturen zwischen 20 und 30°C mehr Mykobakterienkolonien angezüchtet werden als bei 37°C, deckt sich mit früher publizierten Ergebnissen (NEUMANN et al., 1997; KAUSTOVÁ, 1992). Gleichzeitig steigen bei solch niedrigen Temperaturen die Kontaminationsraten an, so dass man hier mit aggressiveren Dekontaminationsverfahren unter Umständen höhere Mykobakterienausbeuten erzielen kann.

4.1.2 Einfluss des Dekontaminationsverfahrens

Vergleicht man die Positivitätsraten in Tabelle 3, so wird deutlich, dass bei der Dekontamination mit CPC insgesamt häufiger Mykobakterien isoliert wurden als bei der Dekontamination mit HCl/KCl-Puffer. Betrachtet man hierzu auch die Kontaminationsraten, so wird ersichtlich, dass die Probenansätze bei Dekontamination mit HCl/KCl-Puffer häufiger mit nicht-mykobakterieller Begleitflora kontaminiert wurden als bei Verwendung von CPC. Daraus folgt, dass die Verwendung von HCl/KCl-Puffer ein milderes Verfahren darstellt.

Bei den höheren Temperaturen (37°C und 44°C) ist auffällig, dass bei Dekontamination mit HCl/KCl-Puffer tendenziell mehr Mykobakterien als bei niedrigeren Temperaturen angezüchtet wurden. Die Ursache hierfür liegt wiederum darin, dass das Wachstum von Begleitorganismen bei Temperaturen >37°C deutlich reduziert ist. Dies wird auch von anderen Autoren bestätigt (NEUMANN, 1997).

Demnach ist bei niedrigeren Temperaturen die Verwendung von CPC empfehlenswert, wohingegen HCl/KCl-Puffer bei höheren Temperaturen das geeignetere Dekontaminationsverfahren ist.

Wenn man dazu noch die Speziesdiversität in die Beurteilung mit einbezieht (s. Tab. 4), lassen sich obige Aussagen bestätigen. Vergleicht man die Ergebnisse mit der Literatur, so stellt sich heraus, dass die CPC-Dekontamination bisher nicht mit HCl/KCl-Puffer verglichen wurde, da die Eignung des HCl/KCl-Puffers zum kulturellen Nachweis von Mykobakterien aus Umweltproben in dieser Arbeit erstmals untersucht wurde.

4.1.3 Einfluss des Mediums

Tabelle 3 zeigt, dass die Positivitätsrate bei Verwendung von Löwenstein-Jensen-Medium (LJ) etwas höher lag, als bei Verwendung von 7H10-Agar. Betrachtet man die Kontaminationsrate, zeigt sich, dass LJ auch niedrigere Kontaminationsraten aufweist als 7H10-Agar. Mit dem Flüssigmedium (MB-Redox) wurden sowohl die niedrigsten Positivitätsrate als auch die niedrigsten Kontaminationsraten erzielt. Auch das Spektrum der isolierten Mykobakterienspezies war bei Verwendung von MB-Redox am engsten. Die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Befund liegt am unterschiedlichen Gehalt der drei verwendeten Medien an antimikrobiellen Zusätzen: LJ verfügt über eine höhere Konzentration an Malachitgrün (25%) als 7H10 (0,025%), die zwar das Wachstum der Begleitflora einschränkt, das Wachstum von Mykobakterien jedoch nur unwesentlich

hindert. Das laut Herstellerangabe explizit zur Tuberkulose-Diagnostik hergestellte Flüssigmedium MB-Redox enthält dagegen das Antibiotikagemisch „PACT“ (Polymyxin B, Amphotericin B, Carbenicillin und Trimethoprim), welche offenbar das Wachstum sowohl der Begleiflora als auch vieler Mykobakterien unterdrückt. MB-Redox wird daher besonders für klinisch-diagnostische Zwecke empfohlen (LIU et al., 1990).

4.2 Vergleich der Differenzierungsmethoden

4.2.1 Chemotaxonomische Methoden

Die Mykolsäure-Dünnschichtchromatographie (DC, vgl. Kap. 2.7.1) besitzt den wesentlichen Vorteil, dass sie mit geringem Kosten- und Arbeitsaufwand durchführbar ist. Darüber hinaus liefert sie in aller Regel eindeutige Ergebnisse, die eine klare Gruppenzuordnung erlauben und damit Zugehörigkeit zu einer großen Zahl von Spezies ausschließt. Außerdem liefert die DC (neben der Ziehl-Neelsen-Färbung) eine Bestätigung der Zugehörigkeit eines Isolats zur Gattung *Mycobacterium*. In der Literatur wird zwar immer wieder berichtet, dass sich in der Ziehl-Neelsen-Färbung ausschließlich Mykobakterien säure- und alkoholfest verhalten; in der Praxis hat man es aber hin und wieder mit nicht-mykobakteriellen Isolaten (z.B. Nocardien) zu tun, die in der Ziehl-Neelsen-Färbung fraglich positiv sind und die sich mit Hilfe der DC eindeutig von Mykobakterien abgrenzen lassen. Der Nachteil der DC ist, dass sie lediglich eine Zuordnung zu bestimmten Speziesgruppen erlaubt und keine Differenzierung bis auf die Spezies-Ebene. Insgesamt lässt sich die DC als wertvollen und kosteneffektiven Bestandteil der Differenzierung von Umweltmykobakterien bezeichnen.

Die HPLC (vgl. Kap. 2.7.2) erlaubt dagegen in der Regel eine recht eindeutige Spezieszuordnung untersuchter Mykobakterienisolate. Zu Verunsicherungen können in Einzelfällen Variationen des HPLC-Chromatogramms bei verschiedenen Vertretern einer Spezies führen, so dass intraspezifische Varianten nicht immer eindeutig von interspezifischen Varianten abgegrenzt werden können. Von Nachteil ist darüber hinaus der hohe, für die HPLC benötigte Geräteaufwand und der (im Vergleich zur DC) hohe Zeitaufwand zur Etablierung der Methodik. Bei Verwendung dieser Methodik fallen hohe Kosten für die Anschaffung des HPLC-Gerätes an wie auch für die regelmäßig notwendige Wiederbeschaffung der Trennsäulen. Für Routinezwecke ist die Methode daher nicht zu empfehlen, sie liefert jedoch wertvolle Informationen hinsichtlich der Spezieszuordnung und bei der Erkennung und Beschreibung neuer Spezies.

4.2.2 Molekularbiologische Differenzierungsmethoden

Die Sequenzierung der 16S-rDNA (s. Kap. 2.7.3) ist eine genaue Methode und heute der Goldstandard der Mykobakterienidentifizierung. Das Verfahren ist inzwischen so weit entwickelt und vielfach etabliert, dass man es zu vertretbaren Kosten überwiegend als Auftragsarbeit durchführen lässt. Für die eindeutige Zuordnung eines unbekannten Mykobakterienisolats zu einer bestimmten Spezies oder für seine Abgrenzung von bekannten Spezies wird heute im Zweifelsfalle auf die Sequenzierung der 16S-rDNA zurückgegriffen. Für den routinemäßigen Einsatz bei der Identifizierung von Umweltisolaten ist das Verfahren aus Kostengründen jedoch nicht geeignet.

Was die beiden PCR-RFLP-Methoden betrifft, so kann man sagen, dass durch die Analyse des *hsp65*-Gens mit Hilfe der PRA (s. Kap. 2.7.1) in aller Regel eine Identifizierung bis zur Speziesebene, zum Teil sogar bis unterhalb der Speziesebene ermöglicht wird. Diese einfache und wirtschaftliche Methode ist daher als wertvoller Bestandteil der Mykobakteriendifferenzierung empfehlenswert (LIU et al., 1999). Bei Vorliegen eines bekannten PRA-Musters ermöglicht die PRA regelmäßig eine korrekte Spezieszuordnung. Nur selten finden sich bei verschiedenen Spezies solch geringfügige Unterschiede im Bandenmuster, dass sie nur bei paralleler Auftragung auf einem Gel erfasst werden können (die Auswertung der Gele erlaubt nur eine ungenaue Abschätzung der Restriktionsfragmentlängen). Bei Vorliegen eines unbekannten PRA-Musters steht man jedoch immer wieder vor der Unklarheit, ob es sich um das Bandenmuster einer unbekannten Spezies handelt oder um einen bisher unbekannten Subtyp einer bekannten Spezies. Die PRA sollte daher grundsätzlich nicht als einzige Differenzierungsmethode verwendet werden.

Die Analyse des 16S-23S-rDNA-Spacers (s. Kap. 2.7.2) mittels PCR-RFLP führt bei schnellwachsenden Mykobakterienspezies oftmals zu mehreren unterschiedlichen RFLP-Bandenmuster innerhalb einer Spezies. Dies mag darin begründet liegen, dass der 16S-23S-rDNA-Spacer bei schnellwachsenden Mykobakterien häufiger einen intraspezifischen Sequenz- Polymorphismus aufweist. Dies hat zur Folge, dass die Spacer- RFLP bei schnellwachsenden Mykobakterien nicht immer eine eindeutige Spezieszuordnung erlaubt. Bei langsamwachsenden Mykobakterien dagegen kommt es nicht zu dieser Problematik, da in ihrem Genom der 16S-23S-rDNA-Spacer wenig intraspezifische Sequenz-Polymorphismen aufweist. Bei langsamwachsenden Mykobakterien ermöglicht die Spacer-RFLP in der Regel eine eindeutige Spezieszuordnung. Von Vorteil ist das Fehlen von Varianten innerhalb einer Spezies. Von Nachteil ist dagegen die Tatsache, dass sich eine Reihe von Mykobakterienspezies nicht mit den beiden gängigen Restriktionsenzymen *HaeIII* und *CfoI* voneinander unterscheiden lassen und hierzu eine Reihe weiterer Restriktionsenzyme eingesetzt werden müssen (ROTH et al., 1999).

4.2.3 Beurteilung der Kombination verschiedener Differenzierungsmethoden

Da die Sequenzierung für die routinemäßige Identifizierung mykobakterieller Umweltisolate zu teuer ist, muss nach einfacheren Differenzierungsmethoden oder nach einer Kombination solcher Methoden gesucht werden, mit denen ein Screening und eine Zuordnung eines großen Teils der Umweltisolate möglich ist.

Insgesamt ist festzustellen, dass sich keines der hier verwendeten Verfahren (DC, HPLC, PRA, Spacer-RFLP) alleine für ein solches Screening eignet. Als einfachste Kombination mit recht guten Identifizierungsergebnissen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit die Verbindung von DC mit PRA. Von den hier näher untersuchten 398 Umweltisolaten ließen mit dieser Methodenkombination 264 Isolate (66%) eindeutig zuordnen (s. Kap. 3.2.2, Abb. 4). Von den verbleibenden unbekannten Isolaten ließen sich weniger als die Hälfte durch zusätzliche Untersuchung mittels HPLC und Spacer-RFLP einer bekannten Spezies zuordnen, wobei aus Zeit- und Kostengründen auf eine 16S-rDNA-Sequenzierung verzichtet werden musste und unklar blieb, welcher Anteil der unbekannten Isolate wahrscheinlich als neue Spezies zu betrachten sind. Als interessanter Nebentbefund ergab sich, dass die Ergebnisse der Spacer-RFLP meistens mit denen der HPLC korrelieren (Beispiel unter den wiedergegebenen Ergebnissen).

4.3 Mykobakterienspektrum in den verschiedenen Probearten

Tabelle 15 fasst die Mykobakterienspezies zusammen, die in Biofilmen aus Trinkwasserrohren, in Biofilmen von Aufwuchsträgern und aus Trinkwasserproben isoliert wurden. Wie in Kapitel 2.2 erwähnt, stammten die Rohrproben aus dem zentralen, unterirdischen Verteilungsnetz, wurden Aufwuchsträger in drei verschiedenen Wasserwerken dem aufbereiteten Trinkwasser exponiert und wurden die Trinkwasserproben verschiedenen Hausinstallationssystemen entnommen. Die in Tabelle 15 aufgelisteten Spezies wurden hinsichtlich ihrer Humanpathogenität gekennzeichnet (SCHULZE-RÖBBECKE, 1993).

Tabelle 15 Spektrum nachgewiesener Mykobakterienspezies in Biofilmen aus Rohrproben und Aufwuchsträgern sowie aus Trinkwasserproben

Rohrproben	Aufwuchsträger	Wasserproben (Hausinstallation)
<i>M. abscessus</i> **	<i>M. abscessus</i> **	<i>M. abscessus</i> **
<i>M. aurum</i> *	<i>M. aurum</i> *	<i>M. aurum</i> *
<i>M. brumae</i> *	<i>M. chelonae</i> **	<i>M. chelonae</i> **
<i>M. chelonae</i> **	<i>M. flavescens</i> *	<i>M. gilvum</i> *
„Spezies X“	<i>M. gilvum</i> *	<i>M. gordonae</i> *
	<i>M. gordonae</i> *	<i>M. flavescens</i> *
	<i>M. mucogenicum</i> **	<i>M. hassiacum</i> **
	<i>M. peregrinum</i> **	<i>M. intracellulare</i> ***
	<i>M. porcinum</i> *	<i>M. lentiflavum</i> **
		<i>M. mucogenicum</i> **
		„Spezies X“
		„Spezies Y“
		<i>M. peregrinum</i> **
		<i>M. porcinum</i> *
		<i>M. xenopi</i> **

* Spezies, die als apathogen gelten

** Spezies mit relativ geringem pathogenen Potential (nur Einzelbeschreibungen von Infektionen beim Menschen)

*** Spezies mit relativ hohem pathogenen Potential (in der Literatur nicht nur vereinzelt als Erreger von Infektionen beim Menschen beschrieben)

Betrachtet man die Speziesspektren in Tabelle 15, so kann man sagen, dass obligat pathogene Mykobakterienspezies wie *M. tuberculosis* erwartungsgemäß nicht in der Umwelt zu finden sind. Man findet vorwiegend apathogene Spezies wie *M. gordonae*, aber auch fakultativ pathogene wie *M. abscessus* oder *M. lentiflavum*, so dass man durchaus von der Existenz eines breiten Mykobakterienspektrums in der Umwelt ausgehen kann. Relativ ungewöhnlich ist es, dass *M. abscessus* auch im Trinkwasser gefunden wurde. Über einen Nachweis dieser Mykobakterienart aus Umweltproben wurde bisher nur ganz vereinzelt (wenn überhaupt in überzeugender Form) berichtet.

Tabelle 15 zeigt weiterhin, dass in Biofilm-Rohrproben das mykobakterielle Spektrum enger ist als in den Aufwuchsträgerproben oder den Wasserproben. Über die Ursachen, warum Mykobakterienspezies mit relativ hohem pathogenem Potenzial wie *M. intracellulare* (andere Autoren fanden auch z.B. *M. avium*, *M. kansasii* und *M. malmoense*)

in peripheren Hausinstallationssystemen nachgewiesen wurden, nicht jedoch in Proben des zentralen Trinkwasserverteilungsnetzes, kann hier nur spekuliert werden. Zum einen könnte dies an den allgemein niedrigen Mykobakteriendichten in Biofilmen des zentralen Trinkwasserverteilungsnetzes liegen, so dass der Nachweis seltenerer Mykobakterienspezies in solchen Proben sehr unwahrscheinlich ist. Zum anderen ist aber auch nicht auszuschließen, dass Mykobakterienspezies mit hohem pathogenem Potenzial in Biofilmen des zentralen Trinkwasserverteilungsnetzes nicht oder nur in sehr kleinen Zahlen vorkommen und sich erst in Hausinstallationssystemen zu nachweisbaren Zahlen vermehren. Es ist durchaus vorstellbar, dass solche Spezies auf Grund ihrer im Bereich der Körpertemperatur liegenden Vermehrungstemperaturen (Ausnahme *M. kansasii*) und möglicherweise auch auf Grund anderer Nährstoffansprüche in aquatischen Habitaten außerhalb der Hausinstallation selten Vermehrungsmöglichkeiten finden.

4.4 Biofilm-Untersuchungen

In den Rohrproben des Trinkwasserverteilungsnetzes wurden niedrige Mykobakteriendichten zwischen 0 und 10 KBE/cm² nachgewiesen, die um etwa zwei Zehnerpotenzen unterhalb derjenigen der 2 Jahre lang exponierten Aufwuchsträger lag. Noch größere Unterschiede bestanden zwischen der Mykobakteriendichte in den Rohrproben und der Dichte in Proben aus Hausinstallationssystemen. In einem vorangegangenen Projekt wurden in Biofilmproben aus Hausinstallationssystemen mittlere Mykobakteriendichten zwischen 1000 und 10000 KBE/cm² nachgewiesen mit maximalen Werten von über 10⁶ KBE/cm² (SCHULZE-RÖBBECKE, 1992). Wie aus Tabelle 15 hervorgeht, verhielt es sich ähnlich mit dem nachgewiesenen Mykobakterienspektrum: Während sich in den Rohrproben nur 5 verschiedene Mykobakterienspezies nachweisen ließen, fanden sich 9 Spezies auf den Aufwuchsträgern und 15 Spezies in Wasserproben aus Hausinstallationssystemen.

Die hier erzielten Ergebnisse (Abb 12 in Kap. 3.4.2) erlauben keine Schlussfolgerungen dahingehend, dass von den einzelnen Mykobakterienspezies oder Biofilm-Mykobakterien bestimmte Materialien als Substratum bevorzugt werden. Während sich bei den Aufwuchsträgern ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Expositionsdauer und der Mykobakteriendichte in Biofilmen zeigte, war ein solcher Zusammenhang in den Rohrproben nicht nachweisbar. Als spekulative Ursachen lassen sich anführen:

- Die Rohrproben wurden größeren Tiefen des Erdbodens entnommen, in denen niedrige Temperaturen herrschen, bei welchen sich Mykobakterien nur sehr langsam vermehren,
- Bei langen Expositionsdauern (z.T. >50 Jahre!) stellt sich in Biofilmen eine spezielle Mikroflora ein, an der Mykobakterien nur noch einen geringen Anteil haben,
- Eine Kombination der ersten beiden hypothetischen Ursachen oder andere Faktoren, die bisher unbekannt sind, wären durchaus denkbar.

Allgemein kann gesagt werden, dass Mykobakterien in Biofilmen des Trinkwasserverteilungssystems ubiquitär vorkommen; bei den unbegeißelten und mit stark hydrophoben Zellwänden ausgestatteten Mykobakterien scheint es sich somit um „Adhäsionsspezialisten“ aquatischer Lebensräume zu handeln. Sowohl hinsichtlich ihrer Dichte als auch hinsichtlich ihres Spektrums scheint eine Zunahme von zentral nach peripher stattzufinden.

4.5 *M.-xenopi*-Pseudoepidemie

Wie die Abbildung 14 zeigt, hat sich die RAPD zur Genotypisierung von *M.-xenopi*-Isolaten als brauchbar erwiesen. Sie ist nicht nur eine schnell durchführbare Methode, die sich zu diesem Zweck gut in einem Routinelabor etablieren lässt sondern auch sehr preisgünstig.

Vergleicht man die Ergebnisse, die mit den einzelnen Primern erzielt wurden, so sieht man, dass alle in der Lage waren, die Patientenisolat aus Regensburg von den Düsseldorfer Gruppen („Wasserisolat Düsseldorf“ und „Patientenisolat Düsseldorf“) zu unterscheiden, wobei sich die diskriminierenden Eigenschaften von Primer Stenmal 270 als weniger günstig erwiesen als die der anderen Primer. Aus unbekannten Gründen war jedoch der *M.-xenopi*-, „Type strain“ NCTC 10042.) mit allen Primern außer ZAP40 nur schwer von den Düsseldorfer Stämmen zu unterscheiden. Dies wirft die Frage auf, ob sich die RAPD bei der Aufklärung von (Pseudo-) Infektionsfällen durch *M. xenopi* generell zu Typisierungszwecken eignet. In solchen Fällen wäre nötig, nach geeigneteren Primern zu suchen. In der Literatur konnten keine vergleichbaren Arbeiten gefunden werden, die es erlauben würden, bessere Primer oder RAPD-Reaktionsprofile zur Typisierung von *M. xenopi* zu finden.

Die unterschiedlichen RAPD-Muster der Regensburger Patientenisolat erklären sich aus der Tatsache, dass das Tuberkulose-Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg seine Einsendungen aus einem großen Einzugsgebiet bezieht und *M.-xenopi*-Isolationen aus Patientenmaterial normalerweise eine solche Rarität sind, dass ein epidemiologischer Zusammenhang unwahrscheinlich ist. Die eng verwandten RAPD-Muster aller Düsseldorfer Isolate sprechen dagegen für einen solchen epidemiologischen Zusammenhang, im vorliegenden Fall für eine Pseudoepidemie.

5. Zusammenfassung

Die Gattung *Mycobacterium* umfasst nicht nur die obligat pathogenen Erreger der Tuberkulose und Lepra sondern auch zahlreiche Spezies, die saprophytär in der Umwelt leben und nur zum Teil bei abwehrgeschwächten Menschen Infektionen hervorrufen können. Infektionen durch derartige fakultativ pathogene Mykobakterien werden offenbar größtenteils durch Wasser übertragen, insbesondere Leitungswasser. Im Wasser scheinen sich Mykobakterien besonders in Biofilmen zu vermehren. Über ihre Akkumulationskinetik in Biofilmen ist wenig bekannt. So ist es möglich, dass bestimmte, im Trinkwasserverteilungsnetz eingesetzte Materialien die Mykobakterien-Akkumulation begünstigen.

Ziel der Arbeit war es, die Akkumulation von Mykobakterien in Biofilmen des Trinkwasserverteilungsnetzes in Abhängigkeit von Expositionsdauer und Material des Substrats zu untersuchen. Als Untersuchungsobjekte dienten zum einen unterirdische Rohre des Trinkwasserverteilungsnetzes und zum anderen Aufwuchsträger unterschiedlicher Materialien, die zwei Jahre lang dem Trinkwasser exponiert und in regelmäßigen Abständen beprobt wurden. Darüber hinaus sollten Verfahren zur kulturellen Anzucht von Mykobakterien aus Trinkwasser optimiert sowie chemotaxonomische und molekularbiologische Verfahren zu ihrer Differenzierung angewandt werden. Im Rahmen einer Häufung des klinischen Nachweises von *M. xenopi* sollte darüber hinaus ein molekularbiologisches Typisierungsverfahren zur Aufklärung der epidemiologischen Zusammenhänge etabliert werden.

Während sich bei den Aufwuchsträgern ein deutlicher Zusammenhang zwischen Expositionsdauer und der Mykobakteriendichte in Biofilmen zeigte, war ein solcher Zusammenhang in den Rohrproben nicht nachweisbar. Bei den verschiedenen Materialien (Kupfer, Edelstahl, Polyethylen, PVC, Grauguss, Kugelgraphitguss, Zementmörtel) zeigte sich kein Einfluss auf das Vorkommen und die Dichte von Mykobakterien in Biofilmen. Von 24 kulturellen Nachweisverfahren erwies sich bei den 146 untersuchten Wasser- und Biofilmproben die Kombination aus Probendekontamination mit Cetylpyridiniumchlorid und dreimonatiger (!) Inkubation bei 30°C auf Löwenstein-Jensen-Medium als optimal. Beim Nachweis spezieller Mykobakterien (z.B. *M. xenopi*) mittels höherer Inkubationstemperaturen ist dagegen eine Dekontamination mit HCL/KCL-Puffer zu empfehlen. Als bestes Verfahren zur Identifizierung der Mykobakterienisolate erwies sich die Sequenzierung der 16S-rDNA. Von den übrigen chemotaxonomischen (Mykolsäure-Dünnschichtchromatographie [DC] und -HPLC) und molekularbiologischen Differenzierungsverfahren (RFLP des *hsp65*-Gens [PRA] und der 16S-23S-Spacerregion) eignete sich kein einzelnes zur sicheren Identifizierung. Als kosteneffektivste Kombination mit recht guten Identifizierungsergebnissen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit die Verbindung von DC mit PRA. 15% der angezüchteten Mykobakterienisolate ließen sich trotz Einsatz eines großen Differenzierungsaufwandes nicht identifizieren. Bei zwei Gruppen, die vorläufig als „Spezies X“ (11 Isolate) und „Spezies Y“ (ein Isolat) bezeichnet wurden, wurde mit den zur Beschreibung einer neuen Spezies erforderlichen Untersuchungen begonnen. Zur Genotypisierung von *M. xenopi* bewährte sich die RAPD. Im vorliegenden Fall stellte sich die Häufung des klinischen *M. xenopi*-Nachweises als Pseudoepidemie heraus, die mit entsprechenden Interventionsmassnahmen behoben werden konnte.

6. Literaturverzeichnis

Ashford DA, Kellerman S, Yakrus M, Brim S, Good RC, Finelli L, Jarvis WR, McNeil M (1997). Pseudo-outbreak of septicemia due to rapidly growing mycobacteria associated with extrinsic contamination of culture supplement. *J Clin Microbiol.* 35: 2040-2042

Ausina V, Luquin M, Garcia Barcelo M, Lanéelle MA, Lévy-Frébault V, Belda F, Prats G (1992). *Mycobacterium alvei* sp. nov. *Int J System Bacteriol.* 42: 529-535

Avanis-Aghajani E, Jones K, Holtzman A, Aronson T, Glover N, Boian M, Froman S, Brunk CF (1996). Molecular technique for rapid identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 34: 98-102

Badak FZ, Kiska DL, Setterquist S, Hartley C, O'Connell MA, Hopfer RL (1996). Comparison of mycobacteria growth indicator tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 34: 2236-2239

Barksdale L, Kim KS (1977) *Mycobacterium*. *Bacteriol Rev.* 41: 217-372

Bascunana C, Belak K (1996). Detection and identification of mycobacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested PCR and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 34: 2352-2355

Beerwerth W, Eysing B, Kessel U (1979). Mykobakterien in Arthropoden verschiedener Biotope. *Zbl Bakt Hyg. I Abt Orig A.* 244: 50-57

B  ddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Bl  cker H, Böttger EC (1990a). Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol.* 28: 1751-1759

B  ddinghaus B, Wolters J, Heikens W, Böttger EC (1990b). Phylogenetic analysis and identification of different serovars of *Mycobacterium intracellulare* at the molecular level. *FEMS Microbiol Let.* 70: 197-204

Böttger EC (1991). Systematik, Differenzierung und Nachweis von bakteriellen Infektionserregern - die Familie *Mycobacteriaceae*. *Immun Infekt.* 19: 143-152

Böttger EC, Hirschel B, Coyle MB (1993). *M. genavense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 43: 841-843

Borgans JGA, Stanford JL (1973). *Mycobacterium chelonae* in abscesses after injection of diphtheria-pertussis-tetanus-polio vaccine. *Am Rev Respir Dis.* 107: 1-8

Brock TD, Madigan MT (1991). *Biology of Mikroorganisms*. Prentice Hall; Englewood Cliffs, New Jersey. 6: 785-786

Brownds SE, Kurzynski TA, Norden MA, Dufek JL, Schell RF (1996). Rapid susceptibility testing for nontuberculosis mycobacteria using flow cytometry. *J Clin Microbiol.* 34: 1386-1390

Burkhardt F (1992). Färbeverfahren. In: Burkhardt, F (Hrsg.): Mikrobiologische Diagnostik. Thieme; Stuttgart, New York .

Butler WR, Jost KC, Kilburn JO (1991). Identification of mycobacteria by high performance liquid chromatography. J Clin Microbiol. 29: 2468-2472

Butler WR, O'Connor SP, Yakeus MA, Smithwick RW, Plikaytis BB, Moss CW, Floyd MM, Woodley CL, Kilburn JO, Vadney FS, Gross WM (1993). *Mycobacterium celatum* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 43: 539-548

Butler WR, Cage G, Desmond E, Duffey PS, Floyd MM, Gross WM, Guthertz LS, Jost KC, Ramos LS, Silcox V, Thibert L, Warren N (1995). Uniform procedure for HPLC identification of mycobacteria. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta.

Cilliers FJ, Warren RM, Haumann JH, Wild IJF, vanHelden PD (1997). Oligonucleotide (GTG)₅ as an epidemiological tool in the study of nontuberculous mycobacteria. J Clin Microbiol. 35: 1545-1549

Collins CH, Grange JM, Yates MD (1984). Mycobacteria in water. J Appl Bacteriol. 57: 193-211

Conville PS, Wittebsky FG (1998). Variables affecting results of sodium chloride tolerance test for identification of rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol. 36: 1555-1559

Cornfield DB, Beavis KG, Greene JA, Boyak M, Bondi J (1997). Mycobacterial growth and bacterial contamination in the mycobacteria growth indicator tube and BACTEC 460 culture systems. J Clin Microbiol. 35: 2068-2071

Curtis E. Margo, MD, MPH; Peter Reed Pavan, MD (2000). Arch Ophthalmol. 118:1125-1128

Daffé M, Lanéelle MA, Asselineau C, Lévy-Frébault V, David HL (1983) Intéret taxonomique des acides gras des mycobactéries: proposition d'une méthode d'analyse. Ann Microbiol. (Inst. Pasteur) 134B: 241-256

David HL, Lévy-Frébault V, Thorel MF (1989) Methodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. Institut Pasteur, Paris.

De Beenhouwer H, Liang Z, De Rijk P, Van Eekeren C, Portaels F (1995). Detection and identification of mycobacteria by DNA amplification and oligonucleotide-specific capture plate hybridisation. J Clin Microbiol. 33: 2994- 2998

Del Portillo P, Thomas MR, Martinez E, Maranon C, Valladares V, Patarroyo ME, Lopez MC (1996). Multiprimer PCR system for differential identification of mycobacteria in clinical samples. J Clin Microbiol. 34: 324-328

DIN (1991). DIN 58943; parts 3,8,9. Beuth Verlag, Berlin, Germany

Deutsches Zentralkomitee der Tuberkulose (1991). Die Bakteriologie der Tuberkulose. Pneumologie 45: 753-774

Devallois A, Goh KS, Rastogi N (1997). Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol.* 35: 2969-2973

Dobson G, Minnikin DE, Minnikin SM, Parlett JH, Goodfellow M, Ridell M, Magnusson M (1985). Systematic Analysis of Complex Mycobacterial Lipids. In: Goodfellow M., Minnikin DE (eds.). Chemical methods in bacterial systematics. Academic Press, London. P 237-265

Domenech, P, Jimenez MS, Menendez MC, Bull TJ, Samper S, Manrique A, Garcia MJ (1997). *Mycobacterium mageritense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 535-540

Domenech P, Menendez MC, Garcia MJ (1994). Restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes in the differentiation of fast-growing mycobacterial species. *FEMS Microbiol letters.* 116: 19-24

Duffey PS, Guthertz LS, Evans GC (1996). Improved rapid identification of mycobacteria by combining solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography analysis of BACTEC cultures. *J Clin Microbiol.* 34: 1939-1943

Du Molin GC, Stottmeier KD (1978). Use of cetylpyridinium chloride in the decontamination of water for culture of mycobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 36: 771-773

Du Molin, GC, Stottmeier KD (1986). Waterborne mycobacteria: an increasing threat to health. *ASM News.* 52: 525-529

Du Molin, GC, Stottmeier KD, Pelletier PA, Tsang AY, Hedley-Whyte J (1988). Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. *J Am Med Assoc.* 260: 1599-1601

Esteban J, Molleja A, Fernandez-Roblas R, Soriano F (1998). Number of days required for recovery of mycobacteria from blood and other samples. *J Clin Microbiol.* 36: 1456-1457

Gillespie SH, Newport LE, McHugh TD (1998). IS6110 Homologs are present in multiple copies in mycobacteria other than tuberculosis-causing mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 36: 53-54

Falkinham JO, Parker BC, Gruft H (1980). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. I: Geographic distribution in the eastern United States. *Am Rev Respir Dis.* 122: 931-927

Fischeder R (1991). Occurrence of mycobacteria in drinking water samples. *Zbl Hyg.* 192: 154-158

Flemming HC (1991). Biofilme und Wassertechnologie. I: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen. *gwf Wasser Abwasser.* 132: 197-207

Flemming HC (2003) Erfassung des Kontaminationspotenzials von Biofilmen in der Verteilung von Trinkwasser. In: Flemming HC (Hrsg). Erfassung des Wachstums und des Kontaminationspotenzials von Biofilmen in der Verteilung von Trinkwasser – Ergebnisse eines BMBF-Verbundprojektes. Berichte aus dem IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gemeinnützige GmbH. 36: 1-26

Floyd MR, Guthertz LS, Silcox VA, Duffey PS, Jang Y, Desmond EP, Crawford JT, Butler WR (1996). Characterization of an SAV Organism and proposal of *Mycobacterium triplex* sp.nov. J Clin Microbiol. 34: 2963-2967

Floyd MR, Gross WM, Bonato DA, Silcox WA, Smithwick RW, Metchok B, Crawford JT, Butler WR (2000). *Mycobacterium kubicae* sp.nov., a slowly growing, scotochromogenic *Mycobacterium*. Int J Syst evol Microbiol. 50: 1811-1816

Good RC (1985). Opportunistic pathogens in the genus *Mycobacterium*. Ann Rev Microbiol. 39: 347-369

Goodfellow M, Minnikin DE (1984). Circumscription of The Genus. In: Kubica, G.P. and L.G. Wayne (eds.): The Mycobacteria: a Sourcebook. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.p 1-24

Griethuysen AJ, Jansz AR, Butting AGM (1996). Comparison of Fluorescent BACTEC 900 MB System, Septi-Chek AFB System, and Löwenstein-Jensen Medium for Detection of Mycobacteria. J Clin Microbiol. 34: 2391-2394

Gross WM, Hawkins JE, Murphy DB (1976). Origin and significance of *Mycobacterium xenopi* in clinical specimens. Bull Int Union Tubercul. 51: 267-269.

Gruft H, Loder A, Osterhout M, Parker BC, Falkinham JO (1979). Postulated sources of *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum* infection: isolation of mycobacteria from estuaries and ocean water. Am Rev Respir Dis. 120: 1385-1388

Gürtler V, Mayall BC (2001). Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. Int J Syst Evol Microbiol. 51: 3-16

Haas WH, Butler WR, Kirschner PH, Plikaytis BB, Coyle MB, Amthor B, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Salfinger M, Crawford JT, Böttger EC, Brehmer HJ (1997). A new agent of mycobacterial lymphadenitis in children: *Mycobacterium heidelbergense*.sp.nov. J Clin Microbiol. 35: 2303-2309

Häggblom MM, Nohynek LJ, Palleroni NJ, Kronqvist A, Nurmiäho-Lassila EL, Salkinoja-Salonen MS, Klatte S, Kroppenstedt RM (1994). Transfer of polychlorophenol-degrading *Rhodococcus chlorophenolicus* (Apajalahti et al. 1986) to the genus *Mycobacterium* as *Mycobacterium chlorophenolicum* comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 44: 485-493

Hamilton WA (1971). Membrane Active Antibacterial Compounds. In: Hugo W.B. (eds). Inhibition and Destruction of The Microbial Cell. London, New York, Academic Press. p 78-93

Hance AJ, Grandchamp B, Lévy-Frebault V, Lecossier D, Rauzier J, Bocart D, Gicquel B (1989). Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol Microbiol.* 3: 843-849

Hinrikson HP, Pfyffer GE (1994). Mycobacterial mycolic acids. *Med Microbiol Lett.* 3: 49-57

Hughes MS, Ball NW, Beck LA, DeLisle GW, Skuce RA, Neill SD (1997). Determination of the etiology of presumptive feline leprosy by 16S rRNA gene analysis. *J Clin Microbiol.* 35: 2464-2471

Iivanainen EK, Martikainen PJ, Vänänen PK, Katila ML (1993). Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. *Appl Env Microbiol.* 59: 398-404

Kamala T, Paramavisan CN, Herbert D, Venkatesan P, Prabhakar R (1994). Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. *Appl Env Microbiol.* 60: 1021-1024

Kaustová J (1992). The incidence of conditionally pathogenic mycobacteria in the northern Moravia region. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol (Praha).* 36: 141-152.

Kazda J, Stackebrandt E, Smida J, Minnikin DE, Daffé M, Parlett JH, Pitulle C (1990). *Mycobacterium cookii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 40: 217-223

Kazda J, Müller J, Daffé M, Müller K, Pitulle C (1992). *Mycobacterium madagascariense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 42: 524-528

Kazda J, Cooney R, Monaghan M, Quinn PJ, Stackebrandt E, Dorsch M, Daffé M, Müller K, Cook BR, Tarnok ZS (1993). *Mycobacterium hiberniae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 43: 352-357

Kirschner P, Teske A, Schröder KH, Kroppenstedt RM, Wolters J, Böttger EC (1992). *Mycobacterium confluentis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 42: 257-263

Kirschner P, Rosenau J, Springer B, Teschner K, Feldmann K, Böttger EC (1996). Diagnosis of mycobacterial infections by nucleic acid amplification: 18-month prospective study. *J Clin Microbiol.* 34: 304-312

Kirschner P, Springer B, Vogel U, Meier A, Wrede A, Kiekenbeck M, Bange FC, Böttger EC (1993). Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 31: 2882-2889

Kleespies M, Kroppenstedt RM, Rainey FA, Webb LE, Stackebrandt E (1996). *Mycobacterium hoderi* sp. nov., a new member of the fast-growing mycobacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Syst Bacteriol.* 46: 683-687

Koukila-Kähkölä P, Springer B, Böttger EC, Paulin L, Jantzen E, Katila ML (1995). *Mycobacterium branderi* sp. nov., a new potential human pathogen. *Int J Syst Bacteriol.* 45: 549-553

Kubalek I, Mysak J (1996). The prevalence of environmental mycobacteria in drinking water supply systems in a demarcated region in Czech Republic, in the period 1984-1989. *Eur J Epidemiol.* 12: 471-474

Kubin M (1984). Distribution and Ecology in Non-Living Reservoirs – Opportunists and Pathogens. In: Kubica GP, Wayne LG (eds). *The Mycobacteria – a Sourcebook*. Marcel Dekker, New York, Basel. p 1313-1338

Kusunoki S, Ezaki T (1992). Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 42: 240-245

LeChevallier MW (1999). Biofilms in drinking water distribution systems: significance and control. The national academy press: *Identifying Future Drinking Water Contaminants*. Chapter 10. p 206-219

Lévy-Frébault V, Goh KS, David HL (1986). Mycolic acid analysis for clinical identification of *Mycobacterium avium* and related mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 24: 835-839

Lévy-Frébault V, Portaels F (1992). Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol.* 42: 315-323

Lin-Hui S, Ju-Hsin C, Hsieh-Shong L, Shue-Wei C, An-Jing K, Chien-Feng S, Tsu-Lan W (2000). DNA polymorphism of *Mycobacterium abscessus* analyzed by infrequent-restriction-site polymerase chain reaction. *Chang Gung Med J.* 23: 467-475

Liu Y, Huang T, Huang W (1999). Comparison of a nonradiometric liquid-medium method (MB-Redox) with the BACTEC System for growth and identification of mycobacteria in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 37: 4048-4050

Luquin M, Lanéelle MA, Ausina V, Garcia-Barcelo M, Belda F, Alonso C, Prats G (1991). Distribution of a novel mycolic acid in species of the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Bacteriol.* 41: 390-394

Magdalena J, Vachee A, Supply P, Locht C (1998). Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* 36: 937-943

Martin EC, Parker BC, Falkinham JO (1987). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. VII. Absence of mycobacteria in southeastern groundwaters. *Am Rev Respir Dis.* 136: 344-348

Meier A, Kirschner P, Schröder KH, Wolters J, Kroppenstedt RM, Böttger EC (1993). *Mycobacterium intermedium* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 43: 204-209

Middlebrook G, Cohn ML (1958). Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. *Am J Pub Heal.* 48: 844-853

- Minnikin DE, Minnikin SM, Parlett JH, Goodfellow M, Magnusson M** (1984). Mycolic acid patterns of some species of *Mycobacterium*. Arch Microbiol. 139: 225-231
- Mullis KA, Faloona FA** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155: 335-350
- Naumann L** (1995). Cultural detection of mycobacteria. Biotest Bulletin. 5: 177-180
- Neumann M** (1997). Comparison of Methods for Isolation of Mycobacteria from Water. Appl Env Microbiol. 63:547-552
- Ninet B, Monod M, Emler S, Pawlowski J, Metral C, Rohner P, Auckenthaler R, Hirschel B** (1996). Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. J Clin Microbiol. 34: 2531-2536
- Palaci M, Ueki SYM, Sako DN, Da Silva Telles MA, Curcio M, Silva EAM** (1996). Evaluation of mycobacteria growth indicator tube for recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens. J Clin Microbiol. 34: 762-764
- Patel S, Yates M, Saunders NA** (1997). PCR-enzyme-linked immunosorbent assay and partial rRNA gene sequencing: a rational approach to identifying mycobacteria. J Clin Microbiol. 35: 2375-2380
- Petersen KF** (1986). Atypische Mykobakterien - Konsequenzen für das Gesundheitsamt. Öff Gesundh-Wes. 48: 500-504
- Petit JF, Lederer E** (1984). The Structure of The Mycobacterial Cell Wall. In: Kubica GP, Wayne LG (eds.): The Mycobacteria - a Sourcebook. Marcel Dekker, Inc, New York, Basel. p 301-314
- Pfyffer GE, Cieslak C, Welscher HM, Kissling P, Rüsch-Gerdes S** (1997). Rapid detection of mycobacteria in clinical specimens by using the automated BACTEC 9000 MB system and comparison with radiometric and solid-culture systems. J Clin Microbiol. 35: 2229-2234
- Plaus WJ, Hermann G** (1991) The surgical management of superficial infections caused by atypical mycobacteria. Surgery. 110:99-103
- Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakrus MA, Butler WR, Woodley CL, Silcox VA, Shinnick TM** (1992). Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 30: 1815-1822
- Portaels F, Larsson L, Smeets P** (1988a). Isolation of mycobacteria from healthy persons' stools. Int J Leprosy. 56: 468-471
- Portaels F, De Muynck A, Sylla MP** (1988b). Selective Isolation of mycobacteria from soil: a statistical analysis approach. J Gen Microbiol. 134: 849-855

Portaels F, Guimard Y, Rossau R, Schulze-Röbbecke R, Behringer K (1996a). The biodiversity in the *Mycobacterium chelonae*-complex and the clinical significance of the different subgroups. Vortrag anlässlich der 15 th Conference of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy (IWGMT) on the Genus *Mycobacterium*, Newcastle-upon-Tyne.

Portaels F, Realini L, Bauwens L, Hirschel B, Meyers WM, De Meurichy W (1996b). Mycobacteriosis caused by *Mycobacterium genavense* in birds kept in a zoo: 11- year old survey. J Clin Microbiol. 34: 319-323

Portaels F, Aguiar J, Fissette K, Fonteyne PA, De Beenhouwer H, De Rijk P, Guedenon A, Lemans R, Steunou C, Zinsou C, Dumonceau JM, Meyers WM (1997). Direct detection and identification of *Mycobacterium ulcerans* in clinical specimens by PCR and oligonucleotide-specific capture plate hybridisation. J Clin Microbiol. 35: 1097-1100

Realini L, De Ridder K, Palomino JC, Hirschel B, Portaels F (1998). Microaerophilic conditions promote growth of *Mycobacterium genavense*. J Clin Microbiol. 36: 2565-2570

Ridgway HF, Justice CA, Whittaker C, Argo DG, Olson BH (1984). Biofilm fouling of RO membranes – its nature and effect on treatment of water for reuse. J Amer Water Works Assoc. 76: 94-102

Rodrigo G, Källenius G, Hoffmann E, Svenson SB (1992). Diagnosis of mycobacterial infections by PCR and restriction enzyme digestion. Lett Appl Microbiol. 15: 41-44

Rogall T, Flohr T, Böttger EC (1990a). Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. J Gen Microbiol. 136: 1915-1920

Rogall T, Wolters J, Flohr T, Böttger EC (1990b). Towards a phylogeny and detection of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. Int J Syst Bacteriol. 40: 323-330

Rohner P, Ninet B, Metral C, Emler S, Auckenthaler R (1997). Evaluation of the MB/BacT System and comparison to the Bactec 460 System and solid media for isolation of mycobacteria from clinical specimens. J Clin Microbiol. 35: 3127-3131

Roth A, Fischer M, Hamed ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H (1998). Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. J Clin Microbiol. 36: 139-147

Roth A, Reischl U, Streubel A, Naumann L, Kroppenstedt RM, Habicht M, Fischer M, Mauch H (2000). Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23SrRNA gene spacer and restriction endonucleases. J Clin Microbiol. 38: 1094-1104

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 74: 5463-5467

Sanguinetti M, Posteraro B, Ardito F, Zanetti S, Cingolani A, Sechi L, De Luca A, Ortona L, Fadda G (1998). Routine Use of PCR-Reverse Cross-Blot Hybridisation Assay for rapid identification of *Mycobacterium* species growing in liquid media. J Clin Microbiol. 36: 1530-1533

Saubolle MA, Kiehn TE, White MH, Rudinsky MF, Armstrong D (1996). *Mycobacterium haemophilum*: microbiology and expanding clinical and geographic spectra of disease in humans. Clin Microbiol Rev. 9: 435-447.

Schinsky MF, McNeil MM, Whitney AM, Steigerwalt AG, Lasker BA, Floyd MM, Hogg GG, Brenner DJ, Brown JM (2000). *Mycobacterium septicum*.sp.nov, a new rapidly growing species associates with catheter-related bacteraemia. Int J Syst Evol. Microbiol. 50: 575-581

Schröder, KH, Naumann L, Kroppenstedt, M, Reischl U (1997). *Mycobacterium hassiacum* sp. nov., a new rapidly growing thermophilic mycobacterium. Int J Syst Bacteriol. 47: 86-191

Schulze-Röbbecke R, Weber A, Fischeder R (1991). Comparison of decontamination methods for the isolation of mycobacteria from drinking water samples. J Microbiol Methods. 14: 177-183

Schulze-Röbbecke R (1993). Mykobakterien in der Umwelt. Immun Infekt. 21: 126-131

Schulze-Röbbecke R, Feldmann C, Fischeder R, Janning B, Exner M, Wahl G (1995). Dental units: an environmental study of sources of potentially pathogenic mycobacteria. Tubercle And Lung Disease. 76: 318-323

Schulze-Röbbecke R, Janning B, Fischeder R (1992). Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. Tubercle And Lung disease. 73: 141-144

Schulze-Röbbecke R, Fischeder R (1989). Mycobacteria in biofilms. Zentralbl Hyg Umweltmed. 88: 385-390

Schulze-Röbbecke R, Ilg B (2003). Auftreten von obligat und fakultativ pathogenen Organismen in Trinkwasser-Biofilmen: Mykobakterien. In: Flemming HC (Hrsg). Erfassung des Wachstums und des Kontaminationspotenzials von Biofilmen in der Verteilung von Trinkwasser – Ergebnisse eines BMBF-Verbundprojektes. Berichte aus dem IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gemeinnützige GmbH, Band 36. p 185-203

Schwartz T, Kalmbach S, Hoffmann S, Szewzyk U, Obst U (1998). PCR-based detection of mycobacteria in biofilms from a drinking water distribution system. J Microbiol Methods. 34: 113-123

Szábo I, Kiss KK, Várnai I (1982). Epidemic pulmonary infection associated with *Mycobacterium xenopi* indigenous in sewage-sludge. Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungariae. 29: 263-266.

Shojaei H, Goodfellow M, Magee JG, Freeman R, Gould FK, Brignall CG (1997). *Mycobacterium novocastrense* sp. nov., a rapidly growing photochromogenic mycobacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 1205-1207

Shojaei, H, Magee JG, Freeman R, Yates M, Horadagoda NU, Goodfellow M (2000). *Mycobacterium elephantis* sp.nov., a rapidly growing non-chromogenic *Mycobacterium* isolated from an elephant. *Int.J Syst Evol Microbiol.* 50: 1817-1820

Soini H, Viljanen MK (1997). Diversity of the 32-kilodalton protein gene may form a basis for species determination of potentially pathogenic mycobacterial species. *J Clin Mikrobiol.* 35: 769-773

Songer GL (1981). Methods for selective isolation of mycobacteria from the environment. *Can J Microbiol.* 27: 1-7

Springer B, Kirschner P, Rost-Meyer G, Schröder KH, Kroppenstedt RM, Böttger EC (1993). *Mycobacterium interjectum*, a new species isolated from a patient with chronic lymphadenitis. *J Clin Microbiol.* 31: 3083-3089

Springer B, Böttger EC, Kirschner P, Wallace RJ (1995). Phylogeny of the *Mycobacterium chelonae*-like organism based on partial sequencing of the 16S rRNA gene and proposal of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 45: 262-267

Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger EC (1996a). Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol.* 34: 296-303

Springer B, Wu WK, Bodmer T, Haase G, Pfyffer GE, Kroppenstedt RM, Schröder KH, Emler S, Kilburn JO, Kirschner P, Telenti A, Coyle MB, Böttger EC (1996b). Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. *J Clin Microbiol.* 34: 1100-1107

Stahl DA, Urbance JW (1990). The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J Bacteriol.* 172: 116-124

Staufer F, Haber H, Rieger A, Mutschlechner R, Hasenberger P, Tevere VJ, Young KKY (1998). Genus level identification of mycobacteria from clinical specimens by using an easy-to-handle *Mycobacterium*- specific PCR Assay. *J Clin Microbiol.* 36: 614-617

Steingrube VA, Gibson JL, Brown BA, Zhang Y, Wilson RW, Rajagopalan M, Wallace Jr RJ (1995). PCR-amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 33: 149-153

Steingrube VA, Wilson RW, Brown BA, Jost KC, Blacklock Z, Gibson JL, Wallace RJ (1997). Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomyces*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* Isolates by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol.* 35: 817-822

Takewaki SI, Okuzumi K, Manabe I, Tanimura M, Miyamura K, Nakahara KI, Yazaki Y, Ohkubo A, Nagai R (1994). Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial *dnaJ* gene and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacterial species. *Int J Syst Bacteriol.* 44: 159-166

Talaat AM, Reimschuessel R, Trucksis M (1997). Identification of mycobacteria infecting fish to the species level using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Vet Microbiol.* 58: 229-237

Tay STL, Hemond HF, Polz MF, Cavanaugh CM, Dejesus I, Krumholz LR (1998). Two new *Mycobacterium* strains and their role in Toluene degradation in a contaminated stream. *Appl Env Microbiol.* 64: 1715-1720

Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW (1997). Routine use of PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J Clin Microbiol.* 35: 79-85

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 31: 175-178

Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL, Passen S (1998). In vitro comparison on NALC-NaOH, Tween 80, and C18-Carboxypropylbetaine for processing of specimens for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 36: 3558-3566

Torkko P, Suomalainen S, Iivanainen E, Suutari M, Totoli E, Paulin L, Katila M (2000). *Mycobacterium xenopi* and related organisms isolated from stream waters in Finland and description of *Mycobacterium botniense* sp.nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50: 283-289

Torkko P, Suutari M, Suomalainen S, Paulin L, Larsson L, Katila ML (1998). Separation among species of mycobacterium terrae complex by lipid analyses: Comparison with biochemical tests and 16S rRNA sequencing. *J Clin Microbiol.* 36: 499-505

Tortoli E, Piersimoni C, Kroppenstedt RM, Montoya-Burgos JI, Reischl U, Giacometti A, Emler S (2001). *Mycobacterium doricum*.sp.nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51: 2007-2012

Tortoli E, Piersimoni C, Kischner P, Bartolini A, Burrini C, Lacchini C, Mantella A, Muzzi G, Tosi CP, Penati V, Scarparo C, Simonetti MT, Böttger EC (1997). Characterization of mycobacterial isolates phylogenetically related to, but different from, *Mycobacterium simiae*. *J Clin Microbiol.* 35: 697-702

Valero-Guillén P, Martin-Luengo F, Jimenez J, Larsson L (1986). A thin-layer chromatographic method for separating methyl esters of mycobacterial mycolic acids. *Acta Path Microbiol Immunol Scand B.* 94: 373-376

Vuorio R, Anderson MA, Rainey FA, Kroppenstedt RM, Kämpfer P, Busse H-J, Viljanen M, Salkinoja-Salonen M (1999). A new rapidly growing mycobacterial species, *Mycobacterium murale* sp.nov., isolated from the indoor walls of a children's day care centre. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 25-35

Wayne LG (1962b). Two varieties of *Mycobacterium kansasii* with different clinical significance. Am Rev Respir Dis. 86: 651-656

Wayne LG, Kubica GP (1986). Family *Mycobacteriaceae* Chester 1897, 63^{AL}. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2. Williams & Wilkins, Baltimore. p 1436-1457

Wayne LG, Sramek HA (1992). Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. Clin Microbiol Rev. 5: 1-25

Wilson RW, Steingrube VA, Böttger EC, Springer B, Brown-Elliott BA, Vincent V, Jost KC, Zhang Y, Garcia MJ, Chiu SH, Onyi GO, Rossmore H, Nash DR, Wallace RJ (2001). *Mycobacterium immunogenicum* sp.nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metal working fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. Int J Syst Evol Microbiol. 51: 1751-1764

Willumsen P, Karlson U, Stackebrandt E, Kroppenstedt RM (2001). *Mycobacterium frederiksbergense* sp.nov., a novel polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Mycobacterium* species. Int J Syst Evol Microbiol. 51: 1715-1722

Wingender J, Dannehl A, Bressler D, Flemming HC (2003). Charakterisierung von Biofilmen in Trinkwasserverteilungssystemen. In: Flemming HC (Hrsg). Erfassung des Wachstums und des Kontaminationspotenzials von Biofilmen in der Verteilung von Trinkwasser – Ergebnisse eines BMBF-Verbundprojektes. Berichte aus dem IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gemeinnützige GmbH, Band 36. p 27-85

Woese R (1987). Bacterial evolution. Microbiol Rev. p 221-271

Wolinsky E (1979). State of the art: nontuberculous mycobacteria and associated diseases. Am Rev Respir Dis. 119: 107-159

Yassin AF, Binder C, Schaal KP (1993). Identification of mycobacterial isolates by thin-layer and capillary gasliquid chromatography under diagnostic routine conditions. Zbl Bakt 278: 34-48

Zanetti S, Ardito F, Sechi L, Sanguinetti M, Molicotti P, Delogu G, Pinna MP, Nacci A, Fadda G (1997). Evaluation of a nonradiometricsystem (BACTEC 900 MB) for detection of mycobacteria in human clinical samples. J Clin Microbiol. 35: 2072-2075

Zolg JW, Philippi-Schulz S (1994). The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. J Clin Microbiol. 32: 2801-2812

7. Abkürzungsverzeichnis

BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Bp	Basenpaare
ca.	circa
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
cm	Zentimeter
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
Cu	Kupfer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ED	Edelstahl
g	Gramm
GC-Gehalt	Cytosin und Guanin-Basengehalt von Nukleinsäuren
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
Kap.	Kapitel
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
KDa	Kilodalton
LJ	Löwenstein-Jensen
Lsg.	Lösung
mg	Milligramm
min	Minute (n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µl	Mikroliter
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n.u.	Nicht untersucht
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Polyethylen
PRA	PCR-Restrictionsanalyse des hsp65-Gens
PVC	Polyvinylchlorid
rDNA	ribosomale DNA
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
s.	siehe
sek	Sekunden
TAE	Tris-Acetate-EDTA Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TU	Technische Universität
UPS	United Parcel Service
UV	Ultraviolett

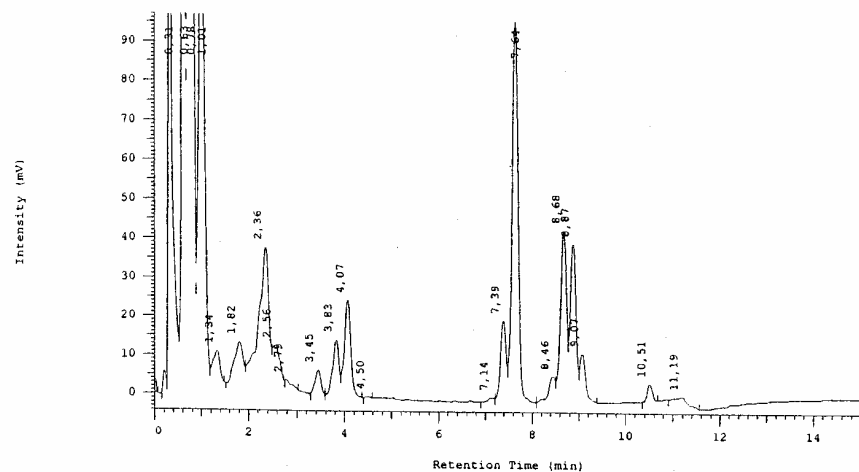
8. Anhang

8.1 Anhang 1: Referenzchromatogramme der HPLC (s. Kap. 2.7.2, 3.2.1)

Im folgenden finden sich Kopien der HPLC-Chromatogramme, die als Referenzen für die Zuordnung der in dieser Arbeit gefundenen Isolate dienen. Der Name der untersuchten Mykobakterienspezies befindet sich über dem jeweiligen Chromatogramm.

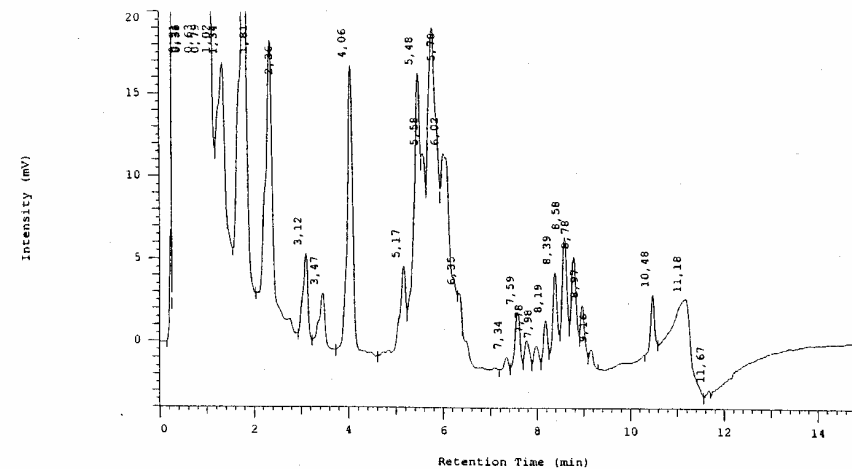
myko standar - Vial 1 Inj 1 M. abscessus - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0118
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 1 Inj Number: 1 Sample Name: M. abscessus

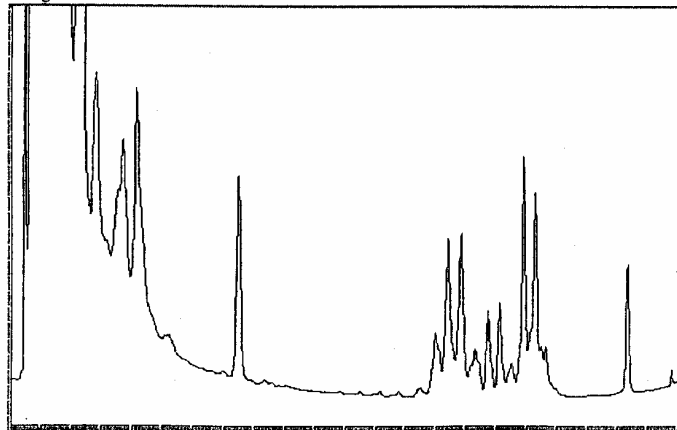


myko standar - Vial 5 Inj 1 M. aichiense - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0086
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 5 Inj Number: 1 Sample Name: M. aichiense

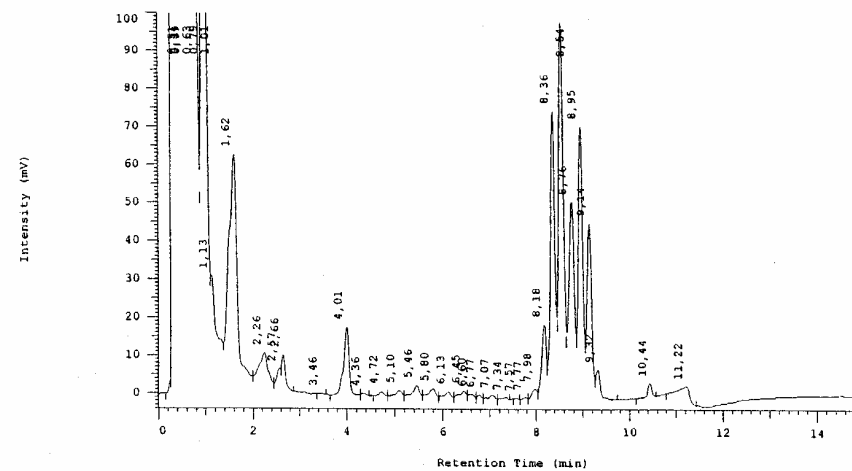


M. agri



myko standar - Vial 7 Inj 1 M. asiaticum - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0086
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 7 Inj Number: 1 Sample Name: M. asiaticum

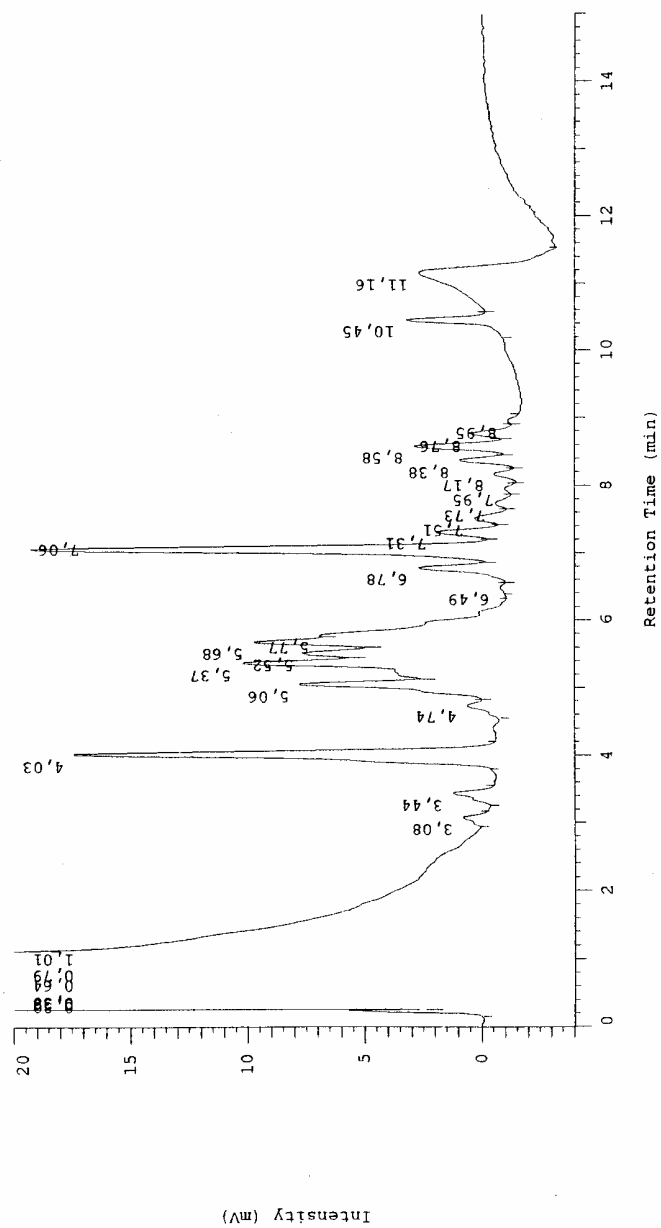


myko standar - Vial 6 Inj 1 M.aurum - Channel 1

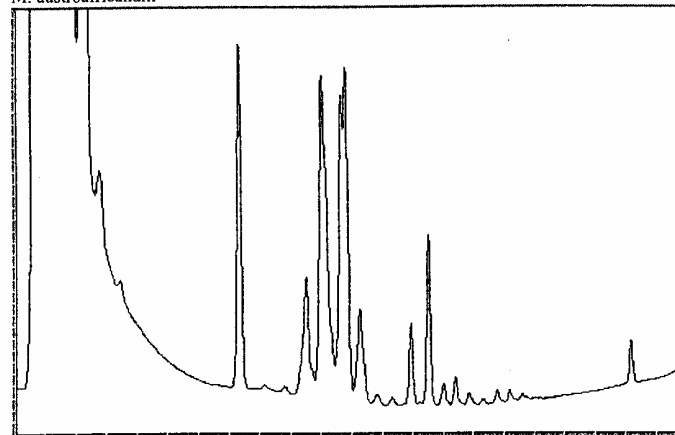
Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0086

Data Desc.: IFM CH1 2-D

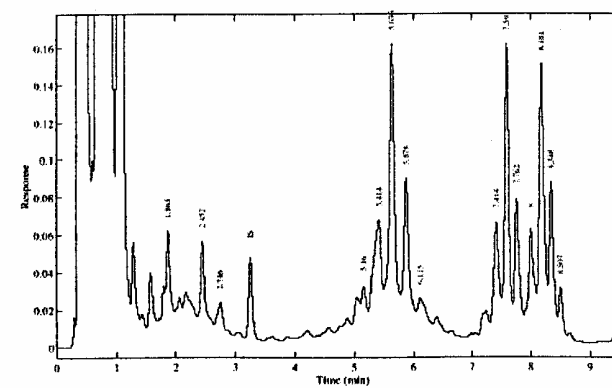
Vial Number: 6 Inj Number: 1 Sample Name: M.aurum

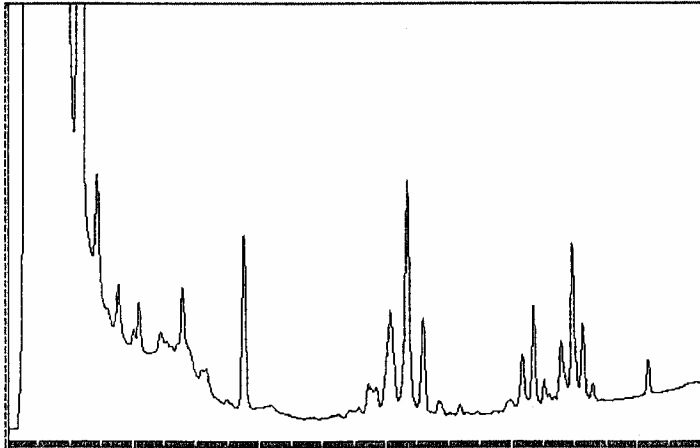
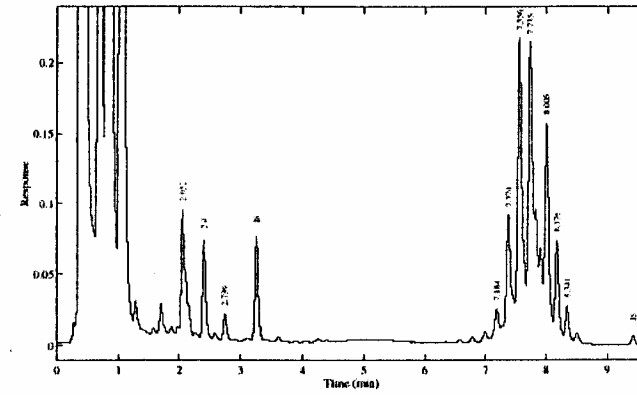
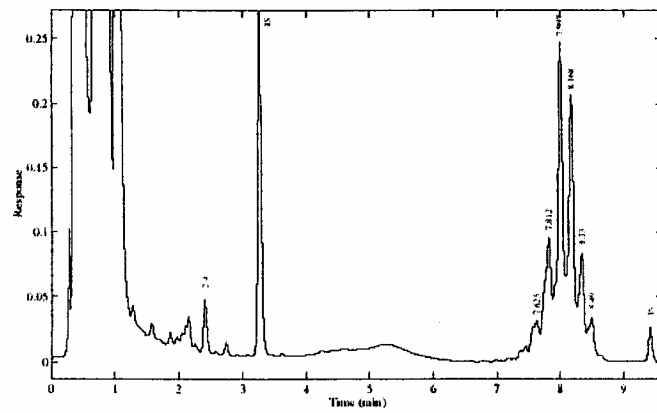
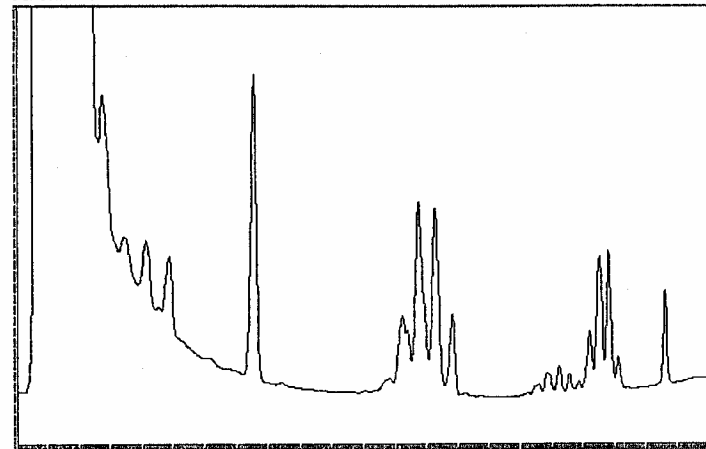


M. austroafricanum



M. avium



M. bohemicum*M. bovis*, BCG*M. bovis**M. branderi*

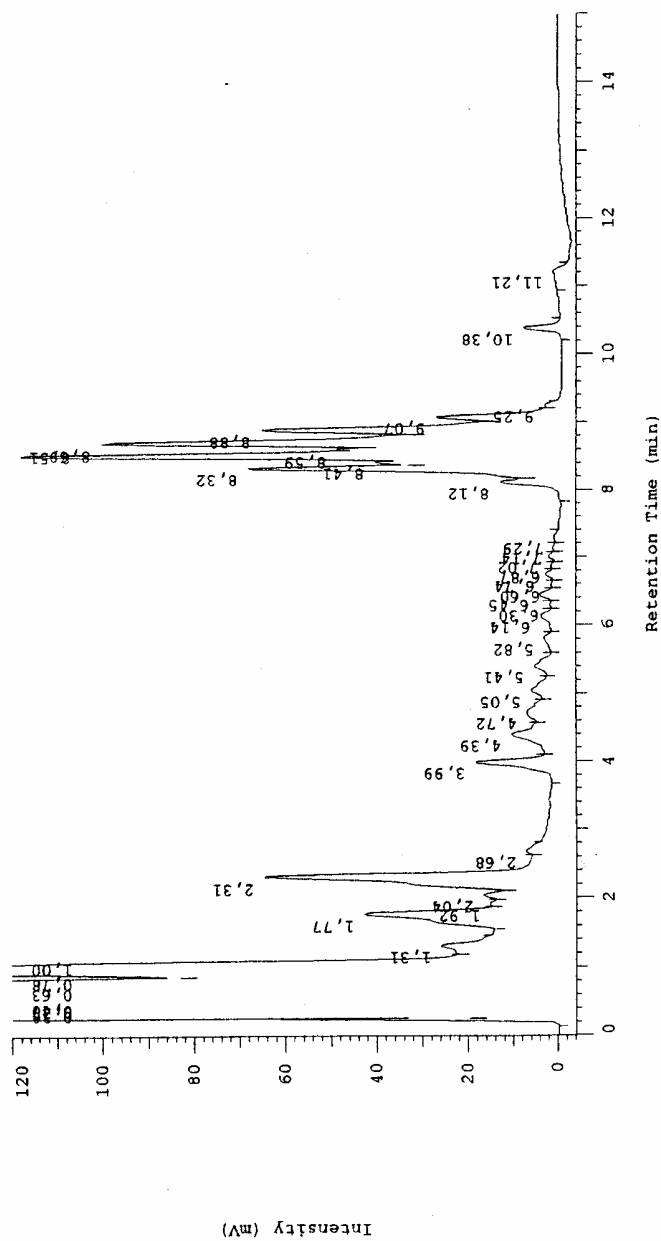
myko standar - Vial 2 Inj 1 BN3217 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0068

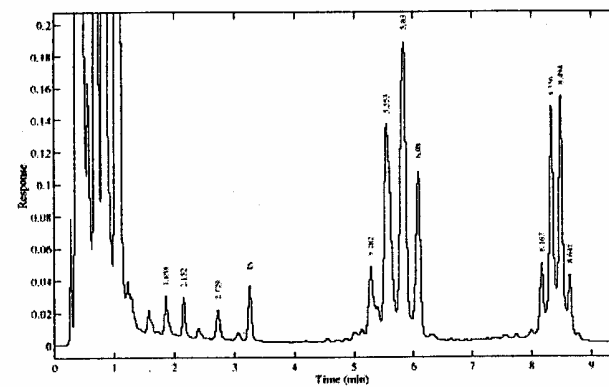
Data Desc.: IFM CH1 2-D

Vial Number: 2 Inj Number: 1 Sample Name: BN3217

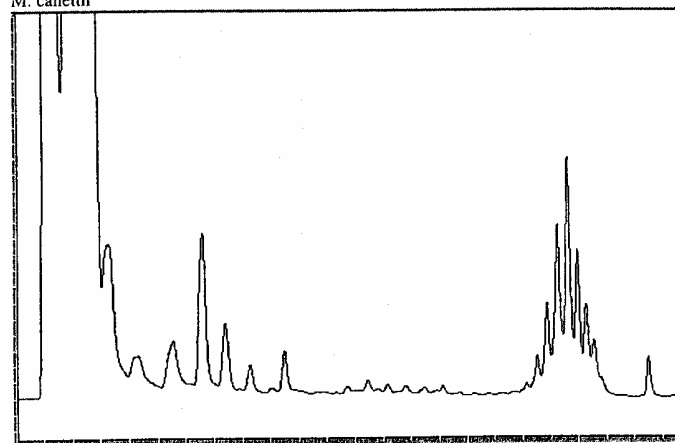
M. brumae



M. celatum

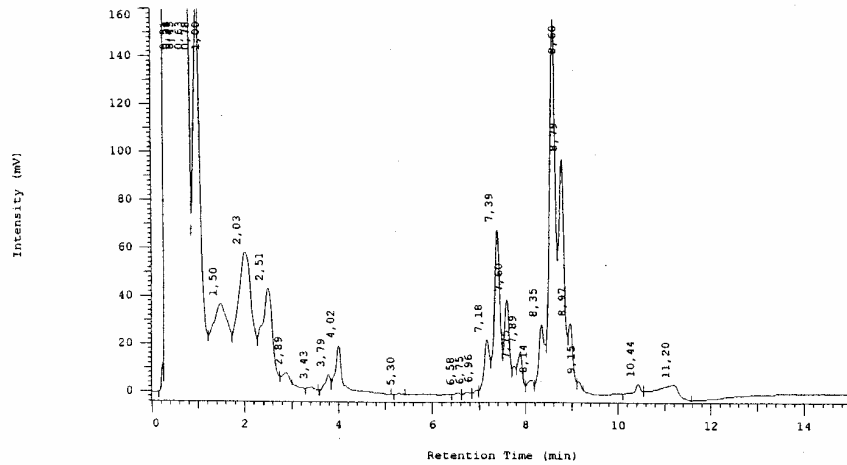


M. canettii



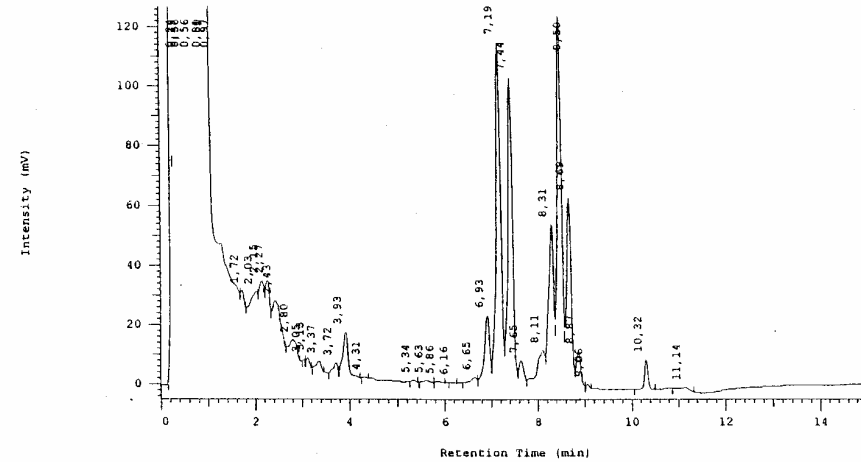
myko standar - Vial 8 Inj 1 M.chelonae - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0086
 Data Desc.: IFM CH1 2-D
 Vial Number: 8 Inj Number: 1 Sample Name: M.chelonae



myko standar - Vial 2 Inj 1 BN3406 - Channel 1

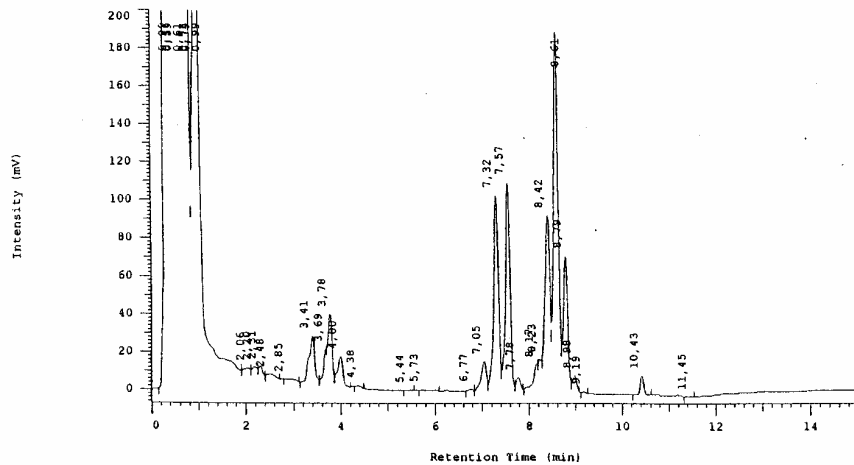
Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0045
 Data Desc.: IFM CH1 2-D
 Vial Number: 2 Inj Number: 1 Sample Name: BN3406



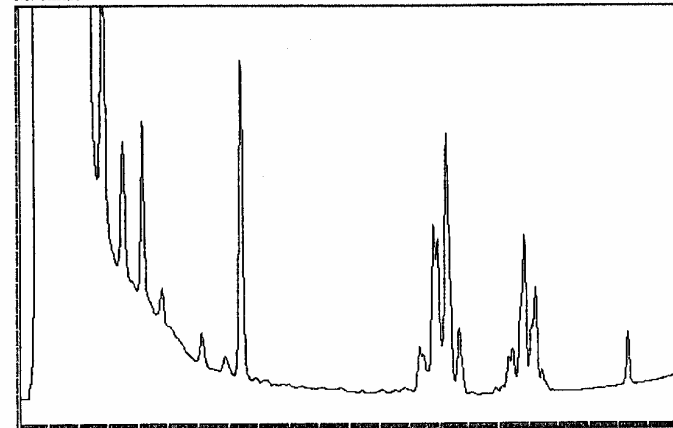
myko standar - Vial 3 Inj 1 BN3392 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0046
 Data Desc.: IFM CH1 2-D
 Vial Number: 3 Inj Number: 1 Sample Name: BN3392

M. chelonae II



M. chitae

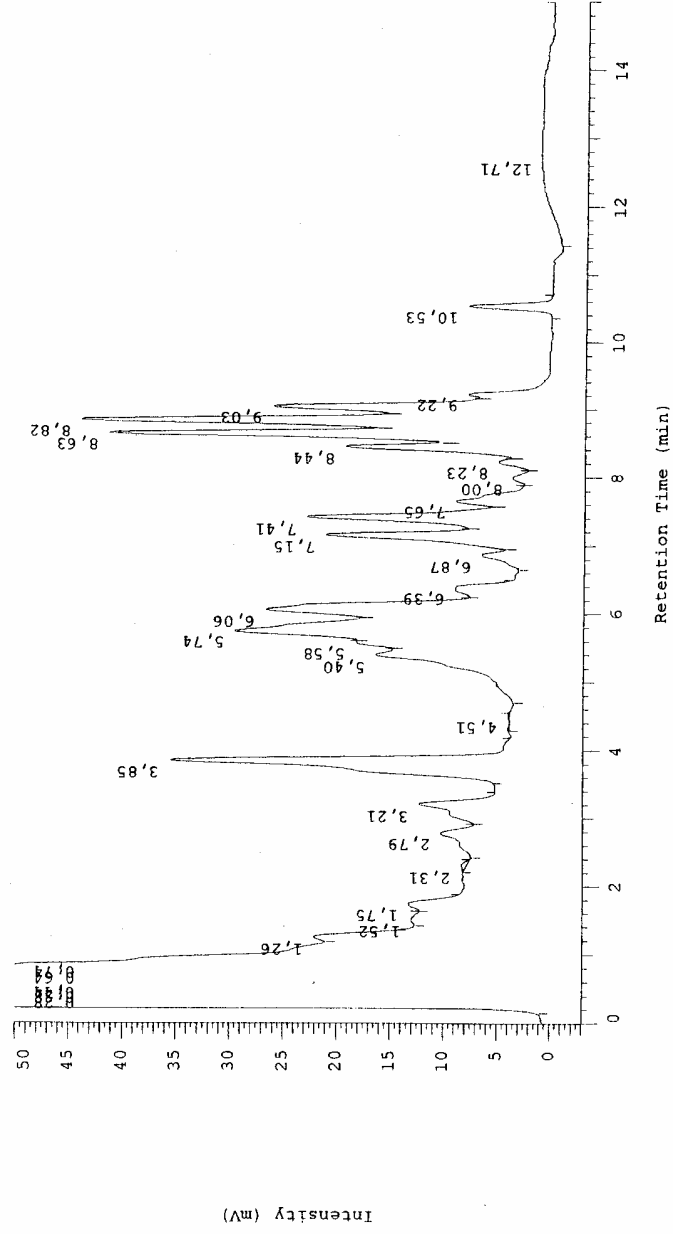


Current Data Path: C:\Win32App\HSMN\mykobakt\DATA\0135

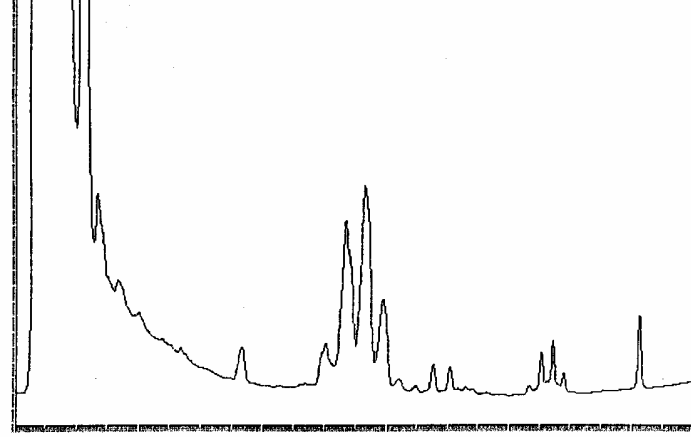
Data Desc.: IFM CHI 2-D

Vial Number: 2 Inj Number: 1

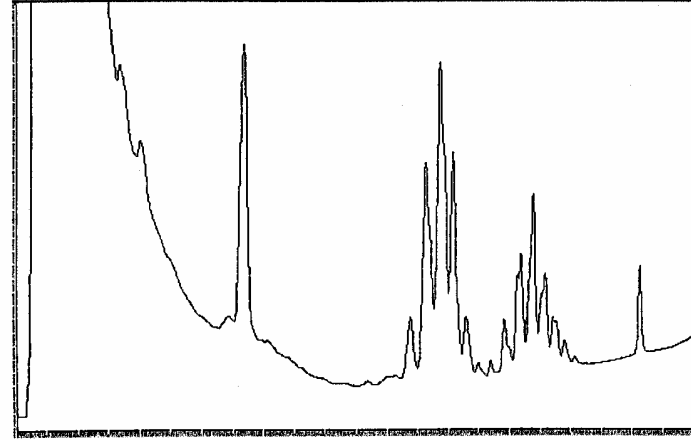
Sample Name: M. chubuense



M. chlorophenicum



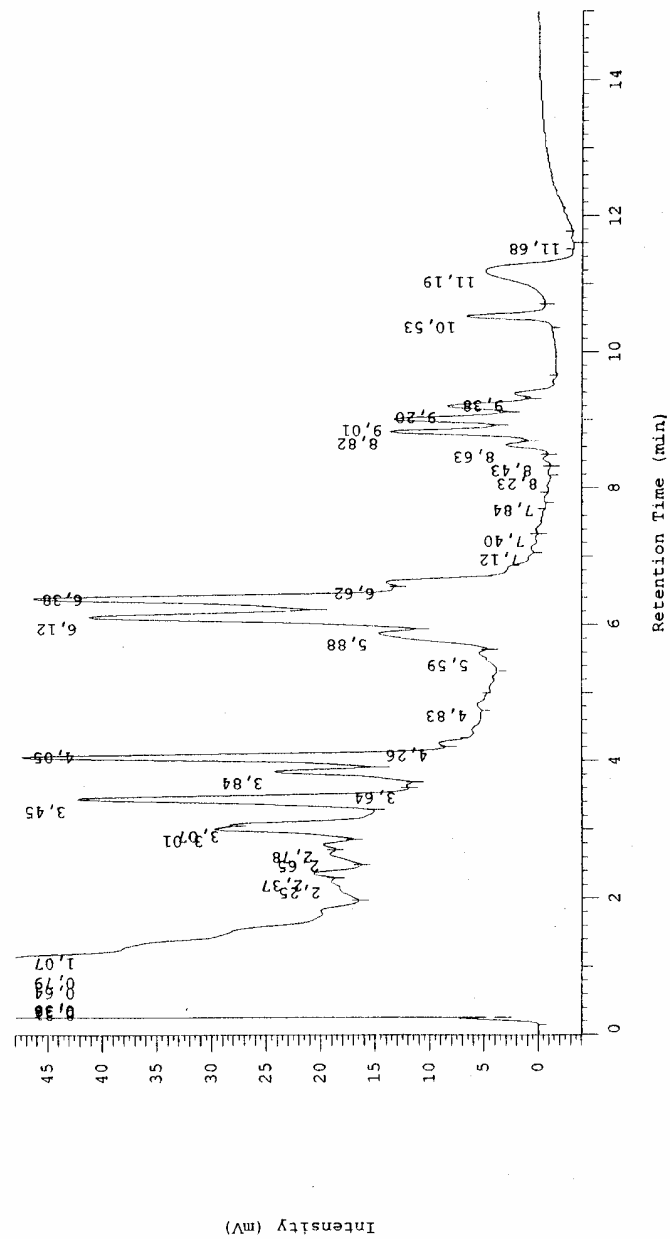
M. confluentis



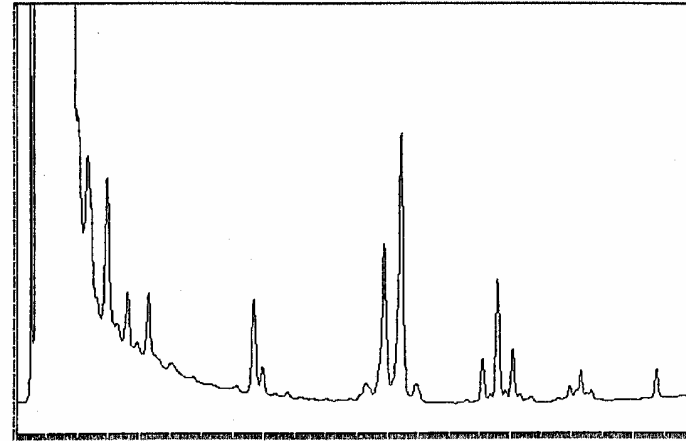
Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0090

Data Desc: IFM CH1 2-D

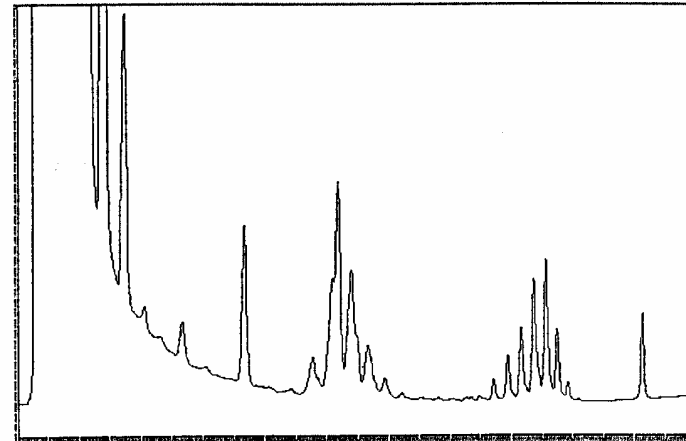
Vial Number: 3 Inj Number: 1 Sample Name: M.conspicuum



M. cookii



M. diernhoferi

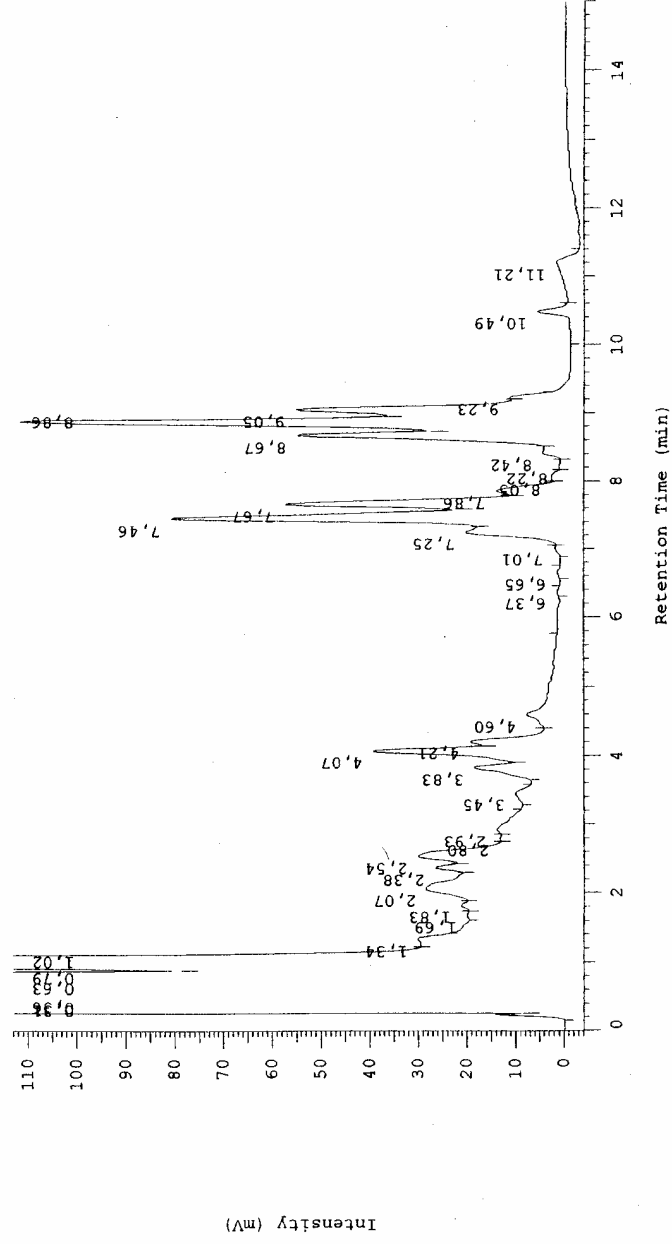


myko standar - Vial 4 Inj 1 M.farcinogen - Channel 1

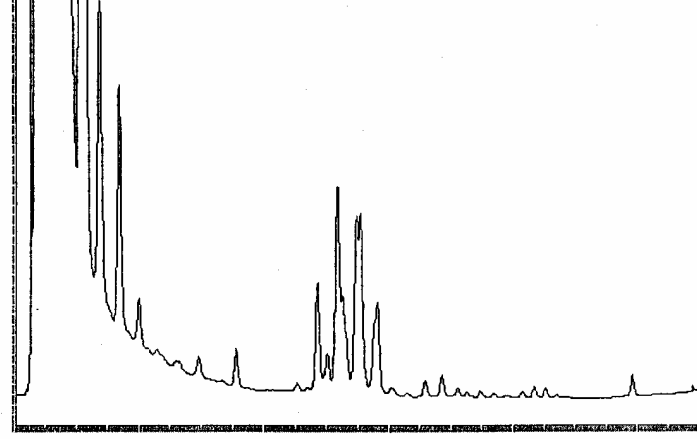
Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0090

Data Desc.: IFM CH1 2-D

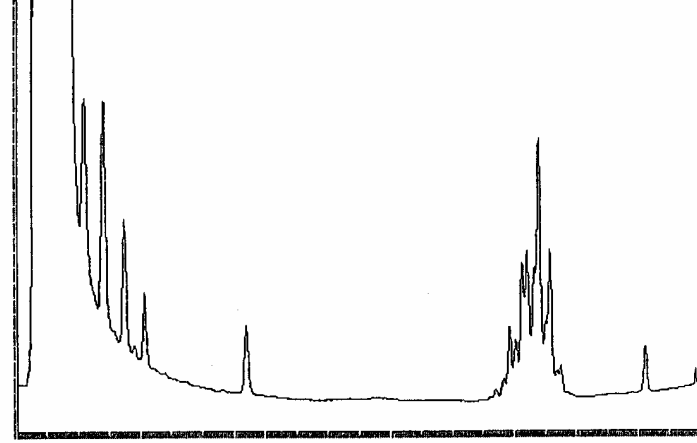
Vial Number: 4 Inj Number: 1 Sample Name: M.farcinogenes



M. duvalii

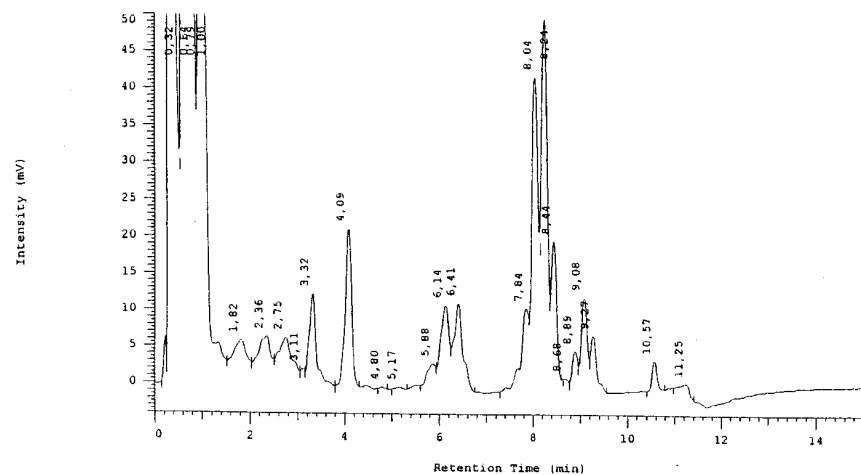


M. fallax

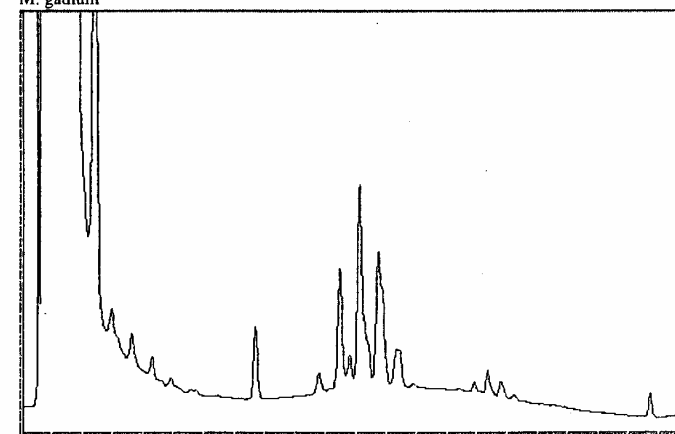


myko standar - Vial 3 Inj 1 M. flavescen - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobak\DATA\0116
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 3 Inj Number: 1 Sample Name: M. flavescen

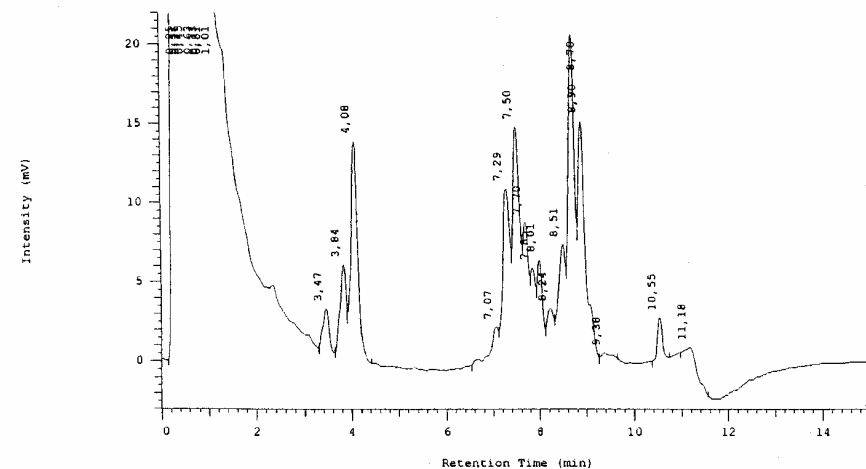


M. gadium

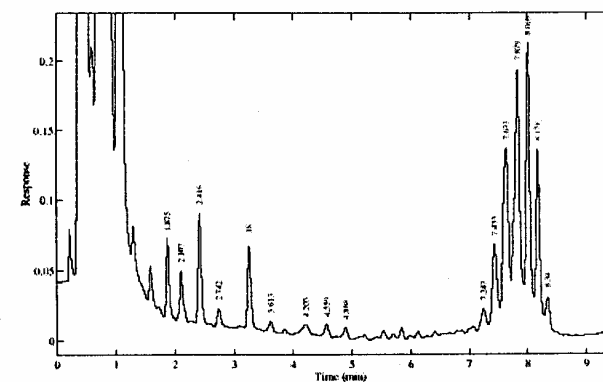


myko standar - Vial 4 Inj 1 M. fortuitum - Channel 1

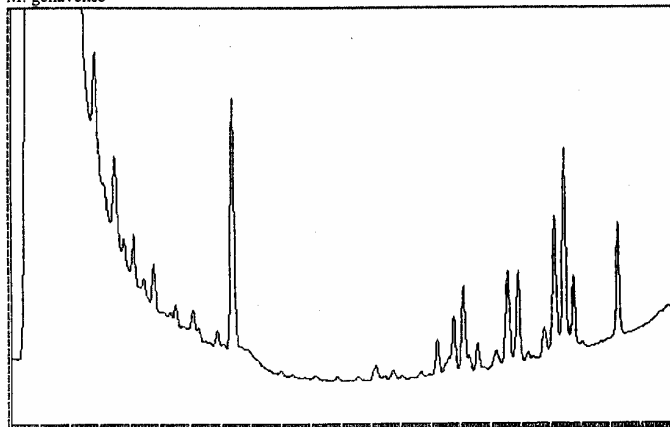
Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobak\DATA\0119
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 4 Inj Number: 1 Sample Name: M. fortuitum



M. gastri

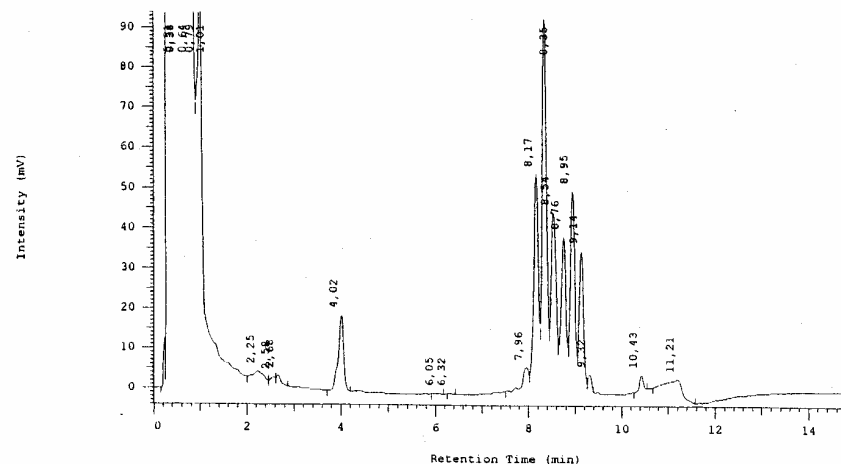


M. genavense



myko standar - Vial 10 Inj 1 M. gordonae - Channel 1

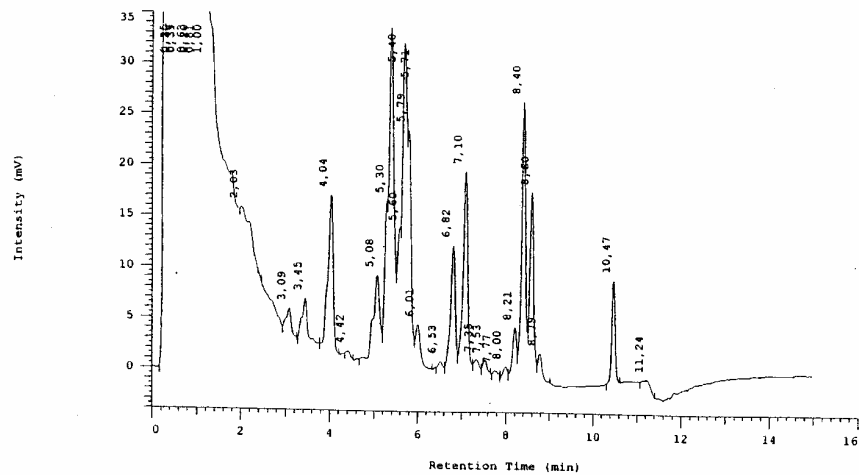
Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0086
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 10 Inj Number: 1 Sample Name: M. gordonae



myko standar - Vial 4 Inj 1 BN3113 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0048
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 4 Inj Number: 1 Sample Name: BN3113

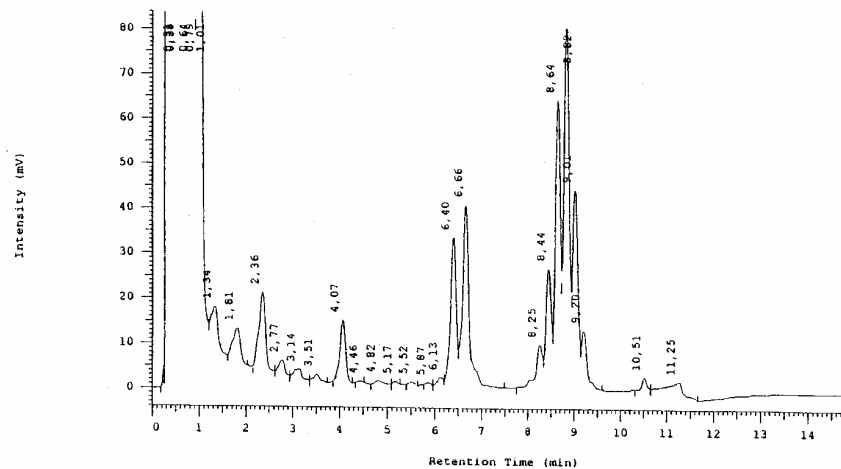
M. gilvum



myko standar - Vial 6 Inj 1 BN 1752 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0104
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 6 Inj Number: 1 Sample Name: BN 1752 (II)

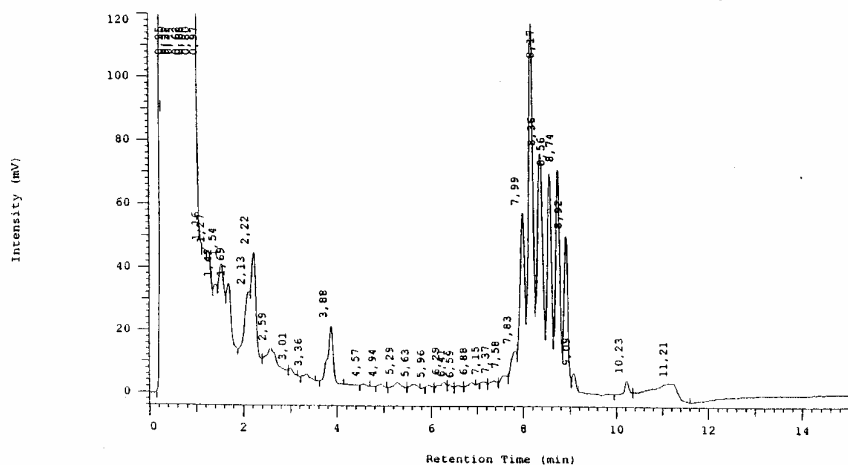
M. gordonae 2



myko standar - Vial 6 Inj 1 BN3182 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0070
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 6 Inj Number: 1 Sample Name: BN3182

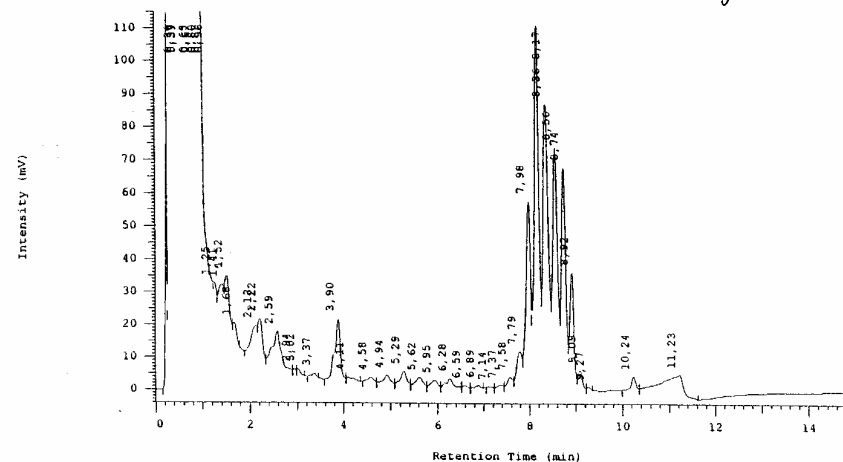
M. goodii III



myko standar - Vial 4 Inj 1 BN3126 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0070
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 4 Inj Number: 1 Sample Name: BN3126

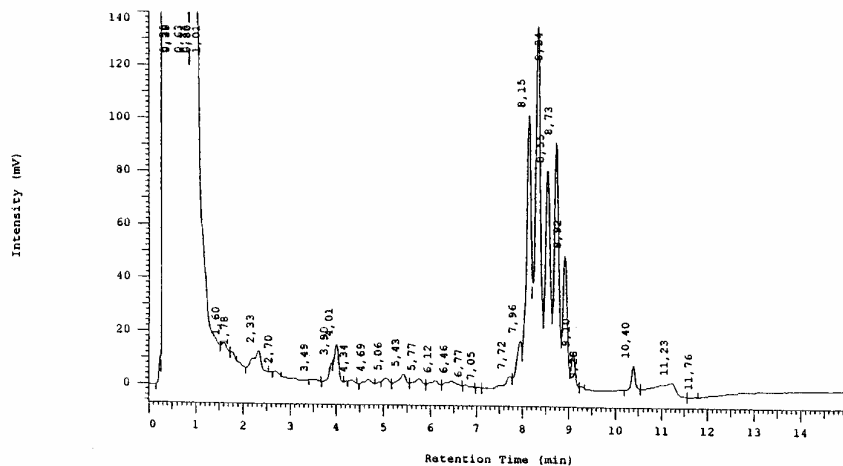
M. goodii XI



myko standar - Vial 6 Inj 1 BN3246 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0067
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 6 Inj Number: 1 Sample Name: BN3246

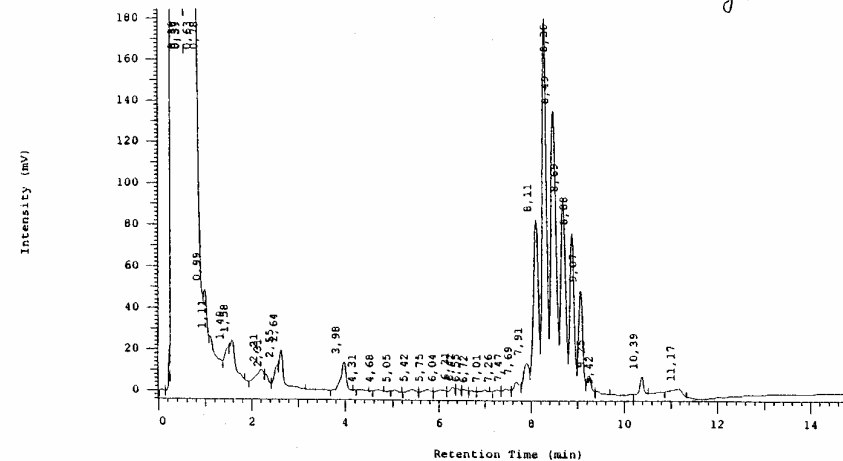
M. goodii VIII



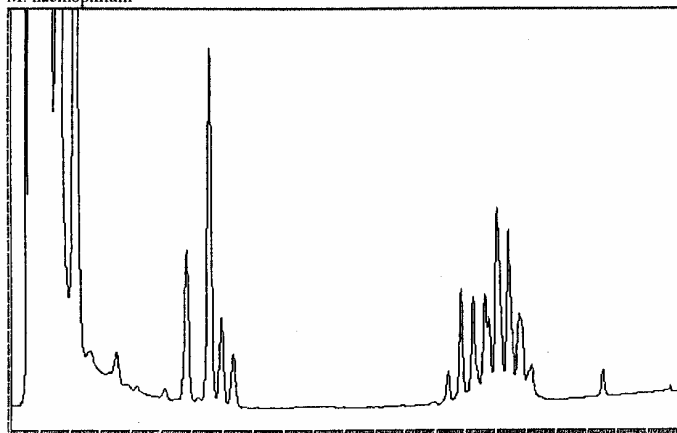
myko standar - Vial 7 Inj 1 BN3586 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0066
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 7 Inj Number: 1 Sample Name: BN3586

M. goodii XIV



M. haemophilum

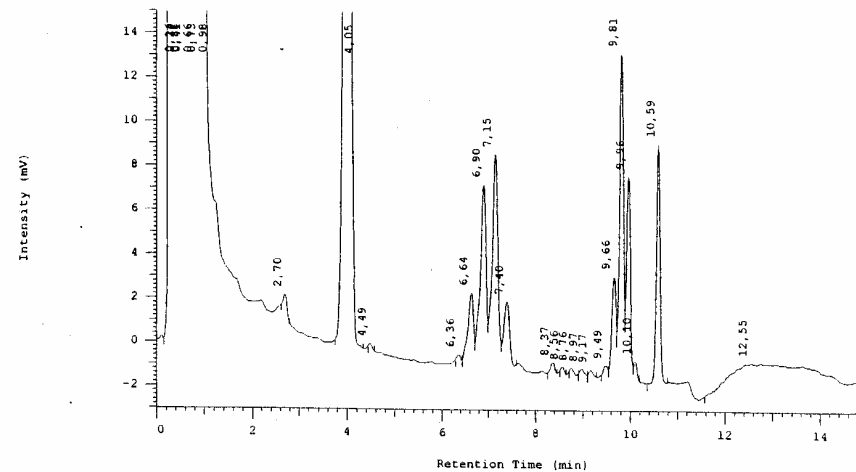


myko standar - Vial 4 Inj 1 M. heckeshor - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0132

Data Desc.: IFM CH1 2-D

Vial Number: 4 Inj Number: 1 Sample Name: M. heckeshorhense

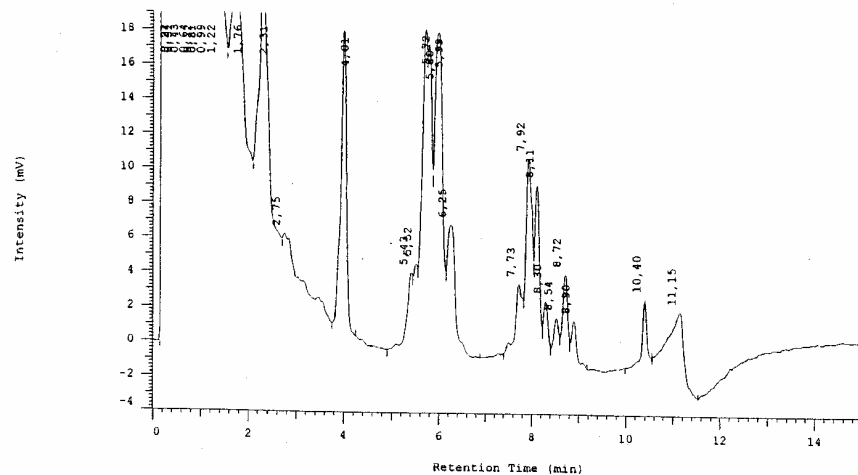


myko standar - Vial 2 Inj 1 M. hassiacum - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0083

Data Desc.: IFM CH1 2-D

Vial Number: 2 Inj Number: 1 Sample Name: M. hassiacum

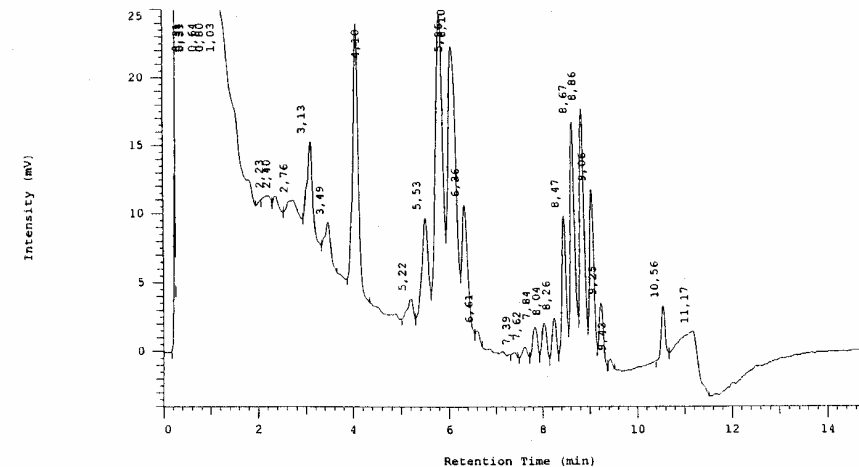


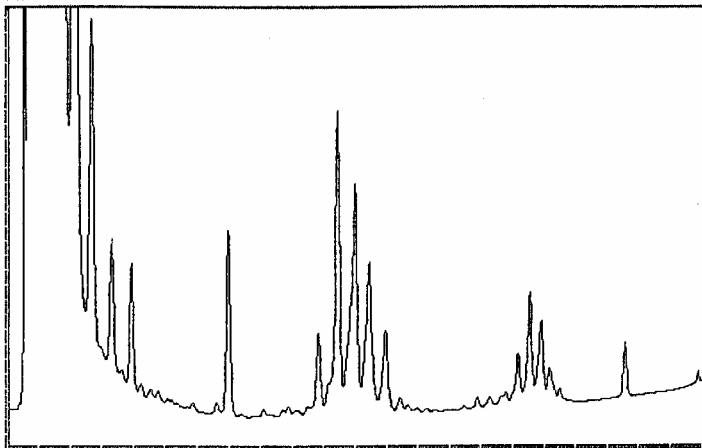
myko standar - Vial 2 Inj 1 M. hodleri - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0088

Data Desc.: IFM CH1 2-D

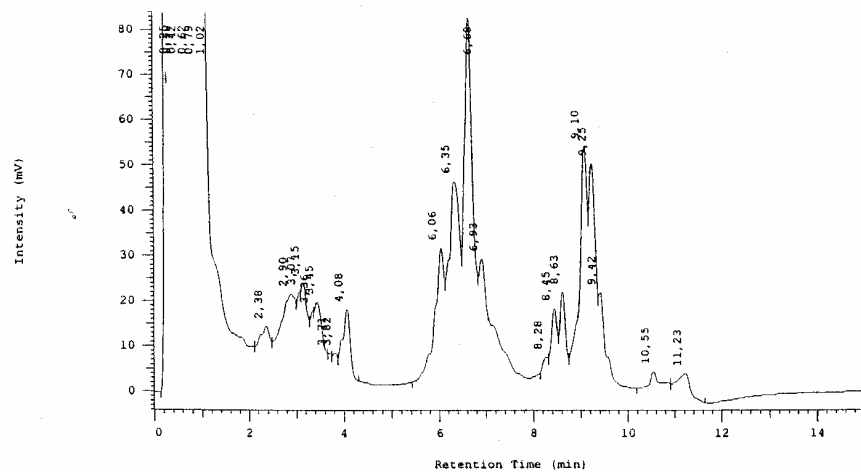
Vial Number: 2 Inj Number: 1 Sample Name: M. hodleri



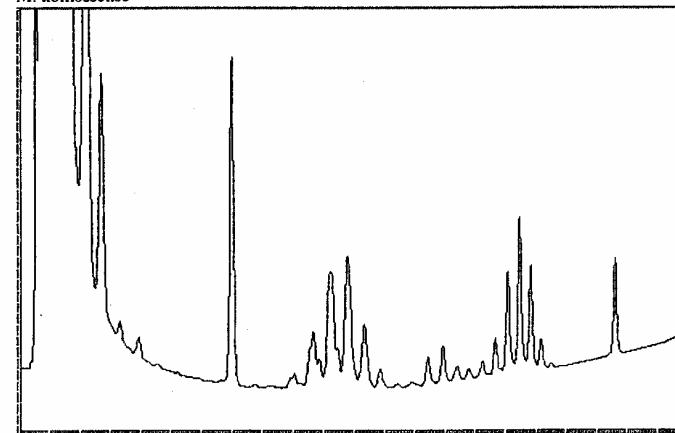
M. hiberniae

myko standar - Vial 5 Inj 1 M. intracell - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0119
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 5 Inj Number: 1 Sample Name: M. intracellulare

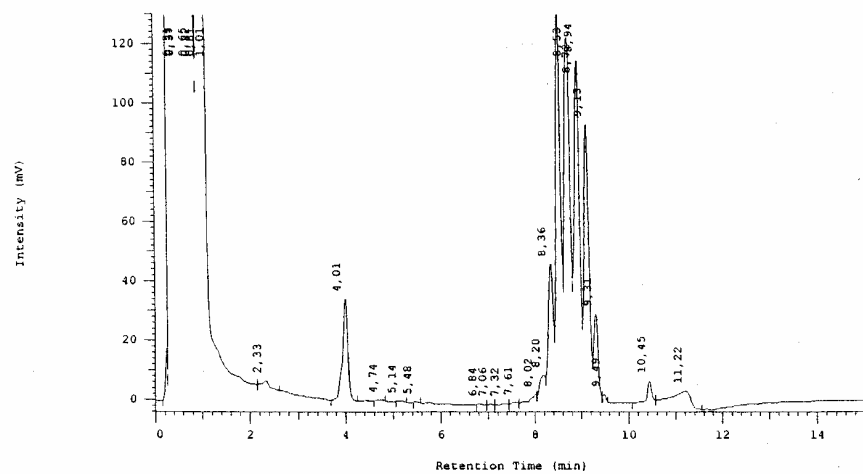


M. komossense

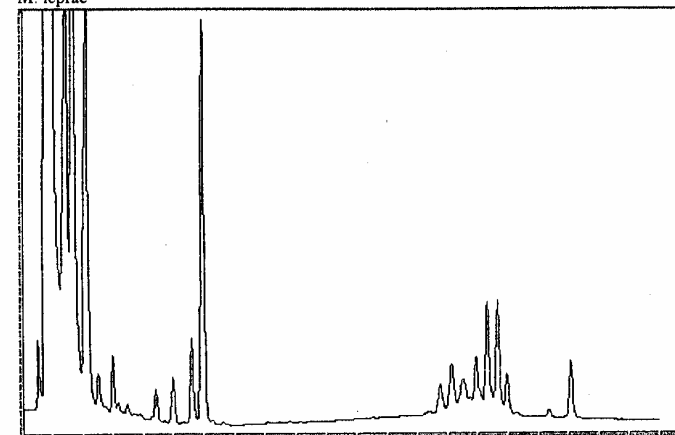


myko standar - Vial 9 Inj 1 M. kansasii - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0088
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 9 Inj Number: 1 Sample Name: M. kansasii



M. leprae



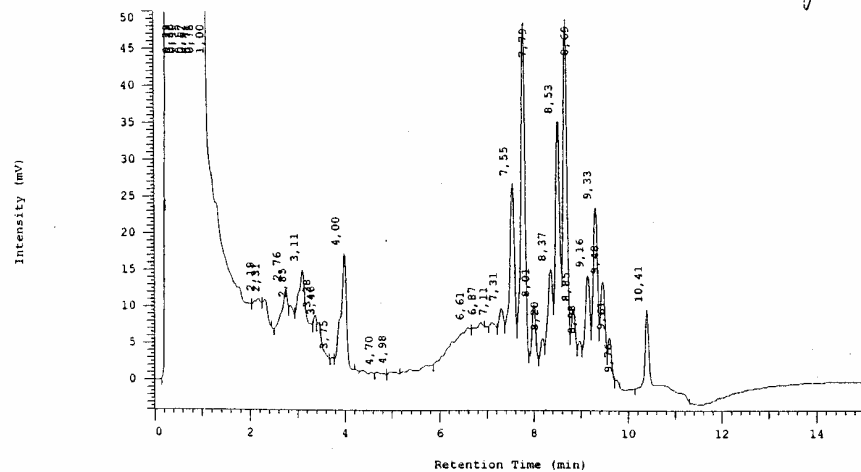
myko standar - Vial 9 Inj 1 BN3260 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobact\DATA\0046

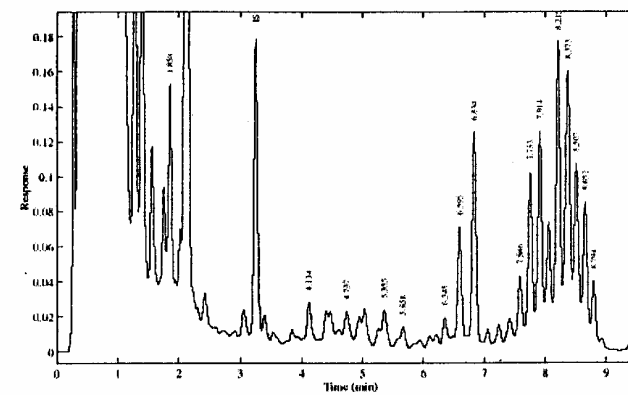
Data Desc.: IFM CH1 2-D

Vial Number: 9 Inj Number: 1 Sample Name: BN3260

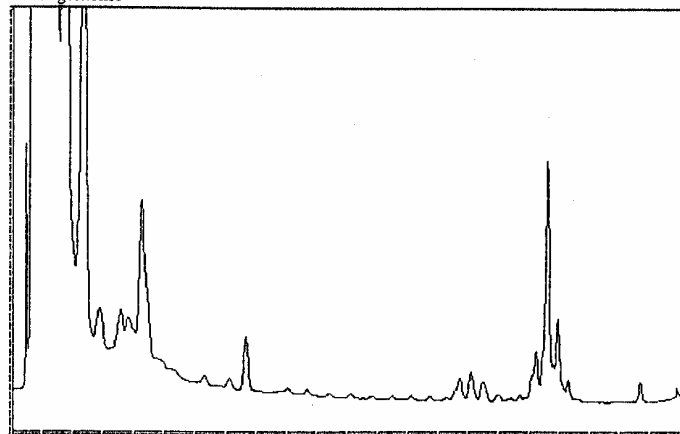
M. lentiflavum



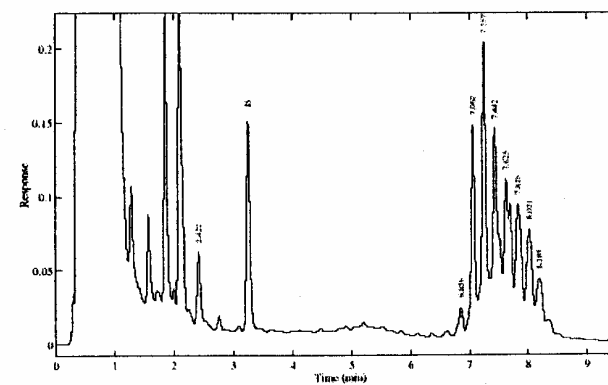
M. malmoense



M. mageritense

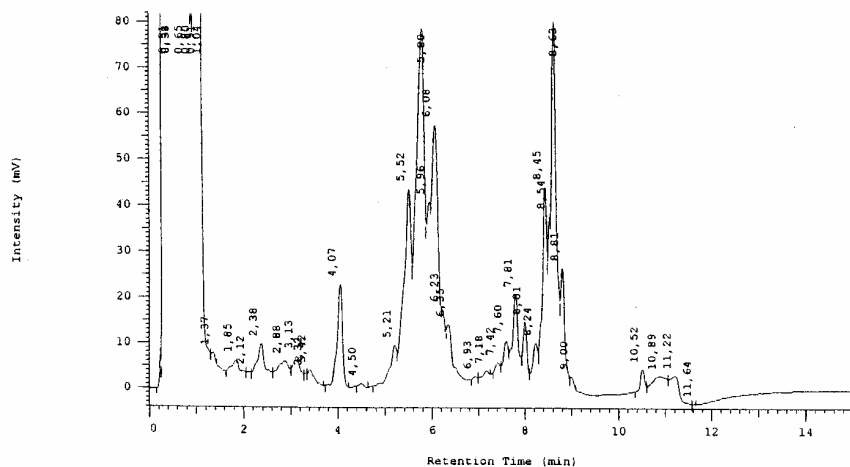


M. marinum



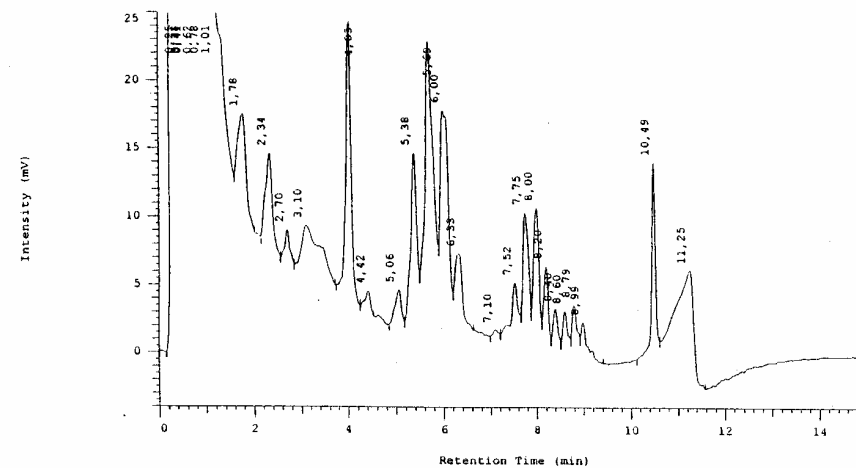
myko standar - Vial 3 Inj 1 M.moriokarie - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0086
Data Desc.: IFM CHI 2-D
Vial Number: 3 Inj Number: 1 Sample Name: M.moriokariense



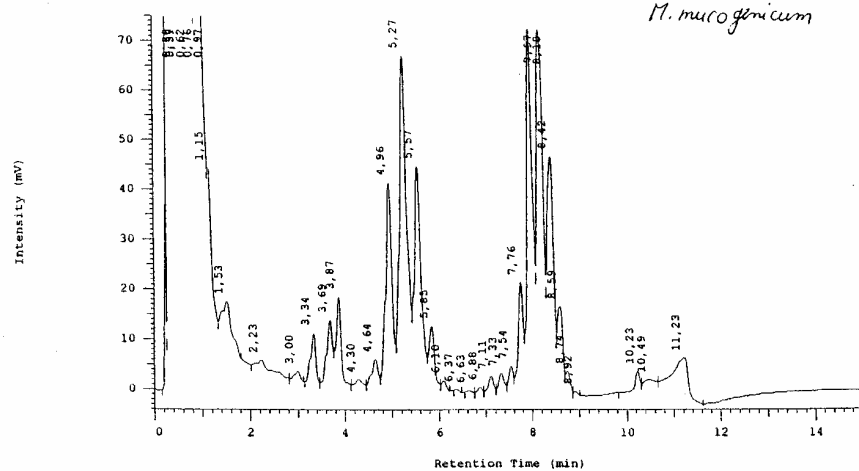
myko standar - Vial 8 Inj 1 BN3122 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0058
Data Desc.: IFM CHI 2-D
Vial Number: 8 Inj Number: 1 Sample Name: BN3122 *M. neglectum*



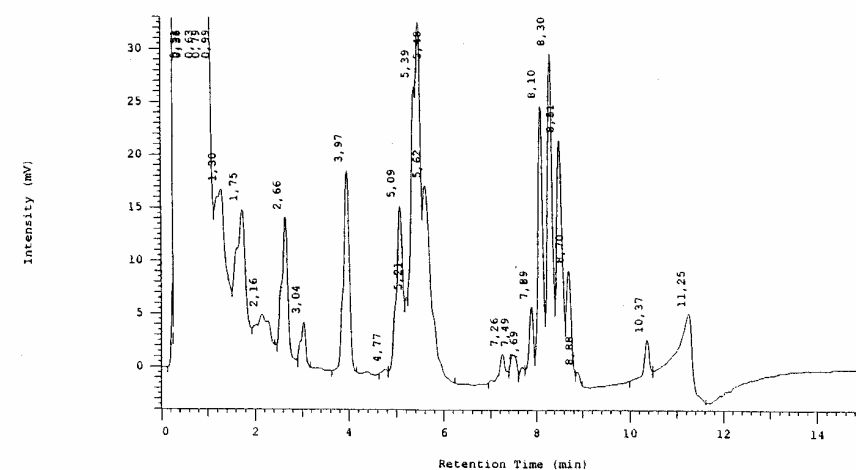
myko standar - Vial 9 Inj 1 BN3599 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0075
Data Desc.: IFM CHI 2-D
Vial Number: 9 Inj Number: 1 Sample Name: BN3599



myko standar - Vial 8 Inj 1 M. neoaurum - Channel 1

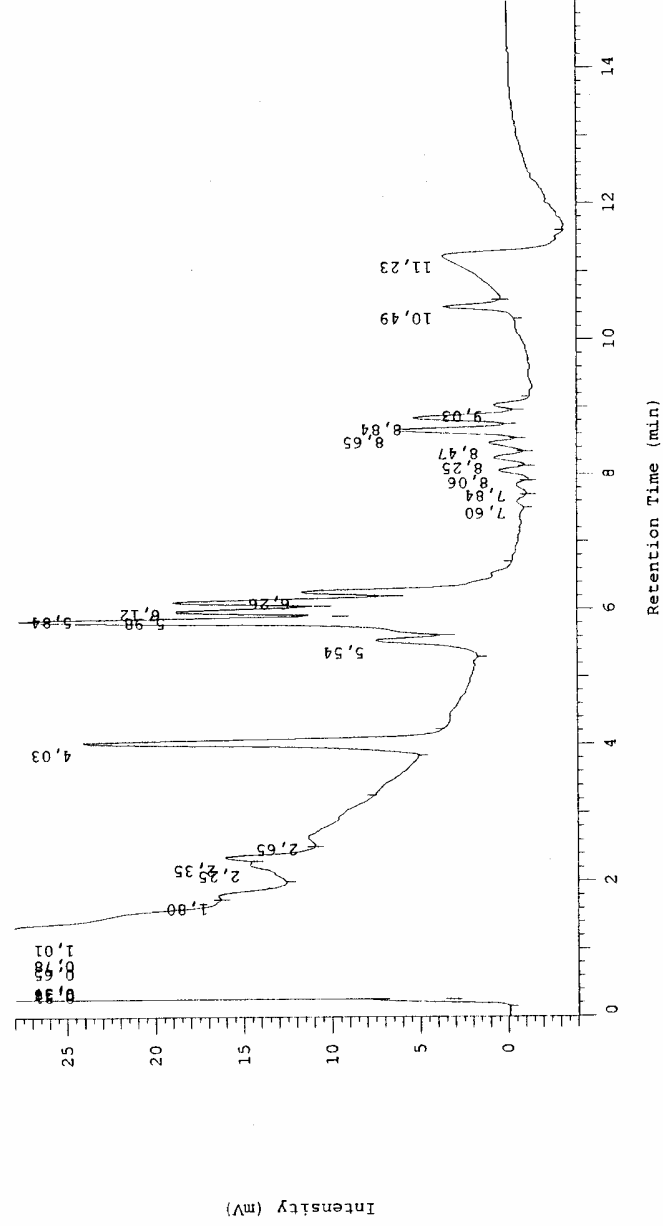
Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0083
Data Desc.: IFM CHI 2-D
Vial Number: 8 Inj Number: 1 Sample Name: M. neoaurum



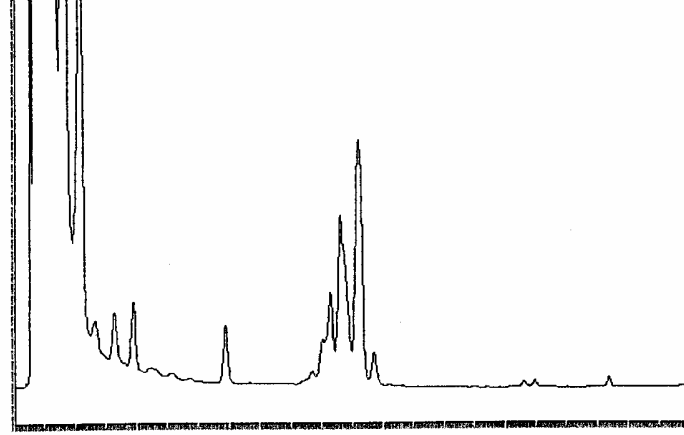
Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0088

Data Desc.: IFM CH1 2-D

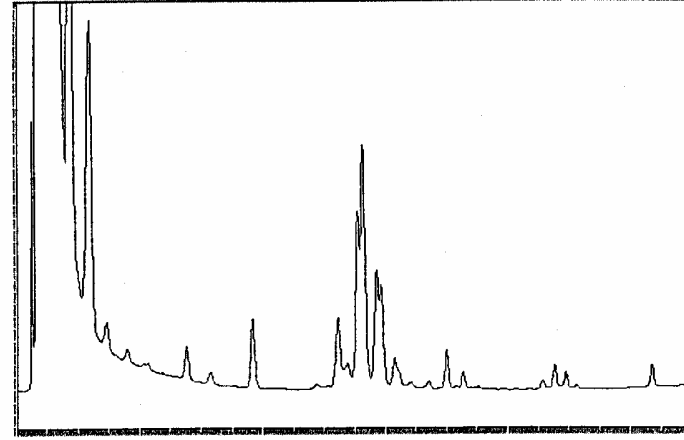
Vial Number: 5 Inj Number: 1 Sample Name: M. nonchromogenicum



M. novocastrense



M. obuense



myko standar - Vial 1 Inj 1 BN3367 - Channel 1

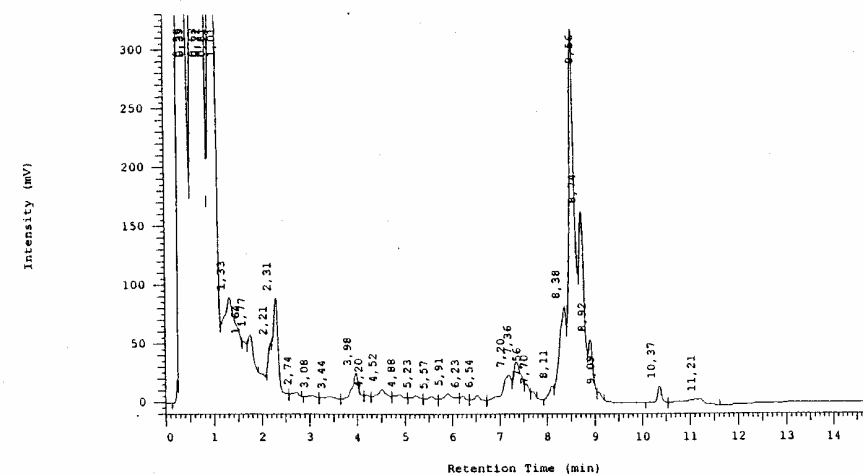
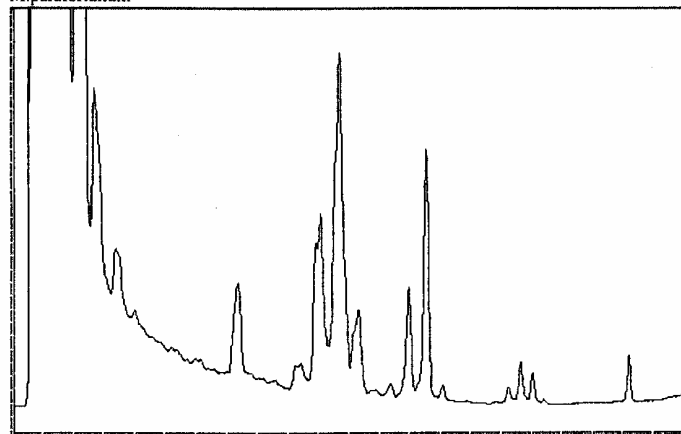
Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0067_001

Data Desc: IFM CH1 2-D

Vial Number: 1 Inj Number: 1 Sample Name: BN3367

M. peregrinum II

M. parafortuitum

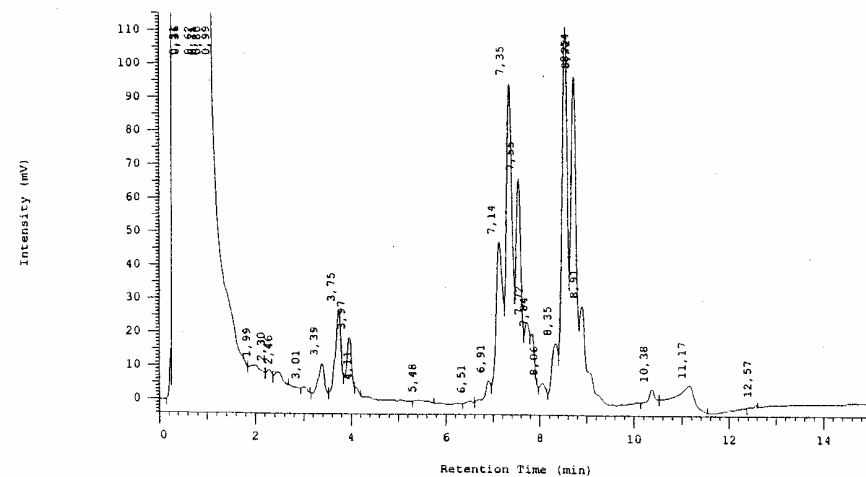


myko standar - Vial 9 Inj 1 M. peregrinu - Channel 1

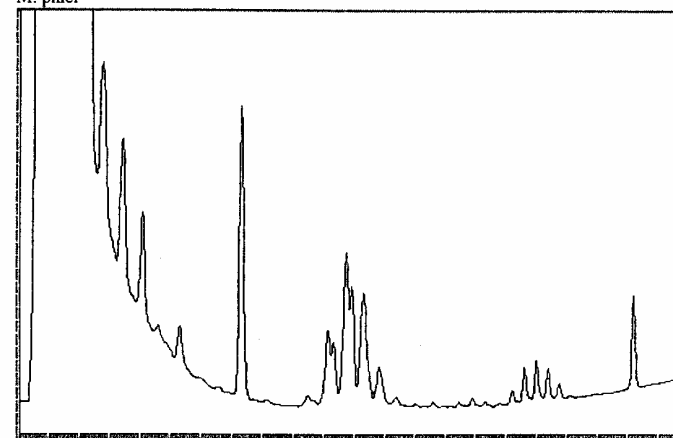
Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0083

Data Desc: IFM CH1 2-D

Vial Number: 9 Inj Number: 1 Sample Name: M. peregrinum

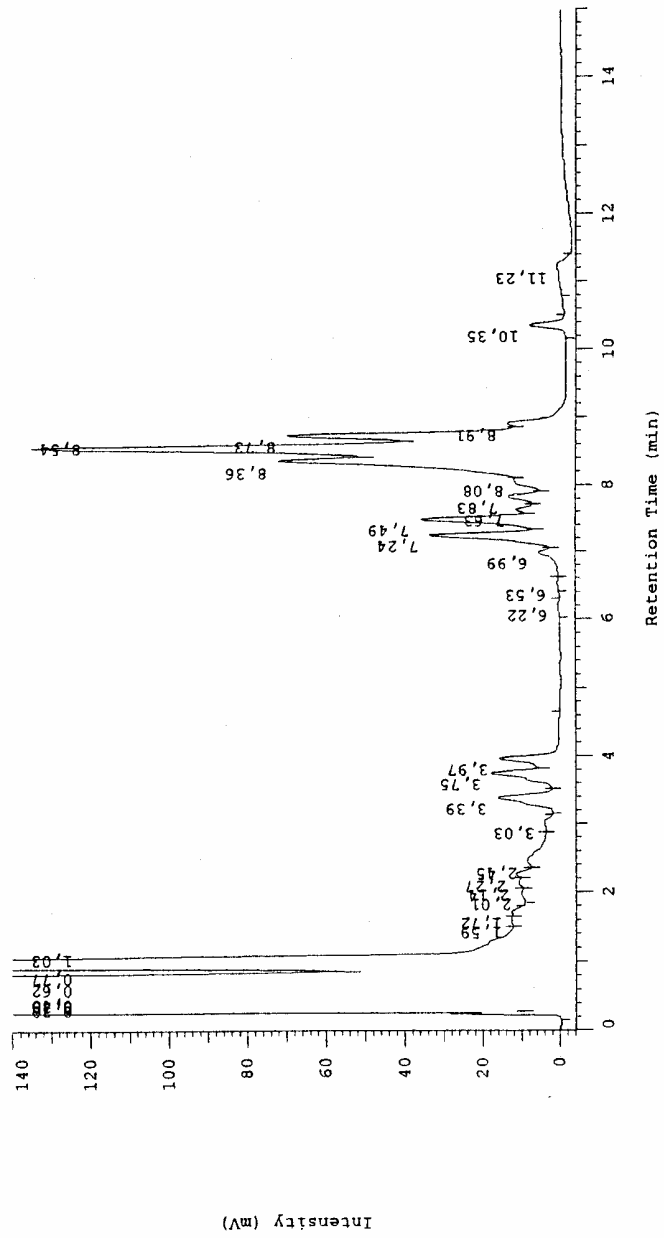


M. phlei

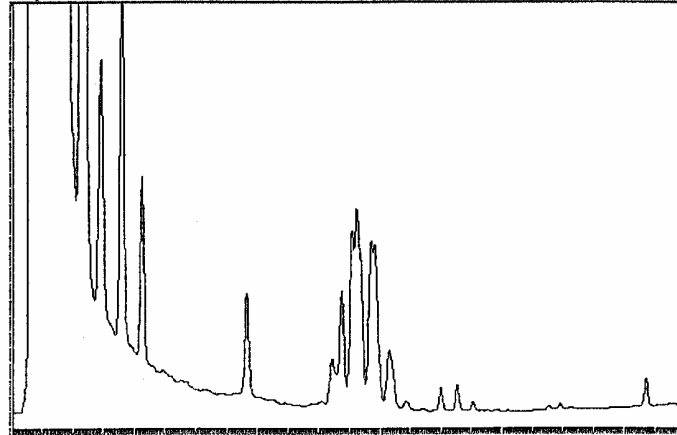


Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0068
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 3 Inj Number: 1 Sample Name: BN3225

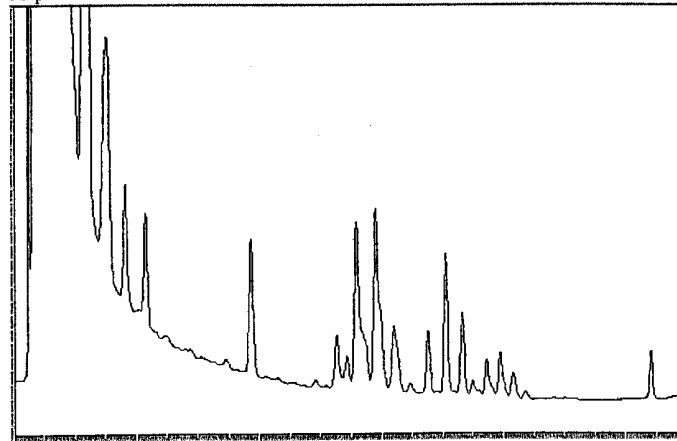
M. porcinum

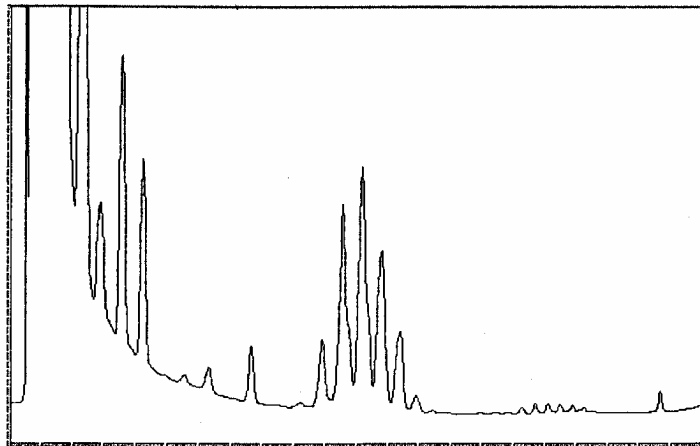
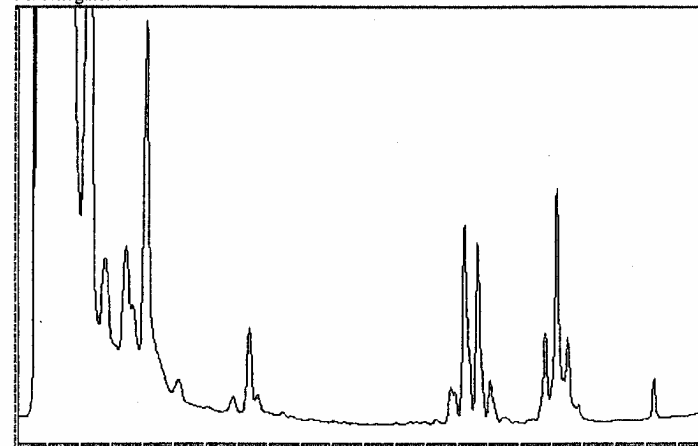
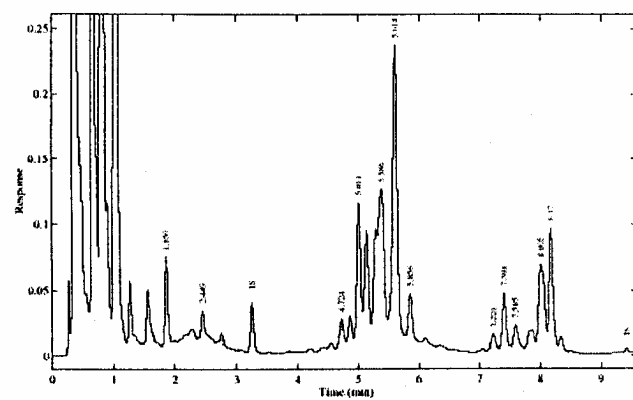
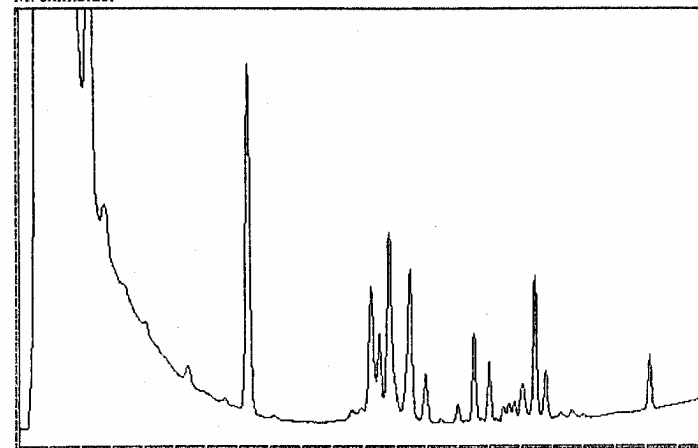


M. poriferae

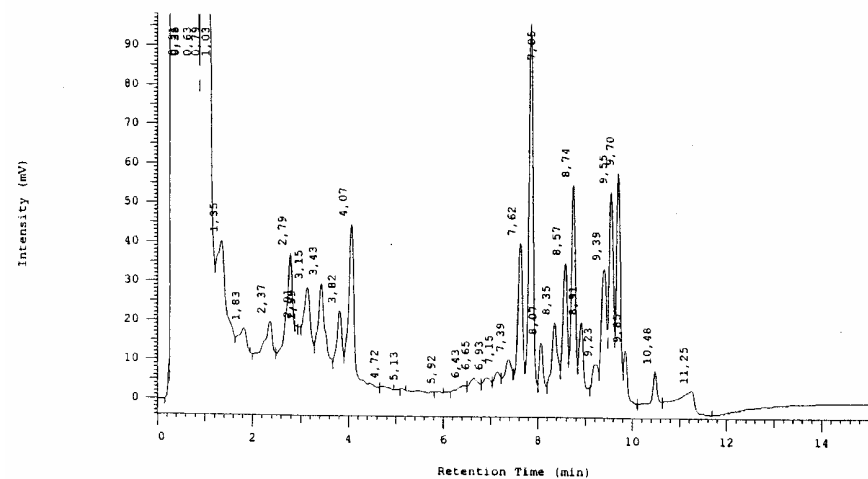


M. pulveris

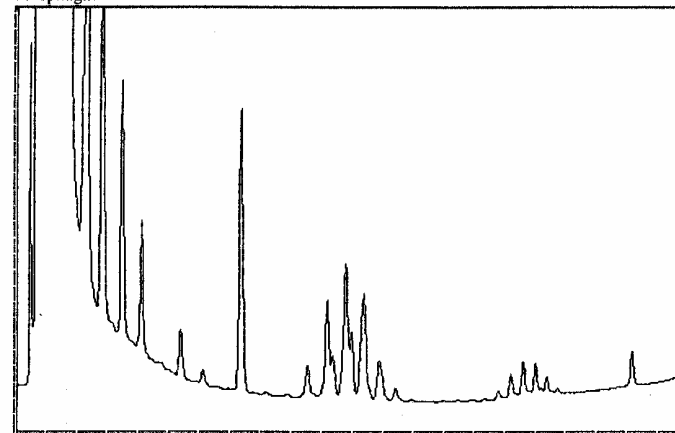


M. rhodesiae*M. senegalense**M. scrofulaceum**M. shimoidei*

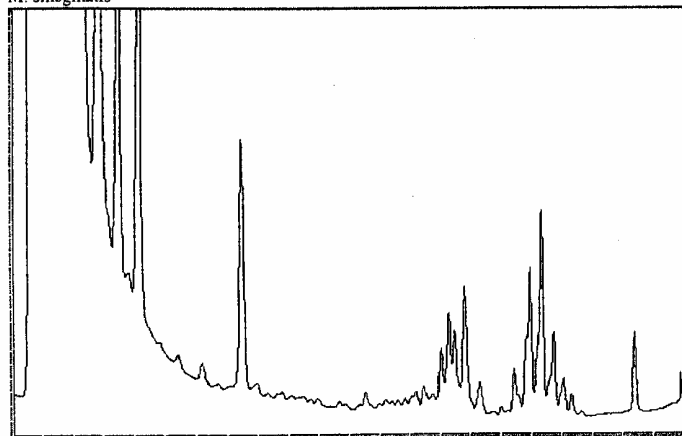
Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0090
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 5 Inj Number: 1 Sample Name: Leerlauf Standard



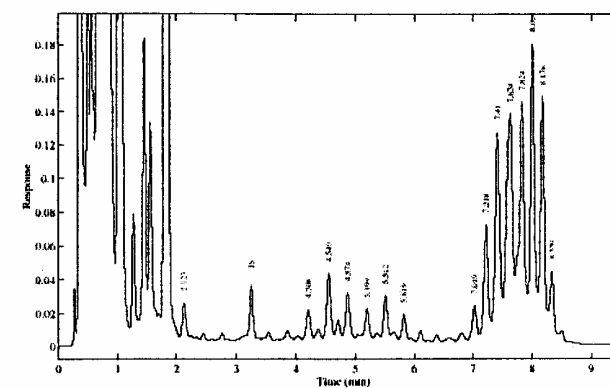
M. sphagni



M. smegmatis



M. szulgai

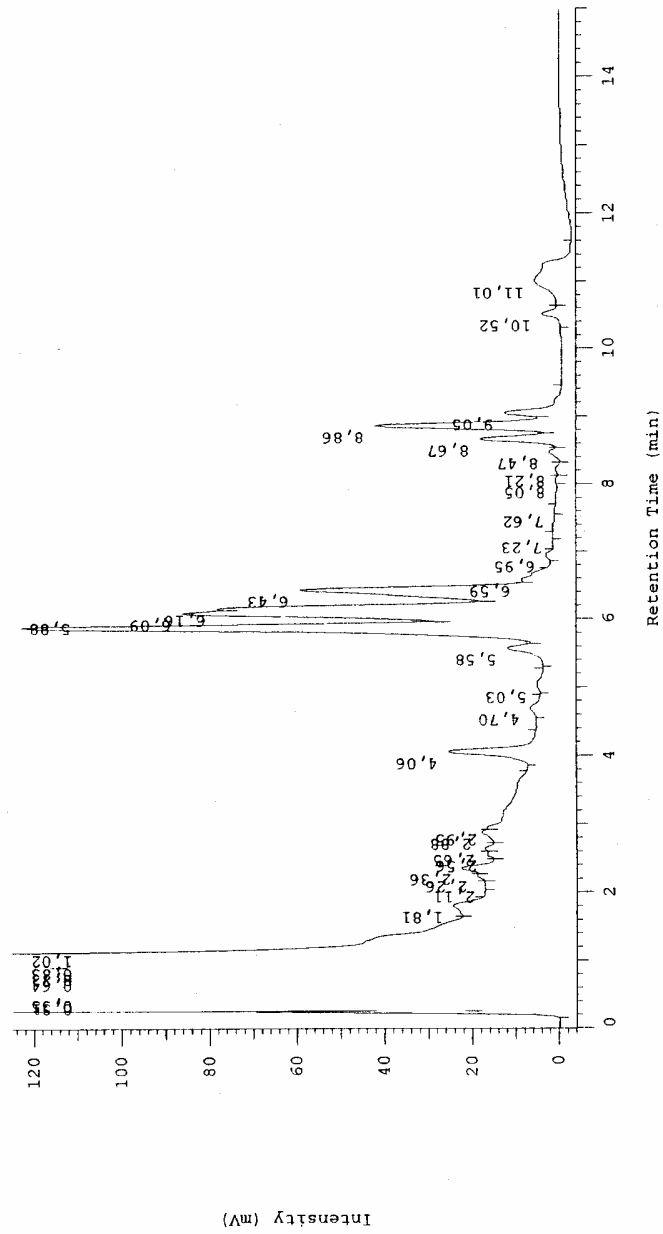


myko standar - Vial 4 Inj 1 M. terrae - Channel 1

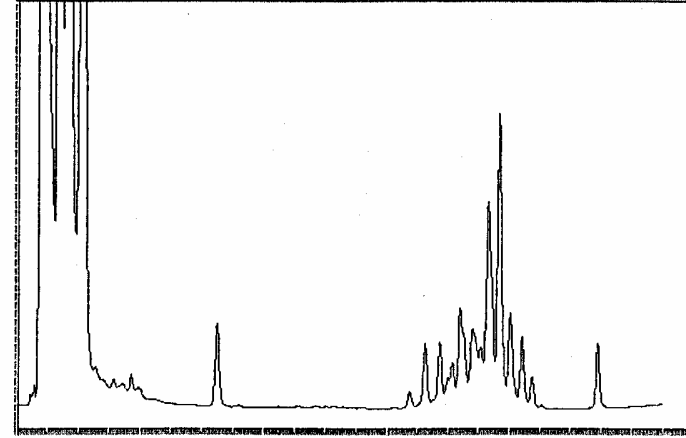
Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0088

Data Desc: IFM CH1 2-D

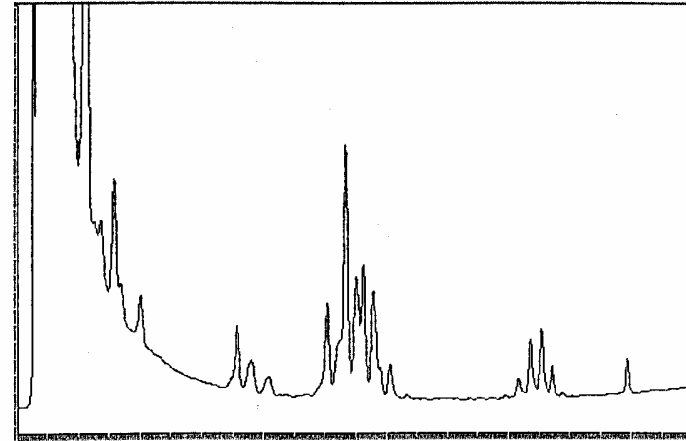
Vial Number: 4 Inj Number: 1 Sample Name: M. terrae



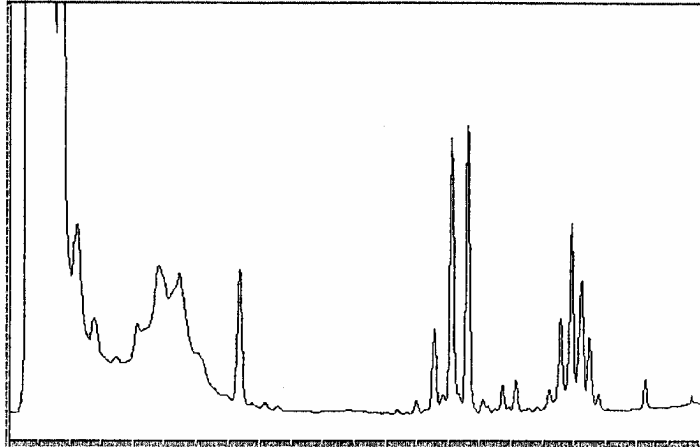
M. thermoresistibilis



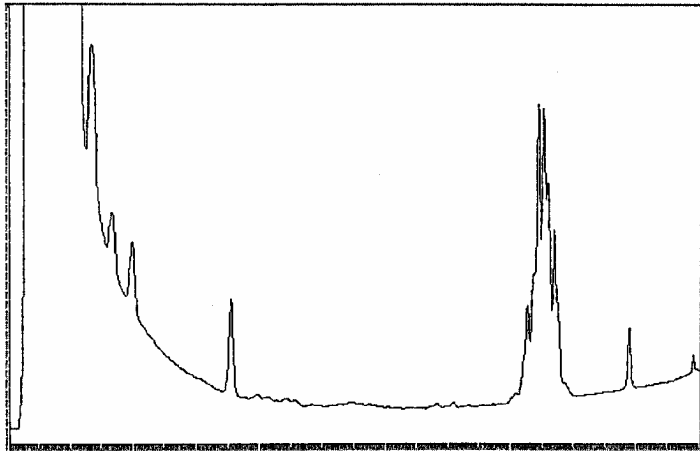
M. tokaiense



M. triplex



M. triviale

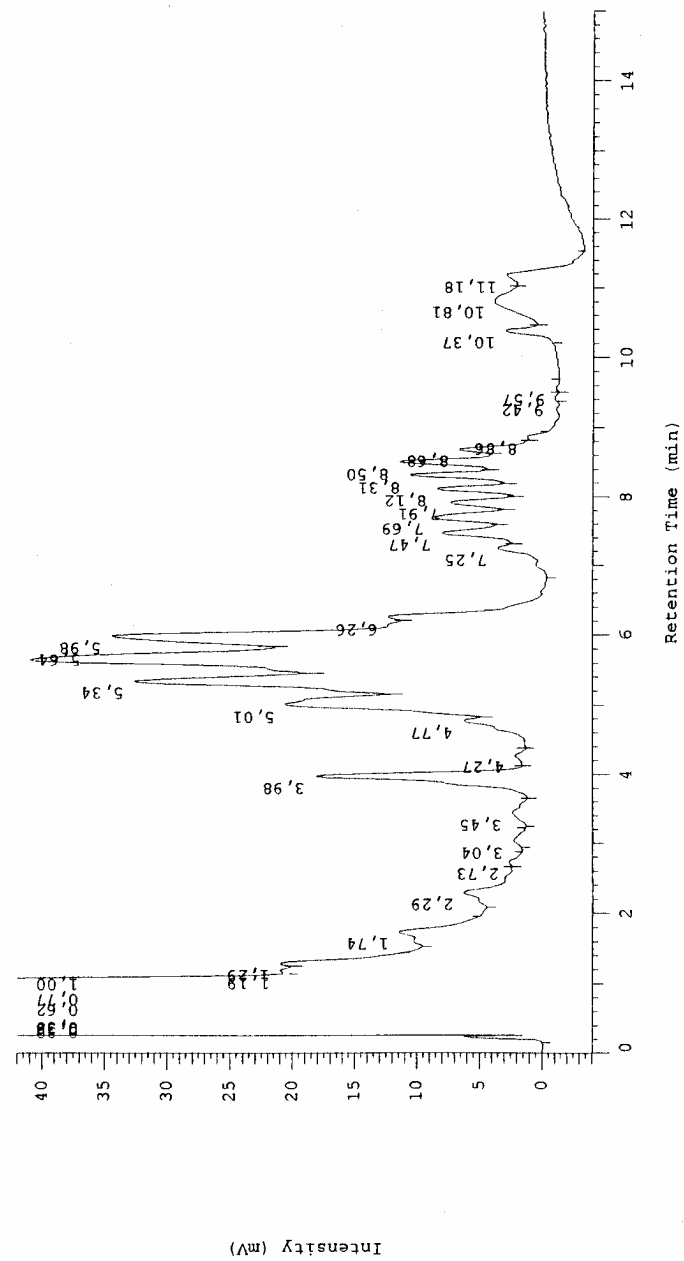


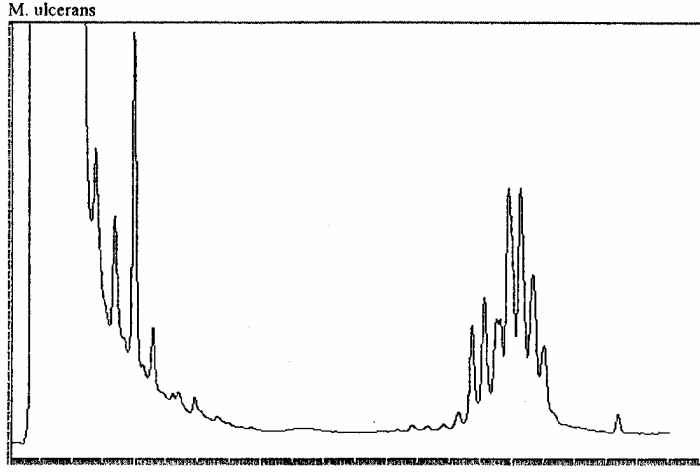
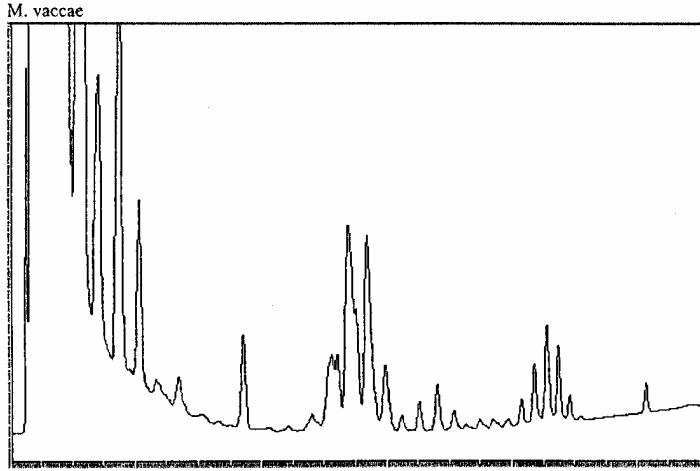
myko standar - Vial 4 Inj 1 M. tusciae - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0083

Data Desc.: IFM CH1 2-D

Vial Number: 4 Inj Number: 1 Sample Name: M. tusciae



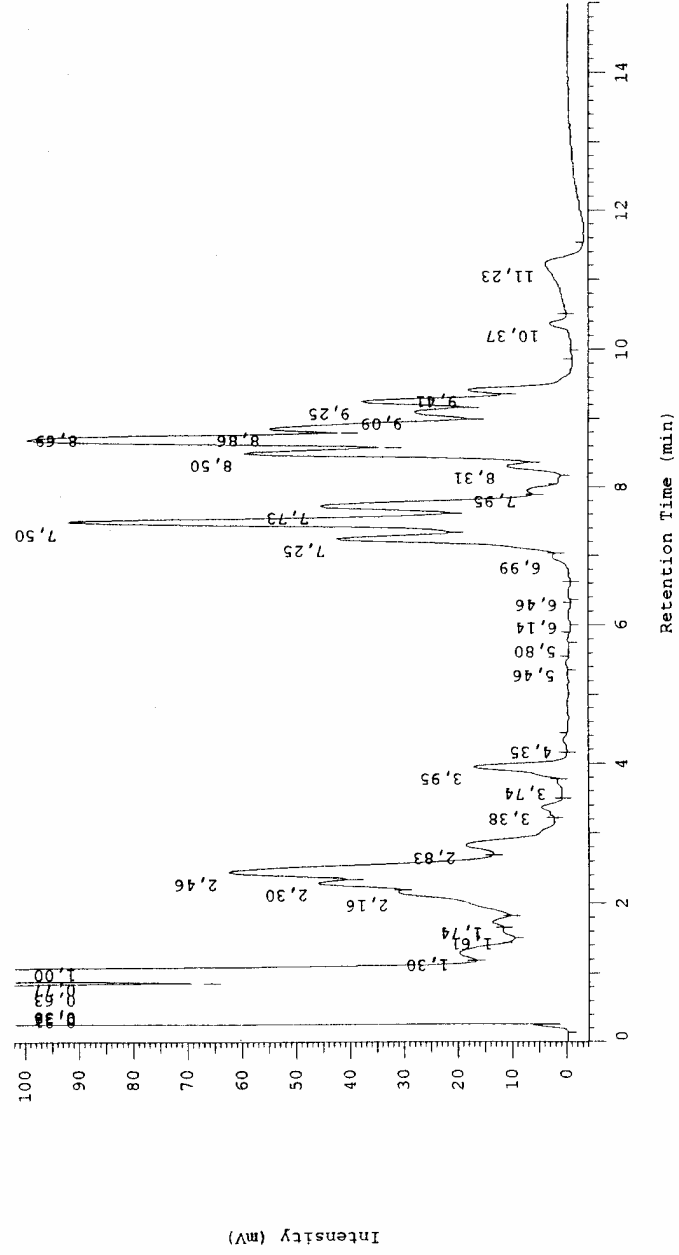


myko standar - Vial 10 Inj 1 M.wolinskyi - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0083

Data Desc.: IFM CH1 2-D

Vial Number: 10 Inj Number: 1 Sample Name: M.wolinskyi

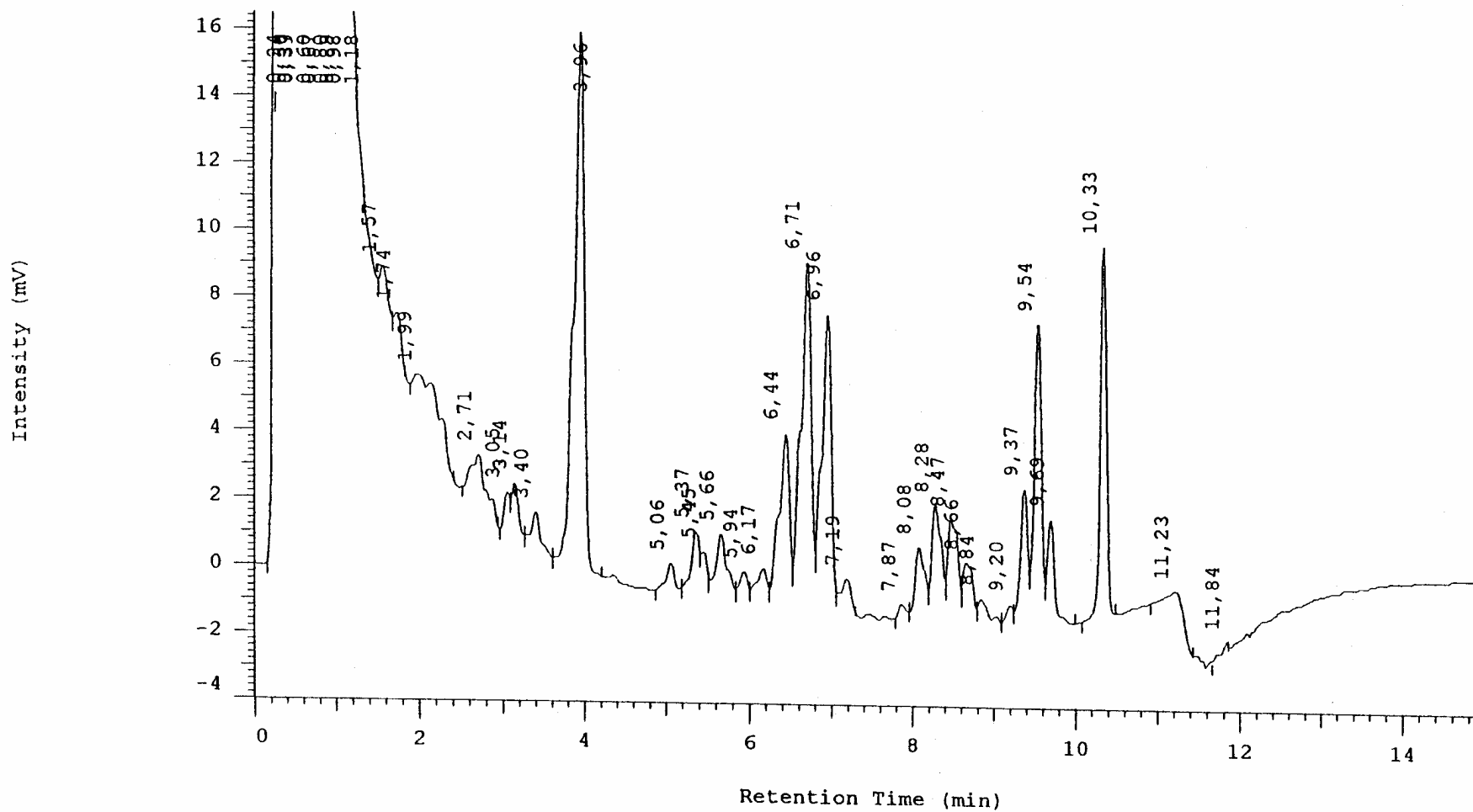


myko standar - Vial 5 Inj 1 BN3133 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobak\DATA\0047

Data Desc.: IFM CH1 2-D

Vial Number: 5 Inj Number: 1 Sample Name: BN3133

M. xenopi

8.2 Anhang 2: Referenzdaten der Spacer –RFLP (s. Kap. 2.8.2, 3.2.1)

Im folgenden sind die RFLP-Muster des 16S-23S.Spacers bekannter Mykobakterienspezies (s. Kap.2.8.2, Kap.3.2.1) aufgeführt, die als Referenzen dienten für die Zuordnung der erhaltenen Fragmentmuster der unbekannten Mykobakterienisolate (s. Tab.9).

Als Referenzmuster dienten die Ergebnisse von ROTH et al.(1999), welche als Ausschnitt der Publikation entnommen wurden. Nähere Angaben finden sich in obig genannter Publikation.

Anmerkung zur Anlage

Aufgeführt sind die Größen der jeweiligen PCR-Produkte in Basenpaaren und die erhaltenen Fragmente nach Verdau mit *HaeIII* und *CfoI*. Zur weiteren Differenzierung verwendeten die Autoren bei einigen Stämmen weitere Enzyme (*TaqI*, *AvaII*, *MspI*, *DdeI*, *HinfI*).

Die Restriktionsfragmente, die nach Verdau mit *HaeIII* erhalten wurden, sind in Kästen unter der Spalte *HaeIII* aufgeführt. Die Fragmente die mit *CfoI* erzielt wurden, wurden zum Teil Buchstaben (A-D) zugeordnet, wobei jeder Buchstabe ein Fragmentmuster repräsentiert. Gleiches wurde für die Restriktionsfragmente die mit *DdeI* bzw. *TaqI* erhalten wurden (A-E) erstellt.

Die Zahl 0 bedeutet, dass das PCR-Produkt nicht geschnitten wurde durch das jeweilige Enzym.

CfoI-Muster Gruppen A-D:

- A. 126-144, 91-96
- B. 129-146, 83
- C. 126, 63,30
- D. 160, 62

DdeI-Muster Gruppen A-E:

- A. 120, 90
- B. 120, 80
- C. 120, 70
- D. 120, 100
- E. 314

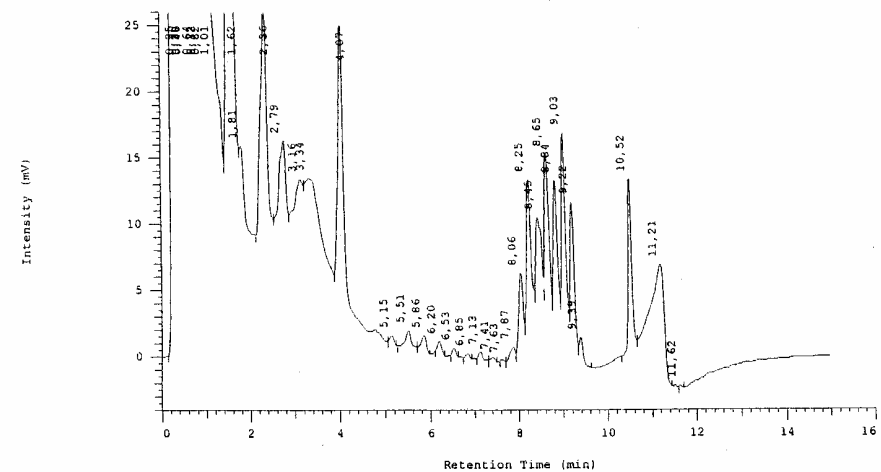
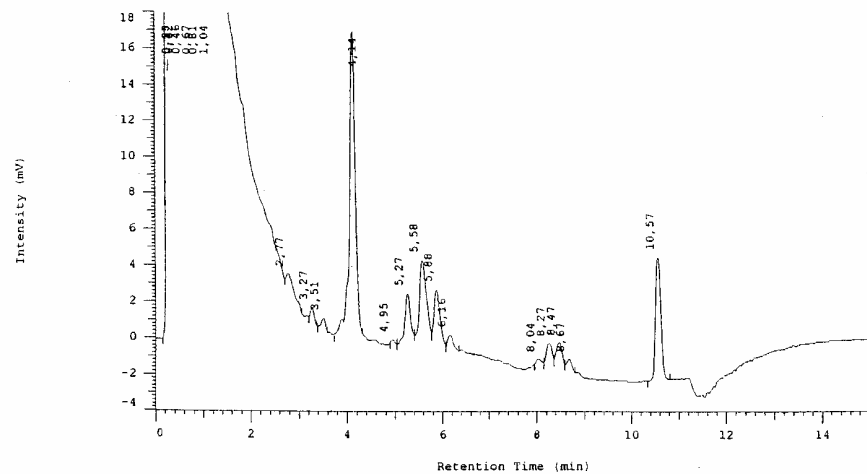
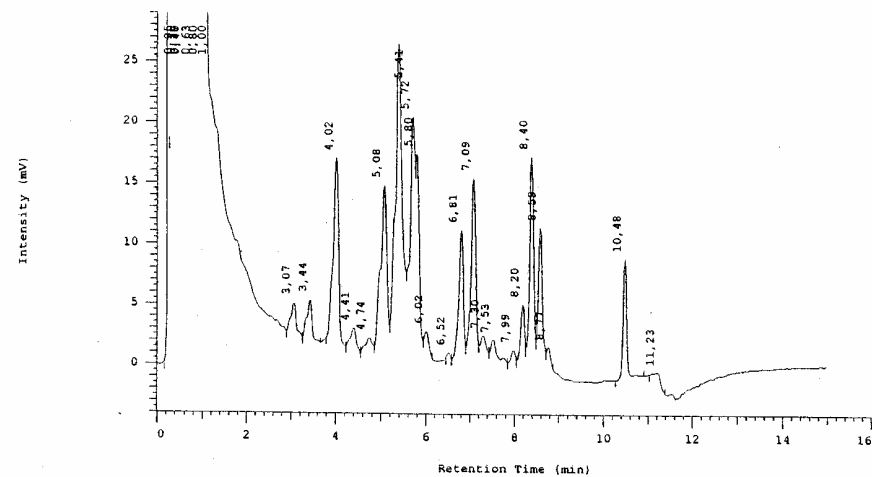
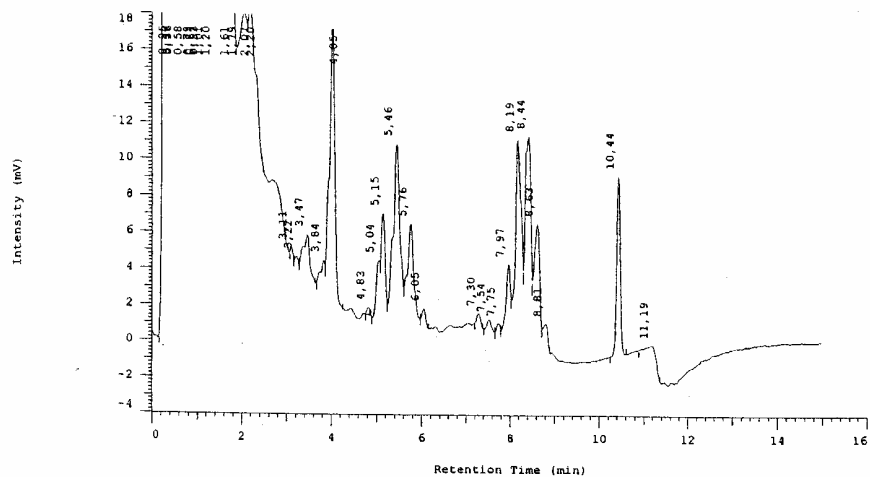
TaqI –Muster Gruppe A: 155, 70

PCR product	<i>NotI</i>	<i>CfoI</i>	<i>DdeI</i>	<i>TaqI</i>	Species and RFLP genotype	No. of strains
205	130, 70	— 0			<i>M. xenopi</i>	(59)
212	95, 75, 42	— B			<i>M. kansasii</i> III	(0)
	168, 51	— 144, 75			<i>M. asiaticum</i>	(3)
	113, 57, 51	— 0			<i>M. tuberculosis</i>	(90)
	137, 52, 33	— A			<i>M. interjectum</i>	(1)
	138, 85	— 0			<i>M. intermedium</i>	(4)
	95, 85, 42	— A — A (AvaI)			<i>M. kansasii</i> IV	(9)
		— A — A (AvaI)			<i>M. avium</i>	(111)
		— 0 — C			<i>M. bohemicum</i>	(2)
		— 0 — A			<i>M. intracellulare</i> I	(19)
		— 0 — C			<i>M. scrofulaceum</i> Ia	(10)
217-220	127, 93	— 0 — A			<i>M. intracellulare</i> IIa	(14)
		— A — C			<i>M. scrofulaceum</i> Ib	(1)
		— 0			<i>M. sp. (scrofulaceum)</i>	(5)
	92, 75, 52	— 0			<i>M. intracellulare</i> IIb	(1)
	85, 74, 42	— C			<i>M. malmoense</i>	(11)
		— 0			<i>M. sp. (malmoense)</i>	(2)
	85, 71, 64	— A — A			<i>M. kansasii</i> IIa	(5)
		— B			<i>M. szulgai</i>	(8)
	80, 79, 63	— D			<i>M. sp. (xenopi)</i>	(2)
	149, 71	— A			<i>M. kansasii</i> IIb	(10)
				0 (<i>MspI</i>)	<i>M. simiae</i>	(15)
				A	<i>M. genavense</i>	(11)
225	85, 80, 42	— 0		A	<i>M. lentiflavum</i>	(5)
				A	<i>M. triplex</i>	(2)
231	146, 85	— A			<i>M. gastri</i>	(5)
237	152, 85	— A			<i>M. kansasii</i> VI	(4)
230	151, 79	— B			<i>M. shimoidei</i>	(3)
211	No restriction	— 0			<i>M. gordonae</i>	(48)
220	No restriction	— 0 — A			<i>M. kansasii</i> I	(23)
		— 0			<i>M. marinum/ulcerans</i>	(16/3)
		— A — A (<i>HinfI</i>)			<i>M. kansasii</i> V/ <i>M. leprae</i>	(1/0)
224	No restriction	— A — E			<i>M. celatum</i>	(15)
231	No restriction	— B — D			<i>M. sp. (gastri)</i>	(10)
234-237	No restriction	— 0 — D			<i>M. conspicuum</i>	(1)
		— A			<i>M. haemophilum</i>	(3)
305	No restriction	— 212, 86			<i>M. triviale</i> I	(1)
		— 180, 80, 40			<i>M. triviale</i> II	(1)
310	175, 90, 48	— 236, 40, 30 — 180, 127			<i>M. nonchromogenicum</i> I	(3)
		— 236, 70 — 180, 127			<i>M. nonchromogenicum</i> II	(1)
318	97, 80, 44	— 0 — 0			<i>M. terrae</i> I	(1)
314	170, 94, 50	— 244, 70 — 254, 60			<i>M. terrae</i> II	(2)
		— 0			<i>M. terrae</i> III	(5)
		— 190, 60, 55 — 0			<i>M. terrae</i> IV	(1)

PCR product	HaeIII fragments	CfoI	TaqI	Species and RFLP genotype	No. of strains
257	— No restriction	— No restriction	226, 31	<i>M. abscessus</i>	(9)
			No restriction	<i>M. chelonae</i> I	(3)
			136, 121	<i>M. chelonae</i> II	(10)
			121, 104, 31	<i>M. chelonae</i> III	(1)
279, 257	170, 148, 109	— 257, 200, 79		<i>M. fortuitum</i> I	(2)
280	172, 108	— No restriction		<i>M. fortuitum</i> II	(4)
		280, 200, 80		<i>M. fortuitum</i> III	(1)
298, 257	148, 109, 80	— 257, 165, 133		<i>M. fortuitum</i> IV	(1)
257	148, 109	— No restriction		<i>M. fortuitum</i> V	(6)
		174, 72		<i>M. senegalense</i>	(10)
298, 280	170, 110, 78	— 199, 165, 133, 81		<i>M. fortuitum</i> VI	(2)
300, 281	191, 172, 109	— 205, 167, 133, 76		<i>M. fortuitum</i> VII	(1)
		281, 167, 133		<i>M. fortuitum</i> VIII	(2)
282	110, 86, 49, 33	— No restriction		<i>M. fortuitum</i> IX	(1)
296	108, 80	— 155, 141		<i>M. fortuitum</i> X	(6)
305, 270	173, 115, 97	— 305, 189, 81		<i>M. peregrinum</i> I	(11)
275	175, 100	— 191, 84		<i>M. peregrinum</i> II	(5)
288	173, 115	— 204, 84		<i>M. peregrinum</i> III	(1)
276	160, 86	— 194, 71,		<i>M. smegmatis</i>	(2)
305	103, 85	— No restriction		<i>M. flavescens</i> I	(1)
300	203, 97	— No restriction		<i>M. flavescens</i> II	(4)
	192, 109, 97, 91	— 297, 210, 70		<i>M. flavescens</i> III	(2)
285	187, 91	— 181, 107		<i>M. hassiacum</i>	(1)
290	130, 110, 50	— No restriction		<i>M. sp. (M511, M516)</i>	(2)
295	No restriction	— 214, 70		<i>M. duvalii</i>	(1)
297	208, 89	— 195, 102		<i>M. chlorophenolicum</i>	(1)
300	190, 110	168, 132	(AvalI)	<i>M. porcinum</i>	(1)
				<i>M. farcinogenes</i>	(20)
305	125, 90, 60, 30	— No restriction		<i>M. obuense</i>	(1)
	189, 107	— 221, 63		<i>M. phlei</i> I	(4)
		221, 85		<i>M. phlei</i> II	(1)
315	121, 115, 47, 35	— No restriction		<i>M. rhodesiae</i>	(1)
308	179, 50, 46, 33	— No restriction		<i>M. vaccae</i>	(4)
310	115, 50, 30	— No restriction		<i>M. parafortuitum</i> I	(1)
	115, 90, 45, 30	— No restriction		<i>M. parafortuitum</i> II	(3)
320	230, 90	— No restriction		<i>M. hoderi</i>	(1)
330	205, 130, 125, 60	— 240, 230, 100		<i>M. mucogenicum</i>	(1)
330, 310	110, 105, 90, 50, 45	— 310, 210, 130		<i>M. neoaurum</i>	(1)
330, 320	125, 110, 105, 80	— No restriction		<i>M. aurum</i>	(2)

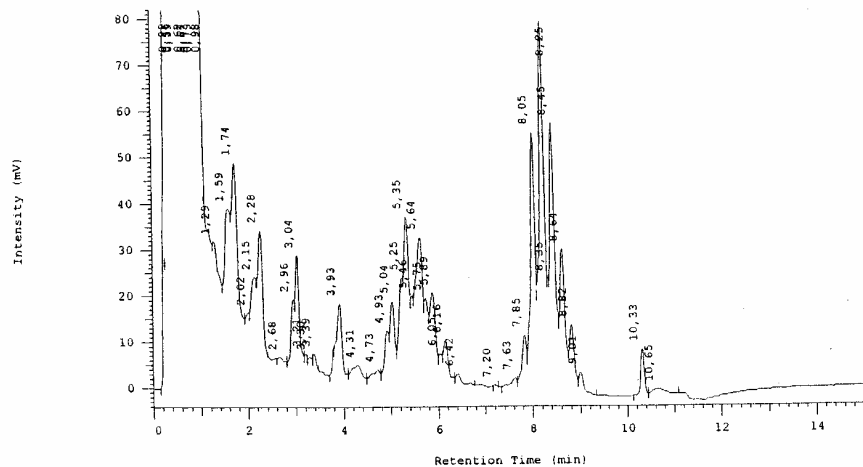
8.3 Anhang 3: HPLC-Muster der unbekannten Isolate aus Tabelle 9 (s. Kap.3.2.2.2)

Im folgenden sind die HPLC-Chromatogramme der nicht zuzuordnenden Isolate aus Tabelle 9 aufgeführt.



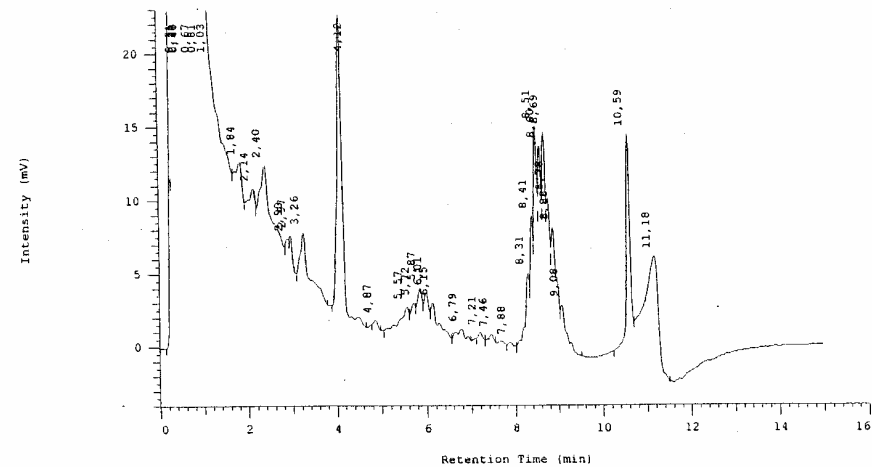
myko standar - Vial 3 Inj 1 BN3153 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0044
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 3 Inj Number: 1 Sample Name: BN3153



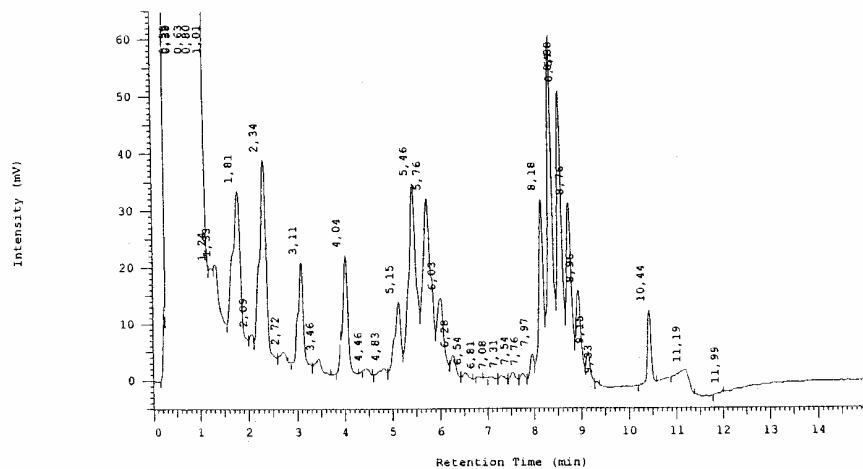
myko standar - Vial 4 Inj 1 BN3216 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0051
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 4 Inj Number: 1 Sample Name: BN3216



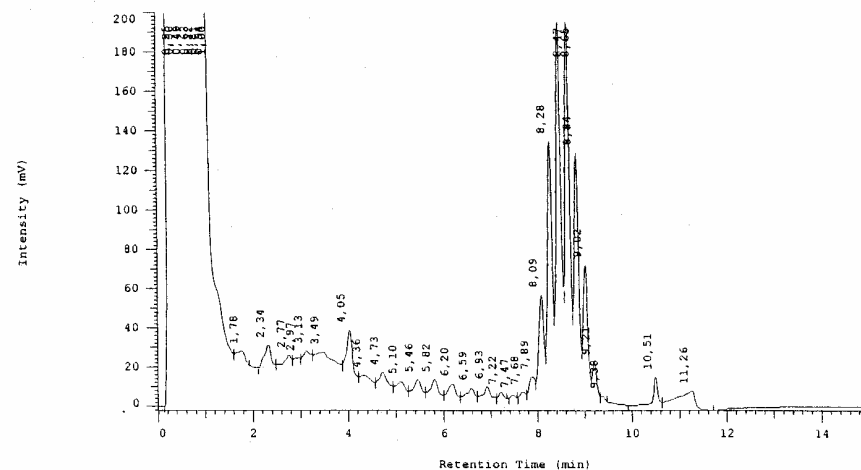
myko standar - Vial 4 Inj 1 BN3232 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0062
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 4 Inj Number: 1 Sample Name: BN3232



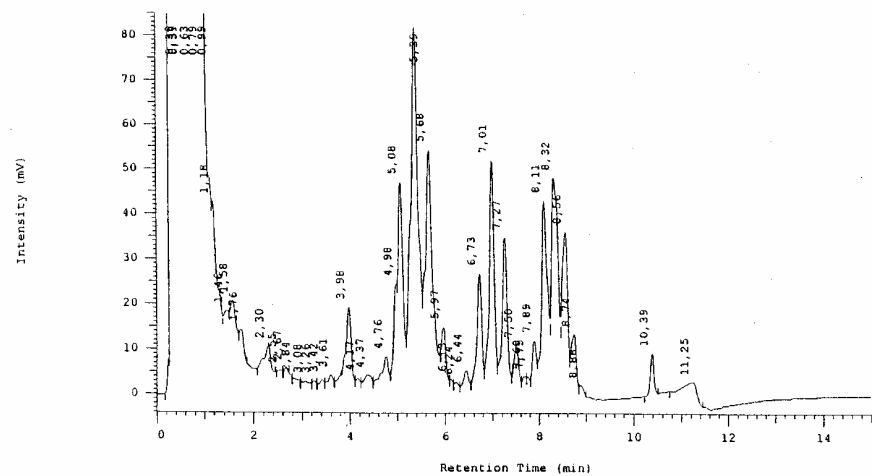
myko standar - Vial 7 Inj 1 BN3273 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0058
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 7 Inj Number: 1 Sample Name: BN3273



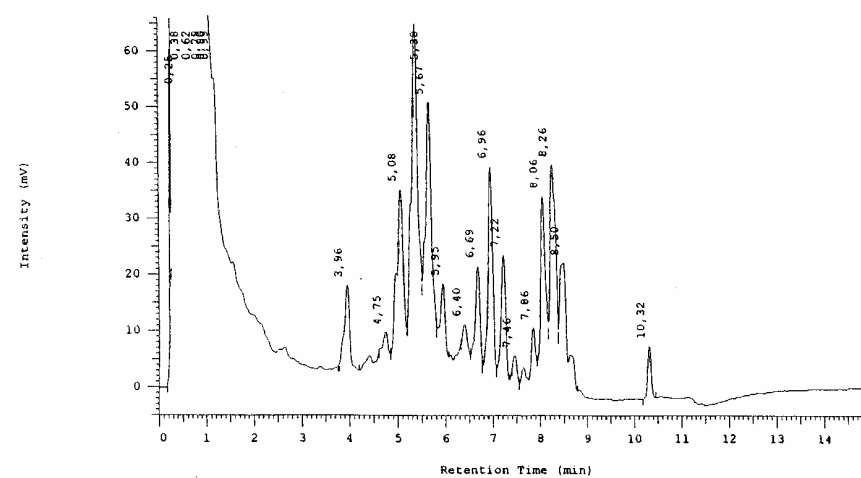
myko standar - Vial 8 Inj 1 BN3271 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0066
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 8 Inj Number: 1 Sample Name: BN3271



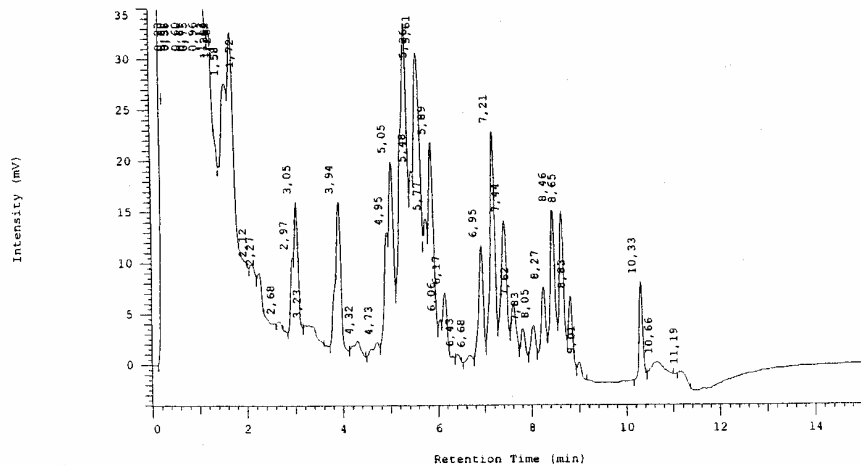
myko standar - Vial 2 Inj 1 BN3274 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0044
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 2 Inj Number: 1 Sample Name: BN3274



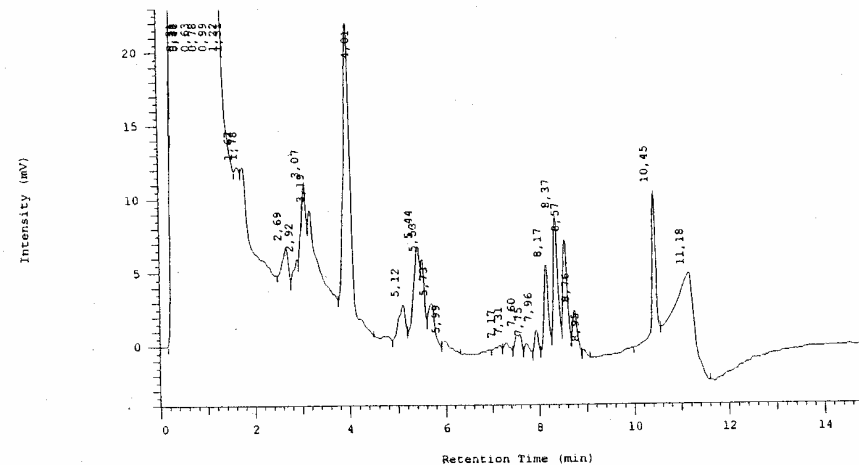
myko standar - Vial 4 Inj 1 BN3276 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0044
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 4 Inj Number: 1 Sample Name: BN3276



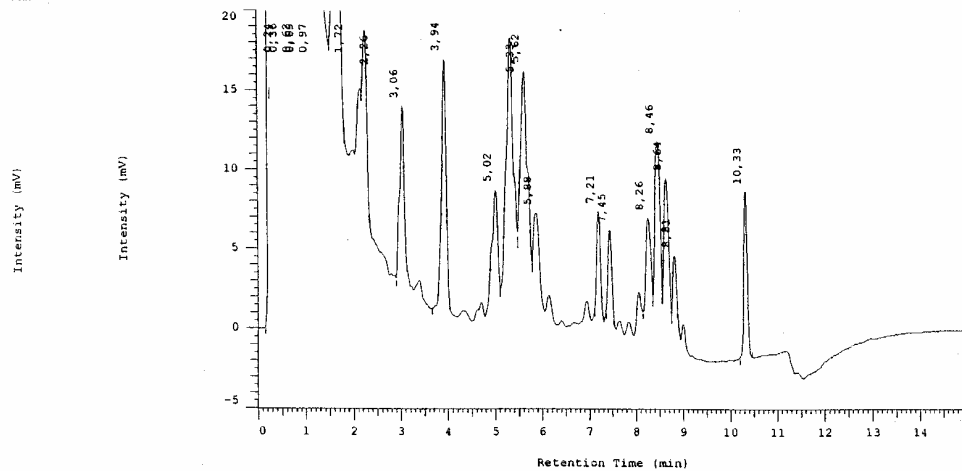
myko standar - Vial 6 Inj 1 BN3282 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0059
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 6 Inj Number: 1 Sample Name: BN3282



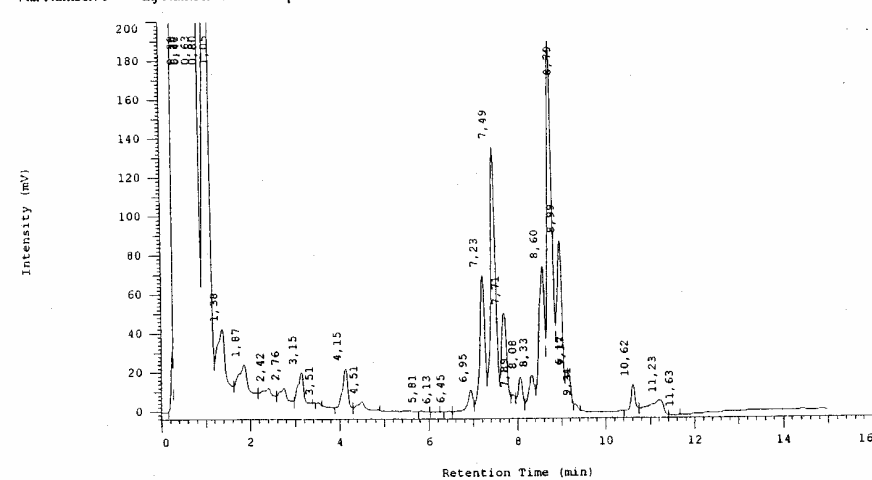
myko standar - Vial 3 Inj 1 BN3280 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0045
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 3 Inj Number: 1 Sample Name: BN3280



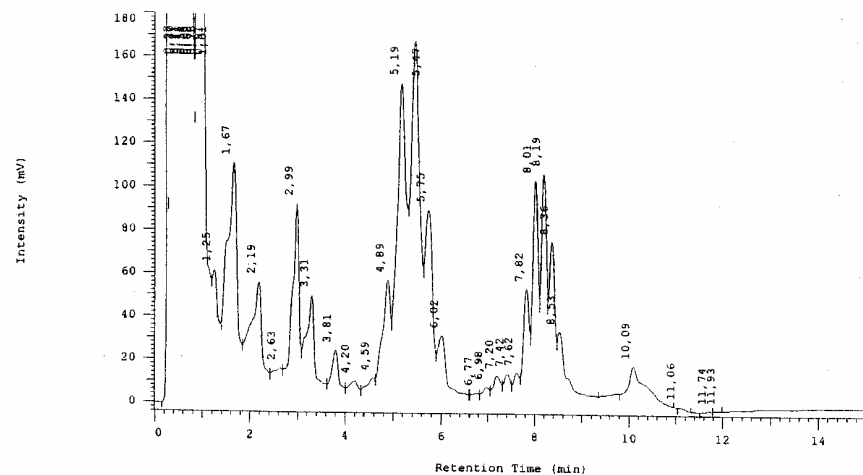
myko standar - Vial 3 Inj 1 BN3283 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0051
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 3 Inj Number: 1 Sample Name: BN3283



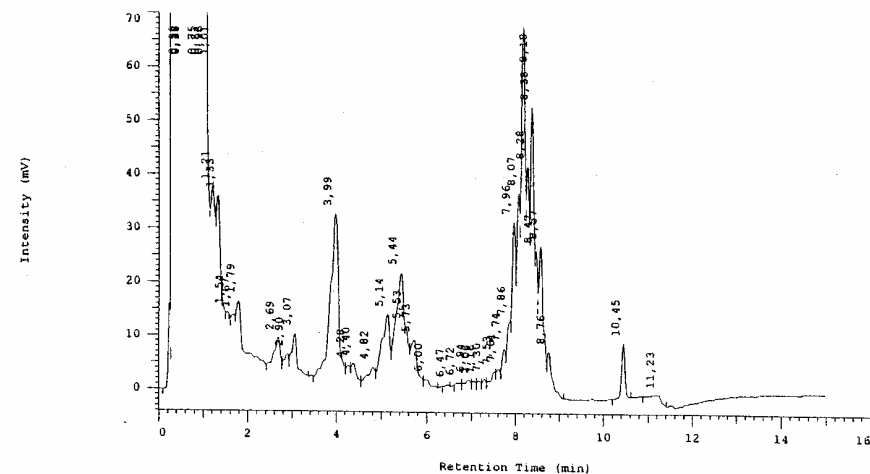
myko standar - Vial 5 Inj 1 BN 3303 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0034
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 5 Inj Number: 1 Sample Name: BN 3303



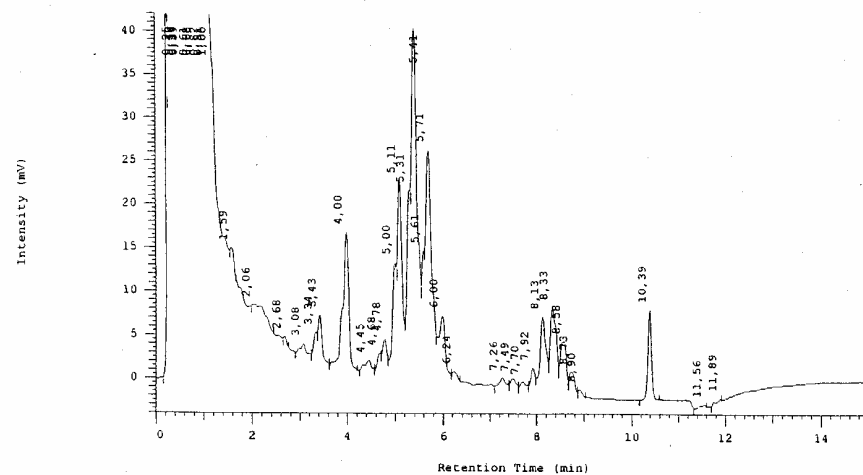
myko standar - Vial 7 Inj 1 BN3307 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0048
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 7 Inj Number: 1 Sample Name: BN3307



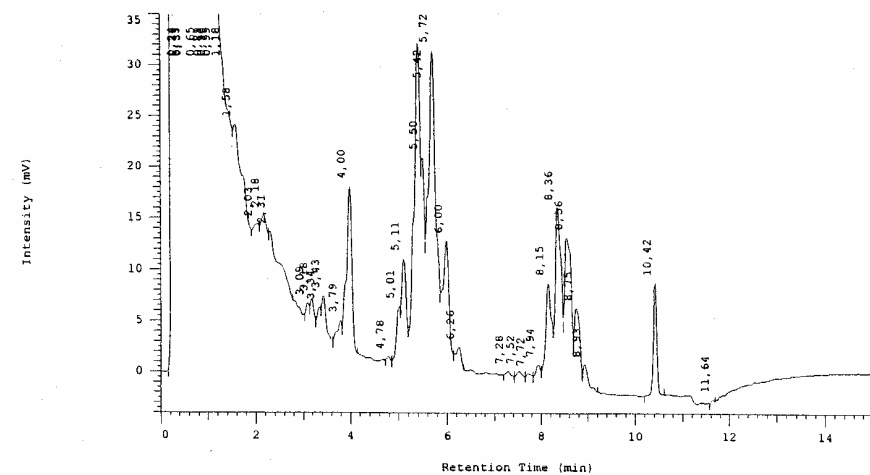
myko standar - Vial 8 Inj 1 BN3304 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0046
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 8 Inj Number: 1 Sample Name: BN3304



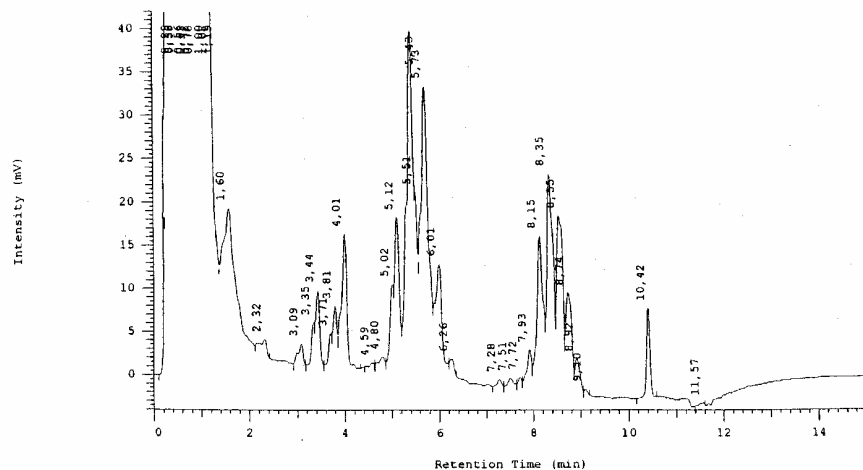
myko standar - Vial 6 Inj 1 BN3337 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0046
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 6 Inj Number: 1 Sample Name: BN3337



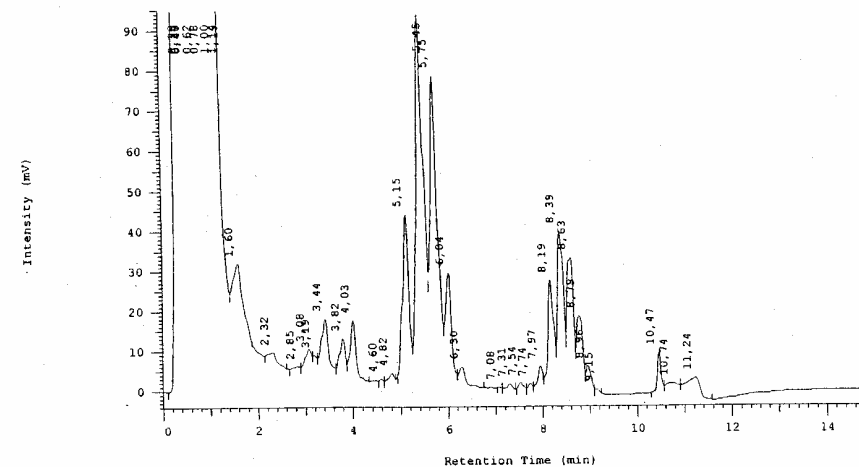
myko standar - Vial 5 Inj 1 BN3338 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0046
 Data Desc.: IFM CH1 2-D
 Vial Number: 5 Inj Number: 1 Sample Name: BN3338



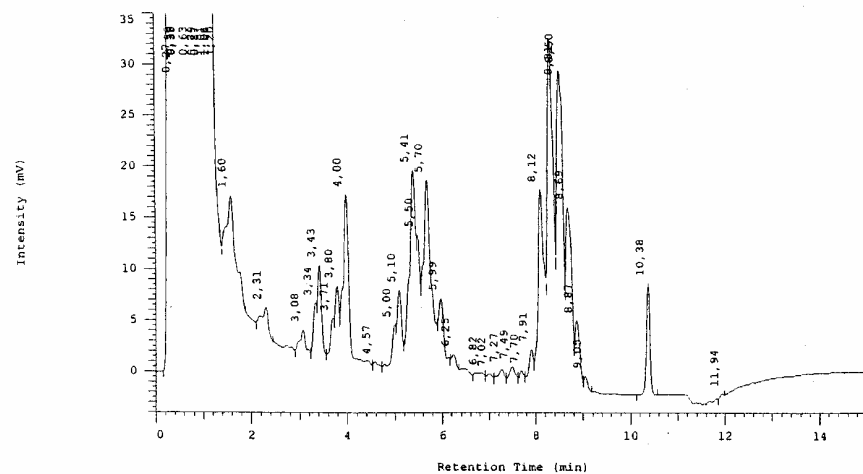
myko standar - Vial 2 Inj 1 BN3340 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0059
 Data Desc.: IFM CH1 2-D
 Vial Number: 2 Inj Number: 1 Sample Name: BN3340



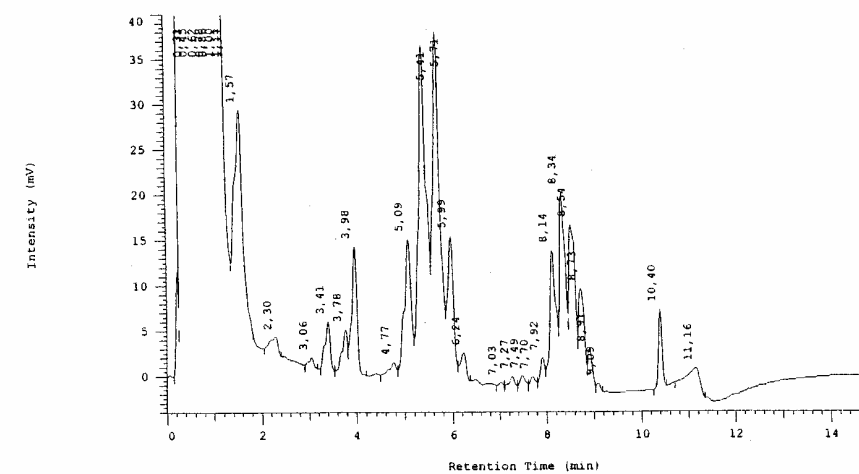
myko standar - Vial 2 Inj 1 BN3339 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0047
 Data Desc.: IFM CH1 2-D
 Vial Number: 2 Inj Number: 1 Sample Name: BN3339



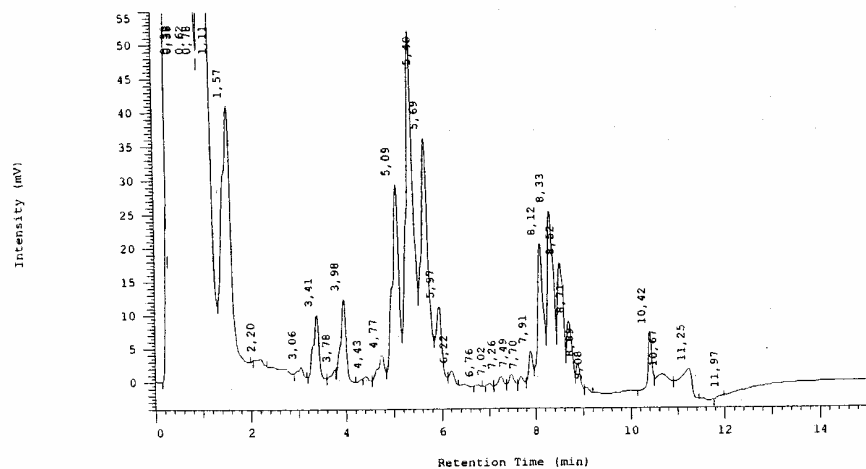
myko standar - Vial 1 Inj 1 BN3341 Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0061
 Data Desc.: IFM CH1 2-D
 Vial Number: 1 Inj Number: 1 Sample Name: 3341



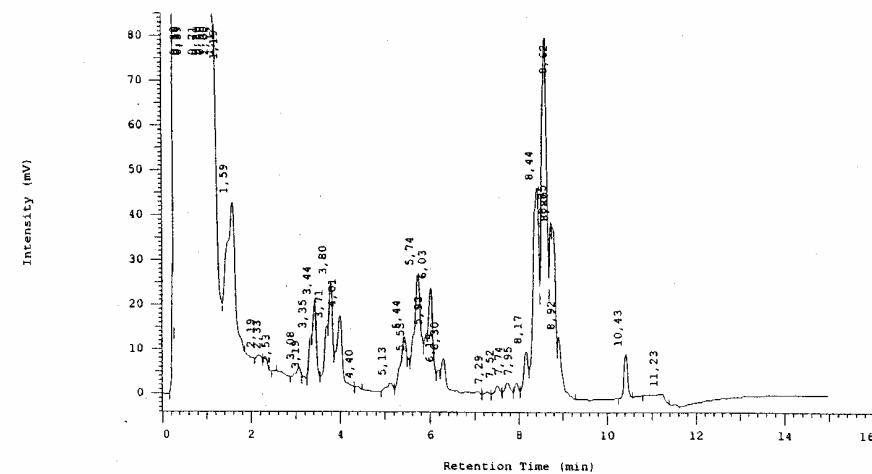
myko standar - Vial 8 Inj 1 BN3342 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0060
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 8 Inj Number: 1 Sample Name: BN3342



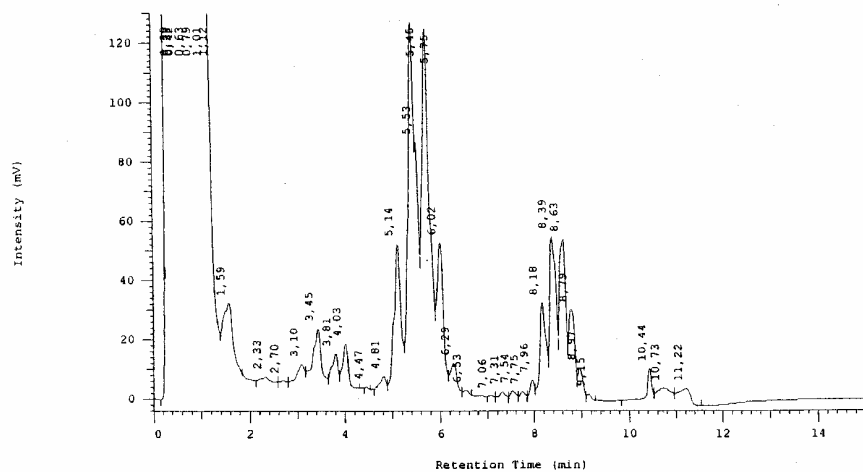
myko standar - Vial 8 Inj 1 BN3373 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0048
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 8 Inj Number: 1 Sample Name: BN3373



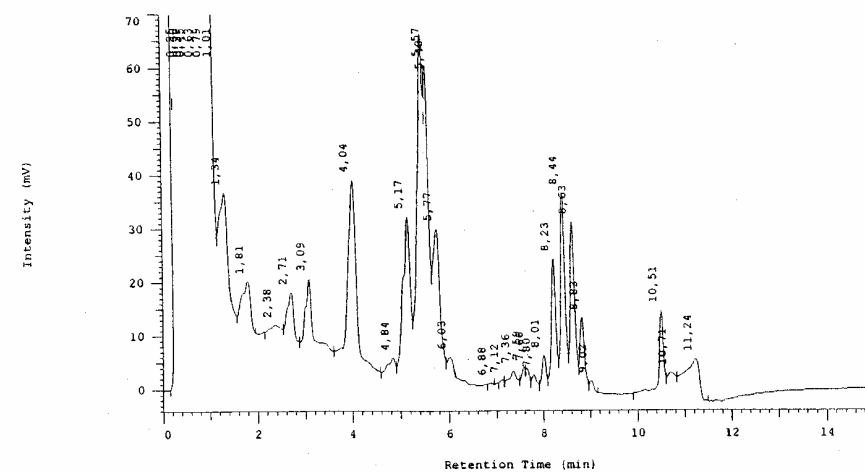
myko standar - Vial 5 Inj 1 BN3343 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0059
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 5 Inj Number: 1 Sample Name: BN3343



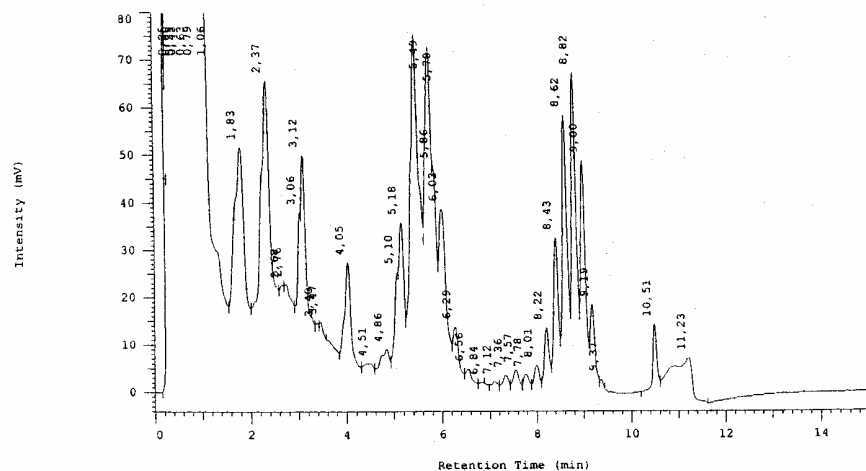
myko standar - Vial 5 Inj 1 BN3374 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0058
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 5 Inj Number: 1 Sample Name: BN3374



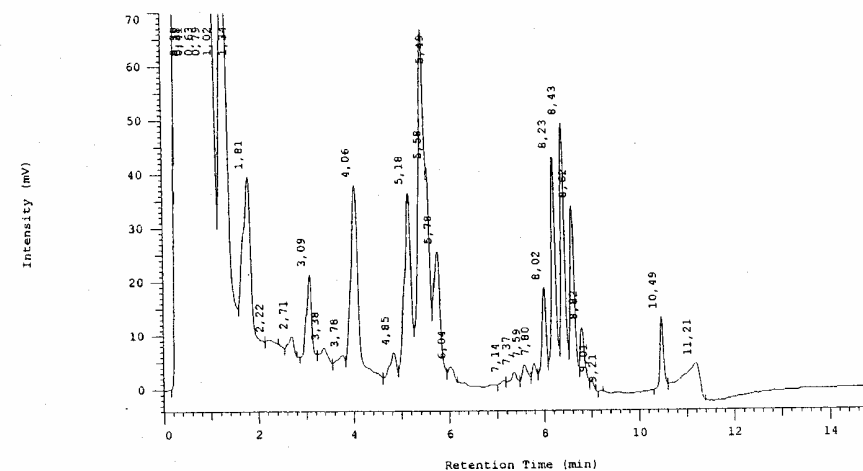
myko standar - Vial 6 Inj 1 BN3385 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0058
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 6 Inj Number: 1 Sample Name: BN3385



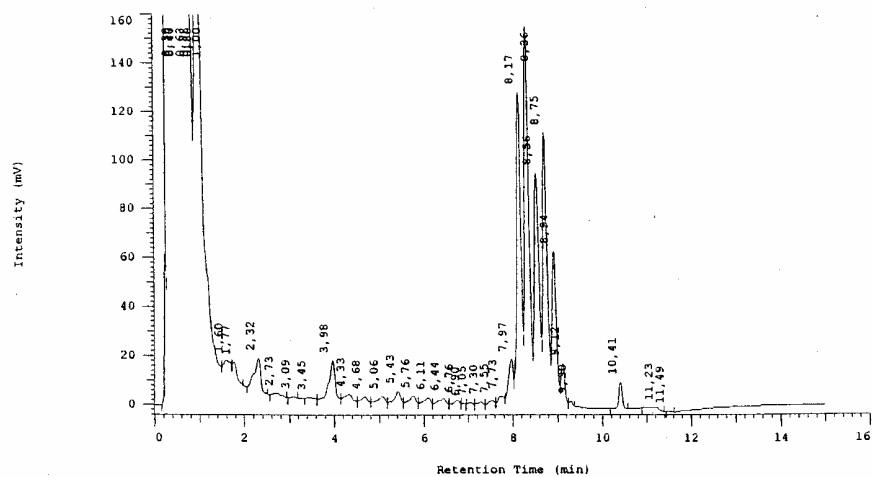
myko standar - Vial 4 Inj 1 BN3390 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0058
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 4 Inj Number: 1 Sample Name: BN3390



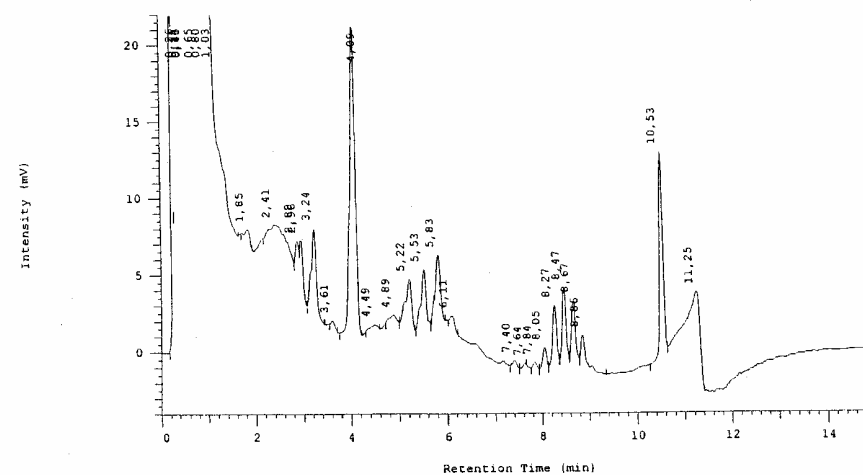
myko standar - Vial 3 Inj 1 BN3388 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0049
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 3 Inj Number: 1 Sample Name: BN3388



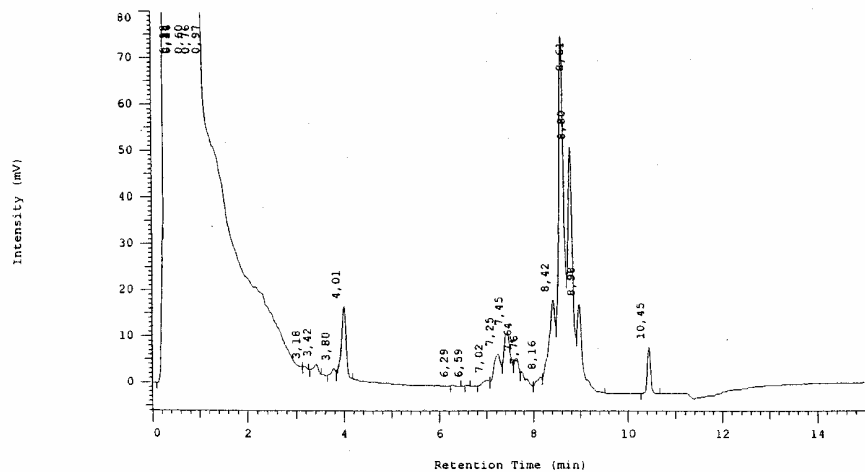
myko standar - Vial 2 Inj 1 BN3391 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0058
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 2 Inj Number: 1 Sample Name: BN3391



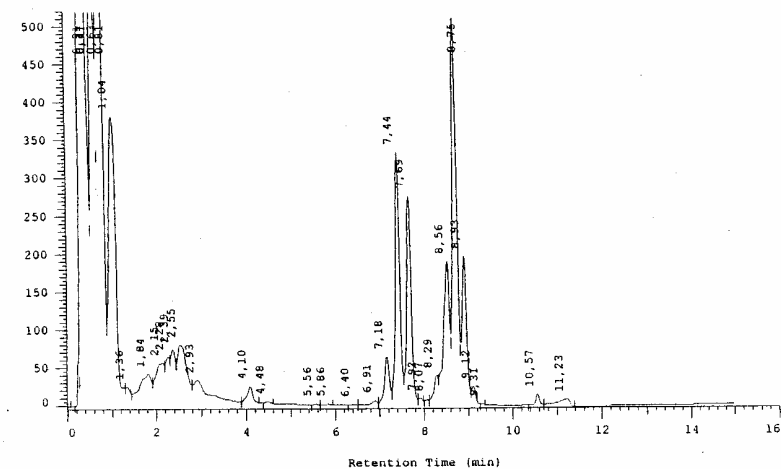
myko standar - Vial 2 Inj 1 BN3398 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0046
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 2 Inj Number: 1 Sample Name: BN3398



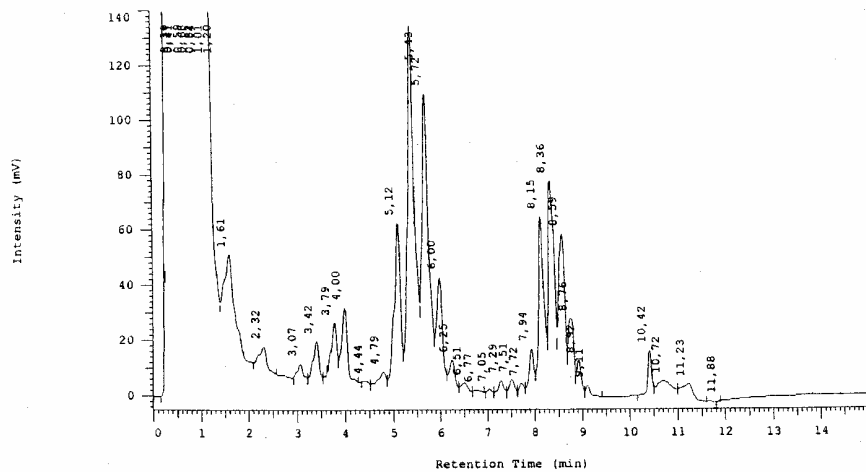
myko standar - Vial 6 Inj 1 BN3538 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0051
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 6 Inj Number: 1 Sample Name: BN3538



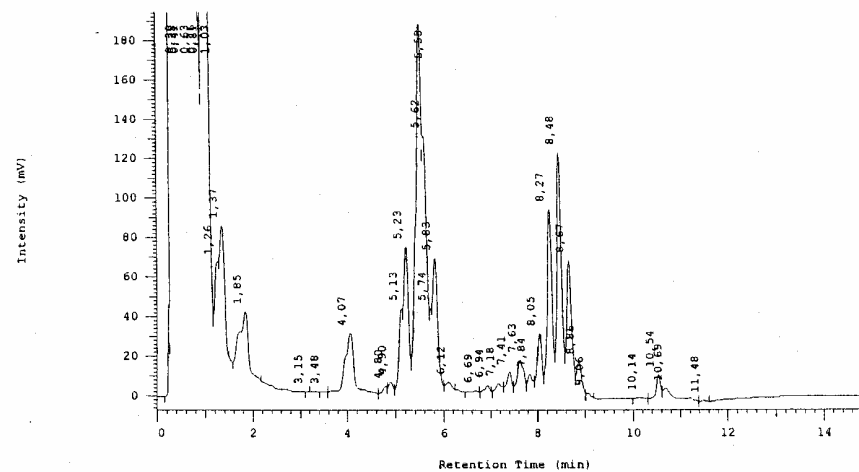
myko standar - Vial 7 Inj 1 BN3522 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0062
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 7 Inj Number: 1 Sample Name: BN3522

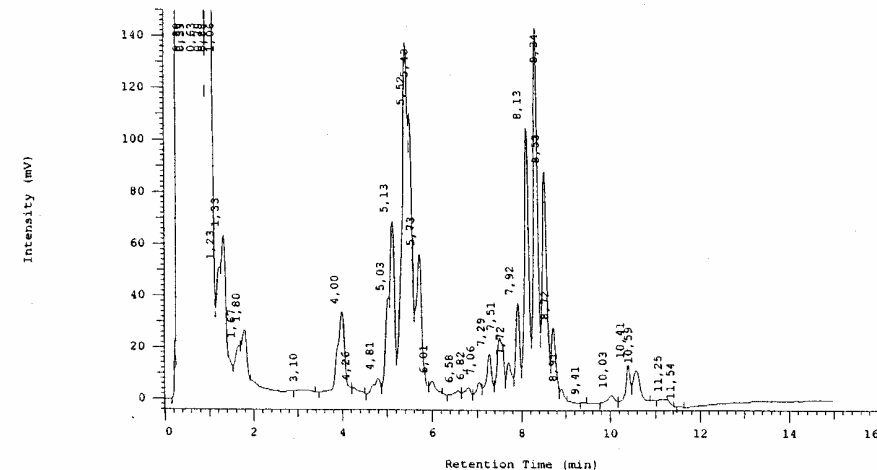


myko standar - Vial 2 Inj 1 BN3572 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0048
Data Desc.: IFM CH1 2-D
Vial Number: 2 Inj Number: 1 Sample Name: BN3572

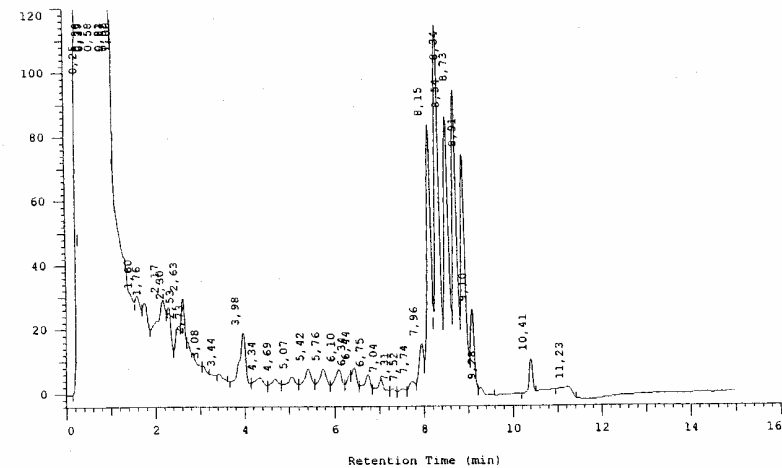


Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobact\DATA\0050
Data Desc.: IFM CHI 2-D
Vial Number: 1 Inj Number: 1 Sample Name: BN3624



myko standar - Vial 2 Inj 1 BN3638 - Channel 1

Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0050
IFM CH1 2-D
2 Inj Number: 1 Sample Name: BN3638

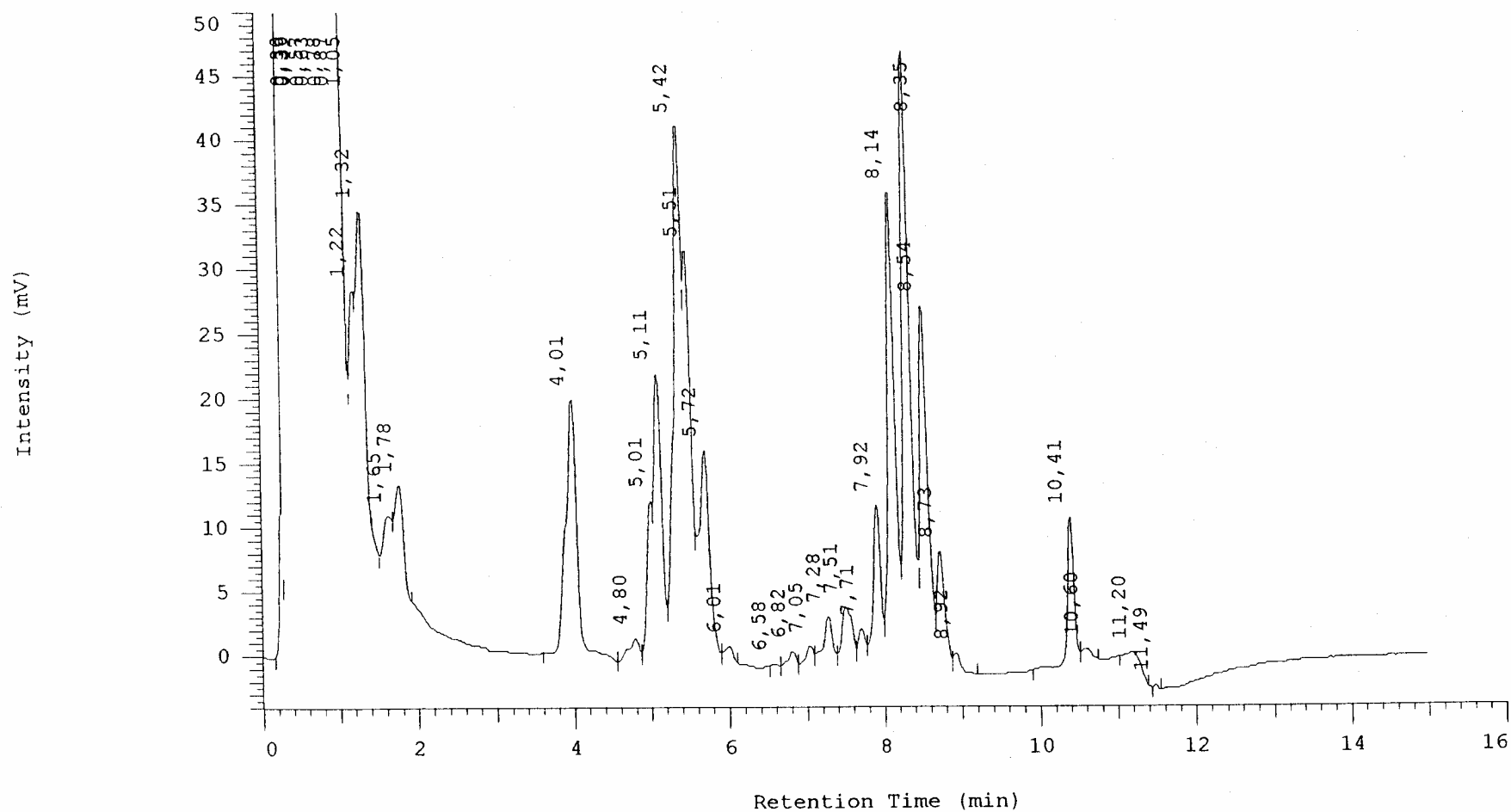


myko standar - Vial 4 Inj 1 BN3654 - Channel 1

Current Data Path: C:\Win32App\HSM\Mykobakt\DATA\0050

Data Desc.: IFM CH1 2-D

Vial Number: 4 Inj Number: 1 Sample Name: BN3654



8.4 Partialesequenzen des 16S -rDNA-Gens von einigen ausgewählten Isolaten aus Tabelle 9 (s. Kap. 3.2.2.2)

Abbildung 15 listet Partialesequenzen des 16S -rDNA-Gens von einigen ausgewählten Isolaten aus Tabelle 9 auf.

Abbildung 15: Partialesequenzen des 16S- rDNA-Gens einige Isolate aus Tabelle 9

BN 3128:

```
CTCCNCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGTGG
CGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTG
GGTCTAATACCGAATAGGACCGCATGCTTCATGGTGTGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTGTG
GGATGGGCCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGACGGG
TAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGCCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACC
TGGAGAAGAAGGACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCG
TTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGGTGTCCCNNGNAAAA
AA
```

BN 3149:

```
TGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGTGGCG
AACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG
TCTAATACCGGATATACCTCATGGACTGCATGGTTTGTGGGGGAAAGCTTTTGCGGTGTGG
GATGGGCCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTTATGGCTTACCAAGGCGACGACGGGT
AGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGG
GATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCT
GTAGAAGAAGGACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGT
TGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGGTGTNNNNNGGNAAA
```

BN 3214:

```
TCGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCTCTTCGGAGGTACTCGAGTGG
CGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTG
GGTCTAATACCGAATATGACCACGAGACGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTGTG
GGATGGGCCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGACGGCCTACCAAGGCGACGACGGG
TAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCGGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACC
TGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCG
TTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGGTGTNCCNNGGAAAA
AA
```

Fortsetzung Abbildung 15

BN 3260:

CTCNNCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCTCTTCGGAGGTACTCGAGT
 GGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCCTGCACTTTCGGGATAAGCCTGGGAAAC
 TGGGTCTAATACCGGATAGGACCTTTTGGCGCATGCCTTTTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTG
 TGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGACGGCCTACCAAGGCGACGACG
 GGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTAC
 GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTG
 GGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTA
 CCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAG
 CGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTNGTCGCGTNTNCCCNNGNAA
 AAA

BN 3340:

GCTCGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGTG
 GCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGAAACT
 GGGTCTAATACCGAATATGACCACATGCTTCATGGTGTGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTGT
 GGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGG
 GTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACG
 GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGA
 GGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCATAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTAC
 CTATAGAAGAAGGACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCGAGC
 GTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGGTGTNNNNNGGNAA
 AAA

BN 3624:

CTCGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGTGGC
 GAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGG
 GTCTAATACCGAATATGACCATGCGCCTCCTGGTGTGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTGTGG
 GATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGT
 AGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGG
 AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGG
 GATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCACAGACGAAGCGCAAGTGACGGTATGT
 GCAGAAGAAGGACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGT
 TGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGGTGTNNNNNGGAAAAA
 A

BN 3631:

TTNNNCGCTCGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTC
 GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGG
 AAAGTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACACACTTCATGGTGAGTGGTGCAAAGCTTTTGC
 GGTGTGGGATGAGCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGGCGAC
 GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCG
 CGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGACGAAGCGAAAGTGAC
 GGTACCTACAGAAGAAGGACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTC
 CGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGGTNTNNNNN
 GNAAAAA

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eidesstatt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Düsseldorf, April 2003

Danksagung und Grüße:

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Univ. Prof. W. Martin bedanken, für die Übernahme dieser Arbeit als Koreferent.

Frau Univ. Prof. Dr. med. Idel danke ich ganz herzlich, für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Hygiene der Universität Düsseldorf durchführen zu können. Ebenso danke ich für die produktive und freundliche Arbeitsatmosphäre, die in diesem Institut herrscht.

Herrn Priv.-Doz. Dr. R. Schulze-Röbbecke danke ich für die nette, kompetente Betreuung meiner Arbeit und ebenso für viele schöne, aufbauende und lustige Gespräche außerhalb des Arbeitsumfeldes.

Unserer MTA Frau Ulrike Strenz danke ich für ihre kompetente Unterstützung bei allen Versuchen. Es ist schön, noch jemanden zu kennen, der gerne auf Achterbahnen geht und auch generell auf der gleichen Wellenlänge ist.

Sonja Bienert, Anne Brüske und Sabine Mewes danke ich für eine schöne Laborzeit und wünsche ihnen viel Glück bei ihrem weiteren Medizinstudium.

Herrn Dr. med. R. Geisel, Julia und Thomas danke ich ganz herzlich für die Hilfe mit Scans und PC-Angelegenheiten und natürlich auch für eine schöne Laboratmosphäre.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Hygiene sei gedankt, für die Kollegialität. Die Betriebsausflüge waren klasse und ich denke, ich werde auch später noch versuchen ab und zu bei der einen oder anderen Feier dabei zu sein.

Aus dem privaten Bereich danke ich in erster Linie meinen Eltern, ohne die ich mein Studium nicht hätte durchführen können. Auch meiner Schwester Sonja gebührt hierbei viel Dank. Ohne meine Familie wäre mein Leben bei weitem nicht so reibungslos und schön verlaufen. Danke!

Pierre Röser danke ich für seine Unterstützung während dieser Arbeit. Ohne ihn hätte ich einige Termine vergessen. Außerdem hat er mich unterstützt, wo er nur konnte, und mich mit schönen Dingen auch von der Arbeit ablenken können.

Alexander Franze danke ich für die tiefe Freundschaft, die wir seit 11 Jahren haben. Er hat mich in vielen Bereichen sehr unterstützt, und er wird in meinen Augen oft von anderen Leuten bezüglich seiner Talente verkannt.

Judith Jeromin danke ich ebenfalls für die tiefe Freundschaft, die sie mir seit der Schule entgegenbringt. Wir werden jetzt hoffentlich bald mehr Zeit haben, uns zu treffen. Andreas Bensiek danke ich ebenfalls für die nette Zeit und freue mich bald regelmäßig beim Training dabei sein zu können.

Gabrielle Röhrich danke ich für ihre Freundschaft und ständige Hilfsbereitschaft in Laborangelegenheiten. Ja, wir würden ein gutes Team abgeben. Ich wünsche ihr viel Glück bei ihrer Dissertation und werde ihre nette Unterstützung beim Southern Blot und anderen Situationen nicht vergessen.

Kai Arndt danke ich für eine schöne Zeit, tröstende Worte wenn der Computer mal wieder alles durcheinander gebracht hat und viele Sci-Fi Gespräche.

Thomas Tuchlinski danke ich für viele wichtige und interessante Gespräche. Ich konnte viel verstehen durch ihn, über mich und andere Dinge. Ich danke ebenfalls Claudia König. Durch sie habe ich ebenfalls viele Dinge erkannt.

Markus Noe danke ich für die langjährige Freundschaft und viele Parallelen in der Sichtweise des Universums.

Dieter und Ildiko Kraetzig, Tommie und Andreas danke ich für ihre Freundschaft und schöne Zeit.

Ivonne und Joachim Zechlin, Michael Gläser, Stefanie , Ingo und Nicole danke ich für eine lustige, schöne Zeit und Freundschaft.

Sandra Augustin, Sebastian Geese und Chris Roberts danke ich für viele schöne Gespräche und Momente.

Ich grüße hier auch Annette Leonhard, mit der ich über die genialste Sci-Fi Show Babylon 5 diskutieren kann. Ich wünsche ihr viel Glück bei ihrem weiteren Studium. Ein Gruß geht auch an ihre Eltern und an Sven.

Ich grüße an dieser Stelle auch alle Teilnehmer der Kung-Fu I und Frauenselbstverteidigungsgruppe der Tai-Wan-Do Akademie Düsseldorf. Es macht Spass mit euch zu trainieren.

Ingo Lautenbach danke ich ganz herzlich für die Hilfe mit dem Formatieren und Ausdrucken.

Jürgen Knobloch danke ich für die vielen hilfreichen Tipps zur Promotion.

Ein herzlicher Dank und Gruß geht auch an alle, die ich vielleicht vergessen habe zu erwähnen. Ich bin nun mal ein Schussel, aber ich danke euch, dass es euch gibt.