

The image contains several microscopic views of atypical mycobacteria. On the left, there are two overlapping rectangular frames: the top one shows a dense field of small, yellowish-orange granules, while the bottom one shows larger, white, spherical colonies. On the right, there are two overlapping rectangular frames: the top one shows a dense field of small, white, granular particles, and the bottom one shows three distinct, larger, white, spherical colonies.

Atypische Mykobakterien

Klinische Relevanz und Möglichkeiten der Diagnostik

Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere

Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen

veterinärmedizinisches Referenzlabor für Tuberkulose

Irmgard Moser, A. Skrypnik, H. Hotzel,
P. Möbius, W. Erler, J. Gottschaldt, B. Baumgärtner



Methoden zur Differenzierung atypischer Mykobakterien

Phänotypische Methoden

biochemische Leistungen

Dünnschichtchromatographie (Zellwand)

Gaschromatographie / Massenspektrometrie (Zellwand)

Genotypische Methoden

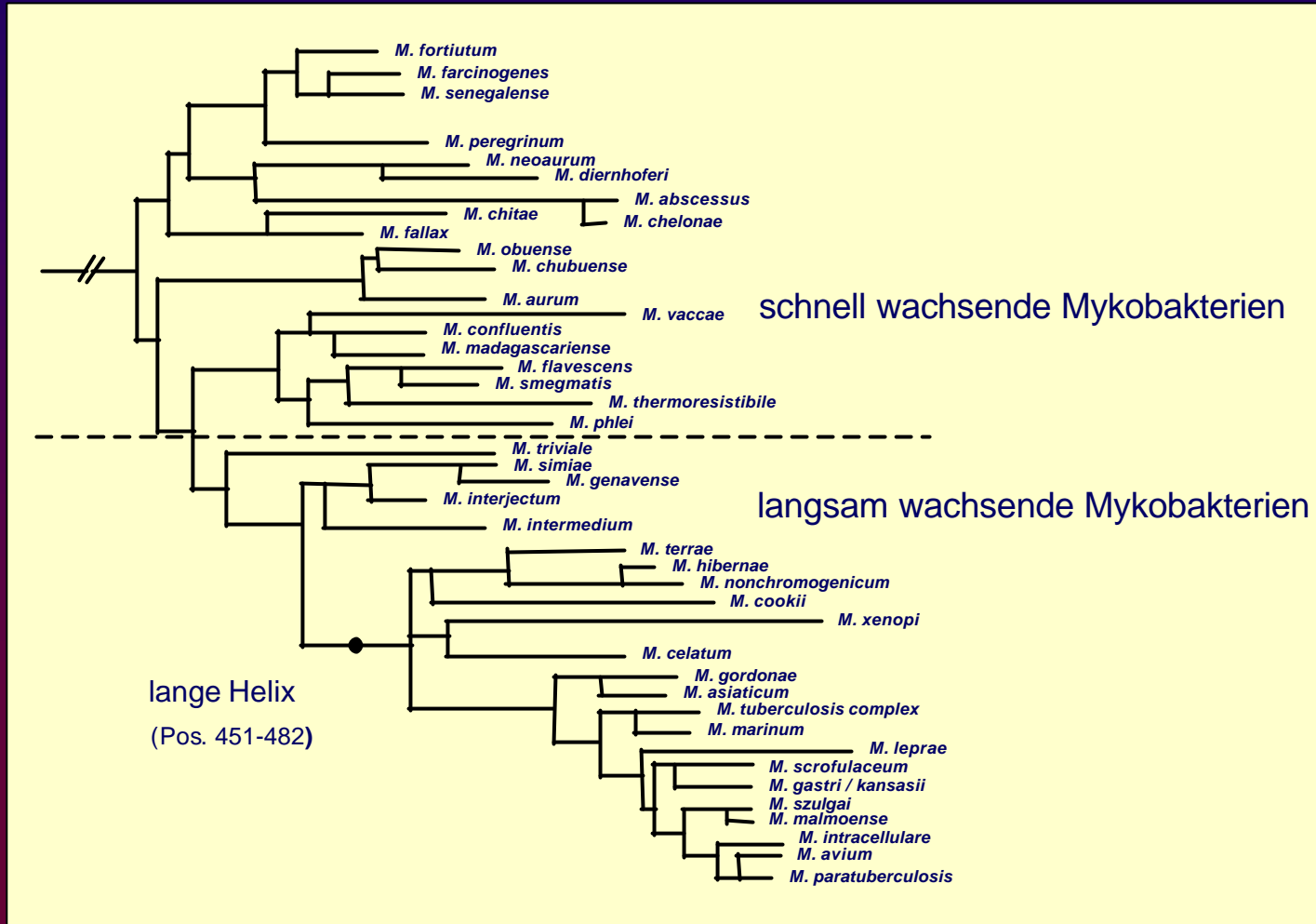
16Sr DNA Sequenzanalyse (1 Gen)

hsp65 PCR-Restriktionsanalyse (1 Gen)

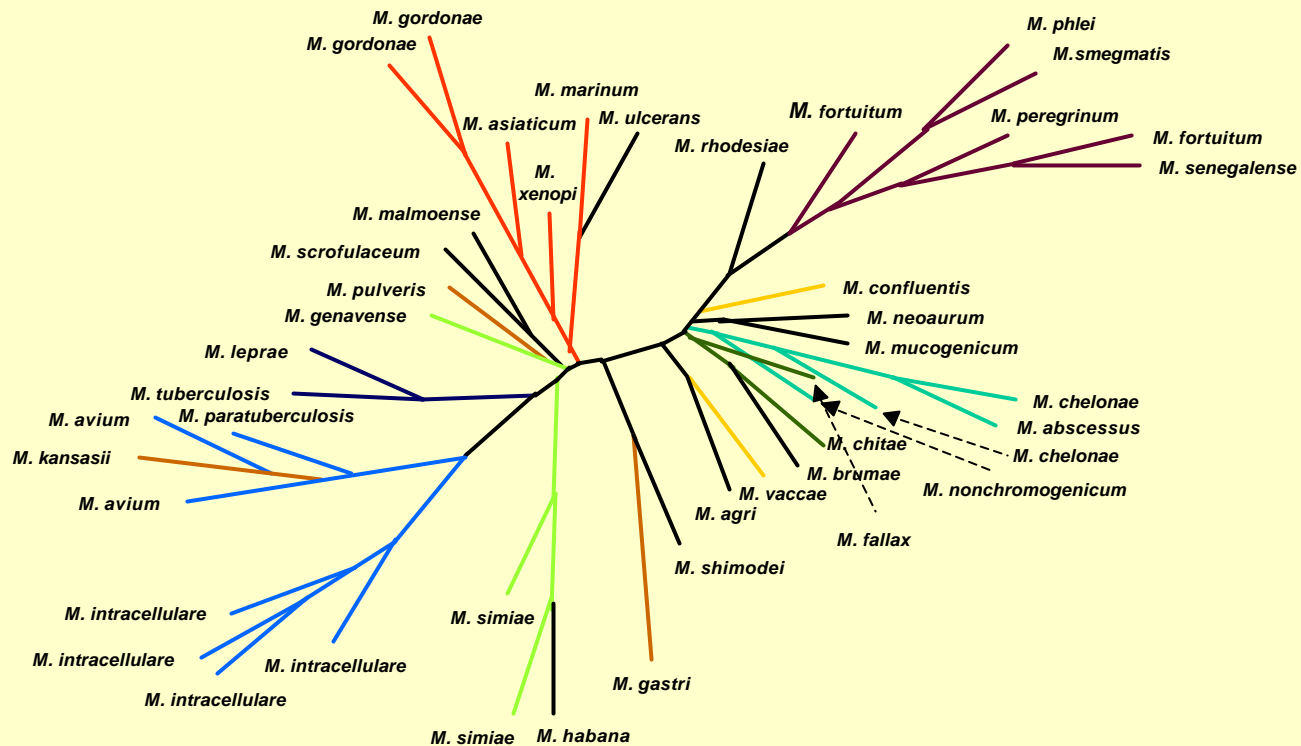
ITS PCR-Restriktionsanalyse

Makrorestriktionsanalyse (ganzes Genom)

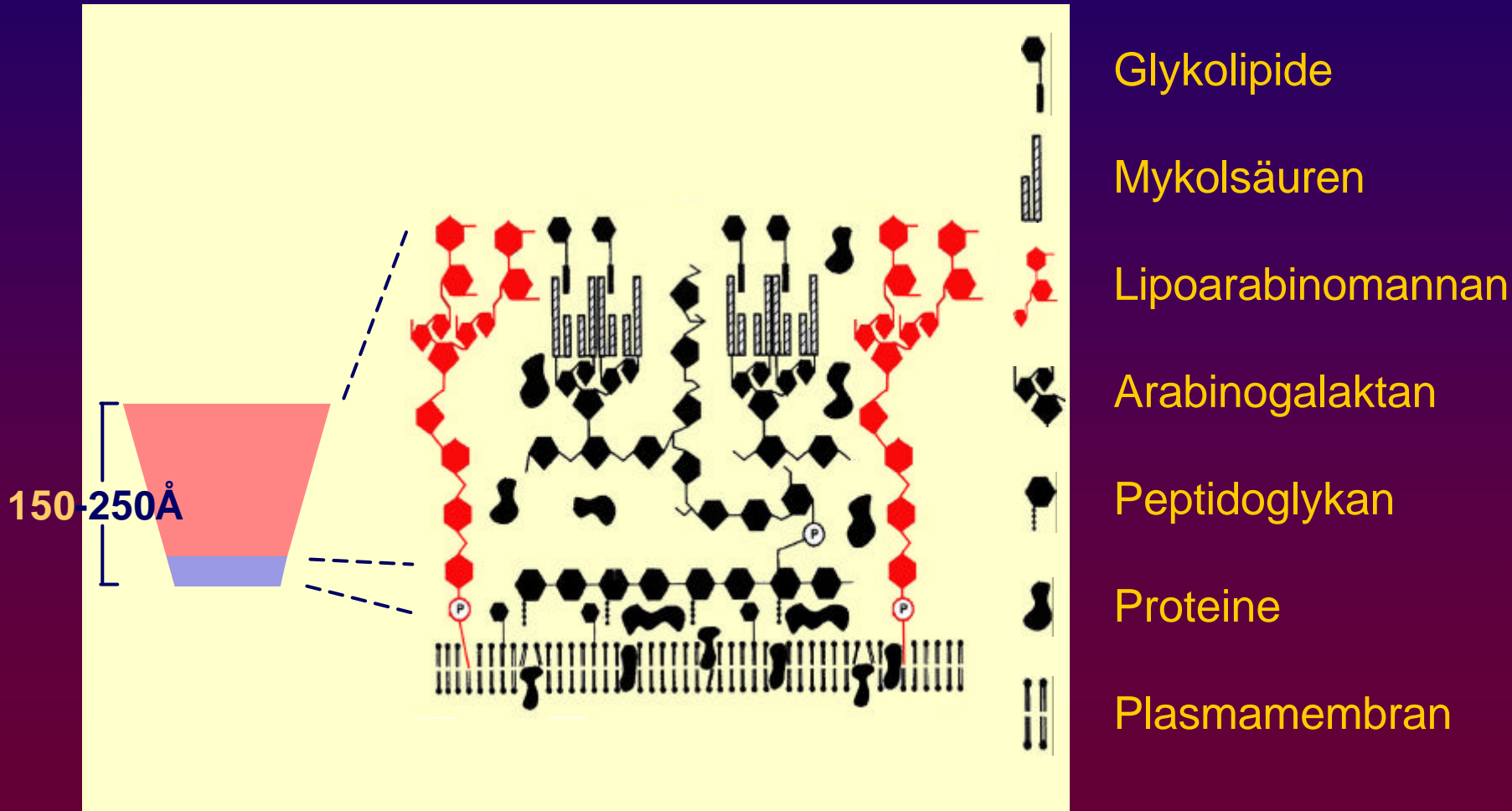
Phylogenetischer Baum von 44 schnell und langsam wachsenden Mykobakterienspezies auf der Basis von 16S rDNS Sequenzen



Phylogenetischer Baum von 39 schnell und langsam wachsenden Mykobakterienspezies auf der Basis der *hsp65* Gensequenz



Schematische Darstellung der Zellwand von *M. tuberculosis*



Prinzip der Dünnschichtchromatographie (DSC)



aliphatischer Rest R' = α -Mykolsäure

niedriges Molekulargewicht = α' -Mykolsäure

R' kann funktionelle Gruppen enthalten, z. B. Keto-Mykolsäuren

Methoxy-

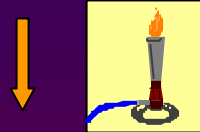
Wachsester-

Epoxy-

1. Herstellung von Mykolsäuremethylestern

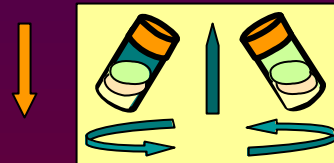


+ Methanol-Toluol-Schwefelsäure



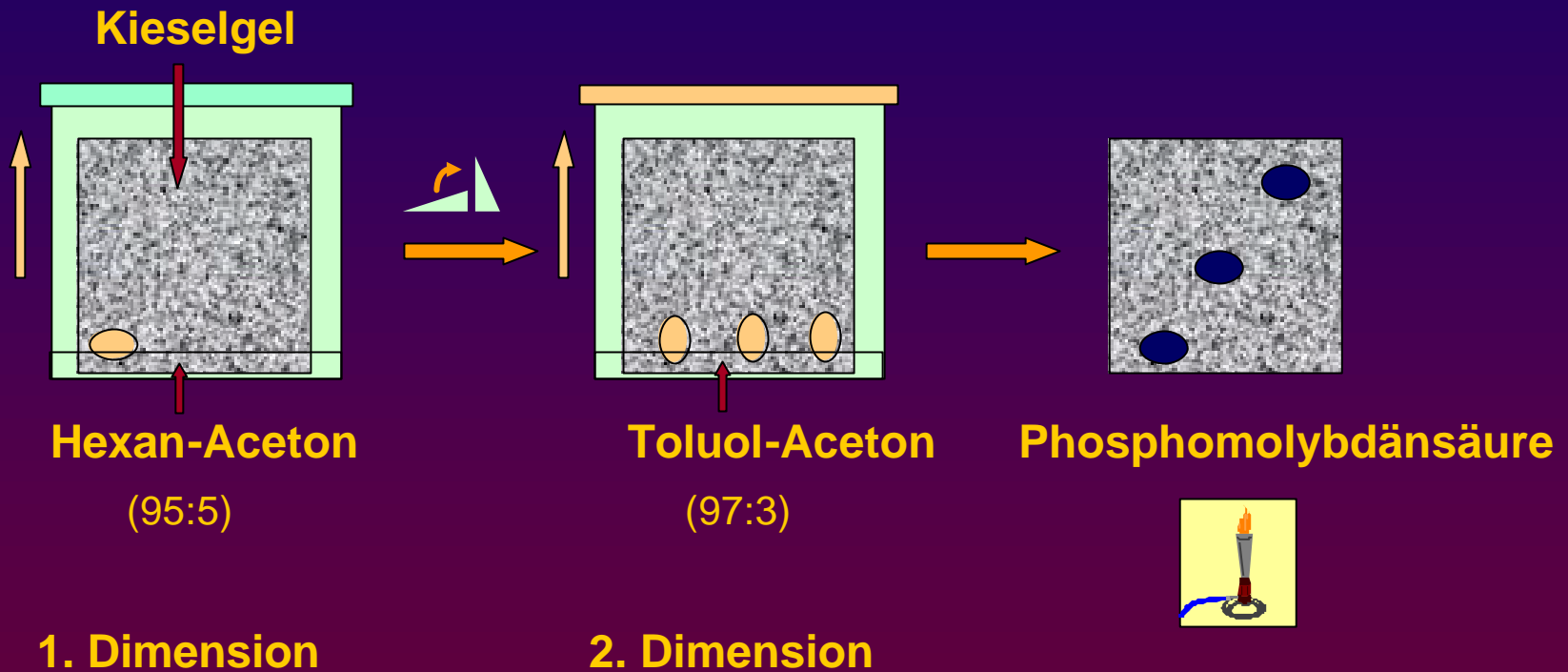
Mykolsäuremethylester

+ Hexan



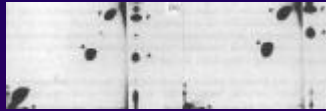
Hexan-Phase enthält Methylester

2. Chromatographie



Differenzierung von Mykobakterien durch DSC der Mykolsäuremethylester

1 *M. triviale*



3 *M. agri*



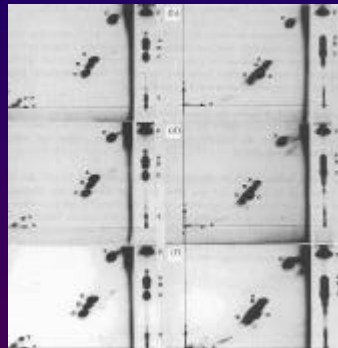
5 *M. thermoresistibile*



Laufmittel:

1. Petroleumbenzin
2. Toluol / Aceton

7/1 (1-5)



M. kansasii

M. tuberculosis

M. gordonae

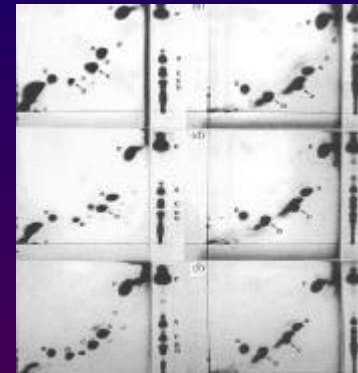
M. asiaticum

M. africanum

M. szulgai

M. marinum

9/2 (1-10)



M. aichiense

M. aurum

M. avium

M. pulveris

M. gadium

M. intracellulare

M. nonchromo-

genicum

M. neoaurum

M. scrofulaceum

M. terrae

M. phlei

M. rhodesiae

M. sphagni

M. austro-

africanum

M. obuense

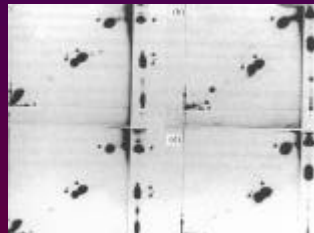
M. tokaiense

M. xenopi

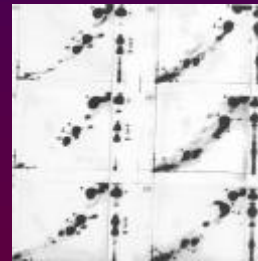
M. diernhoferi

M. flavescens

2 *M. chelonae*



8/1(1-4)



M. fortuitum

M. porcinum

M. farcinogenes

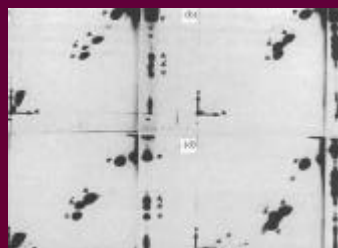
M. smegmatis

M. chitae

M. senegalense

4 *M. maloense*

M. simiae



10/1 (1,2)



M. chubuense

M. duvalii

M. gilvum

M. parafortuitum

M. vaccae

Differenzierung von Mykobakterien durch eindimensionale DSC

Gruppeneinteilung

A enthält Spezies der Gruppe 9 (1-10) (2-dim. DSC)

M. avium

M. diernhoferi

M. phlei

M. paratuberculosis

M. nonchromogenicum

M. scrofulaceum

M. terrae

M. xenopi

B → 6, 7

M. tuberculosis 7

M. Africanum 7

M. bovis 6

BCG

C → 4, 6, 7

M. bovis 6

M. africanum 7

M. gordonae 7

M. marinum 7

M. szulgai 7

M. simiae 4

M. malmoense 4

M. ggstri

D → 8

M. abscessus

M. fortuitum

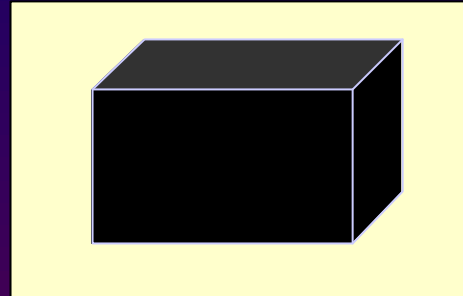
M. smegmatis



E → 2

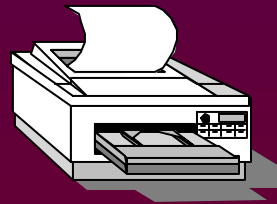
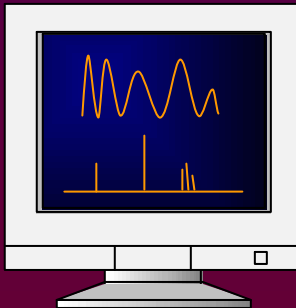
M. chelonae

Differenzierung von Mykobakterien mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Mykolsäure-Methylester



- Erhitzen  Gasphase
- Chromatographie über eine 33 m lange Säule
- Beschießen mit Elektronen
 Spaltprodukte



“relevante Säuren”

hsp65 PCR-Restriktionsanalyse ausgewählter atypischer Mykobakterien

Restriktionsmuster (Bp)

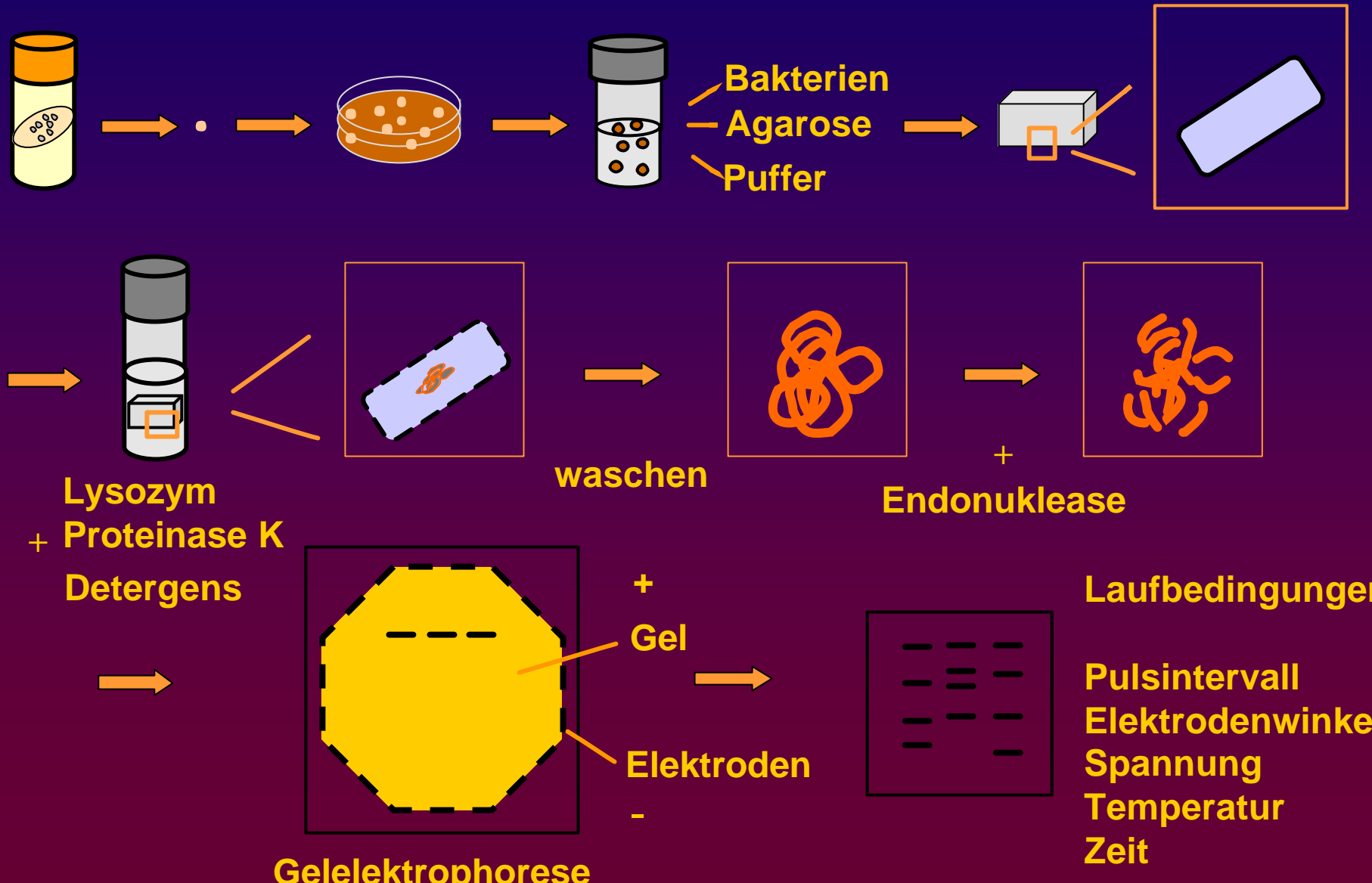
PCR-Produkt (Bp)

*Bst*EII

Hae III

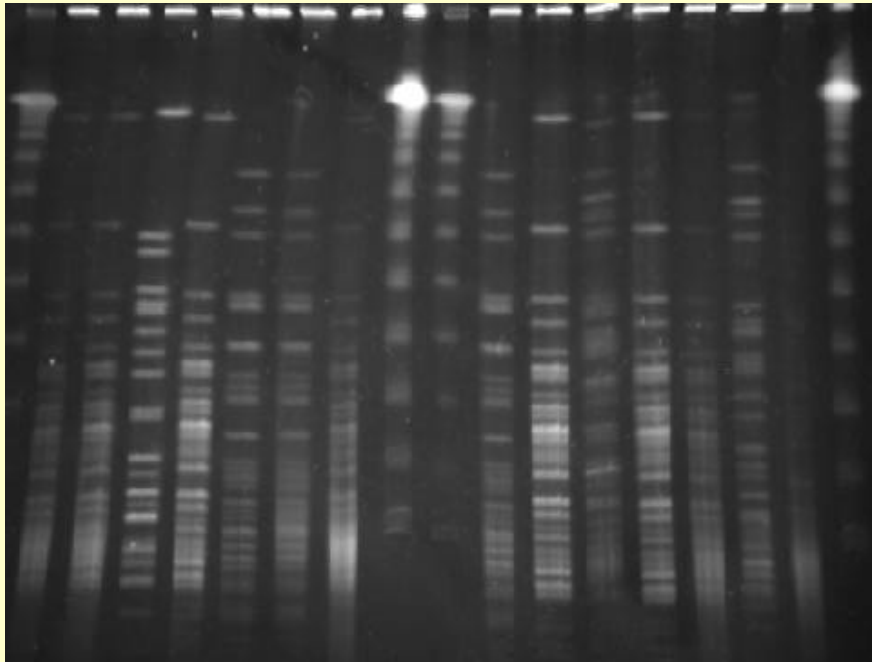
	439 (Pos. 398 - 836)	<i>Bst</i> EII			<i>Hae</i> III				
<i>M. gordonae</i>		245	140	80		140	120	95	
<i>M. gordonae</i> I		245		120	80	170		115	60
II		245		120	80	235		115	
III		245		120/100		140	120		
IV		325		120		140	115		70 (60)
<i>M. peregrinum</i> I		245/220				155/150			100
II		245/220				150	135		100
III		245	140		80	155/150			100
<i>M. kansasii</i> I		245/220				140		105	80
II		245	140		80	140		105	
III		245	140		80	140		105	70
IV		245		120	80	140	115		70
V		325		120		140		100	80
<i>M. scrofulaceum</i>		245/220				155	135		95
<i>M. peregrinum</i> II		245/220				150	135		100

Methodendiagramm Pulsfeld - Gelelektrophorese



Makrorestriktionsanalyse von atypischen Mykobakterien

M ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ M M ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ M



- ▶ *M. fortuitum*
- ▶ *M. phlei*
- ▶ *M. nonchromogenicum*
- ▶ *M. confluentis*

Atypische Mykobakterien isoliert im vet. med. Referenzlabor für Tuberkulose 2000-2003

Wirt; Organ	Herkunft	Mykobakterienspezies
Rind; Milch	Potsdam	<i>M. smegmatis</i> : 52x <i>M. phlei</i> : 4x <i>M. fortuitum</i> : 5x <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. obuense</i> / <i>M. chubuense</i> atyp. M.
Rind; Darm (Para-Tb-Verdacht)	TLLV Frankfurt/O Stendal Koblenz	<i>M. flavescens</i> : 2x <i>M. thermoresistibile</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. chitae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. diernhoferi</i> , <i>M. phlei</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. gastri</i> , atyp. M.

Atypische Mykobakterien isoliert im vet. med. Referenzlabor für Tuberkulose 2000-2003

Wirt; Organ	Herkunft	Mykobakterienspezies
Schwein; Lk (Darm, Lunge, Leber, Mandib.), Einstreu	Nohra Hannover Stade Halle	<i>M. intermedium</i> : 4x <i>M. mucogenicum</i> : 2x <i>M. smegmatis</i> atyp. M.
Pferd	Aulendorf	<i>M. tokaiense</i>
BFAV (Stall)	Jena	<i>M. fortuitum</i> <i>M. diernhoferi</i>
Elephant; Rüssel	Stendal Berlin	<i>M. concordense</i> / <i>M. peregrinum</i> / <i>M. septicum</i> <i>M. smegmatis</i>
Schneeziege; Lunge	Stuttgart	<i>M. gastri</i> / <i>M. kansasii</i>

Atypische Mykobakterien isoliert im
vet. med. Referenzlabor für Tuberkulose 2000-2003

Wirt; Organ	Herkunft	Mykobakterienspezies
Reh, Mufflon, Damwild, Rothirsch,	Freiburg TLLV	<i>M. diernhoferi</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. engbaekii</i> , <i>M. vaccae</i>
Marder, Fuchs, Dachs; Lk: mesent., retroph., Darm, Milz		<i>M. fortuitum</i> : 5x <i>M. xenopi</i> , <i>M. scrofulaceum</i>

Atypische Mykobakterien isoliert im vet. med. Referenzlabor für Tuberkulose 2000-2003

Wirt; Organ	Herkunft	Mykobakterienspezies
Schildkröte; Leber	Bitburg	<i>M. marinum</i>
Netzpython	Halle	<i>M. fortuitum</i>
Gelbwangenschildkröte	Stendal	<i>M. smegmatis</i>
Boa; Leber, Milz	TLLV	<i>M. chelonae / M. abscessus: 8x</i>
Fische,	Dresden	<i>M. flavescens: 6x</i>
Wasseragame,	Potsdam	<i>M. gordonae: 3x</i>
Bartagame		<i>M. kansasii / marinum: 3x</i>
		<i>M. agri</i>

Atypische Mykobakterien in der Milch

- klinische Charakteristika -

- **Laktierende Kühe unterschiedlichen Alters**
- **Milch meist sinnfällig verändert**
- **chronisch rezidivierende Mastitis (mehrfach Penicillin, Oxacillin) 19 / 23**
- **subklinische Mastitis, erhöhter Zellgehalt, 4 / 23**
noch keine Therapie eingeleitet

Atypische Mykobakterien in der Milch

- Haltungstechnische Parameter -

- **Bestände > 100 Tiere, 2 Betriebe mit 1300 bzw. 2500 Kühen, in beiden Betrieben jedoch nur ein Einzelfall**
- **Herdenprobleme (nicht in den großen Betrieben) 2 / 23**
- **Haltungs- und Melkhygiene mangelhaft: 14 / 23**
- **Strohangel, verschimmelter Stroh, nasser Stroh,**
- **Tiefstreu mit zu wenig Stroh, Kühe liegen im Schmutz,**
- **Abfallbeseitigung mangelhaft**
- **keine jährliche Generalreinigung und-desinfektion des Stalles,**
- **stark verschmutzte Kühe und Euter,**
- **Eutereinigung vor dem Melken unzureichend, Melkhygiene fehlerhaft**

Danksagung

BFAV / IBIZ

R. Putsche

S. Werner

H. Wittig

U. Pfeil

LVL Potsdam

BFAV / IMT

J. König

K. Steger

