

Universitätsklinikum Ulm

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Stenger

**NACHWEIS ATYPISCHER MYKOBAKTERIEN  
IM LEITUNGSWASSER MITTELS QUANTITATIVER PCR  
UND KULTUR**

**DISSERTATION**

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von  
Ziyad Hussein  
aus Latakia, Syrien

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Nele Wellinghausen  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Reter Kern  
Tag der Promotion: 15.02.2008

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1.    Historie und Taxonomie atypischer Mykobakterien .....	1
1.2.    Mikrobiologische Eigenschaften von atypischen Mykobakterien.....	2
1.3.    Natürliches Vorkommen atypischer Mykobakterien.....	3
1.4.    Pathogenese und klinische Bedeutung atypischer Mykobakterien .....	3
1.5.    Therapie und Prognose .....	6
1.6.    Diagnostik atypischer Mykobakterien.....	6
1.7.    Mykobakterien in künstlichen Wassersystemen.....	7
1.8.    Fragestellung .....	13
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1.    Bakterienstämme .....	14
2.2.    Reagenzien.....	15
2.3.    Laborbedarf .....	19
2.4.    Probenentnahme und Verarbeitung der Proben.....	20
2.4.1.    Kultivierung von Mykobakterien .....	21
2.4.2.    Anreicherung von Mykobakterien aus Leitungswasser .....	22
2.4.3.    Versuchsansätze zur Dekontamination des Leitungswassers und zur Selektion der Mykobakterien.....	23
2.5.    Identifizierung der Mykobakterien.....	28
2.5.1.    Morphologie, Farbe, Wachstumsgeschwindigkeit .....	28
2.5.2.    Sonden-Hybridisierungsverfahren.....	28
2.5.3.    Sequenzierung .....	29
2.6.    Isolierung der DNA von Mykobakterien.....	31
2.7.    LightCycler Real-time PCR.....	32
2.7.1. <i>Mycobacterium spp.</i> -spezifische PCR.....	33
2.7.2. <i>Mycobacterium xenopi</i> -PCR.....	33
2.7.3.    LightCycler-Programmierung .....	34
2.7.4.    Auswertung der LightCycler-PCRs.....	35
2.7.5.    Quantitative PCR.....	35
2.7.6.    Dual-color Multiplex PCR mit Inhibitionskontrollen .....	36
2.7.7.    Klonierung der internen Inhibitionskontrollen .....	36

---

2.8.	Statistische Auswertung .....	37
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
3.1.	Kultureller und molekularer Nachweis von Mykobakterien aus Wasserproben.....	38
3.1.1.	Anreicherung von Mykobakterien aus Wasserproben.....	38
3.1.2.	Dekontamination der Wasserproben .....	39
3.1.3.	Etablierung einer quantitativen PCR mit interner Inhibitionskontrolle zum Nachweis von Mykobakterien .....	43
3.1.4.	Etablierung einer PCR zum Nachweis von <i>Mycobacterium xenopi</i> .....	48
3.2.	Untersuchung der Trinkwasserproben.....	50
3.2.1.	Untersuchung der Trinkwasserproben mittels quantitativer PCR.....	50
3.2.2.	Kulturelle Untersuchung von Trinkwasserproben.....	54
3.2.3.	Vergleich der PCR-Ergebnisse mit dem kulturellen Mykobakterien-Nachweis .....	60
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>67</b>
4.1.	Bewertung der LightCycler-PCR für den direkten Nachweis atypischer Mykobakterien.....	67
4.2.	Spezies der nachgewiesenen Mykobakterien im Leitungswasser .....	68
4.3.	Klinische Bedeutung ubiquitärer Mykobakterien für Patienten im Krankenhaus.....	70
4.4.	Maßnahmen zur Prophylaxe von Infektionen mit ubiquitären Mykobakterien ..	72
4.5.	Die Empfehlungen der Trinkwasserverordnung (TWVO).....	75
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>77</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>90</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADH	Arginindihydrolase
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ATCC	American Type Culture Collection
Aqua bidest.	Aqua bidestilliert
bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNA
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
DIN EN ISO	Deutsche Industrienorm Europäische Norm International Organisation for Standardisation
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
kb	Kilobasen
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
kbp	Kilobasenpaare
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ssDNA	single stranded DNA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

# 1. Einleitung

## 1.1. Historie und Taxonomie atypischer Mykobakterien

Der Begriff „atypische Mykobakterien“ wurde von Timpe und Runyon 1954 verwendet, um nichttuberkulöse säurefeste Bakterien, die aus Untersuchungsmaterial von an tuberkuloseähnlichen Lungenerkrankungen leidenden Patienten isoliert worden waren, gegen Tuberkelbazillen abzugrenzen (99).

Die atypischen Mykobakterien werden auch als “nontuberculous mycobacteria (NTM)” oder als “mycobacteria other than tuberculosis“ bezeichnet.

Während der Tuberkulose-Erreger *Mycobacterium tuberculosis* bereits 1882 durch Robert Koch erstbeschrieben wurde (48), wurden seit den dreißiger und vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts vereinzelt Fallberichte über weitere Mykobakterienarten veröffentlicht. Diese wurden zunächst als harmlose Saprophyten betrachtet. In den 50er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts wurde nachgewiesen, dass diese atypischen Mykobakterien durchaus Krankheiten beim Menschen verursachen können (20; 43). In diesem Zusammenhang wurde *Mycobacterium avium* erstmals als Krankheitserreger erwähnt (44).

Runyon unterteilte die ubiquitären Mykobakterien 1959 basierend auf phänotypischen Eigenschaften wie Wachstumsverhalten und Pigmentbildung in vier Gruppen (s. Tabelle 1). Dieses Schema behielt bis in die 90er Jahre des 20. Jahrhunderts Gültigkeit. Es wurde jedoch deutlich, dass sich in dieses recht grobe Schema nicht alle Mykobakterien einordnen lassen. Vor allem die Unterschiede im Pigmentationsverhalten innerhalb der einzelnen Spezies wurden nicht detailliert genug berücksichtigt.

**Tabelle 1:** Einteilung der Mykobakterien nach Runyon (83)

Gruppe I:	Langsamwachsende photochromogene Mykobakterien: Sie entwickeln nach Lichtexposition orangefarbenes oder gelbes Pigment, wachsen innerhalb einer Woche : z. B. <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. asiaticum</i> , <i>M. simiae</i> .
Gruppe II:	Langsamwachsende scotochromogene Mykobakterien: Sie entwickeln auch ohne Lichtexposition ein orangefarbenes bis gelbes Pigment: z. B. <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. flavescens</i> , <i>M. xenopi</i> .
Gruppe III:	Langsamwachsende nonchromogene Mykobakterien: Diese Gruppe von Mykobakterien ist immer unpigmentiert: z. B. <i>M. avium</i> , <i>M. gastri</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. nonchromogenicum</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. terrae</i> .
Gruppe IV:	Schnellwachsende Mykobakterien: Wachstum innerhalb von 3-4 Wochen: z. B. <i>M. fortuitum</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. phlei</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. neoaurum</i> , <i>M. gilvum</i> .

Mit der Entwicklung und Verbreitung molekularer Methoden, wie der Gen-Sequenzierung, hat sich die Klassifizierung der atypischen Mykobakterien grundlegend gewandelt. Die Einteilung erfolgt heute aufgrund genetischer Merkmale, insbesondere der Variabilität des 16S rRNA-Gens, wobei sich das Artenspektrum atypischer Mykobakterien ständig erweitert. Allein während der experimentellen Phase dieser Arbeit, 2004-2006, wurden ca. 25 Arten neu beschrieben (2; 22). Heute sind ca. 160 Arten atypischer Mykobakterien bekannt.

## 1.2. Mikrobiologische Eigenschaften von atypischen Mykobakterien

Analog zu *M. tuberculosis* handelt es sich bei den atypischen Mykobakterien um unbewegliche, nicht sporenbildende, aerobe Stäbchenbakterien, die sich nur schwer in der Gram-Färbung anfärben lassen. Die charakteristische Eigenschaft von Mykobakterien ist die Säurefestigkeit, die man sich z. B. in der Ziehl-Neelsen-Färbung zunutze macht. Die Säurefestigkeit ist bedingt durch den lipidreichen Zellwandaufbau der Mykobakterien. Lipide machen bis zu 60 % des Trockengewichts aus und beinhalten vor allem

Mykolsäuren (langkettige gesättigte Fettsäuren) und Mykoside (Mykolsäure-haltige Glykolipide oder Glykolipeptide).

Die lipidreiche Zellwand ermöglicht den Mykobakterien eine sehr hohe Umwelttenazität. Sie können beispielsweise in der Natur unter günstigen Bedingungen mehrere Monate infektiösfähig bleiben.

### **1.3. Natürliches Vorkommen atypischer Mykobakterien**

Atypische Mykobakterien kommen weltweit und ubiquitär in der Umwelt als Saprophyten vor (59). Natürliches Habitat ist der Erdboden (105).

Man konnte atypische Mykobakterien, wie *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum* und *M. terrae*, aus verschiedenen Arten von Staub oder Böden isolieren (14; 105). Böden wie Acker- und Weideland erwiesen sich als besonders gute Vermehrungsorte für Mykobakterien (58; 63).

Aus dem Habitat Boden werden Mykobakterien passiv in natürliche Gewässer wie Meer, Flüsse, Bäche und Seen verbreitet (52). Es wurde aus den USA berichtet, dass bis zu 25 % der Wasserproben aus unterschiedlichen Gewässerarten (Trinkwasserversorgung, Flüsse, Wasserquellen) obligat oder fakultativ pathogene Mykobakterien enthalten (51).

### **1.4. Pathogenese und klinische Bedeutung atypischer Mykobakterien**

Infektionen mit atypischen Mykobakterien werden am häufigsten per Inhalation erworben. Seltener erfolgt der Infektionsweg per Ingestion oder Inokulation, wobei die Mykobakterien durch kleinste Hautwunden eintreten können. Während für *M. tuberculosis* der infizierte Mensch die Infektionsquelle für den Menschen darstellt, ist für die atypischen Mykobakterien die Infektionsquelle weitgehend unbekannt. Sie findet sich vermutlich in der Umwelt, wobei Wasserquellen, auch Leitungswasser, eine besondere Bedeutung zukommt. Offenbar findet keine Übertragung von Mensch zu Mensch statt.

Mykobakterien werden nach dem Eindringen in den Organismus durch Makrophagen phagozytiert, können als primär intrazelluläre Erreger jedoch im Zellinneren weiterleben und sich vermehren (53).

Der Verlauf einer Infektion mit atypischen Mykobakterien wird maßgeblich vom Zustand der zellulären Immunität des Wirtes bestimmt. Bei einer bestehenden Schwächung der T-Zell-abhängigen Makrophagenaktivierung und zellulären Immunität kommt es vermehrt zu

disseminierten Infektionen mit atypischen Mykobakterien. Prädisponierte Patientengruppen umfassen HIV-Patienten (42), Patienten mit angeborenen oder erworbenen Immun-defekten, z. B. SCID, Patienten nach Stammzelltransplantation, und Intensivpatienten.

Während *M. tuberculosis* obligat pathogen für den Menschen ist, sind atypische Mykobakterien fakultativ pathogen und verursachen oft opportunistische Infektionen. Über 40 Arten atypischer Mykobakterien werden als Infektionserreger beim Menschen beschrieben.

Die wichtigsten Krankheitsbilder, die von atypischen Mykobakterien hervorgerufen werden, umfassen Lymphknoten-, Lungen- und Hautinfektionen sowie disseminierte Mykobakteriosen.

### **Lymphadenitiden**

Chronische durch atypische Mykobakterien verursachte Lymphadenitiden finden sich in der Regel bei ansonsten gesunden Kindern im Alter von 1 bis 5 Jahren. Klinisch zeigt sich eine meist einseitige schmerzlose Schwellung der zervikalen, submandibulären oder submaxillären Lymphknoten. Die Lymphadenitis wird häufig verursacht durch *M. scrofulaceum*, *M. avium*, und *M. intracellulare* (27; 70; 77). In den letzten Jahren wurden auch *M. abscessus*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. haemophilum*, *M. fortuitum*, *M. malmoense* und *M. lentiflavum* als Erreger zervikaler Lymphadenitiden beschrieben (16; 61). Die häufigste Komplikation ist eine Fistelbildung.

### **Pulmonale Erkrankungen**

Die Lunge ist bei Patienten mit Immundefekten oder chronischen Lungenerkrankungen das am häufigste von atypischen Mykobakterien befallene Organ. Meistens handelt es sich um Patienten, die älter als 40 Jahre sind (60). Symptome sind chronischer Husten, Dyspnoe, Fieber und abnorme Sputumproduktion. Der Verlauf ist chronisch-progredient und rezidivierend mit langen stationären Krankheitsphasen. Die röntgenologischen Veränderungen können ähnlich der Tuberkulose, aber auch sehr diskret sein und sich nur mittels hochauflösender Computertomographie nachweisen lassen. Komplikationen sind persistierende Hämoptysen und respiratorische Insuffizienz

Die Häufigkeit der Kavernenbildung wird bei *M. avium* mit 75 % angegeben, bei *M. kansasii* sogar mit 95 % (50).

Die häufigsten Erreger sind *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. chelonae* und *M. abscessus*, aber auch *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. szulgai*, *M. scrofulaceum* und *M. malmoense* und wurden bereits nachgewiesen (15; 76; 112).

### **Haut- und Weichteilmanifestationen**

Haut- und Weichteilerkrankungen durch atypische Mykobakterien umfassen vor allem zwei charakteristische Krankheitsbilder (63). Das in den Tropen vorkommende Buruli-Ulkus, das durch *M. ulcerans* verursacht wird, und das weltweit verbreitete Schwimmbadgranulom, das durch *M. marinum* hervorgerufen wird.

### **Disseminierte Infektionen**

Disseminierte Infektionen treten bei Patienten mit schwerer Beeinträchtigung des zellulären Immunsystems auf. Auslöser können u. a. Infektionen der Lunge, des Gastrointestinaltraktes oder der Haut sein. Die Krankheitserscheinungen sind meist uncharakteristisch und umfassen Fieber, Gewichtsverlust und Abgeschlagenheit, Anämie und mesenteriale Lymphknoten-vergrößerungen. Aufgrund dieser uncharakteristischen klinischen Symptomatik sind diese Infektionen nur schwer von anderen, eventuell gleichzeitig auftretenden opportunistischen Infektionen oder Tumorerkrankungen abzugrenzen.

Kauppinen (57) hat über disseminierte Infektion mit *M. fortuitum* bei Patienten mit Leukämie berichtet. Weitere häufig nachgewiesene Mykobakterien umfassen *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. malmoense* und *M. chelonae* (39).

### **Iatrogene Infektionen**

*M. chelonae*, *M. fortuitum* und *M. abscessus* wurden regelmäßig in Abszessen, sowie in Wunden nach Operationen nachgewiesen (84; 107; 112). Weiterhin wurde über Pseudoausbrüche mit *M. gordonae* durch kontaminierte Infusionslösungen berichtet (101). Auch traten disseminierte Infektionen mit Sepsis nach Peritonealdialyse oder Hämodialyse auf (7; 13), nachdem das Dialysat zuvor Kontakt mit Mykobakterienhaltigem Wasser gehabt hatte.

### **Seltene Erkrankungsformen**

Selten verursachen atypische Mykobakterien septische Arthritis, Osteomyelitis, Endokarditis, Prostatitis, Peritonitis, Keratitis und Infektionen des Zentralnervensystems (3; 8; 37; 71).

## 1.5. Therapie und Prognose

Die Therapie von Infektionen durch atypische Mykobakterien umfasst chirurgische und chemotherapeutische Maßnahmen. Viele atypische Mykobakterien zeigen eine natürliche Resistenz gegen einige tuberkulostatisch wirkende Chemotherapeutika wie Isoniazid oder Rifampicin. Die Therapie muss häufig über mehrere Monate durchgeführt werden.

Nicht selten treten während der Therapie Nebenwirkungen auf. Es ist deswegen besonders wichtig zu klären, ob es sich bei einem Erregernachweis aus Patientenmaterial tatsächlich um eine echte Infektion oder um eine Kontamination handelt.

Die Prognose und der klinische Verlauf der Erkrankung sind vom Immunstatus des Patienten abhängig. Während lokalisierte Infektionen bei ansonsten Gesunden in aller Regel komplikationslos abheilen, gehen disseminierte Infektionen bei Immungeschwächten mit einer hohen Letalität einher (23; 39; 57).

## 1.6. Diagnostik atypischer Mykobakterien

Für den mikrobiologischen Nachweis von atypischen Mykobakterien stehen mikroskopische, kulturelle und molekulare Methoden zur Verfügung.

Färbeverfahren, die auf der Säurefestigkeit beruhen, erlauben den mikroskopischen Nachweis von atypischen Mykobakterien, ermöglichen jedoch keine Speziesidentifizierung und auch keine Abgrenzung gegenüber *M. tuberculosis* Komplex. Für den kulturellen Nachweis werden spezielle Nährmedien wie Middlebrook-Agar und Löwenstein-Jensen-Medium, verwendet, die über lange Zeit bebrütet werden sollten. Bei einigen Arten kann es bis zu 8 Wochen dauern, bis Kolonien mit bloßem Auge erkennbar sind.

Entsprechend der Einteilung von Runyon (Tabelle 1) helfen Morphologie, Pigmentierung und Wachstumsverhalten neben biochemische Eigenschaften bei der Identifizierung von atyp. Mykobakterien. Eine eindeutige Speziesidentifizierung atypischer Mykobakterien ist jedoch mittels phänotypischer Methoden nicht möglich.

Molekulare Verfahren haben heutzutage eine wesentliche Bedeutung für den Nachweis und die Identifizierung atypischer Mykobakterien. Während PCR-Verfahren für den Direkt-nachweis von *M. tuberculosis* gut etabliert sind, handelt es sich bei den publizierten PCR-Assays für atypische Mykobakterien um nicht standardisierte in-house Verfahren.

Die Entwicklung fluorezenzbasierter real-time PCR-Verfahren, wie der LightCycler<sup>®</sup>-Technologie, bietet jedoch die Basis für eine molekulare Schnell Diagnostik aus Umwelt-

und Patientenproben. Diese Technologie wurde bereits für einen Direktnachweis atypischer Mykobakterien aus Milch (97), Biofilmen (97; 116), Leitungswasser (81), Patientenmaterial und direkt aus Kultur (64; 93) eingesetzt.

Für die Identifizierung kulturell angezüchteter atypischer Mykobakterien stellen molekulare Verfahren, wie die Sequenzierung bestimmter Genabschnitte (16S rRNA, ITS-Sequenzen) oder die Hybridisierung an spezifische DNA-Sonden, heute aufgrund ihrer Exaktheit die Methode der Wahl da.

Öffentliche Gendatenbanken (z. B. GenBank und RidomDatenbank) erlauben Sequenzvergleiche mit bekannten Umwelt-, Klinik- und Kontrollisolaten. Dabei liegen am meisten Daten bezüglich der genetischen Varianz des 16S rRNA-Gens vor. Die Interpretation von Sequenzierungsdaten erfordert jedoch genaue molekularbiologische Kenntnisse und eine kritische Überprüfung der Ergebnisse, da einige Mykobakterienarten eine enge genetische Verwandtschaft zeigen.

## **1.7. Mykobakterien in künstlichen Wassersystemen**

### **1.7.1. Epidemiologie und Erregerspektrum**

Ausgehend von ihrer saprophytären Lebensweise in der Umwelt haben sich atypische Mykobakterien sehr erfolgreich an das Habitat „künstliches Wassersystem“ angepasst.

In Studien aus verschiedenen Regionen der Welt wurden atypische Mykobakterien u. a. in folgenden künstlichen Wasserquellen nachgewiesen:

- Trinkwasser (Warm- und Kaltwasser) (46; 88)
- Krankenhauswasserverteilungssysteme (19; 28; 100)
- Badewasser in Schwimmbädern und Whirlpools (55)
- Abstriche von Wasserhähnen und Duschen (25)
- Biofilme in wasserdurchströmten Leitungssystemen (90; 91)
- Mineralwasser (17)
- Wasserproben aus Hämodialysegeräten (18)
- Aerosole aus künstlichen Wasserversorgungssystemen (24)
- Aquarien (1; 11)

Unter den oben genannten Wasserquellen hat Trinkwasser naturgemäß für den Menschen die größte Bedeutung.

Mykobakterien wurden 1922 erstmals in Trinkwasser gefunden. Die gelbpigmentierten Mykobakterien wurden damals als „Tap-water Scotochromogene“ bzw. deskriptiv als *M. aquae* bezeichnet (24). 1962 wurde erstmals die Spezies *M. gordonae* eingeführt und *M. aquae* wurde 1970 in *M. gordonae* umbenannt (113). Später zeigte sich, dass die sog. „Tap water Scotochromogene“ die Arten *M. gordonae*, *M. flavescens* und *M. scrofulaceum* umfassen, wobei die Liste sicherlich noch nicht vollzählig ist.

Die am häufigsten isolierte Spezies aus Trinkwasserproben ist *M. gordonae* (s. Tabelle 2). Andere häufig aus Wassersystemen isolierte Spezies umfassen *M. kansasii* (bevorzugt in Kaltwasserproben) und *M. xenopi* (bevorzugt in Warmwasserproben). *M. xenopi* und *M. kansasii* wurden bislang fast ausschließlich aus Leitungswasser isoliert, und noch nie in Bodenproben in der Umwelt nachgewiesen.

Einen Überblick über die wichtigsten bislang in Leitungswasserproben nachgewiesene Arten gibt Tabelle 2.

Auch aus Leitungswasserproben aus Krankenhäusern wurden wiederholt atypische Mykobakterien isoliert (100). Beispielsweise fand sich im Kaltwassersystem eines Bostoner Krankenhauses die pathogene Spezies *M. avium* in Konzentrationen von durchschnittlich 15 KBE/ml, und im Warmwassersystem in Konzentrationen von 1410 KBE/ml (34).

*M. avium-intracellulare* Komplex wurde außer an Kalt- und Warmwasserhähnen auch in medizinischen Geräten wie Inhalationsgeräten und in Trinkgefäßen nachgewiesen (41; 100). Durch Isolierung identischer Mykobakterienstämme bei Patienten und in deren Umgebung im Leitungswasser gelang es wiederholt, Leitungswasser als Infektionsquelle zu identifizieren (s. unter 1.7.4).

**Tabelle 2:** Erregerspektrum atypischer Mykobakterien in Leitungswasser

Mykobakterienspezies (Referenz)	Kaltwasser	Warmwasser
<i>M. abscessus</i> (41; 91)	+	-
<i>M. avium</i> (5; 29; 41)	+	+
<i>M. chelonae</i> (41; 46; 66; 86)	+	+
<i>M. flavescens</i> (41; 46)	+	+
<i>M. fortuitum</i> (19; 41; 66; 91)	+	+
<i>M. gadium</i> (66)	+	-
<i>M. gastri</i> (19; 24; 75)	+	-
<i>M. gilvum</i> (91)	+	-
<i>M. gordonae</i> (41; 46; 66; 86; 91)	+	+
<i>M. haemophilum</i> (41)	+	-
<i>M. intracellulaer</i> (29; 41)	+	-
<i>M. kansasii</i> (46; 94; 115)	+	+
<i>M. lentiflavum</i> (102; 104)	+	-
<i>M. marinum</i> (41)	+	-
<i>M. mucogenicum</i> (29; 45)	+	-
<i>M. nonchromogenicum</i> (66)	+	-
<i>M. peregrinum</i> (29)	+	+
<i>M. phlei</i> (103)	+	-
<i>M. scrofulaceum</i> (19; 29)	+	-
<i>M. simiae</i> (19; 28; 36)	+	-
<i>M. smegmatis</i> (78)	+	-
<i>M. szulagi</i> (41; 117)	+	-
<i>M. terrae</i> (41)	+	-
<i>M. tusciae</i> (102)	+	-
<i>M. vaccae</i> (78)	+	-
<i>M. xenopi</i> (4; 10; 86; 94; 95; 106)	+	+

### 1.7.2. Persistenz

Aufgrund der unterschiedlichen Temperaturansprüche der verschiedenen Arten atypischer Mykobakterien, scheint die Temperatur des Trinkwassers ein wichtiger Faktor für die Kontamination mit atyp. Mykobakterien zu sein. Du Moulin et al. (34) berichten, dass Wassertemperaturen von 52 bis 57 °C das Vorkommen von *M. avium* begünstigen. Einige Spezies wie *M. avium*, *M. xenopi*, *M. chelonae*, *M. phlei* und *M. scrofulaceum* sind hitzeresistenter als *M. kansasii* und *M. fortuitum* (89; 104). *M. fortuitum* und

*M. peregrinum* sind hingegen besonders resistent gegenüber Kälte. Sie wurden selbst aus Eismaschinen von Krankenhäusern isoliert (29).

Atypische Mykobakterien tolerieren selbst hohe Chlor-Konzentrationen im Leitungswasser (98; 106). So konnten Pelletier et al. (74) *M. avium* in einem Wassersystem mit einer Chlorkonzentration von 1,0 mg/l nachweisen. Auch gegenüber vielen Desinfektionsmitteln weisen atypische Mykobakterien eine hohe Widerstandfähigkeit auf (65; 68).

Atypische Mykobakterien besitzen weiterhin gegenüber weiteren schädigenden Umwelteinflüssen eine hohe Resistenz. Hierzu zählen z. B. chemische Faktoren wie pH-Wert, Salzkonzentration oder Einwirkung von bakteriziden Substanzen.

Da Mykobakterien aufgrund ihrer lipidreichen Zellwand eine hohe Resistenz gegen Austrocknung besitzen, behalten sie auch in trockener Umgebung lange ihre Vermehrungsfähigkeit bei. So ist zu erklären, dass man auch in Hausstaub Mykobakterien nachweisen kann (56).

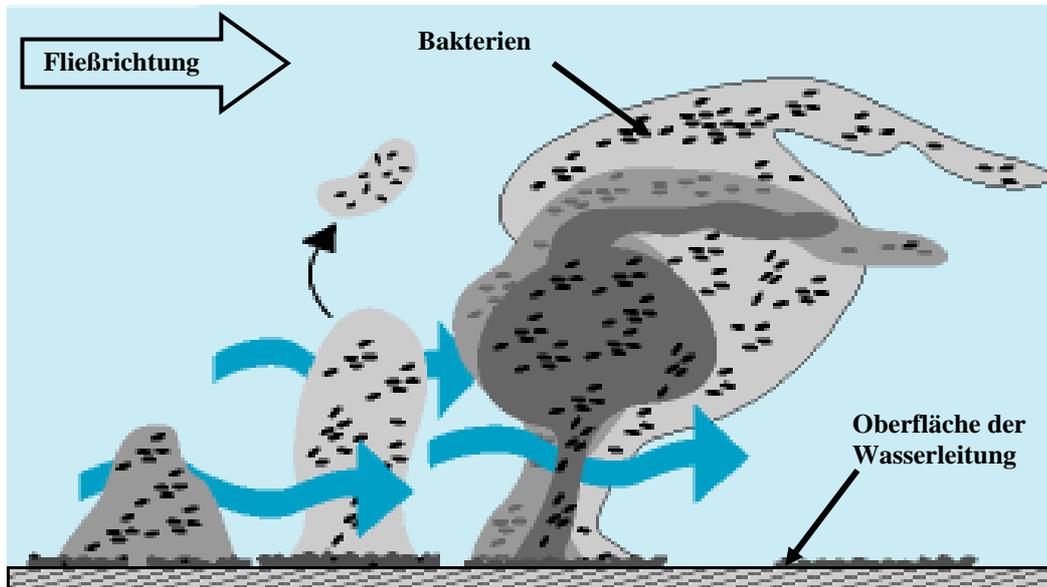
Schließlich wurde beobachtet, dass atypische Mykobakterien ähnlich wie Legionellen in frei lebenden Amöben intrazellulär überleben können und so gegen Umwelteinflüsse und Desinfektionsmittel geschützt sind (96). Alle beschriebenen Faktoren ermöglichen atypischen Mykobakterien somit ein effizientes Überleben und eine Vermehrung in künstlichen Wassersystemen.

### 1.7.3. Biofilmbildung

Biofilme sind mikrobielle Beläge, die sich auf Oberflächen bzw. Grenzflächen zu einer festen Phase (wie Schlauch- und Rohrleitungen) bilden können. Sie bestehen aus zahlreichen Mikroorganismen und den von ihnen produzierten extrazellulären, polymeren Substanzen, besonders Polysacchariden (21). Die Bakterien sind in die Biofilmbestandteile eingebettet, was ihnen eine Schutz gegenüber physikalischen und chemischen Faktoren, wie Temperaturschwankungen, pH-Wertveränderungen oder Desinfektionsmittel, bietet (s. Abb.1). Da Biofilme von im Wasser lebenden Amöben regelrecht abgeweidet werden, kommt hier ein enger Kontakt zwischen den Bakterien und Vektoren zustande.

Biofilme kommen daher als wichtiges Reservoir für atypische Mykobakterien in Trinkwasserleitungen in Frage. In Untersuchungen von Biofilmproben aus Trinkwasserrohren in Deutschland und Südafrika wurden tatsächlich in bis zu 90 % der Fälle atypische Mykobakterien (*M. flavescens*, *M. terrae*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. abscessus*, *M. gilvum*, *M. fortuitum* und *M. chelonae*) in einer Konzentration von  $10^3$  -  $10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> isoliert (90; 91).

Experimentelle Arbeiten zeigen, dass besonders die in der freien Umwelt bislang nie nachgewiesene Spezies *M. xenopi*, Biofilme sehr schnell (innerhalb 1 Stunde) besiedeln und in diesen wochenlang persistieren kann (31).



**Abb. 1:** Architektur eines Biofilms in einer Wasserleitung. Bakterien sind in extrazelluläre Matrix eingebettet und können mit dieser durch den Wasserfluss abgetrennt werden

#### 1.7.4. Klinische Bedeutung

Infektionen mit atypischen Mykobakterien konnten wiederholt auf kontaminiertes Leitungswasser als Quelle zurückgeführt werden. Dabei handelt es sich vor allem um nosokomiale Infektionen bei immungeschwächten Patienten. Nosokomiale Bakteriämien durch *M. mucogenicum* bei hämatologischen Patienten und Pneumonien durch *M. avium* Komplex bei HIV-Patienten konnten auf kontaminiertes Trinkwasser in den Krankenhäusern zurückgeführt werden (62; 100). Weiterhin fanden sich pulmonale Infektionen nach Bronchoskopien mit kontaminierten Bronchoskopen (10).

Berichtet wurde auch über Spinalkanal-Infektionen durch *M. xenopi* durch Verwendung von kontaminierten chirurgischen Gräten, die mit Leitungswasser gespült wurden (6), sowie über Fälle von Otitis media durch *M. chelonae* nach Mittelohrspülung mit kontaminiertem Wasser (67).

Auch bei Nachweis von *M. simiae*, *M. xenopi* und *M. szulgai* im Sputum immunsupprimierter Patienten konnte das Leitungswasser des Krankenhauses durch molekulare Erregertypisierung eindeutig als Erregerquelle identifiziert werden. Die Vielzahl nosokomialer Erregerübertragungen durch Leitungswasser und die berichteten zum Teil schwerwiegenden Infektionen bei immunsupprimierten Patienten betonen die Bedeutung von Leitungswasser als Erregerreservoir atypischer Mykobakterien und die Notwendigkeit einer Überwachung des Leitungswasser in Bereichen mit besonders gefährdeten Patienten.

Mehrere Fallberichte legen nahe, dass atypische Mykobakterien bei nicht Immunsupprimierten auch eine Hypersensitivität-Pneumonitis auslösen können, insbesondere durch die Inhalation von Aerosolen mykobakterienhaltigen Leitungswassers (38; 40).

Neben Leitungswasser können atypische Mykobakterien auch aus anderen künstlichen Wasserquellen auf den Menschen übertragen werden. Beispielsweise kam es bei drei Kindern mit Mukoviszidose durch Wasser eines Hydrotherapie-Pools innerhalb eines Rehabilitations-zentrums zu einer pulmonalen Besiedlung mit *M. chelonae* (9).

Es ist wichtig zu erwähnen, dass kontaminiertes Leitungswasser auch für viele Pseudo-Ausbrüche mit atypischen Mykobakterien verantwortlich war (36; 95; 111). Kontaminierte Endoskopiegräte spielen in diesem Zusammenhang wegen der Gefahr der Kontamination der Proben und einer möglichen Bakterienübertragung eine besondere Rolle (10; 30; 47). Auch über Pseudoinfektionen von Mykobakterien durch kontaminierte Reagenzien, die zur kulturellen Anreicherung der Mykobakterien benutzt wurden, wurde berichtet (101).

## 1.8. Fragestellung

Leitungswasser wurde wiederholt als Quelle für Infektionen mit atypischen Mykobakterien diskutiert. Da Trinkwasser gemäß der Trinkwasserverordnung frei von Krankheitserregern sein soll, die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit befürchten lassen, erscheint eine Übersuchung des Leitungswassers in Bezug auf atypische Mykobakterien sinnvoll. Bislang liegen jedoch keine aussagekräftigen Daten über die Epidemiologie atypischer Mykobakterien, wie beispielsweise das Artenspektrum oder Konzentrationsbereiche, im Leitungswasser in Deutschland vor, so dass diese in der TWVO nicht berücksichtigt wurden.

Ein wesentlicher Faktor für die geringe Kenntnis bezüglich der Epidemiologie atypischer Mykobakterien ist die schwierige Nachweisbarkeit und Identifizierung dieser Bakterien. Atypische Mykobakterien lassen sich kulturell nur auf Spezialnährmedien nach zum Teil monatelanger Bebrütung nachweisen und lassen sich nur mittels moderner molekularbiologischer Methoden, wie der Gensequenzierung, einwandfrei identifizieren.

Ziele dieser Arbeit waren daher

1. Die Entwicklung eines Aufbereitungsverfahrens für Wasserproben, das eine quantitative Anzucht auch langsam wachsender atypischer Mykobakterien bei optimaler Unterdrückung der Begleitflora des Wassers ermöglicht.
2. Die Etablierung einer quantitativen real-time LightCycler-PCR mit interner Inhibitionskontrolle zum Schnelldachweis von allen bekannten Arten atypischer Mykobakterien aus Leitungswasserproben.
3. Die Etablierung einer quantitativen real-time LightCycler-PCR zum spezifischen Nachweis von *Mycobacterium xenopi*, da diese Spezies in Süddeutschland besonders verbreitet im Leitungswasser sein soll und häufig aus Patientenproben am Universitätsklinikum Ulm nachgewiesen wird.
4. Die Untersuchung von Leitungswasserproben von allen Standorten des Universitätsklinikums Ulm mittels obigen PCR- und Kultur-Verfahren gefolgt von einer eindeutigen molekularen Identifizierung aller kulturell angezüchteten Isolate, um somit Erkenntnisse über das Artenspektrum und die Konzentration atypischer Mykobakterien zu erhalten. Dabei soll auch die Frage geklärt werden, ob die quantitative PCR als Schnellmethode zum Nachweis von atypischen Mykobakterien in Wasserproben geeignet ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Bakterienstämme

#### 2.1.1. Mykobakterien

<i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC 19977	DSM 44196
<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	ATCC 33464	DSM 44191
<i>Mycobacterium avium</i>	DSM 43216	
<i>Mycobacterium chelonae</i>	ATCC 35752	DSM 43804
<i>Mycobacterium flavescens</i>	ATCC 14474	DSM 43991
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	ATCC 6841	DSM 46621
<i>Mycobacterium frederiksbergense</i>	DSM 44346	
<i>Mycobacterium gastri</i>	ATCC 15754	DSM 43505
<i>Mycobacterium gordonae</i>	ATCC 14470	DSM 44160
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC 13950	DSM 43223
<i>Mycobacterium kansasii</i>	DSM 43224	
<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	Klinisches Isolat	
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	ATCC 49650	DSM 44625
<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	ATCC 19530	DSM 44164
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	ATCC 14467	DSM 43271
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	ATCC 19981	DSM 43992
<i>Mycobacterium simiae</i>	ATCC 25275	DSM 44165
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 19420	DSM 43756
<i>Mycobacterium terrae</i>	ATCC 15755	DSM 43227
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ATCC 27294	
<i>Mycobacterium vaccae</i>	ATCC 15483	DSM 43292
<i>Mycobacterium xenopi</i>	ATCC 19250	DSM 43995

#### 2.1.2. Gram-positive und gram-negative Bakterien

<i>Acinetobater baumannii</i>	ATCC 19606
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Klinisches Isolat
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 25416

<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	ATCC 23348
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 29213
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC 10953
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC 43863
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 33152
<i>Nocardia farcinica</i>	Klinisches Isolat
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC 6919
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	ATCC 17588
<i>Ralstonia pickettii</i>	ATCC 27511
<i>Rhodococcus equi</i>	Klinisches Isolat
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813
<i>Streptococcus bovis</i>	ATCC 33317
<i>Streptococcus constellatus</i>	ATCC 27823
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 49456
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 12344
<i>Streptomyces spp.</i>	Klinisches Isolat
<i>Tsukamurella pulmonis</i>	Klinisches Isolat

## 2.2. Reagenzien

### 2.2.1. Chemikalien

- Ampuwa<sup>®</sup> für Spülzwecke, 1000 ml Plastipur<sup>®</sup> (Aqua dest) (Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg)
- Baypen<sup>®</sup> 2g (Mezlocillin-Natrium 1 H<sub>2</sub>O) (Bayer, Leverkusen, Best.-Nr. 6079.02.00)

- Blue Dextran EDTA (Applied Biosystems, Darmstadt)
- Cetrimid-Agar (BioMérieux, Nürtingen, Best.-Nr. 3565)
- Cetylpyridiniumchlorid (CPC) (Merck, Hohenbrunn, Best.-Nr. 8.40008.0025)
- Colistinsulfate-Lsg 100 mg in 5 ml (Klinikapotheke Ulm)
- Cycloheximid (Sigma, Steinheim. Best.-Nr. C4859)
- Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt)
- Glycerin (Roth, Karlsruhe, Best.-Nr. 75301)
- Hexadecyltrimethylammonium bromid (Cetrimid) (Merck, Best. Nr. 814087.0100)
- Kinyoun-Färbung-Farbstoffe (Becton Dickinson, Heidelberg)
- NaCl-Lösung, 0,9 % B-Braun (Braun, Melsungen)
- Natriumhypochlorit 1 % (Hedinger, Stuttgart)
- Natronlauge (NaOH=1 mol/l [1N]) (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.09137.1000)
- Oxalsäure-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.00495.0100)
- Sodiumdodecylsulfate (SDS) (Sigma, München, Best.-Nr. 034k8930)
- 1% Triton X-100 (Sigma, Best.-Nr. T8787)
- 0,5% Tween 20 (Sigma, Best.-Nr. P9416)

### 2.2.2. Lösungen und Puffer

- CPC 5% Lösung
  - 5 g von CPC-Pulver in 995 ml Aqua dest., zur Auflösung wurde gut geschüttelt.
- Ladepuffer:
  - 0,25 g Bromphenolblau; 0,25 g Xylencyanol
  - 0,2 ml 0,5 M EDTA; 50 ml 100 % Glycerin
  - 4 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0–8,2
  - 5 ml 10 % SDS
- Sörensen-Puffer (Phosphatpuffer)
  - 5,94 g di-Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O) (Merck, No. 6580)
  - 4,54 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Merck, No. 4873)
  - 1 liter Aqua dest., Lösung auf pH 6,8 einstellen und autoklavieren
- TBE-Puffer (Fluka, Buchs)
- TRIS-EDTA-Puffer (TE-Puffer) pH 8,0 (Lysispuffer) enthält:
  - 0,5 ml Tris-EDTA (TE-Puffer) pH 8,0 (100x) (Fa. Sigma, Best.-Nr. T9285)

- 0,5 ml 1% Triton X 100 (Fa. Sigma, Best.-Nr. T8787)
- 0,25 ml 0,5% Tween 20 (Fa. Sigma, Best.-Nr. P9416)
- 50 ml Aqua dest.

### 2.2.3. Nährmedien

- Löwenstein-Jensen-Agar (LJ) mit Glycerol+PACT (Heipha, Artikel-Nummer 500r)
- Middelbrook-Agar 7H11 + OADC + PACT (Röhrchen) (Heipha, Artikelnummer 536r)
- Middelbrook-Agar 7H10 + OADC (Platte) (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 5243715)
- Middlebrook 7H10 Agar 500g (Becton Dickinson, USA, Best.-Nr. 262710)
- Middlebrook OADC Enrichment 100 ml (Becton Dickinson, USA, Best.-Nr. 212240)
- BBL™ MGIT™ 7 ml: MGIT-Indikatorröhrchen für die Anzucht von Mykobakterien im BACTEC MGIT 960-System
- MacConkey-Agar ohne Kristallviolett (Heipha, Eppelheim, Deutschland)

### 2.2.4. Primer und Sonden

#### 2.2.4.1 Primer und Sonden für atypische Mykobakterien-PCR:

- Primer LC 5 (5'-GGC GGA GCA TGT GGA TTA) (Thermo Electron GmbH, Ulm)
- Primer LC 4 (5'-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA) (Thermo Electron GmbH)
- Primer LC 1 (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCAGGA) (Thermo Electron GmbH)
- Sonde LC 39 (5'-GCA ACG CGA AGA ACC TTA CCT GG-Fluoresecein) (TIB Molbiol, Berlin)
- Sonde LC 40 (Light Cycler Red640-TTT GAC ATG CAC AGG ACG) (TIB Molbiol)
- Lambda-spezifische Hybridisierungssonde Lam LC ( 5`-LC Red705- CGG ATA TTT TTG ATC TGA CCG AAG CG)
- Lambda-Spezifische Hybridisierungssonde Lam FL (5`-GGT GCC GTT CAC TTC CCG AAT AAC)

#### 2.2.4.2 Primer und Sonden für *Mycobacterium xenopi*-PCR:

Alle Primer and Sonden wurden von Firma TIB Molbiol, Berlin, hergestellt

- Primer pMyc 14 (5`- GGG GTG CTC GAG TGG CGA AC)
- Primer amyc xen (5`- CCC ACA CCG CTA CCA AAC)

- Sonde Xenopi FL (5`- CCC CAC ATG CGC AGA ATG- Fluoresecein)
- Sonde Myco LC (LightCycler Red640-CCT ATC CGG TAT TAG ACC CAG TTT CCC)

### 2.2.4.3 Sequenzierungs-Primer für Mykobakterien

- Alle Primer and Sonden wurden von Firma Thermo Electron GmbH hergestellt

Myco 9 for	5`-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG
Myco 1046 rev	5`-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA
Myco 609 rev	5`-TTT CAC GAA CAA CGC GAC AA
Myco 361 rev	5`-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AG

## 2.2.5. Kommerzielle Kits

### 2.2.5.1 Kommerzielle Kits für PCR

- LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master<sup>Plus</sup> Hybridization Probes (Roche, Mannheim, Deutschland, Best.-Nr. 03515 575 001)
- Taq DNA Polymerase für Thermocycler (Qiagen, Hilden, Best.-Nr. 221203)
- Thermostabile Hotstart- DNA-Polymerase inklusive Puffer (HotStarTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase 50 units) (Qiagen, Hilden, Bestell-Nr. 203203)

### 2.2.5.2 Kommerzielle Kits für Sequenzierung

- Der **QIAquick PCR Purification** Kit (Qiagen aus Hilden Best. Nr. 28104) wurde zur Aufreinigung der DNA verwendet
- **BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit** Version 1.1 (Applied BioSystems, Darmstadt, Best.-Nr. 24336774) wurde für die Sequenzierreaktion verwendet
- DNA Polymerization Mix (Amersham Biosciences, England, Best.-Nr. 27-2094-02)

### 2.2.5.3 Kit für die Identifizierung von Mykobakterien (GenoType<sup>®</sup>)

Der Kit (Hain, Lifescience GmbH, Nehren) wurde für Identifizierung atypischer Mykobakterien verwendet.

## 2.3. Laborbedarf

### 2.3.1. Verbrauchsmaterial

- Duran Glasflasche, 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Schott, Mainz)
- Filter Millipore 0,45 µm (Cellulose Nitrate Filter) (Sartorius, Göttingen, Best.-Nr. 13806-47) Filtertrichter 1000 ml
- Glaskügelchen (steril) (Fa. Scherf)
- Kühlblock zum Pipettieren (Eppendorf, Rösrath)
- Thermometer - Checktemp (Hanna Instruments, England)

### 2.3.2. Geräte

- BACTEC<sup>®</sup> MGIT 960-System (Becton Dickinson)
- Elektrophorese-Spannungsgerät ST 606 T (Life Technologies GmbH, Eggenstein)
- Gel Elektrophorese Apparatur 1114 Horizon<sup>®</sup> (Life Technologies)
- LightCycler<sup>®</sup> real-time PCR-Gerät (Roche, Mannheim)
- Photometer Ultrospec III (Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Pumpe Millipore
- Sequenzer Abi Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt)
- Spannungsgerät: Electrophoresis Power Supply ST 606 T (Life Technologies)
- Thermocycler Primus 25/96 (Hain Lifescience GmbH, Nehren)
- Thermocycler Touch Down Hybaid (Thermo Electron GmbH)
- Thermomixer 5436 Eppendorf (Eppendorf, Hamburg)
- Transilluminator (UV-Bildschirm) (Bachofer)
- TwinCubator (Clemens, Vertrieb Fa. Hain Lifescience GmbH)
- Ultraschallbad Sonorex RK100H (Bandelin, Berlin)
- Zentrifuge MiniSpin<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg)
- Zentrifuge Varifuge 3.0 R (Heraeus, Hanau)

### 2.3.3. Software

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST>)

Ridom TraceEdit 1,0 (Ridom GmbH, Würzburg)

LightCycler3 Software Version 1.5.3 (Roche, Mannheim)

## 2.4. Probenentnahme und Verarbeitung der Proben

Die Wasserproben wurden im Zeitraum von April bis November 2005 entnommen. Entnahme-Orte waren Wasserhähne in den Universitätsklinika Oberer Eselsberg, Safranberg, Michelsberg, Söflingen, Schillerstraße, und in der Zentralküche der Uni-Ulm (s. Tabelle 3).

Insgesamt wurden 93 Wasserproben von 53 Wasserhähnen untersucht (40 Wasserhähne mit jeweils Kalt- und Warmwasser, 9 Wasserhähne nur kaltes Wasser, und 4 Wasserhähne nur warmes Wasser).

Die Wasserproben wurden nach DIN Empfehlung entnommen (32). Es wurde ein geeigneter hitzebeständiger Wasserhahn ohne Schlauch ausgesucht. Bei Probenentnahme wurde der Zapfhahn mehrere Male voll geöffnet und wieder geschlossen, um Schmutzpartikel aus der Leitung auszuschwemmen. Der Wasserhahn wurde geschlossen und solange mit dem Gas-Bunsenbrenner abgeflammt, bis deutliche Zischgeräusche zu hören waren. Danach lief das Wasser mindestens 5 Minuten lang in einem bleistiftstarkem Strahl. Anschließend wurde für jede Probe 1000 ml Wasser in eine sterile und beschriftete Glasflasche gefüllt. Während der Entnahme wurde die Temperatur des Probenwassers bestimmt.

Die Temperatur der warmen bzw. kalten Wasserproben reichte von 34-38 °C (durchschnittlich 36,2 °C) und von 14-22 °C (durchschnittlich 19,1 °C).

**Tabelle 3:** Entnahmestellen der Wasserproben

Ort	Klinik- Gebäude	Zahl der Kaltwasserproben	Zahl der Warmwasserproben
Oberer Eselsberg	Gebäude M 23/M 24	2	2
	Medizinische Klinik	16	16
	Zentralküche	2	1
Söflingen	Dermatologische Klinik	3	1
Michelsberg	Augen Klinik	1	1
	Frauenklinik	4	3
	HNO	1	1
	Kinderklinik	4	5
	Urologische Klinik	2	2
Safranberg	Chirurgische Klinik	13	11
Schillerstraße	Amb. Mucoviszidose	1	1

Die Proben wurden innerhalb einer Stunde nach Abnahme ins Labor gebracht, und am selben Tag verarbeitet. Für die Verarbeitung wurden jeweils 500 ml auf zwei Glasflaschen verteilt. Ein Teil wurde filtriert (Filter Millipore 0,45 µm). Der Filter wurde für die DNA-Isolierung weiter benützt, danach wurde die LightCycler-PCR durchgeführt (s. Kap. 2.6.2). Der zweite Teil wurde dekontaminiert, dann filtriert (s. Kap. 2.4.4.5.1) Der Filter wurde auf dem Middlebrook-Agar angelegt, und regelmäßig alle drei Tage auf das Wachstum von Mykobakterien kontrolliert (s. Kap. 2.4.1).

### **2.4.1. Kultivierung von Mykobakterien**

Als Kulturmedien für Mykobakterien wurden drei Festmedien und ein Flüssigmedium verwendet.

Die Referenzstämme wurden anfangs auf Löwenstein-Jensen-Agar (LJ), und auf Middlebrook 7H11 subkultiviert. Die Platten wurden bei  $36 \pm 1$  °C unter erhöhter CO<sub>2</sub> (5 %) Atmosphäre bebrütet.

Alle Filter wurden direkt auf Middlebrook-Agar 7H10 aufgebracht, und bei  $36 \pm 1$  °C unter erhöhter CO<sub>2</sub> (5 %) Atmosphäre für mindestens 50 Tage bebrütet.

Die Platten wurden mit Parafilm<sup>®</sup> beklebt, um die Kultur vor Befall durch Schimmelpilze zu schützen und die Feuchtigkeit länger zu bewahren. Zweimal pro Woche wurden die Nährmedien auf das Wachstum von Mykobakterien überprüft. Von jedem verdächtigen Kolonietyp wurde eine Kinyoun-Färbung angefertigt. Bei Nachweis von säuerfesten Stäbchen wurden die Kolonien nach Wachstumsgeschwindigkeit, Morphologie, und Pigmentbildung beurteilt und gezählt. Die Stämme wurden auf Middlebrook-Agar 7H10 subkultiviert, um saubere Kolonien (oder Reinkulturen) zu erhalten.

Wenn die Subkulturen wiederholt kontaminiert waren und sich keine sauberen Mykobakterienkolonien isolieren ließen, wurde eine Dekontamination versucht. Hierfür wurde ein von S. Rüscher-Gerdes 1988 etabliertes N-Acetyl-L-Cystein-NAOH-(NACLC-NaOH)-Verfahren verwandt. Schließlich wurde die Suspension in MGIT-Röhrchen (Flüssigmedium) gegeben, und im BACTEC<sup>®</sup> MGIT 960-System bei 36 °C bebrütet. Dem BACTEC<sup>®</sup> liegt ein automatisierter Nachweis des Substratabbaus zugrunde. Das MGIT-Indikatorröhrchen enthält ein Nährmedium, das Wachstumszusätze, fluoreszierende Verbindungen und Antibiotika enthält. Die Fluoreszenz der Substanz wird durch Sauerstoff unterbunden. Wenn große Menge des gelösten Sauerstoffs durch Bakterien-Wachstum verbraucht wurde, wird Fluoreszenz detektiert.

Die Fluoreszenz wird kontinuierlich gemessen. Bei Überschreiten eines eingestellten Grenzwertes, gibt das Gerät ein Signal. Bei positiver Meldung wurde wieder eine Subkultur auf Middelbrook-Agar 7H11 gemacht.

Mittels Sequenzierung des 16S rRNA-Gens lassen sich *M. flavescens* und *M. novocastrense* nicht unterscheiden. Von entsprechenden Isolaten wurden Subkulturen auf MacConkey-Nährmedien ohne Kristallviolett angelegt. Die Subkulturen wurden bei  $36 \pm 1$  °C mit 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bebrütet. Nach fünf Tagen wurde ausgewertet, ob Mykobakterien angewachsen waren. Bei Wachstum wurde der entsprechende Stamm als *M. novocastrense* identifiziert, bei fehlendem Wachstum als *M. flavescens* (33; 92).

#### **2.4.2. Anreicherung von Mykobakterien aus Leitungswasser**

Das erste Ziel war die Etablierung der optimalen Isolierungs-Methode von Mykobakterien aus Wasserproben für die weitere Kultivierung. Zwei Methoden für die Aufbereitung der Wasserproben wurden verglichen. Für die Vorversuche hierzu wurden zwei Ansätze von *M. smegmatis*-Suspensionen wie folgt hergestellt: Eine mittelgroße Kolonie wurde (mittels 10 µl-Öse) von einer Mykobakterienkultur entnommen und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in 800 µl 0,9 % NaCl suspendiert. Durch mehrfaches Resuspendieren mit Hilfe einer Pipette (1000 µl Größe) und anschließendem Vortexen für 30 sec wurde eine homogene Mischung hergestellt. Parallel hierzu wurden je 200 ml steriles Aqua dest. in Duran Glasflaschen mit einer Kapazität von 250 ml eingefüllt. In diese Glasflaschen wurden dann je 200 µl der Mykobakterien-Suspension zugegeben. Durch Verwendung von je 200 µl der Ausgangssuspension konnten bis zu 4 identische Ansätze parallel hergestellt werden. Schließlich wurden die Ansätze geschüttelt und gleich zur weiteren Verarbeitung verwendet.

Als Kontrolle wurden 200 µl der unverdünnten Ausgangs-Suspension direkt auf Middelbrook-Agar 7H10 aufgetragen und mit sterilen Glaskügelchen auf die ganze Platte verteilt.

#### **Isolierungs-Methoden**

Die Methoden wurden wie folgt durchgeführt:

**Methode 1 (Filter):** Der Ansatz wurde durch den Filter Millipore 0,45 µm filtriert. Der Filter wurde anschließend mit einer sterilen Pinzette auf Middelbrook-Agar 7H10

aufgebracht. Der Agar wurde (bei 37 °C bei 5 % CO<sub>2</sub>) bebrütet und alle 3 Tage optisch auf Wachstum kontrolliert.

**Methode 2 (Zentrifugation):** Der Ansatz wurde auf 50 ml Falconröhrchen verteilt (4 mal 50 ml) und bei 4000 rpm für 30 min zentrifugiert wie in früheren Publikationen beschrieben (19). Das Sediment wurde in 400 bis 600 µl Phosphatpuffer resuspendiert, auf Middlebrook-Platte aufgetragen, und mit sterilen Glaskügelchen verteilt.

Nach 10 Tagen bis 15 Tagen wurde die Zahl der Kolonien auf den 3 Platten (Kontrolle, Platte mit Filter, Zentrifugationsmethode) mittels Auszählen ermittelt. (s. Kap. 3.1.1).

### **2.4.3. Versuchsansätze zur Dekontamination des Leitungswassers und zur Selektion der Mykobakterien**

Die Dekontamination des Leitungswassers hat zum Ziel, die nichtmykobakterielle Begleitflora zu unterdrücken und das Wachstum von Mykobakterien möglichst nicht zu beeinflussen.

Die Begleitflora wächst in der Regel schneller als die Mykobakterien. Sie besteht hauptsächlich aus Sporenbildern, Schimmelpilzen und mit Mykobakterien verwandten Gattungen wie *Rhodococcus* und *Nocardia* und anderen Arten (s. Abb. 2).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in der Literatur beschriebene Dekontaminations-Methoden mit modifizierten und neu entwickelten Verfahren verglichen. Die Methoden beinhalteten zum Teil eine Dekontamination der Wasserprobe vor Filtration, zum Teil eine Dekontamination des Filters nach Filtrieren der Wasserprobe. Zum einen wurde untersucht, wie effizient die jeweiligen Methoden das Wachstum von Begleitflora unterdrücken. Zum anderen wurde betrachtet, wie weit sie das Wachstum von ausgewählten Mykobakterien unterdrücken.

Für alle Vorversuche wurden Ansätze von Mykobakterien-Suspensionen wie unter Punkt 2.4.2 beschrieben eingesetzt. Als Kontrolle für diese Versuche wurde ein nicht dekontaminierter Ansatz mit einem Millipore Filter (0,45 µm) filtriert. Dieser Filter wurde anschließend direkt auf Middelbrook-Agar 7H10 aufgelegt und bebrütet.

Parallel hierzu wurden bei allen Vorversuchen auch Leitungswasserproben getestet. Auch hier wurden je 200 ml Leitungswasser eingesetzt. Als Kontrolle für diese Versuche dienten nicht dekontaminierte Leitungswasserproben.

Die Filter der unterschiedlichen Ansätze wurden anschließend auf Middelbrook-Agar 7H10 bebrütet und alle drei Tage auf Wachstum von Kolonien untersucht. Sobald ausreichend große, gut beurteilbare Kolonien auf den Kontrollplatten angewachsen waren,

wurden die Kolonien ausgezählt. Die Auswertung auf das Wachstum von Begleitflora erfolgte zwischen dem 10. und 20. Tag. Die Auswertung auf das Wachstum von Mykobakterien erfolgte zwischen dem 30. und 40. Tag. Die Zahl der Kolonien des dekontaminierten Ansatzes wurde mit der Zahl der Kolonien auf der Kontrolle verglichen. Aus diesen Werten wurde die Hemmung des Wachstums der Begleitflora bzw. der Mykobakterien der jeweiligen Dekontaminationsmethode in Prozent ermittelt.

**Abb.2:** Filter mit angewachsener Flora aus 500 ml Leitungswasser der Uniklinik Ulm ohne Dekontamination nach 3 Tagen Bebrütung



#### 2.4.3.1 Dekontamination mit SDS, NaOH und Ceftriaxon

Die Dekontamination mit 3 % SDS, 4 % NaOH und 2 % Ceftriaxon wurde durchgeführt, wie von andere Autoren angegeben (72). Die Methode wurde wie unter Punkt 2.4.2 beschrieben an Mykobakterien-Suspensionen und Leitungswasserproben getestet.

Der Ansatz (200 ml der Mykobakterien Suspension oder 200 ml Leitungswasser) wurde filtriert, und der Filter wurde wie folgt dekontaminiert:

- Der Filter wurde für 15 bzw. 25 Minuten in eine sterile Petrischale mit 20 ml Dekontaminationslösung I (3 % SDS Endkonzentration, 4 % NaOH Endkonzentration) gegeben.
- Die Dekontaminationslösung I wurde mit einer Pipette abgesaugt.
- Anschließend wurden 20 ml Ceftriaxon (2 % Endkonzentration) für 10 min in die Petrischale gegeben.

- Cetrimid wurde mit einer Pipette abgesaugt.
- Der Filter wurde in einer weiteren Petrischale mit 20 ml Phosphatpuffer pH 6,8 für 5 min gespült.
- Der Filter wurde auf Middelbrook-Agar 7H10 gebracht und bebrütet.
- Als Kontrolle wurden entsprechende nicht dekontaminierte Filter eingesetzt.

Dieser Versuch wurde 4 Mal wiederholt.

In 6 weiteren Versuchen wurde die Dekontaminationslösung I nicht nach der Filtration eingesetzt, sondern wurde dem Ansatz vor der Filtration zugesetzt (mit 3 % SDS Endkonzentration und 4 % NaOH Endkonzentration).

Vier dieser Versuche liefen ohne Cetrimid-Schritt. In zwei Versuchen wurde der Filter nach Filtrierung wie oben beschrieben mit Cetrimid behandelt.

#### **2.4.3.2 Dekontamination mit NaOH und Na-Citrat**

Um zu untersuchen, wie sich die Dekontamination-Methode mit 2 % NaOH und Na-Citrat auf das Wachstum von Mykobakterien auswirkt, wurden zu einem Ansatz mit *M. smegmatis* und *M. fortuitum* eingesetzt. Zum anderen wurden Versuche mit unbehandeltem Leitungswasser durchgeführt:

- Ein 200 ml Ansatz einer Mykobakterien-Suspension, bzw. des Leitungswassers (siehe oben) wurde filtriert (Filter Millipore 0,45 µm).
- Der Filter wurde für 15 Minuten in eine sterile Petrischale mit 20 ml Dekontaminationslösung (2 % NaOH, Na-Citrat Endkonzentration und Na-Citrat 1:1 mischen) gegeben.
- Die Dekontaminationslösung wurde mit einer Pipette abgesaugt.
- Dann wurde der Filter in 20 ml Phosphatpuffer für 5 min gespült.
- Der Filter wurde auf Middelbrook-Agar 7H10 gebracht und bebrütet.
- Parallel hierzu wurde ein nicht dekontaminierter Filter als Kontrolle bebrütet.
- Die Bebrütung und die Beurteilung wurden wie unter Punkt 2.4.3 beschrieben durchgeführt.

#### **2.4.3.3 Dekontamination mit Oxalsäure**

Die Dekontamination mit 5 % Oxalsäure wurde wie von Glover et al. (49) beschrieben durchgeführt. Für die Versuche wurden Ansätze mit *M. smegmatis* und *M. fortuitum* eingesetzt:

- Der Ansatz wurde filtriert und der Filter für 15 min in sterile Petrischale mit 20 ml (5 % Oxalsäure Endkonzentration) gegeben.
- Dekontaminationslösung wurde abgesaugt. Der Filter wurde für 5 min mit Phosphatpuffer gespült.
- Der Filter wurde auf Middelbrook-Agar 7H10 gebracht, bebrütet und später beurteilt.

#### **2.4.3.4 Dekontamination mit Cetylpyridiniumchlorid**

Die Dekontamination mit Cetylpyridiniumchlorid (CPC) wurde mit verschiedenen Konzentrationen CPC durchgeführt. Hierbei wurden in früheren Publikationen beschriebene Vorgehensweisen verglichen (29; 41; 45; 46; 69; 87). Zum einen wurde CPC in verschiedenen Konzentrationen direkt in das Leitungswasser gegeben, welches anschließend filtriert wurde, zum anderen wurde Leitungswasser filtriert und anschließend der Filter mit CPC versetzt.

##### **2.4.3.4.1 Direkte Behandlung der Wasserprobe mit Cetylpyridiniumchlorid**

500 ml Wasser wurden unterschiedlichen Mengen CPC zugesetzt, um Endkonzentration von 0,005 %, 0,01 %, 0,02 % und 0,04 % CPC zu erreichen.

Die Einwirkzeit bis zur anschließenden Filtration betrug 15 bzw. 30 min. Im Anschluss an die Dekontamination mit CPC wurde das Wasser filtriert. Der Filter wurde anschließend mit 500 ml sterilem Wasser gespült. Der Filter wurde vorsichtig mit einer sterilen Pinzette von der Filteranlage abgenommen und auf den Nährboden aufgelegt.

Die Bebrütung und die Beurteilung wurden wie unter Punkt 2.4.3 beschrieben durchgeführt.

##### **2.4.3.4.2 Behandlung des Filters mit Cetylpyridiniumchlorid**

Für die Vorversuche zur Dekontamination von Filtern mittels CPC wurden Leitungswasser-Proben und Mykobakterien-Suspension eingesetzt.

- Der Ansatz wurde filtriert. Der Filter wurde für 15 min in eine sterile Petrischale mit 20 ml (0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 % CPC Endkonzentration) gegeben.
- Der Filter wurde danach mit Phosphatpuffer in einer Petrischale für 5 min gespült.
- Danach wurde der Filter auf Middelbrook-Agar 7H10 gebracht.
- Die Bebrütung und die Beurteilung wurden wie unter Punkt 2.4.3 beschrieben durchgeführt.

### 2.4.3.5 Verwendung Antibiotika-haltiger Nährmedien

Die Vorversuche wurden parallel mit Leitungswasser und Mykobakterien-haltigem Ansatz durchgeführt.

#### 2.4.3.5.1 Selektion mit Colistin und Mezlocillin

Colistin und Mezlocillin wurden in Kombination in 2 unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt:

- 1) 4 µg/ml Colistin und 6 µg/ml Mezlocillin.
- 2) 6 µg/ml Colistin und 10 µg/ml Mezlocillin.

#### **Herstellung von Colistin und Mezlocillin- haltigem Middelbrook-Agar 7H10:**

1 ml Colistin Stocklösung (Konzentration 2 g/100 ml) wurde mit 24 ml Aqua dest gemischt um eine Lösung I mit einer Konzentration von 0,8 mg/ml Colistin zu erreichen. 100 µl bzw. 150 µl von Lösung I wurde auf Middelbrook-Agar 7H10 gegossen um eine Endkonzentration von 4 µg/ml bzw. 6 µg/ml Colistin im Agar zu erreichen. Analog wurde eine Mezlocillinlösung mit einer Konzentration von 1,33 mg/ml hergestellt. Anschließend wurden 100 µl bzw. 150 µl von Mezlocillinlösung auf Middelbrook-Agar 7H10 gegossen um eine Endkonzentration von 6 bzw. 10 µg/ml Mezlocillin im Agar zu erreichen. Die Lösungen wurden mit sterilen Glaskügelchen auf dem Agar verteilt. Der Agar wurde 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen bis die Lösungen absorbiert waren. Anschließend wurde der Agar für die Versuche benützt.

#### **Versuchsdurchführung:**

Jeder Ansatz (Leitungswasser bzw. Mykobakterien-Ansatz) wurde filtriert und der Filter wurde direkt auf den Agar aufgelegt. Die Bebrütung und die Beurteilung wurden wie unter Punkt 2.4.3 beschrieben durchgeführt.

#### 2.4.3.5.2 Selektion mit Cycloheximid

##### **Herstellung von Middelbrook-Agar 7H10 mit 500 mg Cycloheximid:**

- 19 g Middlebrook 7H10 Agar-Pulver wurde in 900 ml Aqua dest + 5 ml Glycerin gelöst, dann gekocht, autoklaviert und abgekühlt bis auf 50-55 °C.
- 100 ml OADC-Anreicherung wurde zugegeben.
- 500 mg Cycloheximid wurde zugegeben.
- Je 20 ml des noch flüssigen, gut gemischten Agars wurden verwendet um Agarplatten zu gießen.

- nachdem sie abgekühlt waren, wurden die Platten bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert (maximal 4 Wochen).

Jeder Ansatz (Leitungswasser bzw. Mykobakterien-Ansatz) wurde filtriert und der Filter wurde direkt auf den Agar mit Cycloheximid aufgelegt. Die Bebrütung und die Beurteilung wurden wie unter Punkt 2.4.3 beschrieben durchgeführt.

## 2.5. Identifizierung der Mykobakterien

### 2.5.1. Morphologie, Farbe, Wachstumsgeschwindigkeit

Bei Wachstum von Kolonien auf dem Filter wurde zunächst die Form, die Größe, die Oberflächenbeschaffenheit und die Farbe der Kolonien beurteilt. Von einer repräsentativen Auswahl Mykobakterien-verdächtiger Kolonien wurde anschließend eine Kinyoun-Färbung angefertigt.

Von allen unterschiedlichen Kolonietypen, die in der Kinyounfärbung säurefeste Stäbchen zeigten, wurde eine Subkultur auf Middlebrook-Agar 7H10 durchgeführt. Um ein möglichst großes Spektrum zu isolieren, wurden auch solche Kolonien, die sich nur geringfügig unterschieden, einzeln subkultiviert. Von den entsprechenden Subkulturen wurde die weitere Differenzierung durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde jede Mykobakterien-Spezies nur einmal gezählt, unabhängig davon, ob mehrere Morphologie-Typen vorlagen oder nicht.

### 2.5.2. Sonden-Hybridisierungsverfahren

Der GenoType<sup>®</sup> *Mycobacterium* CM ist ein molekulargenetisches Testsystem zur Differenzierung von Mykobakterien aus Fest- oder Flüssigkulturmedien.

Der Test basiert auf der DNA-Strip<sup>®</sup>-Technologie mit initialer Amplifikation der Zielgene mittels 16S rRNA Gen-Sequenzierungs-PCR und anschließender reverser Hybridisierung auf einem Teststreifen. Der Test erzielte hohe Sensitivität und identifiziert ca. 30 Mykobakterienarten aus Kultur (80; 85). Dieses Verfahren wurde bei Stämmen eingesetzt, die in der Sequenzierung des 16S rRNA-Gens ein Ergebnis mit *M. chelonae/abscessus* ergaben, die Sequenzierung nicht zwischen *M. chelonae* und *M. abscessus* unterscheiden kann.

Die DNA wurden aus frischer Kultur isoliert (s. Kap. 2.6.1), der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.5.3. Sequenzierung

#### 2.5.3.1 Amplifikation des Zielgens

Die Amplifikation des Zielgens erfolgte mittels PCR auf dem Thermocycler.

Bei jeder PCR-Reaktion wird eine Reagenzien-Negativkontrolle, bestehend nur aus den Reagenzien und sterilem Aqua dest, anstelle der Probe, mitgeführt.

##### Pipettierschema für die PCR:

Taq Polymerase (5 U/ $\mu$ l, Applied Biosystems)	0,5 $\mu$ l	
Primer Myco 9 for	0,5 $\mu$ l	entspricht 10 pmol
Primer Myco 1046 rev	0,5 $\mu$ l	entspricht 10 pmol
DNA	4 $\mu$ l	
dNTP 5 mM	1,3 $\mu$ l	
10 X PCR Puffer (Perkin Elmer)	10 $\mu$ l	
Aqua bidest.	82,7 $\mu$ l	

Die PCR wurde im Thermocycler Touch Down in 39 Zyklen durchgeführt:

Zuerst Erhitzung bei 94 °C für 5 min

Dann für jeden Zyklus:	1- Denaturierung	1 min 94 °C
	2- Anlagerung (Annealing)	1 min 64 °C
	3- Elongation (Extention)	1 min 72 °C

Dann 5 min 72 °C für 1 Zyklus, dann auf 4 °C abkühlen und Temperatur halten.

Alle Reagenzien wurden für den Reaktionsansatz auf Eis gelagert und im Kühlblock pipettiert, um ein unkontrolliertes, zu frühes Beginnen der PCR und somit die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte zu verhindern.

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Das PCR-Produkt sollte eine Bande bei ca. **1037 bp** zeigen.

Um überschüssige Primer und freie Nukleotide zu entfernen, wurden die PCR-Amplifikate mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Fa. Qiagen) aufgereinigt. Die Durchführung wurde nach Standardanweisung gemacht.

#### 2.5.3.2 Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierreaktion wurde das BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Fa. Applied Biosystems entsprechend des Protokolls des Herstellers verwendet. Die Sequenzierreaktion wurde dabei mit folgenden Primern durchgeführt:

Myco 9 for, Myco1046 rev, Myco 609 rev, und Myco 361 rev. Da je Primer ein Ansatz hergestellt werden muss, benötigt man pro Isolat drei Ansätze.

Pipettierschema für Sequenzierungen eines Primer-Ansatzes:

- |  |        |
|--|--------|
| - BigDye Terminator Ready Reaction Mix | 4,0 µl |
| - Sequenz-Puffer, 5x                   | 4,0 µl |
| - Primer (20 pmol /µl)                 | 0,3 µl |
| - Aqua bidest.                         | 6,7 µl |

Zu dem Ansatz 5,0 µl gereinigtes PCR-Produkt zugeben.

Die Sequenzierreaktion stellt im Prinzip eine PCR dar. Sie wurde im Thermocycler Touch Down mit folgenden Einstellungen durchgeführt.

1. Erhitzen auf 96 °C, 30 sek.
2. Temperatur 60 °C, 4 min  
für 25 Zyklen

Anschließend wurden die Sequenzierprodukte durch alkoholische Fällung aufgereinigt

Die Durchführung der Aufreinigung wurde nach Standardanweisung des Instituts durchgeführt.

### **2.5.3.3 Sequenzanalyse im Sequenziergerät**

Die Sequenzanalyse erfolgte als automatisierte, computergestützte Bestimmung der Nukleotidabfolge im Kapillarsequenziergerät ABI Prism 310. Das Sequenziergerät trennt die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente durch Kapillarelektrophorese auf und detektiert die jeweiligen Nukleotide nach Aktivierung der Fluoreszenzmoleküle durch einen Laser. Dabei transformiert das Sequenziergerät das Emissionsmuster in Chromatogramme, die anhand spezieller Software ausgewertet werden können und somit die Nukleotidsequenz entschlüsseln.

### **2.5.3.4 Auswertung von Sequenzierungen**

Um für ein Isolat die vollständige DNA-Sequenz des 16S rRNA-Gens zu erhalten, müssen die einzelnen Teilstücke der drei Primer in der richtigen Reihenfolge und an den passenden Schnittstellen zusammengesetzt werden. Dies wurde mit Hilfe des Auswertungsprogramm Trace Edit, Fa. Ridom, durchgeführt.

Die ermittelten Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST-Programmes der GenBank-Datenbank des National Center for Biotechnology Information der USA (NCBI,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST>), mit allen in der Datenbank enthaltenen Sequenzen verglichen. Zusätzlich wurden die Sequenzen mit der Datenbank des Ridom-Programmes der GenBank-Datenbank des Ribosomal Differentiation of Medical Microorganism der Uni Würzburg (<http://www.ridom-rdna.de/>) verglichen. Diese Datenbank enthält nur Sequenzen von Referenzstämmen.

Die Auswertung einer Sequenzierung gibt dabei einen Grad der Homologie zwischen zwei DNA-Sequenzen an. Eine Homologie des 16S rRNA-Gens größer 97 % zu einer Sequenz der Datenbank gilt als zuverlässige Identifizierung eines Bakteriums. In dieser Arbeit wurde jedoch als Kriterium für eine eindeutige Identifizierung der bakteriellen Spezies eine Homologie zur entsprechenden Spezies in der Datenbank von > 98 % und eine eindeutige Homologie zum jeweiligen Referenzstamm in der Ridom-Datenbank definiert, um möglichst exakte Ergebnisse zu erhalten.

## **2.6. Isolierung der DNA von Mykobakterien**

### **2.6.1. Isolierung der DNA aus Reinkulturen**

Die DNA wurde von Referenzstämmen und von isolierten Mykobakterien aus Kultur wie folgt isoliert.

1. 500 µl TE-Puffer in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß 1,5 ml pipettieren.
2. Mit einer Öse mehrere sichtbare Kolonien entnehmen und direkt in den TE-Puffer suspendieren, vortexen.
3. Das Gefäß in Gensonden -Ultraschall –Bad (35 KHz) für 15 min behandeln.
4. 10 min in Thermomixer bei 95 °C kochen.
5. 5 min bei 14.000 U/min zentrifugieren.

Anschließend wurde ca. 100 µl des Überstandes entnommen. Die isolierte DNA wurde zur Lagerung in ein sauberes beschriftetes Reaktionsgefäß gegeben und bei 2-8 °C aufbewahrt.

### **2.6.2. Isolierung der DNA aus Wasserproben**

- Filtration von 500 ml Wasserprobe.
- Der Filter wurde mit einer sterilen Pinzette in ein Röhrchen mit 10 ml TE-Puffer gegeben.
- Das Röhrchen wurde im Gensonden -Ultraschall –Bad (35 KHz) für 30 min behandelt.

- Anschließend wurde das Röhrchen 5 min gevortext.
- Der Filter wurde aus dem Röhrchen entnommen und entsorgt.
- Das Röhrchen wurde 15 min bei max. Geschwindigkeit (5000 g) zentrifugiert.
- Überstand wurde abpipettiert, und das Sediment (ca. 500 µl, die genaue Menge wurde immer dokumentiert) wurde gevortext und ins Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben.
- Das Reaktionsgefäß wurde in Gensonden -Ultraschall –Bad (35 KHz) für 15 min behandelt.
- Kochen für 10 min bei 95 °C.
- Die Suspension wurde 5 min bei (14000 U/min) zentrifugiert.
- Der Überstand wurde für die PCR entnommen.

Es wurden hier verschiedene Vorversuche zur Etablierung dieser Methode durchgeführt.

Zwei Ansätze von Mykobakterien wurden vorbereitet, nachher wurden beide filtriert. Als Kontrolle wurde ein Filter ohne weitere Behandlung auf den Agar aufgelegt.

Der zweite Filter wurde wie oben beschrieben behandelt. In einer Reihe von Versuchen wurde die oben beschriebene Methode bezüglich der Länge der Ultraschallbehandlung und des Vortexens folgendermaßen variiert:

1. 5 min in Gensonden –Ultraschall, dann 1 min vortexen.
2. 15 min in Gensonden –Ultraschall, dann 15 min vortexen.
3. 30 min in Gensonden –Ultraschall, dann 5 min vortexen.
4. 5 min Vortexen, 30 min in Gensonden –Ultraschall, dann 1 min vortexen.

## 2.7. LightCycler Real-time PCR

Es wurde in dieser Studie eine LightCycler-PCR mit Hybridisierung-Sonden durchgeführt. Bei Anwendung wurden zusätzlich zu den Primern zwei sequenzspezifische Sonden eingesetzt, die an die Primer amplifizierter DNA binden können. Die Sequenzen der Sonden sind so gewählt, dass sie im kleinstmöglichen Abstand zueinander liegen, so dass ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer stattfinden kann.

Bei den Vorversuchen wurden mehrere Sonden und Primer mit unterschiedlichen Mengen ausprobiert. Um optimale PCR Ergebnisse zu erzielen. Schließlich wurde die LightCycler-PCR mit Hybridisierung-Sonden für atypische Mykobakterien und für *M. xenopi* etabliert (s. Kap. 3.1.3 und Kap. 3.1.4).

### 2.7.1. *Mycobacterium spp.*-spezifische PCR

Ein 100 bp großes Fragment auf dem 16S rRNA-Gen von Mykobakterien wurde mit den Primern **LC 4** und **LC 5** amplifiziert. Das Gesamtvolumen von jeder PCR betrug 20  $\mu$ l. Das Pipettierschema für einen PCR-Ansatz zum Nachweis aller atypischen Mykobakterien PCR wurde wie folgt durchgeführt:

7.5 $\mu$ l	Aqua dest (Dnase behandelt)	
0.5 $\mu$ l	Primer 1 LC 5 (10 pmol / $\mu$ l)	(5 pmol pro Ansatz)
1 $\mu$ l	Primer 2 LC 4 (10 pmol / $\mu$ l)	(10 pmol pro Ansatz)
1 $\mu$ l	Hybprobe 1 LC 39 (3 pmol / $\mu$ l)	
1 $\mu$ l	Hybprobe 1 LC 40 (3 pmol / $\mu$ l)	
4 $\mu$ l	Master <sup>Plus</sup>	

Alle Reagenzien wurden vor Gebrauch bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden die Reagenzien bei 2-8 °C für weitere PCR-Ansätze gelagert.

Der Ansatz wurde in LightCycler Kapillaren, die in dem Kühlblock waren, pipettiert.

Dann wurde der Kühlblock an einem anderen Arbeitsplatz gebracht, und die 5  $\mu$ l DNA dazu pipettiert und die Kapillaren mit den dazugehörigen Deckeln versiegelt. Der mobile Rotor des LightCyclers wurde mit den Kapillaren beladen und in der LightCycler Zentrifuge 15 sec bei 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Rotor in den LightCycler eingesetzt und der Lauf gestartet.

### 2.7.2. *Mycobacterium xenopi*-PCR

Hier wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Olfert Landt, Fa. TIB Molbiol, neue Primer und Sonden etabliert. Mit den Primern **P myc 14** und **a mycxen** wurde eine 145 bp großes Fragment auf dem 16S rRNA-Gen amplifiziert. Die genauen Sequenzen sind im Kap. 2.2.4 aufgeführt. Mehrere Vorversuche wurden durchgeführt, bis schließlich eine Methode etabliert wurde.

Pipettierschema für *M. xenopi* PCR (für einen Ansatz):

6.75 $\mu$ l	Aqua dest (Dnase behandelt)	
2 $\mu$ l	Primer 1 P myc 14 (10 pmol / $\mu$ l)	(20 pmol pro Ansatz)
0.25 $\mu$ l	Primer 2 amycxen (10 pmol / $\mu$ l)	(2 pmol pro Ansatz)
1 $\mu$ l	Hybprobe 1 xenopi FL (3 pmol / $\mu$ l)	
1 $\mu$ l	Hybprobe 1 myco LC (3 pmol / $\mu$ l)	
4 $\mu$ l	Master <sup>Plus</sup>	
5 $\mu$ l	DNA	

### 2.7.3. LightCycler-Programmierung

Der LightCycler wurde folgendermaßen programmiert:

**Tabelle 4:** Programm der LightCycler-PCR mit Hybridisierung-Sonden für atypische Mykobakterien

Segment-Nr.	Target Temperature (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp. (°C)	Step Size (°C)	Step Delay	Fluorescence Acquisition Mode
<b>Denaturierung</b>		<b>1 Cycle</b>					
1	95	600	20	0	0	0	None
<b>Amplifikation</b>		<b>50 Cycles</b>					
1 (denat.)	95	10	20	0	0	0	None
2 (anneal.)	50	1	20	0	0	0	Single
3 (elongate)	72	20	20	0	0	0	None
<b>Schmelzkurve</b>		<b>1 Cycle</b>					
1	95	30	20	0	0	0	None
2	38	30	20	0	0	0	None
3	90	0	0.2	0	0	0	Continuous
<b>Kühlung</b>		<b>1 Cycle</b>					
1	40	30	20	0	0	0	None

**Tabelle 5:** Protokoll der LightCycler-PCR mit Hybridisierung-Sonden für *M. xenopi*

Segment-Nr.	Target Temperature (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp. (°C)	Step Size (°C)	Step Delay	Fluorescence Acquisition Mode
<b>Denaturierung</b>		<b>1 Cycle</b>					
1	95	600	20	0	0	0	None
<b>Amplifikation</b>		<b>50 Cycles</b>					
1 (denat.)	95	1	20	0	0	0	None
2 (anneal.)	55	2	20	0	0	0	Single
3 (elongate)	72	20	20	0	0	0	None
<b>Schmelzkurve</b>		<b>1 Cycle</b>					
1	95	30	20	0	0	0	None
2	40	30	20	0	0	0	None
3	90	0	0.2	0	0	0	Continuous
<b>Kühlung</b>		<b>1 Cycle</b>					
1	40	30	20	0	0	0	None

#### 2.7.4. Auswertung der LightCycler-PCRs

Bei jeder PCR wurden zur Qualitätskontrolle sowohl eine Positivkontrolle mit einem definierten Referenzstamm (*M. xenopi* ATCC 19250) als auch eine Negativkontrolle (Aqua dest.) mitgeführt. Zur Auswertung der LightCycler-PCRs wurden Amplifikations- und Schmelzkurvenanalyse parallel beurteilt

Der Schmelzpunkt bei der PCR auf atypische Mykobakterien und auf *M. xenopi* lag bei  $62\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

#### 2.7.5. Quantitative PCR

Der LightCycler erlaubt eine quantitative PCR. Der Beginn der exponentiellen Produkt-Zunahme, der linearen Logphase der PCR, wird aufgrund der Fluoreszenzzunahme bestimmt und entspricht dem so genannten crossing point, bei dem das Fluoreszenzsignal eine zuvor festgelegte Schwelle überschreitet. Er korreliert mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden DNA-Sequenz und kann deshalb zur Quantifizierung der Transkripte herangezogen werden. Mittels Software lässt sich die gemessene Fluoreszenz gegenüber der Zyklenzahl darstellen.

Es wurde eine Verdünnungsreihe von einem *M. xenopi*-Stamm in Konzentrationen von 1 fg/μl bis 10 ng/μl pro Ansatz eingesetzt. Bei allen Ansätzen wurde in der LightCycler-PCR eine Negativkontrolle mitgeführt. Dieses Experiment wurde dreimal (*Mycobacterium spp.*-spezifische PCR, *M. xenopi*-PCR) durchgeführt. Dann wurden die Ergebnisse bewertet (s. Kap. 3.1.3.2 und Kap. 3.1.4.2).

Anschließend wurde das Ergebnis der quantitativen PCR als externer Standard gespeichert. Anhand dieser externen Standardkurve mit bekannten Konzentrationen wurde dann die Target-Gen-Konzentration der zu untersuchenden Proben unter Benutzung der LightCycler-Software ermittelt.

Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe von *M. peregrinum* mit sterilem Wasser angesetzt; jeder Ansatz (1 ml) wurde auf zwei Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 ml) verteilt. Ein Teil wurde auf dem Middlebrook-Agar ausgestrichen und bebrütet, anschließend die Kolonienzahl bestimmt. Der zweite Teil wurde für die DNA-Isolierung verwendet, danach wurde eine Genus-spezifische PCR auf *Mycobacterium spp.* durchgeführt. Abschließend wurde berechnet, wie viele KBE pro PCR-Ansatz benötigt werden, um ein positives Signal zu ergeben (s. Kap. 3.1.3.2 und Kap. 3.1.4.2). Dieses Experiment wurde dreimal wiederholt.

### 2.7.6. Dual-color Multiplex PCR mit Inhibitionskontrollen

Um bei Untersuchung der Wasserproben unterscheiden zu können, ob eine Probe negativ für die gesuchte Zielstruktur ist, oder ob eine Amplifikation durch Inhibitoren verhindert wurde, wurde allen Proben eine Inhibitionskontrolle zugesetzt. Diese ermöglichte die Unterscheidung falsch negativer Proben von richtig negativen Proben (82).

Die interne Kontrolle wurde aus Lambda-DNA kloniert (s. Kap. 2.7.7). Diese interne Kontrolle wurde in jeder PCR für atypische Mykobakterien eingesetzt und mit den gleichen Primern amplifiziert. Für die Detektion der internen Kontrolle wurden zwei Lambda-spezifische Hybridisierungsonden, die mit Fluoreszenzfarbstoff LC Red 705 bzw. Fluorescein markiert waren, eingesetzt. Bei der dual-color Multiplex-PCR wird durch die Farbkompensation gewährleistet, dass in Kanal 2 nur das Fluoreszenzsignal des Fluoreszenzfarbstoffes LC Red 640 (entsprechend der Hybridisierungssonde) für die Mykobakterien-PCR dargestellt wird, gleichzeitig wurde in Kanal 3 nur das Fluoreszenzsignal des Fluoreszenzfarbstoffes LC Red 705 (entsprechend der Lambda-spezifischen Hybridisierungsonden) gemessen.

Das Pipettierschema für *Mycobacterium spp.*-spezifische PCR mit der internen Kontrolle ist wie folgt:

0.5 µl	Aqua dest (Dnase behandelt)	
0.5 µl	Primer 1 LC5 (10 pmol /µl)	(5 pmol pro Ansatz)
1 µl	Primer 2 LC4 (10 pmol /µl)	(10 pmol pro Ansatz)
1 µl	Hybprobe 1 LC 39 (3 pmol /µl)	
1 µl	Hybprobe 1 LC 40 (3 pmol /µl)	
4 µl	Master mix	
5 µl	DNA	
5 µl	Interne Kontrolle IC	
1 µl	Lambda Hybridisierungssonde λ FL (2 pmol /µl)	
1 µl	Lambda Hybridisierungssonde λ LC (2 pmol /µl)	

### 2.7.7. Klonierung der internen Inhibitionskontrollen

Bei der Klonierung von DNA wird ein Fragment, das Träger des zu klonierenden Gens ist, in ein zirkuläres DNA-Molekül, den so genannten Vektor eingefügt. Dabei entsteht ein rekombinantes Produkt. Der Vektor dient als ein Vehikel, welches das Gen in eine Wirtszelle bzw. *E. coli*-Zelle einschleust. In der Wirtszelle wird eine Vielzahl identischer Kopien sowohl des Vektors als auch des eingefügten DNA-Fragments erstellt, die bei der

Teilung der Zellen auf beide Tochterzellen übertragen werden. Auf diese Weise entsteht über viele Generationen hinweg ein so genannter Zellklon genetisch identischer Wirtszellen. In dieser Arbeit wurde eine 410-bp Lambda DNA Inhibitionskontrolle kloniert.

Die Klonierung wurde in einer Kooperation von Frau Wirths nach einem Standardprotokoll durchgeführt(114).

## **2.8. Statistische Auswertung**

Die LightCycler Daten wurden durch die LightCycler Software-Version 3.5 (Roche Diagnostics) analysiert.

Die statistische Korrelation zwischen der Kultur und der PCR und Analyse wurden mit dem *Spearman rank*-Korrelationstest und mit dem *Wilcoxon signed rank*-Test durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Kultureller und molekularer Nachweis von Mykobakterien aus Wasserproben

##### 3.1.1. Anreicherung von Mykobakterien aus Wasserproben

Zur Anreicherung von Mykobakterien wurden zwei Verfahren getestet. Die Durchführung ist in Kap. 2.4.3 beschrieben.

Bei allen Versuchen wurde gezeigt, dass durch das Filterverfahren mehr Mykobakterien aus dem Wasser im Vergleich zur Anreicherung mit der Zentrifuge isoliert werden können. Daher wurde in den Hauptversuchen das Filterverfahren verwendet, um Mykobakterien kulturell aus dem Wasser zu isolieren.

Die Resultate der Mykobakterien-Anreicherung aus Wasserproben durch den Filter bzw. mit der Zentrifuge wurden mit prozentualen Angaben (s. Tabelle 6) im Vergleich zu den Kontrollen dargestellt.

**Tabelle 6:** Vergleich zwischen den beiden Anreicherungsverfahren (Filter und Zentrifuge)

Anreicherungsverfahren	Nachweis der Mykobakterien aus dem Wasser (in % der Kontrolle)		
	Versuch (1)	Versuch (2)	Versuch (3)
<b>Filter</b>	99 %	99 %	100 %
<b>Zentrifuge</b>	42 %	52 %	76 %

Um die DNA der Mykobakterien direkt aus dem Filter zu isolieren, wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt.

Die Einzelheiten sind in Kap. 2.6.2 beschrieben. In Tabelle 7 werden die Resultate gezeigt. Die Filter-Spalte gibt prozentual die Zahl der auf dem Filter gebliebenen Mykobakterien an, deren DNA nicht isoliert wurde, nachdem der Filter mit verschiedenen Isolierungsverfahren behandelt wurde. Die Filter wurden am Ende jedes Versuchs auf Middlebrook-Agar 7H10 aufgelegt und bebrütet. Anschließend wurden die angewachsenen Mykobakterienkolonien gezählt.

Es wurden mit den Methoden (3) und (4) mehr Bakterien bzw. mehr DNA aus dem Filter im Vergleich zu anderen Methoden isoliert. Die Hauptversuche wurden daher mit der Methode 3 (30 min Ultraschallbad, 5 min vortexen) durchgeführt.

**Tabelle 7:** Vergleich zwischen den verschiedenen DNA-Isolierungsverfahren aus dem Wasserproben.

	DNA-Isolierungsverfahren	Mykobakterien, deren DNA nicht isoliert wurde				
		Filter 1	Filter 2	Filter 3	Filter 4	Filter 5
Methode (1)	5 min Ultraschallbad 1 min vortexen	25 %	17 %	22 %	25 %	-----
Methode (2)	15 min Ultraschallbad 5 min vortexen	15 %	17 %	13 %	12 %	15 %
Methode (3)	30 min Ultraschallbad 5 min vortexen	5 %	8 %	4 %	3 %	3 %
Methode (4)	5 min vortexen 30 min Ultraschallbad 5 min vortexen	4 %	11 %	3 %	3 %	-----

### 3.1.2. Dekontamination der Wasserproben

In diesem Kapitel werden verschiedene Dekontaminationsmethoden dargestellt. Jede Methode wurde separat mit Leitungswasser und mit dem Mykobakterien-Ansatz getestet. Die Resultate der Dekontaminationsverfahren mit 3 % SDS, 4 % NaOH und 2 % Cetrimid werden in Tabelle 8 dargestellt. In der ersten Spalte sind die Dekontaminationsverfahren mit verschiedenen Einwirkzeiten aufgeführt. Die Anwendung von SDS und NaOH erfolgte entweder vor der Filtration (Versetzen mit der Wasserprobe) oder nach der Filtration (Filter in Petrischale dekontaminieren). In der zweiten Spalte ist die Hemmung des Wachstums der Mykobakterien nach der Dekontamination in Prozent im Vergleich zur Kontrollplatte angegeben. Die Vorversuche wurden mit verschiedenen Mykobakterienarten durchgeführt. In der letzten Spalte sind die prozentualen Angaben zur Hemmung der Flora im Leitungswasser im Vergleich zur Kontrollplatte angegeben.

**Tabelle 8:** Einfluss von SDS, NaOH und Cetrimid auf die Mykobakterien und auf die Flora des Leitungswassers.

Methode	Hemmung des Wachstums der Mykobakterien		Hemmung des Wachstums der Leitungswasser-Flora
	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. chelonae</i>	
Filter in 3 % SDS + 4 % NaOH für 25 min 10 min Cetrimid (Petrischale) 5 min Puffer (Petrischale)	<i>M. smegmatis</i> 100 %	100 %	100 %
	<i>M. chelonae</i> 100 %	100 %	100 %
Filter in 3 % SDS + 4 % NaOH für 15 min 10 min Cetrimid (Petrischale) 5 min Puffer (Petrischale)	<i>M. abscessus</i> 100 %	100 %	100 %
	<i>M. fortuitum</i> 100 %	100 %	100 %
Probe in 3 % SDS + 4 % NaOH für 15 min Filter in Cetrimid (Petrischale) für 10 min 5 min Puffer (Petrischale)	<i>M. chelonae</i> 100 %	100 %	100 %
	<i>M. flavescens</i> 100 %	100 %	100 %
15 min 3 % SDS + 4 % NaOH (versetzen), dann mit A. dest spülen	<i>M. smegmatis</i> 95 %	100 %	100 %
	<i>M. fortuitum</i> 100 %	90 %	100 %
	<i>M. chelonae</i> 100 %	100 %	100 %
	<i>M. flavescens</i> 100 %	100 %	100 %

Da die Dekontamination mit SDS und NaOH das Wachstum der Mykobakterien stark gehemmt hatte, wurden weitere Dekontaminationsmethoden wie Oxalsäure und NaOH-Na-Citrat getestet. In Tabelle 9 sind die Resultate der Dekontamination mit 2 % NaOH, Na-Citrat und 5 % Oxalsäure für 15 min in den prozentualen Angaben im Vergleich zu den Kontrollen angegeben. Die Hemmung von *M. smegmatis* und von *M. fortuitum* betrug über 90 %, deshalb wurde keine weitere Spezies mit diesem Verfahren untersucht, sondern weitere Dekontaminationsverfahren (Selektion mit Antibiotika) evaluiert.

**Tabelle 9:** Einfluss von NaOH, Na-Citrat und Oxalsäure für 15 min auf die Mykobakterien und auf die Flora des Leitungswassers.

Methode	Hemmung des Wachstums der Mykobakterien		Hemmung des Wachstums von Leitungswasser-Flora
	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. smegmatis</i>	
Filter in 2 % NaOH, Na-Citrat	98 %	100 %	50 %
	95 %	100 %	40 %
Filter in 5 % Oxalsäure	95 %	90 %	40 %
	-----	90 %	45 %

Die Ergebnisse der Selektion mit Antibiotika (Colistin, Mezlocillin, Cycloheximid) zeigten, dass bei hoher Antibiotika-Konzentration (Colistin 6 µl/ml + Mezlocillin 10 µl/ml) das Wachstum einiger Stämme wie *M. avium*, *M. chelonae*, *M. flavescens*, *M. nonchromogenicum* stark (über 90 %) gehemmt wurde (Tabelle 10), und dass bei

niedriger Konzentration von Colistin und Mezlocillin oder bei Dekontamination mit Cycloheximid die Flora des Leitungswassers nicht genügend gehemmt wurde.

**Tabelle 10:** Einfluss von Colistin, Mezlocillin und Cycloheximid auf die Mykobakterien und auf die Flora des Leitungswassers.

<b>Methode</b>	<b>Hemmung des Wachstums der Mykobakterien</b>	<b>Hemmung des Wachstums von Leitungswasser-Flora</b>
<b>Middlebrook-Agar 7H10 mit (Colistin 6 µl/ml + Mezlocillin 10 µl/ml)</b>	<i>M. abscessus</i> 10 %	90 %
	<i>M. avium</i> 95 %	
	<i>M. chelonae</i> 97 %	75 %
	<i>M. flavescens</i> 99 %	
	<i>M. gordonae</i> 15 %	80 %
	<i>M. intercellulare</i> 8 %	
	<i>M. nonchromogenicum</i> 95 %	70 %
	<i>M. peregrinum</i> 5 %	
	<i>M. smegmatis</i> 14 %	60 %
	<i>M. simiae</i> 6 %	
<b>Middlebrook-Agar 7H10 mit (Colistin 4 µl/ml + Mezlocillin 6 µl/ml)</b>	<i>M. fortuitum</i> 6 %	50 %
	<i>M. scrofulaceum</i> 75 %	45 %
	<i>M. smegmatis</i> 10 %	40 %
<b>Middlebrook-Agar 7H10 mit 500 mg/l Cycloheximid</b>	<i>M. chelonae</i> 1 %	2 %
	<i>M. fortuitum</i> 1 %	4 %
	<i>M. gordonae</i> 0 %	5 %

Anschließend wurden als Dekontaminationsverfahren zweierlei Anwendungen von Cetylpyridiniumchlorid (CPC) (direkte Behandlung der Proben mit CPC vor der Filtration und Behandlung des Filters mit CPC nach der Filtration) durchgeführt. Analog wurden verschiedene Konzentrationen von CPC appliziert. In Tabelle 11 werden die Ergebnisse der Behandlung des Filters mit CPC nach der Filtration im Vergleich zu den Kontrollen dargestellt. Bei niedrigen Konzentrationen konnte kein deutlicher Einfluss auf die Flora des Leitungswassers gezeigt werden, bei hohen Konzentrationen wurde das Wachstum einiger Mykobakterienstämme stark gehemmt.

**Tabelle 11:** Einfluss verschiedener Konzentrationen von CPC auf die Mykobakterien und auf die Flora des Leitungswassers bei direkter Anwendung auf dem Filter nach der Filtration.

<b>Methode</b>	<b>Hemmung des Wachstums der Mykobakterien</b>		<b>Hemmung des Wachstums von Leitungswasser-Flora</b>
<b>0,02 % CPC für 15 min</b>	<i>M. avium</i>	5 %	15 %
	<i>M. gordonae</i>	5 %	10 %
	<i>M. peregrinum</i>	0 %	10 %
	<i>M. smegmatis</i>	5 %	15 %
<b>0,03 % CPC für 15 min</b>	<i>M. fortuitum</i>	0 %	20 %
	<i>M. gordonae</i>	20 %	15 %
	<i>M. peregrinum</i>	5 %	15 %
	<i>M. smegmatis</i>	10 %	
<b>0,04 % CPC für 15 min</b>	<i>M. avium</i>	5 %	40 %
	<i>M. fortuitum</i>	0 %	30 %
	<i>M. gordonae</i>	70 %	45 %
	<i>M. peregrinum</i>	10 %	40 %
<b>0,04 % CPC für 30 min</b>	<i>M. chelonae</i>	100 %	40 %
	<i>M. gordonae</i>	70 %	45 %
	<i>M. peregrinum</i>	5 %	
	<i>M. xenopi</i>	95 %	
<b>0,05 % CPC für 15 min</b>	<i>M. fortuitum</i>	6 %	55 %
	<i>M. gordonae</i>	70 %	65 %
	<i>M. peregrinum</i>	40 %	
<b>0,06 % CPC für 15 min</b>	<i>M. gordonae</i>	80 %	60 %
	<i>M. peregrinum</i>	65 %	65 %
	<i>M. smegmatis</i>	10 %	

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Dekontamination durch direkte Behandlung der Wasserproben mit CPC dargestellt. Betrachtet man die prozentuale Hemmung des Wachstums der Mykobakterien bei Dekontamination mit 0,02 % CPC bei einer Einwirkungszeit von 15 min, fällt die Hemmung deutlich niedriger aus als bei einer Einwirkungszeit von 30 min. Gleichzeitig wurden bei beiden Einwirkungszeiten mehr als 90 % der Leitungswasser-Flora unterdrückt. Wegen dieses Ergebnisses wurde dieses Verfahren für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

**Tabelle 12:** Einfluss verschiedener Konzentrationen von CPC auf die MB und auf die Flora des Leitungswassers bei direkter Behandlung der Wasserproben vor der Filtration.

Methode	Hemmung des Wachstums der Mykobakterien		Hemmung des Wachstums der Leitungswasser-Flora	
	Einwirkzeit 15 min	Einwirkzeit 30 min	Einwirkzeit 15 min	Einwirkzeit 30 min
0,005 % CPC	<i>M. avium</i> 2 %	2 %	80 %	85 %
	<i>M. chelonae</i> 2 %	5 %		
	<i>M. flavescens</i> 5 %	5 %		
	<i>M. gordonae</i> 0 %	0 %		
	<i>M. xenopi</i> 10 %	10 %		
0,01 % CPC	<i>M. abscessus</i> 0 %	0 %	93 %	93 %
	<i>M. avium</i> 10 %	15 %		
	<i>M. chelonae</i> 5 %	5 %		
	<i>M. flavescens</i> 10 %	15 %		
	<i>M. gordonae</i> 0 %	5 %		
	<i>M. smegmatis</i> 60 %	90 %		
	<i>M. xenopi</i> 13 %	15 %		
0,02 % CPC	<i>M. abscessus</i> 2 %	5 %	95 %	95 %
	<i>M. avium</i> 15 %	20 %		
	<i>M. chelonae</i> 10 %	30 %		
	<i>M. flavescens</i> 15 %	30 %		
	<i>M. fortuitum</i> 15 %	25 %		
	<i>M. gordonae</i> 5 %	15 %		
	<i>M. peregrinum</i> 2 %	2 %		
	<i>M. smegmatis</i> 80 %	85 %		
	<i>M. xenopi</i> 15 %	40 %		
0,04 % CPC	<i>M. abscessus</i> 5 %		98 %	
	<i>M. avium</i> 30 %			
	<i>M. chelonae</i> 50 %			
	<i>M. flavescens</i> 50 %			
	<i>M. fortuitum</i> 50 %			
	<i>M. gordonae</i> 15 %			
	<i>M. smegmatis</i> 98 %			
	<i>M. xenopi</i> 50 %			

### 3.1.3. Etablierung einer quantitativen PCR mit interner Inhibitions-kontrolle zum Nachweis von Mykobakterien

#### 3.1.3.1 Etablierung der LightCycler Real-time PCR

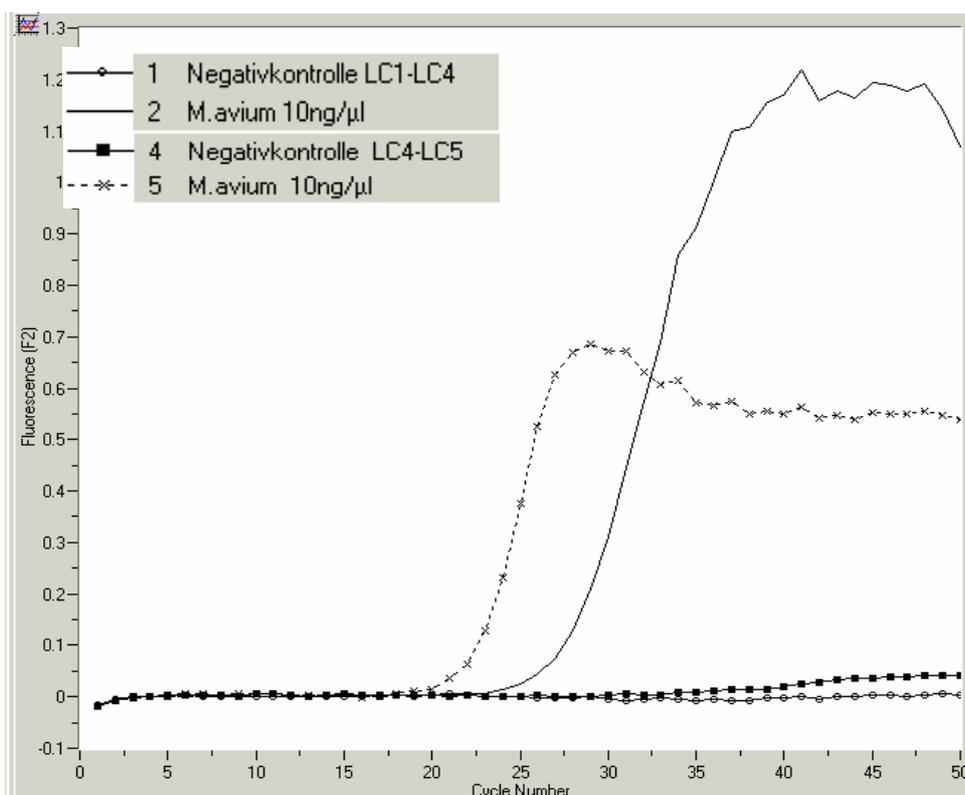
Ziel der Optimierungsversuche war es, ein möglichst sensitives System zu etablieren, das keine Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien zeigt.

Es wurden in dieser Studie zuerst die Primer LC 4 und LC 5, die ein 100 bp großes Fragment des 16S rRNA-Gens amplifizieren, und die Primer LC 4 und LC 1, die ein 1000 bp großes Fragment des 16S rRNA-Gens amplifizieren, verglichen. Als Sonden wurden in

beiden PCR-Assays LC 39 und LC 40 eingesetzt. Da in der PCR mit den Primern LC 4 und LC 5 bereits ab Zyklus 21 ein positives Signal erhalten wurde, was bei den Primern LC 4 und LC 1 erst ab Zyklus 27 der Fall war (s. Abb. 3), wurden die Primer LC 4 und LC 5 für die Hauptversuche verwendet.

Das in Kap. 2.7.3 beschriebene Protokoll für die PCR wurde von Lachnik et al. etabliert. Für die vorliegende Arbeit wurden hierbei die Annealing-Temperatur und die Denaturierungszeit neu definiert.

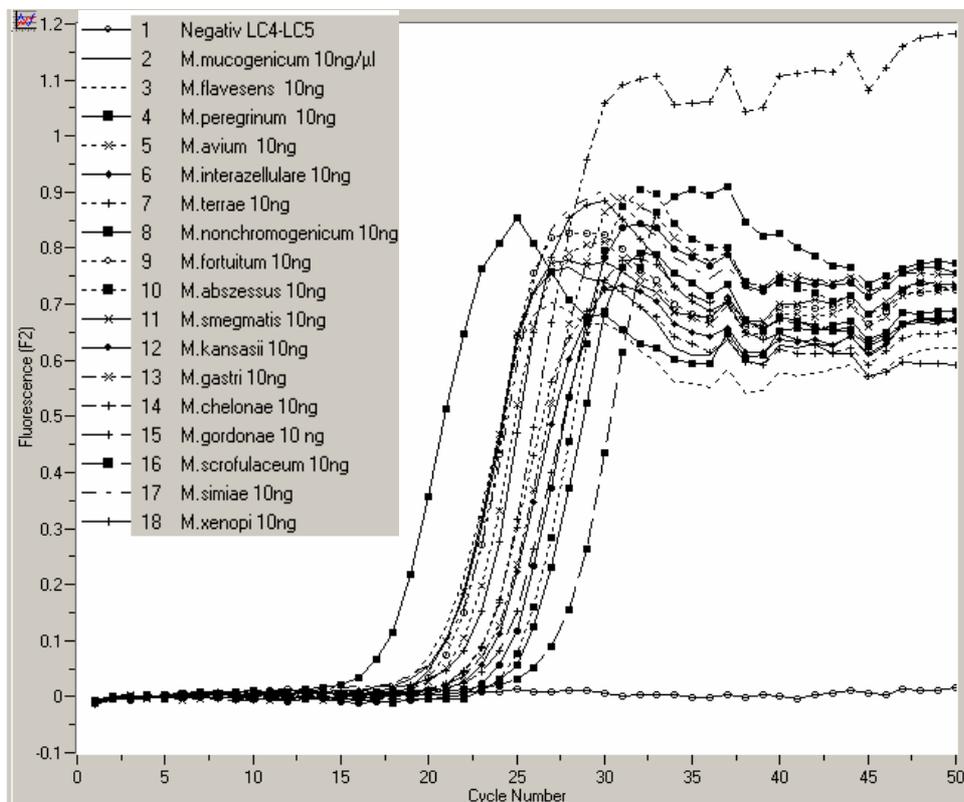
Die Menge an einzusetzendem Primer ist ein weiterer Parameter, der sich je nach Beschaffenheit und Konzentration der Templates und des Reaktionsansatzes auf die Sensitivität und die Spezifität der PCR auswirken kann. Bei einem Überschuss an Primer, an den Strang bindet, an dem die Sonden ansetzen, bilden sich leichte Senkungen der Fluoreszenzsignale in den letzten Zyklen (Hook-Effekt). Andererseits wird bei einem zu niedrigen Verhältnis (zuwenig Primer) das Produkt nicht exponentiell amplifiziert. Aus diesem Grund wurden Vorversuche durchgeführt, um die optimalen PCR-Bedingungen zu ermitteln.



**Abb. 3:** Original LightCycler-Ausdruck, der das positive Signal bei den Primern LC 4 und LC 5 ca. 6 Zyklen früher als bei den Primern LC 4 und LC 1 zeigt, die beiden PCRs wurden mit der gleichen *M. avium*-DNA-Konzentration durchgeführt.

### 3.1.3.2 Spezifität und Sensitivität der PCR

Um die Spezifität einer bereits etablierten *Mycobacterium spp.*-spezifischen PCR zu definieren, wurden die Primer LC 4 und LC 5 und die Sonden LC 39 und LC 40 an 23 Mykobakterienstämmen (s. Kap. 2.1.1) untersucht. Bei allen Stämmen wurde ein positives Signal erhalten (s. Abb. 4). Dabei war *M. tuberculosis* auch positiv und bei den anderen getesteten Bakterienspezies (s. Kap. 2.1.2) gab es keine Amplifikation. Damit zeigte die PCR gute Spezifität an und es wurden die Primer und die Sonden für die Hauptversuche verwendet.



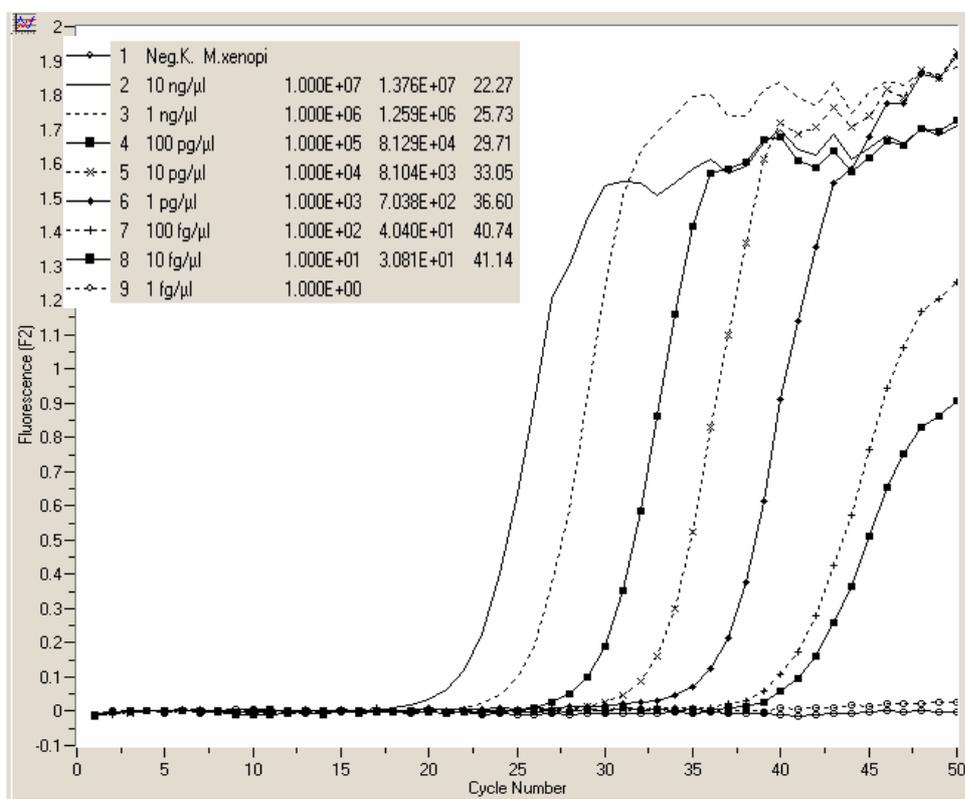
**Abb. 4:** Original LightCycler-Ausdruck, der die Amplifikation aller getesteten atypischen Mykobakterienstämmen zeigt.

Unter der Sensitivität des Assays versteht man die kleinste Konzentration der Standardverdünnungsreihen, die unter den LightCycler-PCR-Bedingungen amplifiziert wird. In dieser PCR lag die unterste Detektionsgrenze bei 10 fg/μl. Die DNA-Konzentration entspricht 50 fg von atypischen Mykobakterien-DNA pro PCR-Ansatz. Dies wurde dreimal durch Verdünnungsreihe von *Mycobacterium*-DNA bestimmt. In Abbildung 5 wurden jeweils die Fluoreszenzkurven der DNA-Mengen abgebildet. Bei einer DNA-Konzentration von 10 fg/μl wurde noch ein positives Signal detektiert. Da jede einzelne Mykobakterien-Zelle ca. 6 fg DNA hat (12), kann man aus diesen Ergebnissen zeigen, dass

ca. 8 KBE in einer PCR-Kapillare (entsprechend 833 KBE pro 500 ml Wasser) ausreichen, um positives Signal zu geben.

Bestätigend ergab sich bei Durchführung der parallelen Versuche von PCR und Kultur (siehe Kap. 2.7.5), dass ab 2 KBE von Mykobakterien pro PCR-Ansatz (entspricht 200 KBE pro 500ml Wasserprobe) eine Amplifizierung stattfand.

Bei der Sensitivitätsbestimmung wurden die Amplifikationen als Standardkurve gespeichert. Anhand dieser externen Standardkurve wurde die Targt-Gen-Konzentration der Wasserproben bei jedem PCR-Lauf ermittelt. Daraus wurde dann die Zahl der KBE der Mykobakterien bei jeder positiven Probe errechnet.



**Abb. 5:** Genuspezifische PCR zur Überprüfung der Sensitivität. Es wurde eine Verdünnungsreihe von *M. xenopi*-DNA verwendet.

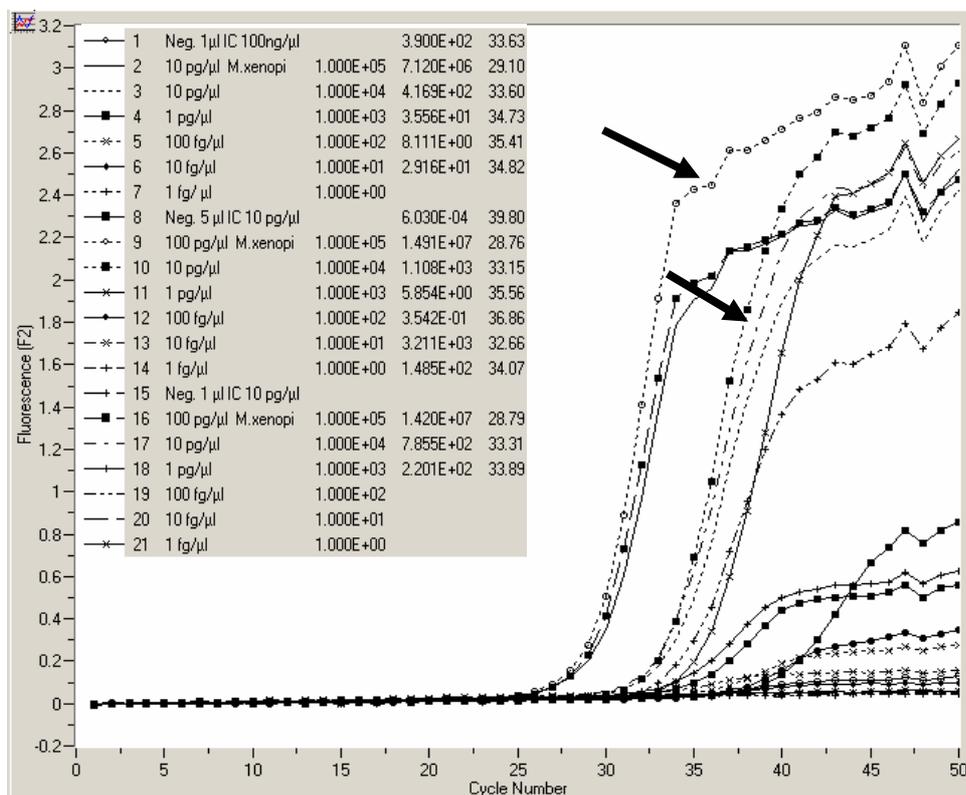
### 3.1.3.3 Anwendung der Inhibitionskontrolle bei Untersuchungen der Wasserproben

Das Multiplex-Verfahren wurde wie unter 2.7.6 beschrieben aufgebaut. Die Konzentration der internen Inhibitionskontrolle wurde nach 3 Versuchen definiert. In diesen Versuchen sollte überprüft werden, in welcher Konzentration der Inhibitorkontrolle die Sensitivität der PCR am wenigsten beeinflusst wird. Dafür wurden 3 verschiedene Konzentrationen von interner Inhibitionskontrolle jeweils mit einer Verdünnungsreihe von *M. xenopi*-DNA in

der LightCycler PCR eingesetzt und mit *Mycobacterium spp.*-spezifischer PCR in einem Durchlauf amplifiziert.

Die Abbildung 6 zeigt, dass bei Verwendung von 5 µl Inhibitionskontrolle mit einer Konzentration von 10 pg/µl die Sensitivität der PCR am wenigsten beeinflusst wurde. Damit wurde diese Konzentration von interner Kontrolle für die Hauptversuche verwendet. Diese interne Inhibitionskontrolle wurde zu jeder Wasserprobe bei der Untersuchung mit *Mycobacterium spp.*-spezifischer PCR als Amplifikationskontrolle hinzugefügt und im Kanal F3 detektiert.

In keiner Wasserprobe gab es eine Inhibition für die Amplifikation der PCR und damit wurden alle Ergebnisse der beiden PCRs (*Mycobacterium spp.*-spezifische PCR und *M. xenopi*-spezifische PCR) als zuverlässige Ergebnisse angenommen.



**Abb 6:** Einfluss verschiedener Konzentrationen der internen Kontroll-DNA (IC) auf die Amplifikation der Target-DNA (*M. xenopi* DNA). Der Amplifikationsverlauf im Kanal F2 zeigt, dass bei Verwendung von 5 µl interner Kontrolle der Konzentration 10 pg/µl im Vergleich zur Verwendung von 1 µl interner Kontrolle der Konzentration 100 pg/µl und 1 µl interner Kontrolle der Konzentration 10 pg/µl ein früheres Amplifikationssignal der *M. xenopi*-DNA (s. Pfeile) detektiert wurde.

### 3.1.4. Etablierung einer PCR zum Nachweis von *Mycobacterium xenopi*

#### 3.1.4.1 Optimierung der LightCycler Real-time PCR

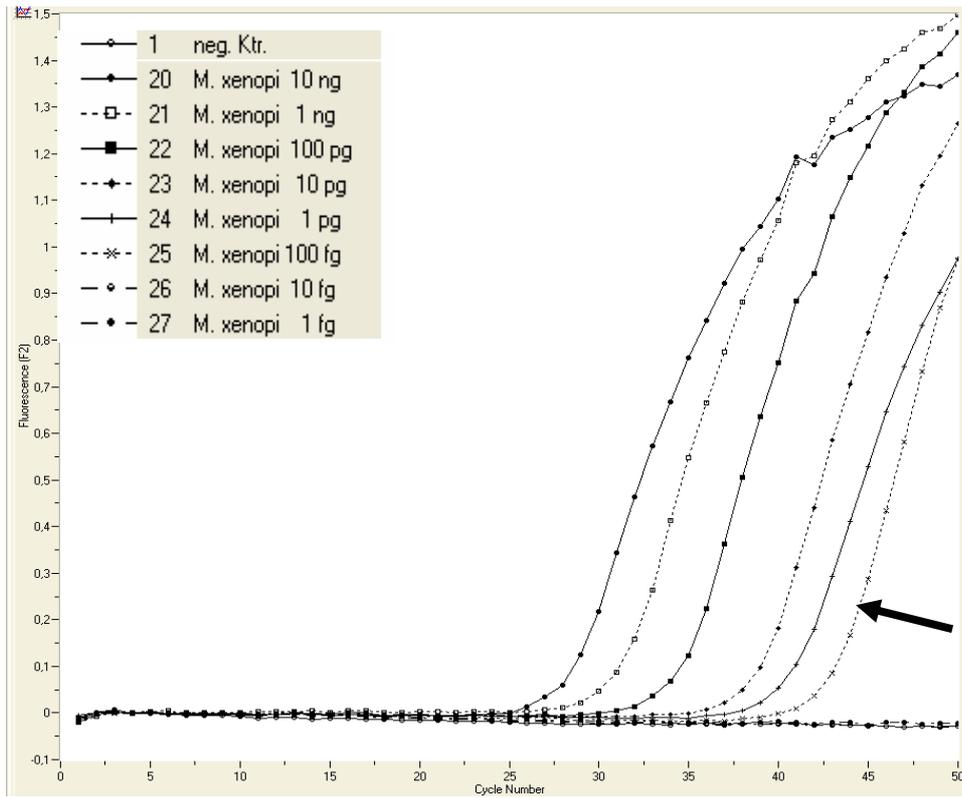
Die Primer P myc 14 und a mycxen, die ein 145 bp großes Fragment amplifizieren, wurden durch eine Reihe von Vorversuchen überprüft, bis schließlich ein optimales Protokoll sowohl für die Menge von Primern und Sonden pro PCR-Ansatz als auch für die Programmierung des LightCyclers definiert wurde. Die positive Kontrolle (*M. xenopi* ATCC 19250) wurde immer amplifiziert, wobei die negative Kontrolle immer negativ war.

#### 3.1.4.2 Spezifität und Sensitivität der PCR

Um die Spezifität der neuen *M. xenopi*-Primer hinsichtlich anderer Bakterien zu überprüfen, wurde die genomische DNA von Mykobakterien und anderen Bakterien mit dieser PCR getestet. Insgesamt wurde die genomische DNA von 22 Mykobakterienspezies und von 31 unterschiedlichen Bakterienspezies (s. Kap. 2.1) überprüft. Lediglich die DNA von *M. xenopi* wurde mit den Primern P myc 14 und a mycxen amplifiziert und bei der entsprechenden Temperatur in der Schmelzkurve detektiert. Alle anderen Mykobakterien und Bakterien wurden nicht amplifiziert (*M. tuberculosis* und *M. fortuitum* wurden mit einer hohen Konzentration amplifiziert und bei Wiederholung mit einer niedrigen Konzentration bzw. bei Konzentrationen von 10 ng/μl wurde kein positives Signal erhalten). Die *M. xenopi*-PCR war damit spezifisch für die Identifizierung von *M. xenopi*.

Bei der Sensitivitätsbestimmung der *M. xenopi*-PCR wurde eine Verdünnungsreihe von *M. xenopi*-DNA eingesetzt und die niedrigste Konzentration bestimmt, bei der noch eine Amplifikation stattfand. In Abbildung 7 wird gezeigt, dass die Nachweisgrenze in der *M. xenopi*-PCR 100 fg/μl erreicht, das entspricht 83 KBE *M. xenopi* pro PCR.

Bei Bestimmung der Sensitivität wurde in einigen Versuchen ein positives Signal bei einer Konzentration von 10 fg/μl DNA detektiert. Aber bei mehrfacher Wiederholung gab es nicht immer eine Amplifikation bei Konzentration von 10 fg/μl. Deswegen wurde eine Konzentration von 100 fg/μl als Nachweisgrenze für die *M. xenopi*-PCR angenommen.



**Abb. 7:** *M. xenopi*-spezifische PCR zur Überprüfung der Sensitivität. Die Amplifikation wurde ab 100 fg/ $\mu$ l DNA von *M. xenopi* (s. Pfeile) in der LightCycler PCR detektiert.

## 3.2. Untersuchung der Trinkwasserproben

### 3.2.1. Untersuchung der Trinkwasserproben mittels quantitativer PCR

#### 3.2.1.1 Untersuchungen von Kaltwasserproben

Insgesamt wurden 49 Kaltwasserproben (s. Tabelle 13) mittels *Mycobacterium spp.*-spezifischer PCR und mit *M. xenopi*-spezifischer PCR untersucht. Die Negativkontrollen bei allen Untersuchungen lieferten negative PCR-Ergebnisse und die Positivkontrolle (*M. xenopi*) wurde immer amplifiziert.

***Mycobacterium spp.*-spezifische PCR:** Alle Proben haben ein positives Signal gezeigt, damit wurde in 100 % der Wasserproben *Mycobacterium*-DNA nachgewiesen.

Die Konzentrationen der Mykobakterien-DNA im Wasser wurden aus den PCR-Ergebnissen berechnet und lagen zwischen 229 und  $38 \times 10^4$  fg/ $\mu$ l (durchschnittlich  $28 \times 10^3$  fg/ $\mu$ l). Da das Genom von atypischen Mykobakterien ungefähr 6 fg DNA enthält, konnten wir die Zahl der KBE der Mykobakterien pro Probe bzw. pro Liter Wasser berechnen. In Probe 17 wurde die niedrigste Zahl der Mykobakterien ( $38 \times 10^3$  KBE/L Wasser) nachgewiesen. Die höchste Zahl der Mykobakterien lag in Probe 27 ( $57 \times 10^6$  KBE/L Wasser) vor.

***M. xenopi* PCR:** 33 Proben von 49 Kaltwasserproben wurden als positive Proben bewertet (67 %). Alle Proben, die von Söflingen und Schillerstraße ( $n=4$ ) entnommen wurden, ergaben kein PCR-Signal (s. Tabelle 13).

Die Konzentration von *M. xenopi*-DNA berechnet aus den PCR-Ergebnissen lag zwischen 2 und  $76 \times 10^4$  fg/ $\mu$ l (durchschnittlich  $41 \times 10^3$  fg/ $\mu$ l). Die niedrigste Zahl von *M. xenopi* war in der Probe 35 mit (266 KBE/L Wasser), die höchste Zahl war in Probe 46 ( $11 \times 10^8$  KBE/L Wasser).

**Tabelle 13:** Zuordnung der Probennummer des Kaltwassers zum Entnahmeort.

Proben-Nr.	Entnahmeort	<i>Mycobacterium</i> spp. PCR	<i>M. xenopi</i> PCR
1	Söflingen- Dermatologie: Allgemeinsprechstunde H 302	+	-
2	Söflingen Dermatologie: Patientenzimmer – H 210	+	-
3	Söflingen- Dermatologie: Tagesklinik, Zimmer- H 110	+	-
4	Schillerstraße Muco. Amp. : Funktionsuntersuchungen 014	+	-
5	Oberer Eselsberg Die Küche : Gemüsevorbereitung E 081	+	-
6	Oberer Eselsberg Die Küche : Geflügelvorbereitung E 096	+	-
7	Oberer Eselsberg Mikrobiologielabor: R. 3411	+	-
8	Safranberg Haus 1/4 Ost : Patientenzimmer Nr. 413	+	+
9	Safranberg Haus 1/2 Ost : Patientenzimmer Nr.2.12	+	-
10	Safranberg Haus 1/3 West (Int.): Zimmer Nr. 362	+	+
11	Safranberg Haus 1/2 West A :Zimmer Nr. 2.64	+	+
12	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 1 C Zimmer Nr. 1323	+	+
13	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 1 B: Raum Nr. 14 31	+	+
14	Safranberg I / 3 Ost Patientenzimmer Nr.3.07	+	-
15	Safranberg I / 3 Mitte Patientenzimmer Nr. 333	+	+
16	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 4 A Zimmer Nr. 4384	+	+
17	Safranberg KOH Station Kätzchenzimmer Nr. 1.12	+	-
18	Safranberg I / 1 Ost Patientenzimmer Nr. 127	+	-
19	Safranberg III / EG Patientenzimmer Nr. 0.4	+	-
20	Safranberg IV / EG Patientenzimmer Nr. 0.2	+	-
21	Michelsberg Urologie Station F Patientenzimmer Nr.1.51	+	+
22	Michelsberg Cyn I (Intensiv) Patientenzimmer Nr.3	+	+
23	Michelsberg Gyn 2 Patientenzimmer Nr. 108	+	+
24	Michelsberg Kinder Station 2 Patientenzimmer Nr. 104	+	+
25	Michelsberg Kinder Station 3 Patientenzimmer Nr. 017	+	+
26	Michelsberg Kinder Station 6 Patientenzimmer Nr. 223	+	+
27	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 3 E Arbeitsraum	+	+
28	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 3 B Zimmer Nr. 68	+	+
29	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik Ebene 2 WC Nr. 2614	+	+
30	Oberer Eselsberg Uni M23 Ebene 2 WC Nr. 241	+	+
31	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 4 B Zimmer Nr. 4368	+	+
32	Michelsberg Gyn 3 Patientenzimmer Nr. 54	+	+
33	Michelsberg Gyn Woche 1 Patientenzimmer Nr. 02	+	+
34	Michelsberg Kinder Station 7 Flur neben Raum Nr. 310	+	+
35	Michelsberg HNO Station 2 Patientenzimmer Nr.302	+	+
36	Michelsberg Augen Station 2 Patientenzimmer Nr.45	+	-
37	Michelsberg Urologie Station B Patientenzimmer Nr.2.36	+	-
38	Safranberg I / 1 West Patientenzimmer Nr. 1.68	+	+
39	Safranberg IV / 2 OG Patientenzimmer Nr. 2.01	+	+
40	Safranberg III / 1 OG Patientenzimmer Nr. 1.3	+	+
41	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik Bronchoskopieraum	+	+
42	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik Bronchoskopie. Spülraum	+	+
43	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik Colonskopie Raum-1826	+	+
44	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 4 D Zimmer Nr. 28	+	+
45	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 4 C Zimmer Nr. 33	+	+
46	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 2 C Zimmer Nr. 32	+	+
47	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 3 G R. Nr. 3133	+	+
48	Oberer Eselsberg Mikrobiologielabor Raum 3419	+	+
49	Oberer Eselsberg Mikrobiologielabor- Forschung Raum 3406	+	-

### 3.2.1.2 Untersuchungen von Warmwasserproben

Es wurde 44 Warmwasserproben (s. Tab. 14) mittels *Mycobacterium spp.*-spezifischer PCR und mit *M. xenopi* PCR untersucht. Die negativen Kontrollen des gesamten Probenkontingents lieferten negative PCR-Ergebnisse und die positive Kontrolle (*M. xenopi*) wurde immer amplifiziert.

***Mycobacterium spp.*-spezifische PCR:** Bei allen Proben wurde ein positives Signal erhalten. Damit wurde in 100 % der Wasserproben *Mycobacterium*-DNA nachgewiesen. Die Konzentration von Mykobakterien-DNA berechnet aus den *Mycobacterium spp.*-spezifischer PCR-Ergebnissen lag zwischen 938 und  $26 \times 10^5$  fg/ $\mu$ l (durchschnittlich  $77 \times 10^3$  fg/ $\mu$ l). In der Probe 2 wurde die niedrigste Zahl der Mykobakterien ( $16 \times 10^4$  KBE/L Wasser) nachgewiesen. Die höchste Zahl der Mykobakterien war bei Probe 22 ( $37 \times 10^7$  KBE/L Wasser).

***M. xenopi* PCR:** 40 von insgesamt 44 Warmwasserproben (91 %) haben ein positives Signal gegeben. Die vier negativen Proben stammen aus Söflingen (Probe1), Schillerstraße (Probe 2) und vom Safranberg (Probe 9 und Probe 35) (s. Tabelle 14).

Die Konzentration von *M. xenopi*-DNA berechnet aus PCR-Ergebnissen lag zwischen 10 und  $79 \times 10^5$  fg/ $\mu$ l (durchschnittlich  $25 \times 10^4$  fg/ $\mu$ l). In der Probe 15 wurde die niedrigste Zahl an *M. xenopi* nachgewiesen ( $15 \times 10^2$  KBE/L Wasser), die höchste Zahl an *M. xenopi* lag in Probe 22 mit  $12 \times 10^8$  KBE/L Wasser.

**Tabelle 14:** Zuordnung der Probennummer des Warmwassers zum Entnahmeort.

Proben-Nr.	Entnahmeort	<i>Mycobacterium</i> spp. PCR	<i>M. xenopi</i> PCR
1	Söflingen Dermatologie: Patientenzimmer – H 210	+	-
2	Schillerstraße Muco. Amp. : Funktionsuntersuchungen- 014	+	-
3	Oberer Eselsberg Die Küche : Bräterbereich E 101	+	+
4	Oberer Eselsberg Mikrobiologielabor: R. 3411	+	+
5	Safranberg Haus 1/3 West (Int.): Patientenzimmer Nr. 362	+	+
6	Safranberg Haus 1/2 West A :Patientenzimmer Nr. 2.64	+	+
7	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 1 C Zimmer Nr. 1323	+	+
8	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 1 B :Raum Nr. 14 31	+	+
9	Safranberg I / 3 Ost Patientenzimmer Nr.3.07	+	-
10	Safranberg I / 3 Mitte Patientenzimmer Nr. 333	+	+
11	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 3 C Zimmer Nr. 3333	+	+
12	Safranberg KOH Station Kätzchenzimmer Nr. 1.12	+	+
13	Safranberg I / 1 Ost Patientenzimmer Nr. 127	+	+
14	Safranberg III / EG Patientenzimmer Nr. 0.4	+	+
15	Safranberg IV / EG Patientenzimmer Nr. 0.2	+	+
16	Michelsberg Urologische Tagesklinik Zimmer (Nr.0.36	+	+
17	Michelsberg Gyn 2 Patientenzimmer Nr. 108	+	+
18	Michelsberg Kinder Station 2 Patientenzimmer Nr. 104	+	+
19	Michelsberg Kinder Station 3 Patientenzimmer Nr. 017	+	+
20	Michelsberg Kinder Station 4 Patientenzimmer Nr. 115	+	+
21	Michelsberg Kinder Station 6 Patientenzimmer Nr. 223	+	+
22	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 3 E Arbeitsraum	+	+
23	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 3 B Zimmer Nr. 68	+	+
24	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik Ebene 2 WC Nr. 2614	+	+
25	Oberer Eselsberg Uni M23 Ebene 2 WC Nr. 241	+	+
26	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 4 B Zimmer Nr. 4368	+	+
27	Michelsberg Gyn 3 Patientenzimmer Nr. 54	+	+
28	Michelsberg Gyn Woche 1 Patientenzimmer Nr. 02	+	+
29	Michelsberg Kinder Station 7 Flur neben Raum Nr. 310	+	+
30	Michelsberg HNO Station 2 Patientenzimmer Nr.302	+	+
31	Michelsberg Augen Station 2 Patientenzimmer Nr.45	+	+
32	Michelsberg Urologie Station B Patientenzimmer Nr.2.36	+	+
33	Safranberg I / 1 West Patientenzimmer Nr. 1.68	+	+
34	Safranberg IV / 2 OG Patientenzimmer Nr. 2.01	+	+
35	Safranberg III / 1 OG Patientenzimmer Nr. 1.3	+	-
36	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik Bronchoskopieraum	+	+
37	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik Bronchoskopie-Spülraum	+	+
38	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik Colonskopie Raum-1826	+	+
39	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 4 D Zimmer Nr. 28	+	+
40	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 4 C Zimmer Nr. 33	+	+
41	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 2 C Zimmer Nr. 32	+	+
42	Oberer Eselsberg Medizinische Klinik 3 G Lagerunrein Nr. 3133	+	+
43	Oberer Eselsberg Mikrobiologielabor Raum 3419	+	+
44	Oberer Eselsberg Mikrobiologielabor Forschung 3406	+	+

### 3.2.2. Kulturelle Untersuchung von Trinkwasserproben

#### 3.2.2.1 Untersuchungen von Kaltwasserproben

Es wurden in 21 Wasserproben von insgesamt 49 Kaltwasserproben (43 %) Mykobakterien kulturell nachgewiesen (s. Tabelle 13,15). Die Speziesverteilung der positiven Proben ist in der Abbildung 10 dargestellt. Das Erregerspektrum enthielt *M. gordonae* in sechs Proben (12 %), *M. flavescens* in vier Proben (8 %), *M. xenopi* in vier Proben (8 %), *M. vaccae* (s. Abb. 9) in drei Proben (6 %), *M. frederiksbergense* (s. Abb. 8) in drei Proben (6 %), *M. chelonae* in zwei Proben (4 %), *M. moriokaense* in einer Probe (2 %), *M. tusciae* in einer Probe (2 %) und nichtidentifizierte Mykobakterien in vier Proben (8 %) (s. Tabelle 15 und Abb.10).

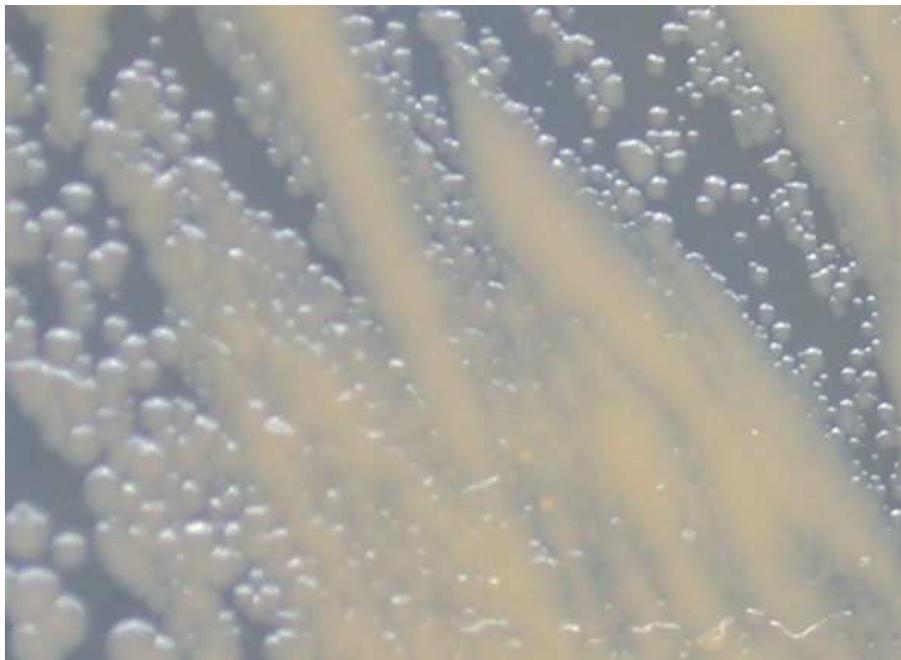
Alle Stämme wurden durch Sequenzierung differenziert. Da die Sequenzierung zwischen *M. abscessus* und *M. chelonae* nicht unterscheiden kann, wurden die Stämme, die in der Sequenzierung des 16S rRNA-Gens ein Ergebnis als *M. chelonae/abscessus* ergaben, weiter mit Sonden-Hybridisierungsverfahren identifiziert.

Ein schnellwachsender Stamm und drei langsamwachsende Stämme konnten aufgrund der wiederholten Kontamination bei der Isolierung nicht identifiziert werden. Diese vier Stämme zeigten in der Kinyounfärbung säurefeste Stäbchen.

Die Konzentration der atypischen Mykobakterien war nicht in allen Wasserproben einheitlich. Während in den Proben 12, 16, 24 und 43 die Konzentration bei 4 KBE/L lag, waren es bei Probe 41 am meisten (8000 KBE/L) (s. Abb.11). Der Median für Kaltwasserproben lag bei 480 KBE/L. Es wurde in den Proben, die vom Oberen Eselsberg entnommen wurden, eine höhere Konzentration von MB im Vergleich zu anderen Entnahmeorten nachgewiesen.



**Abb. 8:** Koloniemorphologie von *M. frederiksbergense* auf Middelbrook-Agar 7H10 (nach 21 Tagen Bebrütung).



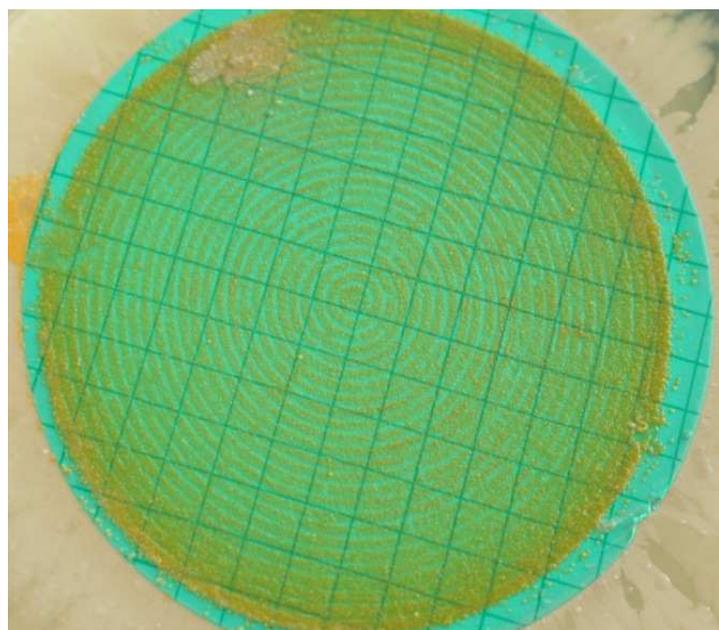
**Abb. 9:** Koloniemorphologie von *M. vaccae* auf Middelbrook-Agar 7H10 (nach 10 Tagen Bebrütung).



**Abb. 10:** Anzahl der angezüchteten Mykobakterienstämme aus Kaltwasserproben.

Die Kontaminationsrate der Filter mit Begleitflora des Leitungswassers lag bei den meisten Kaltwasserproben unter 10 % und hat die Beurteilung des Wachstums der Mykobakterien nicht beeinflusst.

Bei den Proben (5, 6, 16, 35) lag die Kontaminationsrate im Bereich zwischen 10 und 40 %. Dies führte deshalb zu Schwierigkeiten bei der Identifizierung der angewachsenen MB wie oben erwähnt.



**Abb. 11:** Filter mit *M. xenopi* aus 500 ml kaltem Leitungswasser des Bronchoskopieraums (Bereich Oberer Eselsberg-Medizinische Klinik). 4000 KBE wurden auf dem Filter nach 50 Tagen gezählt. Oben links (11:00 Uhr) sieht man eine Kontamination.

**Tabelle 15:** Spezies und Konzentrationen der angezüchteten Mykobakterien aus den Kaltwasserproben.

Entnahmeort	Probe -Nr.	Mykobakterielle Spezies	Konzentration (KBE/L)
<b>Oberer Eselsberg</b>	5	nicht identifizierte MB	24
	6	nicht identifizierte. MB	16
	12	<i>M. xenopi</i>	4
	16	nicht identifizierte. MB	4
	29	<i>M. chelonae</i>	46
	30	<i>M. gordonae</i>	286
	41	<i>M. xenopi</i>	8000
	42	<i>M. xenopi</i>	1210
	43	<i>M. xenopi</i>	4
<b>Michelsberg</b>	24	<i>M. flavescens</i>	4
	25	<i>M. gordonae</i>	18
		<i>M. moriokaense</i>	10
	26	<i>M. flavescens</i>	112
	32	<i>M. gordonae</i>	4
		<i>M. tusciae</i>	8
	34	<i>M. chelonae</i>	64
		<i>M. gordonae</i>	2
	35	nicht identifizierte MB	60
	36	<i>M. gordonae</i>	10
<b>Safranberg</b>	11	<i>M. flavescens</i>	8
	14	<i>M. flavescens</i>	22
		<i>M. gordonae</i>	6
<b>Söflingen</b>	1	<i>M. frederiksbergense</i>	4
		<i>M. vaccae</i>	58
	2	<i>M. vaccae</i>	48
		<i>M. frederiksbergense</i>	4
	3	<i>M. frederiksbergense</i>	6
		<i>M. vaccae</i>	36

### 3.2.2.2 Untersuchungen von Warmwasserproben

Es wurden in 32 aus 44 Warmwasserproben (73 %) Mykobakterien kulturell nachgewiesen (s. Tabelle 14, 16).

Die Speziesbestimmung der Mykobakterienisolate werden in der Abbildung 12 dargestellt. Insgesamt fanden sich sechs verschiedene Mykobakterienarten. *M. xenopi* war die am häufigsten isolierte Art mit vierundzwanzig Proben (52 %), gefolgt von *M. flavescens* in zehn Proben (23 %), *M. gordonae* in sechs Proben (14 %), *M. chelonae* in zwei Proben (4 %), *M. mucogenicum* in einer Probe (2 %), *M. frederiksbergense* in einer Probe (2 %) und nichtidentifizierte Mykobakterien in vier Proben (9 %) (s. Abb. 12).

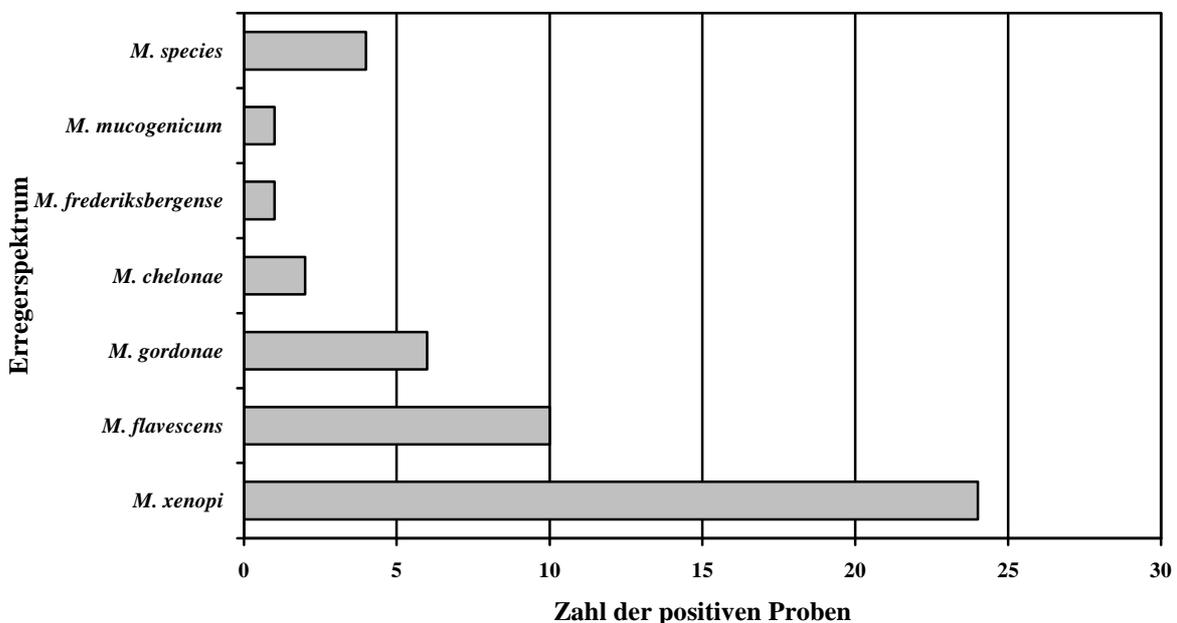
*M. xenopi* ließ sich sechsmal häufiger aus dem warmen Wasser als aus dem kalten Wasser isolieren. Über die Hälfte der *M. xenopi*-Isolate (54 %) wurden vom Oberen Eselsberg isoliert.

Aufgrund der wiederholten Kontamination bei der Isolierung konnten vier Stämme, die mit der Kinyounfärbung als säurefeste Stäbchen bestätigt wurden, nicht weiter identifiziert werden. Davon war ein Stamm schnellwachsend, die anderen gehörten zu den langsamwachsenden Mykobakterien.

Die Erregerkonzentration bei Warmwasserproben war deutlich höher als bei Kaltwasserproben. Die Probe 36 und die Probe 37 zeigten die größte Erregerdichte an Mykobakterien mit 8000 KBE/L Wasser. Die Probe 10 zeigte die niedrigste Erregerdichte an Mykobakterien mit 2 KBE/L Wasser. Der Median lag bei 1672 KBE/L.

Die Kontaminationsrate der Filter mit Begleitflora des Leitungswassers lag bei den meisten Warmwasserproben unter 10 % und hat die Beurteilung des Wachstums der Mykobakterien nicht beeinflusst. Bei einigen Wasserproben gab es keine Kontamination mit Begleitflora des Leitungswassers.

Bei den Proben (1, 3, 31, 40) lag die Kontaminationsrate im Bereich zwischen 10 und 50 %.



**Abb. 12:** Anzahl der angezüchteten Mykobakterienstämme aus Warmwasserproben.

**Tabelle 16:** Spezies und Konzentrationen der angezüchteten Mykobakterien aus den Warmwasserproben.

Entnahmeort	Probe-Nr.	Mykobakterielle Spezies	Konzentration (KBE/L)
<b>Oberer Eselsberg</b>	3	nicht identifizierte MB	18
	7	<i>M. xenopi</i>	16
	8	<i>M. xenopi</i>	6
	11	<i>M. xenopi</i>	20
	22	<i>M. xenopi</i>	200
	23	<i>M. gordonae</i>	14
		<i>M. xenopi</i>	940
	24	<i>M. chelonae</i>	6
	25	<i>M. gordonae</i>	248
		<i>M. xenopi</i>	56
	26	<i>M. gordonae</i>	2
		<i>M. xenopi</i>	5600
	36	<i>M. xenopi</i>	8000
	37	<i>M. xenopi</i>	8000
	38	<i>M. xenopi</i>	60
40	nicht identifizierte MB	10	
41	<i>M. xenopi</i>	854	
42	<i>M. xenopi</i>	14	
43	<i>M. xenopi</i>	420	
<b>Michelsberg</b>	16	<i>M. flavescens</i>	76
		<i>M. xenopi</i>	4000
	18	<i>M. flavescens</i>	256
		<i>M. xenopi</i>	800
	19	<i>M. flavescens</i>	2476
		<i>M. gordonae</i>	22
	20	<i>M. flavescens</i>	20
		<i>M. xenopi</i>	2600
	21	<i>M. flavescens</i>	1660
		<i>M. xenopi</i>	600
	27	<i>M. flavescens</i>	12
		<i>M. xenopi</i>	4000
	<i>M. gordonae</i>	6	
29	<i>M. mucogenicum</i>	20	
	<i>M. chelonae</i>	64	
	<i>M. xenopi</i>	4000	
31	nicht identifizierte MB	10	
32	<i>M. flavescens</i>	4	
	<i>M. xenopi</i>	3800	
<b>Safranberg</b>	5	<i>M. xenopi</i>	302
		<i>M. flavescens</i>	2
	6	<i>M. xenopi</i>	4000
	9	<i>M. flavescens</i>	114
		<i>M. gordonae</i>	6
	10	<i>M. xenopi</i>	2
13	<i>M. xenopi</i>	248	
15	<i>M. flavescens</i>	4	
<b>Söflingen</b>	1	<i>M. frederiksbergense</i>	4
		nicht identifizierte MB	12

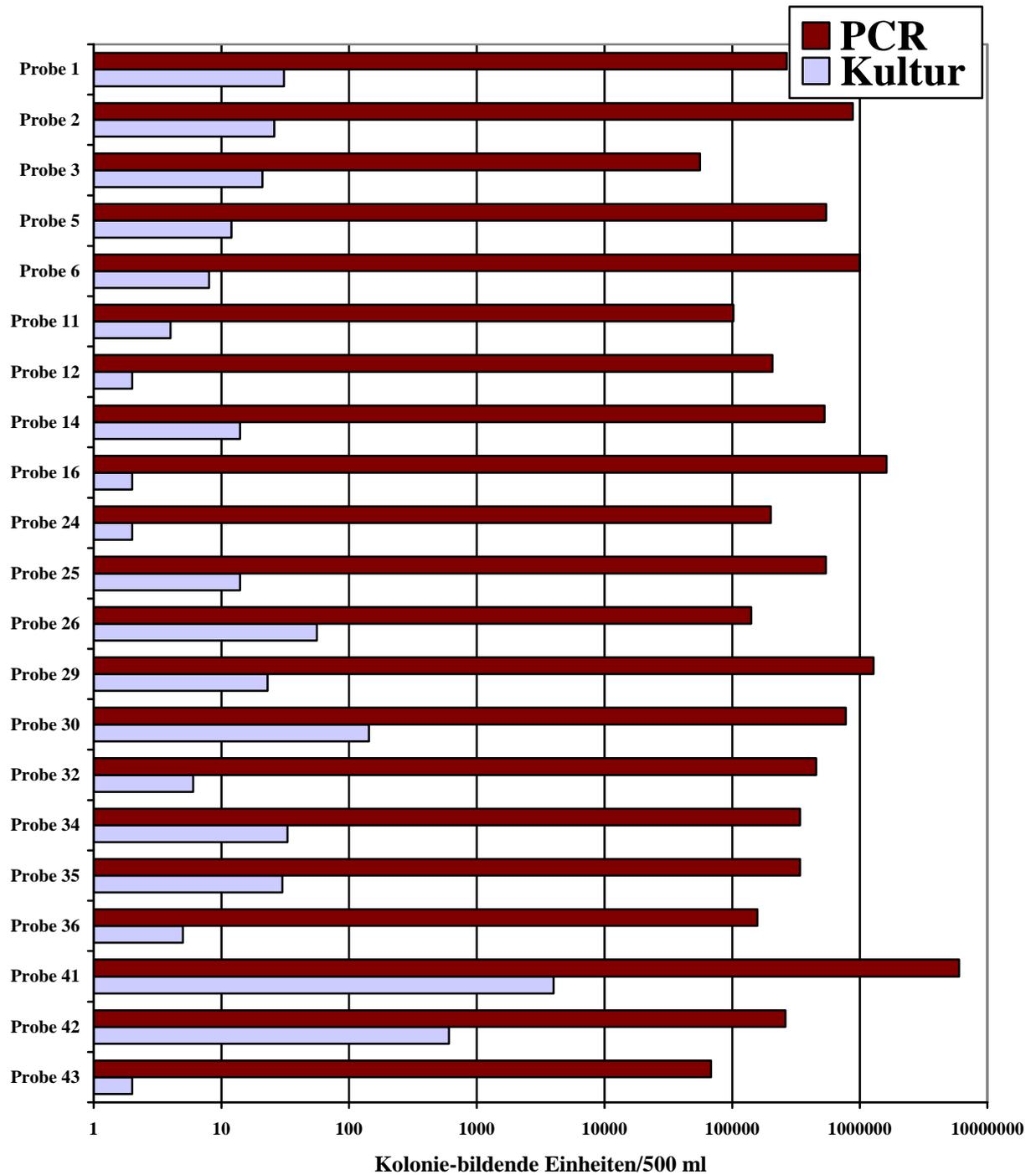
### 3.2.3. Vergleich der PCR-Ergebnisse mit dem kulturellen Mykobakterien-Nachweis

#### 3.2.3.1 *Mycobacterium spp.*-spezifische PCR

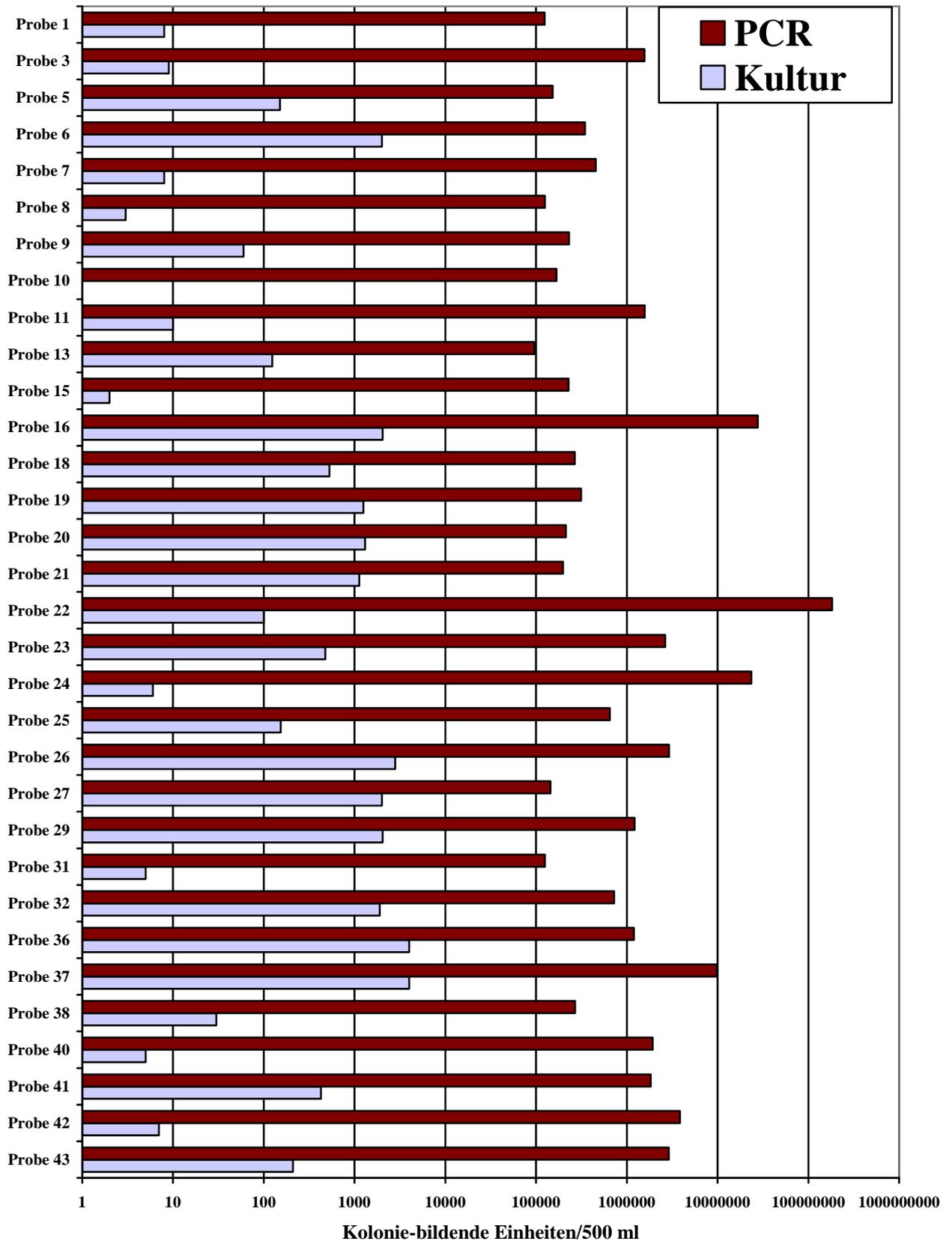
Von insgesamt 93 Kalt- und Warmwasserproben waren 53 Proben (57 %) kulturell positiv. Die *Mycobacterium spp.*-spezifische PCR war bei allen Wasserproben positiv (100 %). Somit gab es keine falschen negativen PCR-Ergebnisse.

Die 40 kulturell negativen Proben stammten vom Oberen Eselsberg (14 Proben), Safranberg (14 Proben), Michelsberg (10 Proben) und Schillerstraße (2 Proben). Bei diesen negativen Proben lag die Erregerkonzentration, die aus PCR-Ergebnissen berechnet wurde, zwischen  $38 \times 10^2$  KBE/L Wasser (bei Kaltwasserprobe 17) und  $57 \times 10^6$  KBE/L Wasser (bei Kaltwasserproben 27). Die minimale Bebrütungszeit für die Filter dieser Proben war 60 Tage.

Die Konzentration von Mykobakterien berechnet aus dem PCR-Ergebnis war besonders bei Kaltwasserproben erheblich höher als die Konzentration der kulturell nachgewiesenen Mykobakterien. In den Abbildungen 13 und 14 wurden die Mykobakterienzahlen der PCR- und Kultur-Ergebnissen für jede Probe dargestellt.

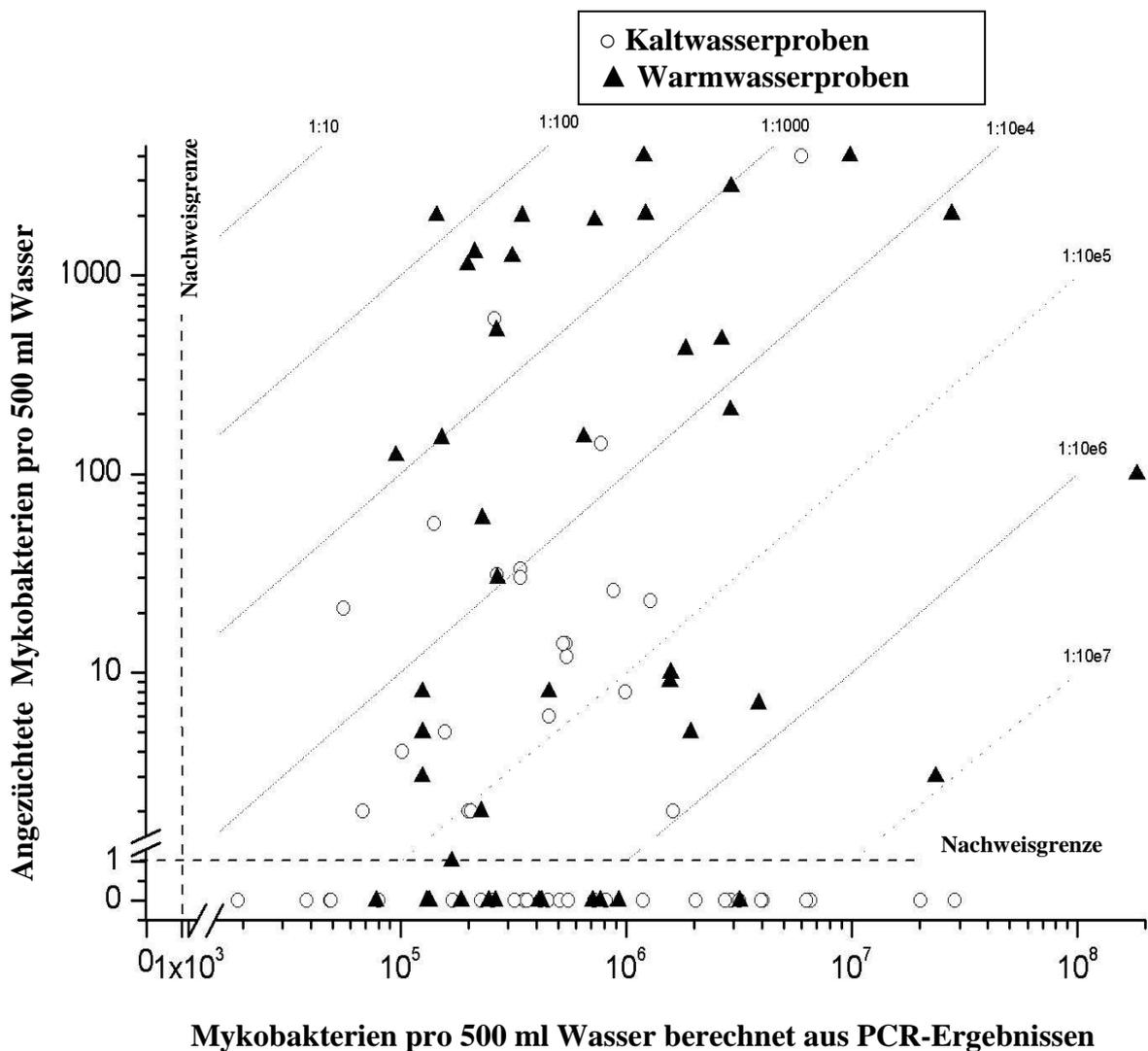


**Abb.13:** Vergleich zwischen der Konzentration der Mykobakterienspezies berechnet aus quantitativer *Mycobacterium spp.*-spezifischer PCR und der Konzentration der Mykobakterienspezies aus dem Kulturnachweis in den positiven Kaltwasserproben.



**Abb. 14:** Vergleich zwischen der Konzentration der Mykobakterienspezies berechnet aus quantitativer *Mycobacterium spp.*-spezifischer PCR und der Konzentration der Mykobakterienspezies aus dem Kulturnachweis in den positiven Warmwasserproben.

Es zeigte sich keine statistische Korrelation zwischen der Mykobakterienzahl bei dem kulturellen Nachweis und der Mykobakterienzahl, die aus den *Mycobacterium spp.*-spezifischen PCR-Ergebnissen berechnet wurde, weder bei den Kaltwasserproben, noch bei den Warmwasserproben (Abb. 15).

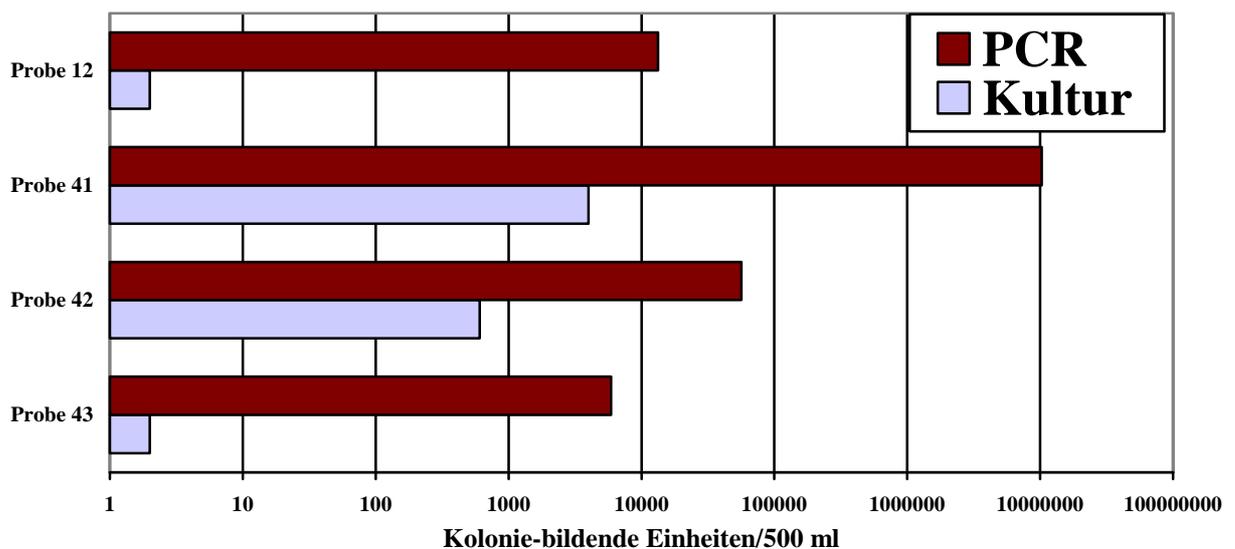


**Abb. 15:** Vergleich zwischen den kulturellen Ergebnissen und den spezifischen PCR-Ergebnissen bei allen 93 Wasserproben. Die Nachweisgrenze liegt für die Kulturnachweis bei 1 KBE/500 ml Wasser und für die PCR bei 833 KBE/500 ml Wasser. Das Verhältnis zwischen beiden Methoden wurde mit punktierten Linien dargestellt.

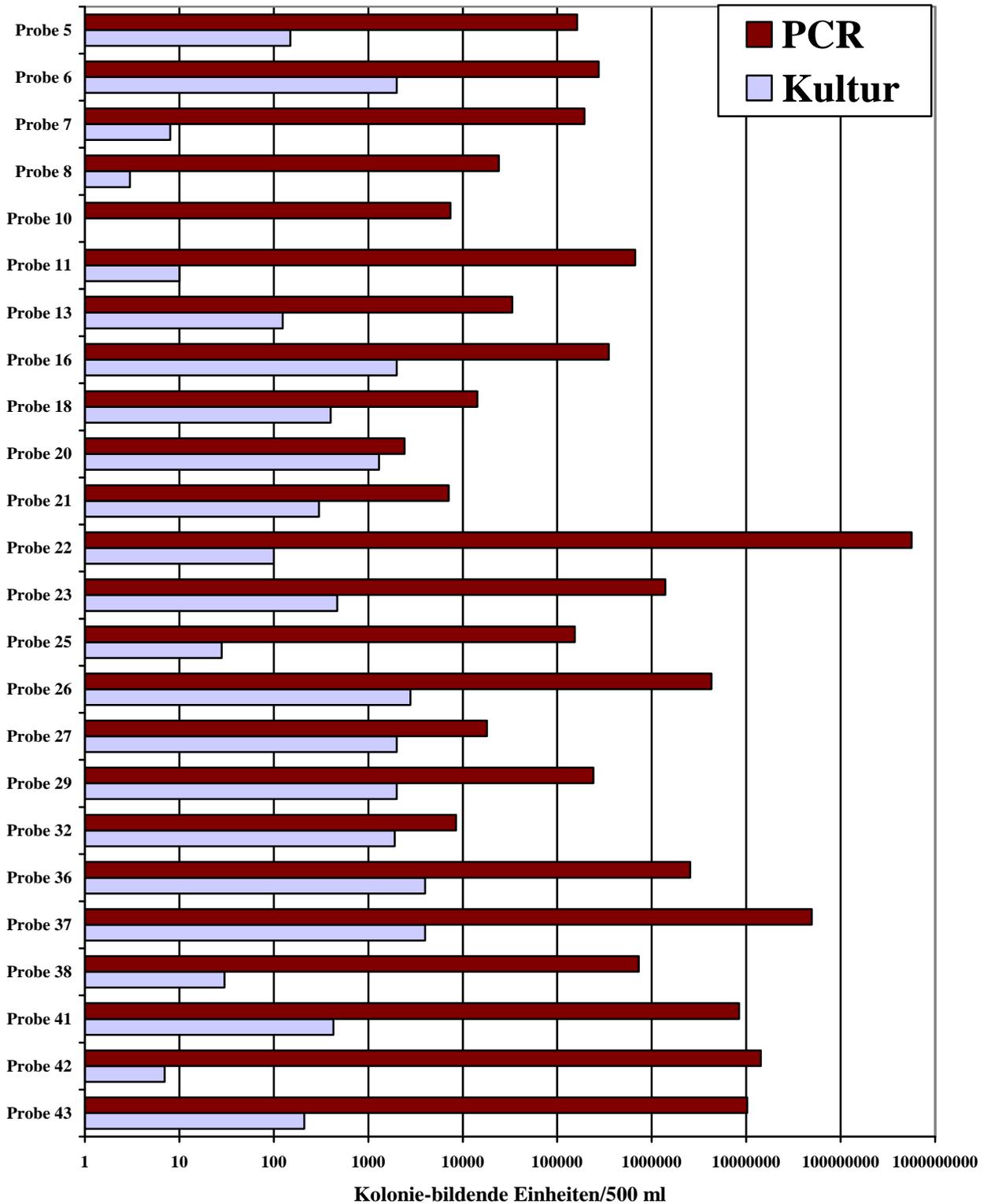
### 3.2.3.2 *Mycobacterium xenopi*

Alle *M. xenopi* kulturell positiven Proben waren auch in der *M. xenopi*-PCR positiv. Andererseits waren auch die Proben, die in der PCR negativ ( $n=20$ ) waren, in der Kultur negativ. Von 65 kulturell negativen Proben zeigten 45 Proben (69 %) ein positives Signal in der *M. xenopi*-PCR.

Die Konzentration von *M. xenopi* beim PCR-Nachweis war deutlich höher als die Konzentration von *M. xenopi* beim kulturellen Nachweis (Abb. 16, 17). Lediglich bei einer Probe (Probe 20, Warmwasser) lag das Verhältnis zwischen PCR- und Kultur-Ergebnis im Bereich von 2:1. Hier lag die Konzentration von *M. xenopi* aus der Kultur bei 1300 KBE/500 ml Wasser, wobei die Konzentration der *M. xenopi*, berechnet aus PCR-Ergebnis, bei 2417 KBE/500 ml Wasser lag.



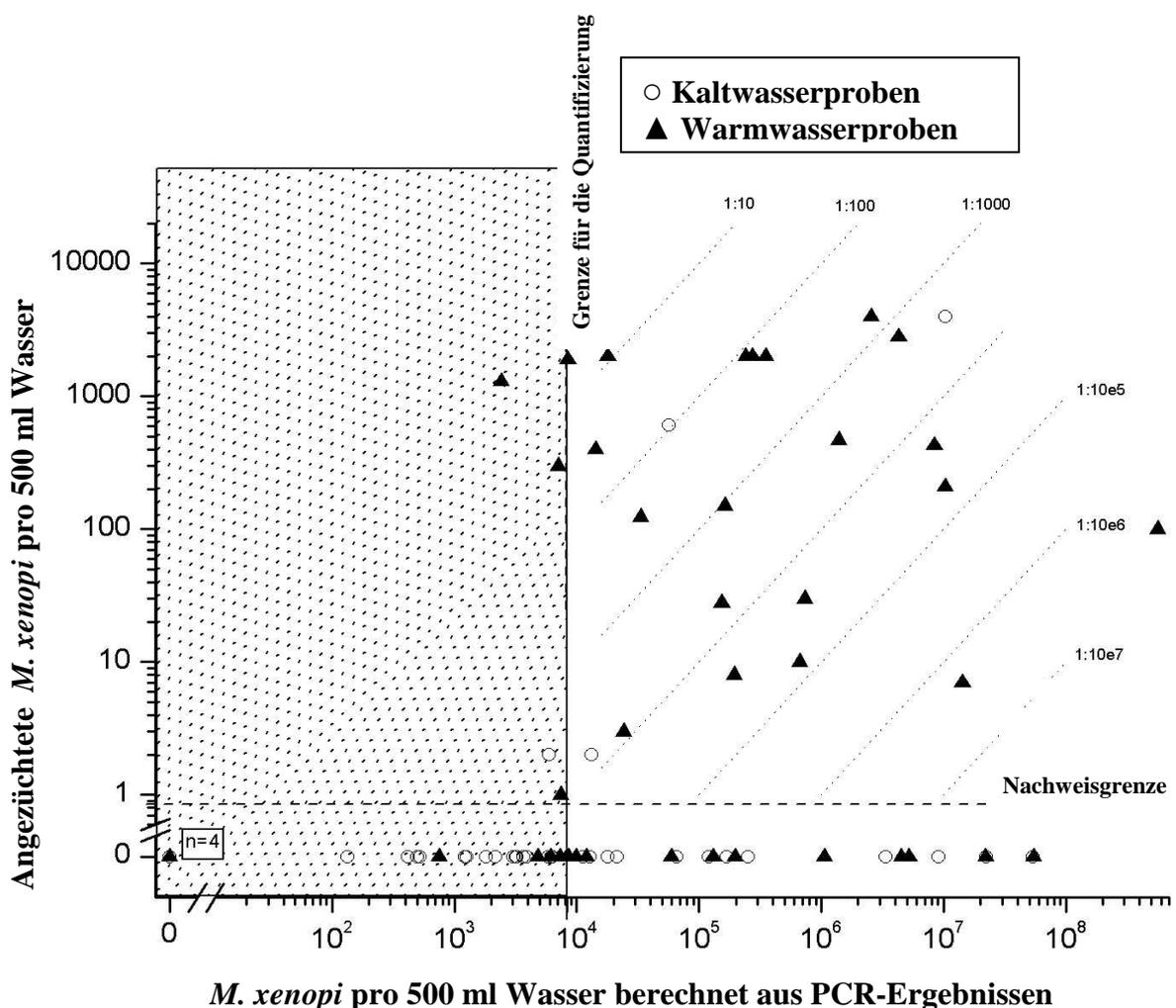
**Abb.16:** Vergleich zwischen der Konzentration von *M. xenopi* berechnet aus *Mycobacterium xenopi*-spezifischer PCR und der Konzentration von *M. xenopi* aus dem Kulturnachweis in den positiven Kaltwasserproben.



**Abb.17:** Vergleich zwischen der Konzentration von *M. xenopi* berechnet aus *Mycobacterium xenopi*-spezifischer PCR und der Konzentration von *M. xenopi* aus dem Kulturnachweis in den positiven Warmwasserproben.

Die statistische Korrelation zwischen der Mykobakterienzahl bei dem kulturellen Nachweis und der Mykobakterienzahl, die aus den *M. xenopi*-PCR Ergebnissen berechnet wurde, war bei Kaltwasserproben und Warmwasserproben schwach ( $r = 0,49$ ,  $p < 0,001$ ; Warmwasserproben  $r = 0,35$ ,  $p = 0,02$ ; Kaltwasserproben  $r = 0,30$ ,  $p = 0,03$ ).

In der Abbildung 18 wurden die Ergebnisse der beiden Methoden graphisch dargestellt. Die Proben, die in der punktierten Zone liegen, haben eine Konzentration von *M. xenopi* unter der Grenze für die Quantifizierung (100 fg/PCR) der *M. xenopi*-PCR. Bei der Sensitivitätsbestimmung der *M. xenopi*-PCR wurde bei einigen Versuchen ein Signal bei Konzentrationen von 10 fg DNA detektiert.



**Abb. 18:** Vergleich zwischen den kulturellen Ergebnissen und den *M. xenopi*-PCR-Ergebnissen bei allen 93 Wasserproben. Die Nachweisgrenze liegt für den Kulturnachweis bei 1 KBE/500 ml Wasser und für die PCR bei 8330 KBE/500 ml Wasser. Das Verhältnis zwischen beiden Methoden wurde mit punktierten Linien dargestellt. In der punktierten Zone wurden Proben mit Konzentration  $< 8330$  KBE/500 ml angezeigt.

## 4. Diskussion

### 4.1. Bewertung der LightCycler-PCR für den direkten Nachweis atypischer Mykobakterien

Eine der zentralen Fragestellungen dieser Arbeit war der Vergleich von PCR und Kultur zum Nachweis von ubiquitären Mykobakterien in Wasserproben. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die PCR der Kultur in der Sensitivität überlegen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mittels LightCycler-PCR in allen entnommenen Warmwasserproben, wie auch in allen entnommenen Kaltwasserproben, DNA von atypischen Mykobakterien nachweisbar ist. In der Kultur hingegen wurden nur in 57 % der Proben NTM nachgewiesen. Die Konzentration der Mykobakterien, die aus den PCR-Ergebnissen berechnet wurde, erreicht  $10^8$  KBE/L Wasser, damit war sie deutlich höher als die Konzentration, die durch die Kultur ermittelt wurde, eine die Konzentration bis 8000 KBE/L Wasser erreichte.

Ein möglicher Grund für die hohe Detektionsrate durch PCR ist, dass die PCR die lebendigen und toten Mykobakterien erfasst. Auch Mykobakterien, die sich in freilebenden Amöben vermehren, wurden mit der PCR nachgewiesen, da Amöben bei der DNA-Isolierung zerstört werden. Andererseits starb bei kulturellem Nachweis ein Teil der Mykobakterien durch die Dekontaminationsverfahren, da bei Anreicherung der Mykobakterien die Dekontamination immer das Wachstum der Mykobakterien beeinflusst (s. Kap. 3.1.2). Bei einigen Kulturen wurden die Mykobakterien von Begleitflora überwuchert. Die tatsächliche Mykobakterienkonzentration, die durch die Kultur ermittelt wurde, dürfte daher oberhalb der hier ermittelten Konzentration liegen.

Als weiterer Grund für diese Differenz kommt die Zellaggregation in Betracht, da bei dem kulturellen Nachweis die Konzentration der Mykobakterien durch die makroskopische Ermittlung der Anzahl kultivierter Kolonien bestimmt wurde. Jede Kolonie kann aus einer unterschiedlichen Anzahl von Bakterien gebildet werden. Für atypische Mykobakterien ist bekannt, dass sie in z. T. erheblichem Ausmaß, einige Spezies mehr als andere (73; 89), zur Zellaggregation neigen. Hierdurch reduziert sich die Anzahl der im beobachteten Zeitraum gebildeten Kolonien, sowie die ermittelte Konzentration. Damit liegt die Konzentration, die durch Kultur ermittelt wurde, unterhalb der tatsächlich vorhandenen Zahl der Mykobakterien.

Es gibt sehr wenige Studien über den direkten Nachweis von atypischen Mykobakterien aus dem Leitungswasser mittels LightCycler-PCR. Deswegen ist der Vergleich unserer Ergebnisse mit anderen Studien schwierig. Chang et al. (19) haben in einer Studie die molekulare Differenzierung bzw. PCR zum direkten Nachweis atypischer Mykobakterien aus dem Wasser verwendet. Es wurde 49 Wasserproben aus dem Leitungswassersystem eines Krankenhauses in Taiwan entnommen und mittels PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) und mit der Kultur untersucht. Bei direkter Verwendung der PCR-RFLP für Leitungswasser gab es keine positive Probe. Bei dem kulturellen Nachweis ließen sich atypische Mykobakterien in 10 Proben (20,4 %) isolieren. Die Speziesverteilung zeigte. *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. gasri*/*M. kansasii*, *M. simiae* und *M. szulgai*.

Wir fanden heraus, dass die LightCycler-PCR im Vergleich zur PCR-RFLP eine höhere Sensitivität bei der Direktuntersuchung des Wassers hat. Beim Betrachten der Kultur-Ergebnisse fanden wir, dass sich eine deutlich höhere Besiedlung des Leitungswassers des Klinikums Ulm durch atypische Mykobakterien im Vergleich zur Chang et al. Studie ergaben.

Ein Grund für diese Differenz könnte die Tatsache sein, dass die Detektion der PCR-Produkte nicht auf Agarose-Gel, wie in der PCR RFLP, erfolgt und optisch bewertet wird. Bei LightCycler-PCR lässt sich mittels Software die gemessene Fluoreszenz, die mit der Konzentration der PCR-Produkte korreliert, gegenüber der Zyklenzahl darstellen. Ein weiterer Grund liegt wahrscheinlich an der DNA-Isolierung. Die Isolierung der DNA direkt aus dem Wasser durch die von uns angewendeter Methode (s. Kap. 2.6.2) ist besser als die Zentrifugationsmethode. Das bekräftigen unsere Ergebnisse, die im Kap. 3.1.1 gezeigt wurden: Die Filtrierung ist für die Anreicherung der Mykobakterien aus dem Wasser besser als die Zentrifugationsmethode.

#### **4.2. Spezies der nachgewiesenen Mykobakterien im Leitungswasser**

Die Speziesverteilung in unserer Untersuchung zeigt, dass *M. xenopi* die häufigsten isolierten Stämme (52 %) aus den Warmwasserproben sind. Im Gegensatz dazu wurden in einer Studie von Schmidt-Hülsmann (86), die 1997 im Bereich Klinikum Oberer Eselsberg und Stadtwerke Ulm/Neu Ulm durchgeführt wurde, *M. gordonae* am häufigsten isoliert (Warmwasser: 100 %) und (Kaltwasser: 93 %). *M. xenopi* wurde nur aus warmem Wasser (83 %) isoliert. Weiterhin fanden sich *M. chelonae* und *M. chelonae*-Gruppe in 77 % der

Warmwasserproben, sowie nicht identifizierbare schnell wachsende Stämme in 38 % der Warmwasserproben und in 8 % der Kaltwasserproben. Beide Studien zeigen somit, dass ein Großteil des Leitungswassersystems des Klinikums Ulm mit *M. xenopi* besiedelt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden 9 Spezies nachgewiesen. Vergleicht man unsere Daten mit den Ergebnissen anderer Studien, erkennen wir, dass Spezies wie *M. moriokaense* zum ersten Mal als atypische Mykobakterien aus dem Leitungswassersystem isoliert wurden (s. Tab. 17). *M. vaccae* wurde bislang ebenfalls nur sehr selten in Wasserproben gefunden (110). *M. moriokaense* und *M. frederiksbergense* wurden bisher noch nie in Deutschland nachgewiesen.

Wie auch in Vergleichstudien fanden wir ein bereits Spektrum an verschiedenen *Mycobacterium* Spezies. Diese Kontamination mit NTM ist nicht nur in Ulm zu betrachten sondern wurde in unterschiedlichen Kontinenten (Bonn (45), Paris (66), USA, Finnland, Zaire und Kenia (29; 109)) nachgewiesen. Somit unterscheidet sich die Verteilung einzelner Mykobakterien-Spezies im Leitungswasser geografisch sehr.

**Tabelle 17:** Kulturell nachgewiesene Mykobakterien im Leitungswasser. Vergleich der Literatur mit eigenen Daten.

Autor (Jahr) Land, Literatur	Entnahmeort	Anzahl positiver Proben (%)	Gefundene Spezies	KBE/L
Havelaar (1985) Niederlande, (55)	Schwimmbad	47/69 (68 %)	GOR, Gr. IV, Gr. II, MAC	10
Carson (1988) USA, (18)	Krankenhaus	(50 %)	FOR, CHE, SCR, GOR, MAC, TER	Keine Angaben
Chang (2002) Taiwan, (19)	Krankenhaus	10/49 (20 %)	GOR, FOR, SCR, KAN, SIM, SZU	Keine Angaben
Le Dantec (2002) Frankreich, (66)	Stadtwasser	104/144 (72 %)	GOR, NON, CHE, PER FOR, AUR, GAD, INT	1-500
Fischeder (1991) Deutschland, (46)	Haus	1/72 (85 %)	GOR, FLA, KAN, CHE, FOR	100-1000
Peters (1995) Deutschland, (75)	Haus + Krankenhaus	50/118 (42 %)	GOR, CHE, GAS, Gr. IV, FOR, KAN, MAC, FLA, MAL, XEN	4-1600
Schmidt- Hülsmann (1997) Deutschland, (86)	Krankenhaus + Stadtwasser	25/26 (96 %)	GOR, XEN, CHE, Gr. IV	1-7930
Covert (1999) USA, (29)	Stadtwasser + Eis	46/139 (33 %)	MUC, GOR, FOR, INT, PER, GAS, SCR, MAC, CHE,	2-40
Torvinen (2004) Finnland, (102)	Stadtwasser	(80 %)	LEN, TUS, GOR	15-140
Diese Arbeit	Krankenhaus	53/93 (57 %)	XEN, FLA, GOR, CHE, FRE, VAC, MUC, MOR, TUS	2-8000

AUR = *M. aurum*, CHE = *M. chelonae*, INT = *M. intracellulare*, FLA = *M. flavescens*, FOR = *M. fortuitum*, FRE = *M. frederiksborgense*, GAD = *M. gadium*, GOR = *M. gordonae*, Gr. II bzw. Gr. IV = nicht näher bezeichnete M. aus Runyon-Gruppe 2 bzw. 4, KAN = *M. kansasii*, LEN = *M. lentiflavum*, MAL = *M. malmoense*, MAC = *M. avium*-Komplex, MOR = *M. moriokanse*, MUC = *M. mucogenicum*, NON = *M. nonchromogenicum*, PER = *M. peregrinum*, SCR = *M. scrofulaceum*, SIM = *M. simae*, SZU = *M. szulgai*, TER = *M. terrae*; TUS = *M. tusciae*, VAC = *M. vaccae*, XEN = *M. xenopi*.

### 4.3. Klinische Bedeutung ubiquitärer Mykobakterien für Patienten im Krankenhaus

Diese hohe Konzentration von Mykobakterien im Leitungswasser des Ulmer Universitätsklinikums steht eine große Gefahr für Patienten, die an angeborenen oder erworbenen Immundefekten leiden, dar. Gefährdet können auch Patienten mit einem durch

andere Grunderkrankungen eingeschränkten Immunstatus sein, z. B. Frühgeborene und Intensivpatienten (s. Kap. 1. 4). Dabei erfolgt die Infektion mit NTM wie *M. xenopi* möglicherweise überwiegend aerogen, durch Inhalation von erregerehaltigen Aerosolen. Beispielsweise beim Duschen oder in Waschbecken entstehende kleinste Wassertröpfchen können in die Lungenalveolen gelangen (25). Weitere Übertragungen erfolgen auf dem oralen und kutanen Infektionsweg. In diesem Zusammenhang konnte experimentell nachgewiesen werden, dass oral aufgenommene *M. avium*-Komplex-Erreger die intakte Mukosa durchwandern, und dort die Submukosa und die mesenterialen Lymphknoten infizieren können (26).

Die Bedeutung dieser Gefahr wurde in den letzten Jahren von einigen Autoren gezeigt, da bei Patienten und deren Umgebung im Leitungswasser molekularbiologisch identische Mykobakterienisolate nachgewiesen waren, so dass häufig Leitungswasser als Hauptinfektionsquelle angesehen wird. Du Moulin et al. (34; 35) und Von Reyn et al. (108; 109) haben in Leitungswasser von Krankenhäusern hohe Konzentration an *M. avium*-Komplex gefunden. Du Moulin et al. vermuteten, dass AIDS-Patienten sich an Aerosolen, die aus diesem Wasser entstehen, infizieren können.

Von Reyn et al. (108) vermuteten, dass AIDS-Patienten sich über Leitungswasser in Krankenhäusern infizieren, weil sie in ihren Untersuchungen identische *M. avium*-Komplex Isolate bei AIDS-Patienten und in Wasserproben von Krankenhäusern fanden, wo sie behandelt wurden.

Bei entsprechender Prädisposition des Patienten, insbesondere bei Immunsuppression, spielt nicht nur die Virulenz einzelner Mykobakterienarten eine Rolle, sondern auch die bakterielle Expositionsdosis. Eine hohe Expositionsdosis, wie sie z. B. beim Duschen erreicht werden kann, kann auch bei Mykobakterien wie z. B. *M. chelonae* oder *M. flavescens*, die normalerweise als apathogen angesehen werden, zur Infektion führen. Hierbei lassen sich keine Aussage darüber machen, welche infektiöse Mindestkonzentration von Mykobakterien möglicherweise erforderlich wäre, um eine Infektion mit atypischen Mykobakterien hervorzurufen. Steigt die Konzentration der Mykobakterien im Trinkwasser dagegen an oder werden pathogene Mykobakterienspezies wie beispielsweise *M. avium*-Komplex nachgewiesen, kann das Wasser als potentielle Infektions- und Kontaminationsquelle wirken.

Eine weitere Gefahr ist die mögliche iatrogene Infektion durch kontaminierte medizinische Geräte (s. Kap. 1.4), z. B. über Spritzen und Infusionen, intravenöse Injektion bei der

Hämodialyse bzw. Peritonealdialyse (7; 13). Auf der andere Seite könnten kontaminierte medizinische Geräte wie Endoskopiegeräte, Bronchoskopiegeräte oder die Probenbehältnisse zu einem falsch-positiven Mykobakteriennachweis führen (s. Kap. 1.7.4). Auch nach sauberer Probenentnahme kann es bei der mikrobiologischen Untersuchung im Laboratorium durch Verwendung von mit atypischer Mykobakterien kontaminierten Lösungen (101) zur Kontamination kommen, die zu Pseudoausbrüchen führen. Durch solche labortechnisch bedingten Kontaminationen sind ebenfalls ernsthafte Irrtümer mit Verdacht auf Tuberkulose, z. T. mit unnötiger tuberkulostatischen Therapie vorgekommen.

Die Entscheidung über die Signifikanz einer positiven Kultur mit Mykobakterien bleibt für den Kliniker nach wie vor eine schwierige Aufgabe. Lediglich an bakteriologischen Befunden orientierende Diagnosekriterien sind nicht ausreichend. Vielmehr muss das Gesamtbild der Erkrankung in Zusammenhang mit dem kulturellen Befund interpretiert werden, da nur bei ungefähr 10 % aller Patienten mit Nachweis von NTM eine wirkliche Infektion mit Mykobakterien vorliegt. Die Untersuchung von Leitungswasser auf Mykobakterien hat deshalb eine große Bedeutung, um potentielle Infektionsherde bzw. Kontaminationsquellen zu erkennen.

Im Universitätsklinikum Ulm wurde *M. xenopi* häufig in Patientenproben, wie Magensäften, Sputum, Bronchialspülungen etc., nachgewiesen, 2005 beispielsweise bei 20 Patienten. Aufgrund der weiten Verbreitung von *M. xenopi* im Leitungswasser ist davon auszugehen, dass es sich bei einen Großteil der Patienten, die klinisch keine Zeichen einer Mykobakterien-Infektion halten bzw. nicht immunsupprimiert waren, um "Pseudo-infektion" beispielsweise durch Trinken von Leitungswasser gehandelt hat.

#### **4.4. Maßnahmen zur Prophylaxe von Infektionen mit ubiquitären Mykobakterien**

Chemische Maßnahmen zur Desinfektion des Wassers wie die Chlorierung führen durch die Resistenz der Mykobakterien häufig nicht zur Abtötung (s. Kap. 1.7.2). Eine unzureichende Chlorierung kann sogar zur Selektion der Mykobakterien im Leitungswasser beitragen. Eine Erhöhung der Chlorkonzentration kann nicht mit Sicherheit alle atypischen Mykobakterien töten (74; 106).

Alternativ kann eine ausreichend hohe Temperatur zur Verbesserung der Wasserqualität im Leitungswassersystem beitragen. Da die Mykobakterien im Vergleich zu anderen Mikroorganismen eher hitzeresistenter sind (s. Kap. 1.7.2), könnte dies ebenfalls zur Selektion der Mykobakterien führen. Für die thermische Abtötung von Mykobakterien im Leitungswassersystem sind Art und Dauer der Temperatureinwirkung von Bedeutung. Sie muss eine gleichmäßige, ausreichende hohe und ausreichende lange Hitzewirkung in allen Leitungsabschnitten gewährleisten. In der Praxis muss berücksichtigt werden, dass der erwartete Temperatureffekt im Leitungssystem nicht immer erreicht werden kann.

Die dezimale Reduktionszeit (*D*-Wert) wurde bereits vielfach als geeigneter Parameter zum Vergleich der Temperaturempfindlichkeit von Mikroorganismen beschrieben. Der *D*-Wert dient als Maß für die Hitzeempfindlichkeit von Bakterien. Dabei entsprechen hohe *D*-Werte einer größeren Hitzeresistenz, niedrige *D*-Werte kennzeichnen die Hitzeempfindlichkeit der Spezies. Bei einer Temperatur von 50 °C lagen die *D*-Werte der meisten Mykobakterienspezies im Bereich einiger Stunden.

Schulze-Röbbecke et al. (89) fanden heraus, dass die Einwirkung von 70 °C bei allen Mykobakterienstämmen zum raschen Absterben der Besiedlung nach wenigen Sekunden führte. Der *D*-Wert der hitzeresistenten Spezies *M. xenopi* betrug bei dieser Temperatur 22 Sekunden, während die übrigen Mykobakterien nach weniger als zehn Sekunden bei gleicher Temperatur schnell abgetötet wurden. Daher wäre eine Temperatur von 70 °C mit einer Einwirkzeit von 30 Sekunden eine relativ sichere Temperatur zur Abtötung atypischer Mykobakterien im Leitungswassersystem. Insbesondere ältere Wasserversorgungsanlagen halten einer längeren Erhitzung auf diese Temperatur jedoch nicht immer stand.

Der Zustand von Leitungen und Rohren spielt für die Besiedlung durch atypische Mykobakterien im Leitungswassersystem eine große Rolle. Die Verkrustungen besonders in alten Leitungen schützen die kolonisierenden Bakterien vor der Einwirkung der schädigenden Einflüsse. Es können in einem älteren Leitungssystem auch „blind endende“ Leitungsabschnitte existieren. Sie führen zu mangelnder Aufheizung des Wassers und spielen eine große Rolle bei der Bildung von Biofilmen im Leitungssystem.

Die Biofilme kommen als wichtiger Vermehrungs- und Besiedlungsort von atypischen Mykobakterien im Leitungswasserbereich vor (s. Kap.1.7.3). So kann die Biofilmbildung in wasserdurchströmten Schlauch- und Rohrsystemen (sowohl in medizinischen Geräten als auch in Trinkwasserleitungen) zu einer Verschlechterung der Wasserqualität führen. Der Biofilm bietet Mikroorganismen günstige Bedingungen zur Vermehrung, so dass sich

im Wasser vorkommende Mykobakterien anreichern können (s. Kap 1.7.3). In diesem Zusammenhang wurde über die Fähigkeit von atypischen Mykobakterien wie *M. chelonae*, *M. fortuitum* oder *M. avium* berichtet, einen Biofilm innerhalb von 48 Stunden zu bilden. Es wurde ferner gezeigt, dass *M. xenopi* Biofilme innerhalb von nur 1 Stunde besiedeln und wochenlang in diesen persistieren kann (31). Diese *Mycobacterium*-Spezies, die bislang nur in Einzelfällen in der natürlichen Umwelt nachgewiesen wurde, scheint besonders gut an den "Lebensraum Biofilm" angepasst zu sein.

Biofilme begünstigen auch die Widerstandsfähigkeit gegenüber antibiotischen Mitteln (54; 90; 116). Deswegen sind Wasserleitung in gutem Zustand wichtig zur Vermeidung oder Reduktion einer Kolonisation mit atypischen Mykobakterien.

Die sorgfältige Reinigung und Desinfektion z. B. von Instrumenten, die mit kontaminierten Wasserquellen in Kontakt kommen (wie Dialysegeräte, Endoskope, Inhalationsgeräte etc.), ist daher von Bedeutung. Die Verwendung von wirksamen Desinfektionsmitteln, gerade für Materialien, die nicht durch Hitze behandelt werden können, ist notwendig und spielt eine entscheidende Rolle. Weitere sinnvolle Maßnahmen in diesem Zusammenhang sind regelmäßige kritische Prüfungen oder das Auswechseln sensitiver Teile der medizinischen Geräte. Die Verwendung von sterilisiertem Wasser ist immer empfehlenswert, genauso die Filtration des Wassers, um die toten, säurefesten Stäbchen zu eliminieren. Damit kann ein falsch-positives Ergebnis bei der Untersuchung durch Mikroskopie oder mittels der PCR vermieden werden.

Wasser für Geräte wie z. B. Sprühlanzen, Mundduschen und Turbinensprays in zahnärztlichen Behandlungseinheiten muss Trinkwasserqualität haben. Diese Geräte neigen besonders zu intensiver Verkeimung und sie sollen regelmäßig gewartet und desinfiziert werden. Die molekulare Typisierung ist eine ausgezeichnete Methode um die Quellen der Kontamination mit atypischen Mykobakterien zu verfolgen. Durch die „fingerprint“-Technik, wie z. B. Pulzfeldgelelektrophorese, ist es möglich Pseudo-Ausbrüche bzw. nosokomiale Infektionen früher zu erkennen.

Solange gezielte prophylaktische Maßnahmen mögliche Infektionen mit atypischen Mykobakterien nicht sicher vermeiden, muss andererseits der Erkrankung durch atypische Mykobakterien intensiver entgegengewirkt werden, gestützt durch eine genaue Beobachtung des Patienten, sowie eine frühzeitige Einleitung gezielter diagnostischer sowie möglicherweise auch therapeutischer Maßnahmen.

Neben solchen Maßnahmen sind regelmäßige Untersuchungen von Leitungswasser, Schwimmbädern, Spüllösungen medizinischer Geräte etc. sinnvoll. Diese Untersuchungen sind notwendig, um gefährdeten Personen (wie Immunsupprimierten) die richtigen Empfehlungen für den Umgang mit Leitungswasser geben zu können. So kann beim Duschen oder Zähnputzen mit Leitungswasser, das eine hohe Konzentration von atypischen Mykobakterien hat, eine Infektionsgefahr für solche Patienten ausgehen. Deswegen sind bei Immunsupprimierten, vor allem in Krankenhäusern, gezielte Umgebungsuntersuchungen sinnvoll, um mögliche Infektionen zu verhindern. Beim Auftreten mehrerer Fälle von Mykobakteriosen im Krankenhaus, sollten diese Untersuchungen immer durchgeführt werden, um die Ansteckung weiterer Patienten zu vermeiden.

Eine hochwirksame prophylaktische Maßnahme ist die Verwendung von Wasserfiltern am endständigen Hahn in Krankenhäusern, um den Kontakt mit Mykobakterien-haltigen Aerosolen zu verringern. Dadurch reduziert sich das Infektionsrisiko bei immungeschwächten Patienten während ihres Aufenthaltes im Krankenhaus. Wasserfilter bieten zusätzlich den Vorteil eines Schutzes gegenüber anderen wasserübertragenen Bakterien, wie Legionellen und Pseudomonaden (79).

#### **4.5. Die Empfehlungen der Trinkwasserverordnung (TWVO)**

Die aktuelle Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung/TrinkwVO 2001) ist am 1. Januar 2003 in Kraft getreten. Laut Trinkwasserverordnung 2001 muss Trinkwasser frei sein von Krankheitserregern. Im Wasser für menschlichen Gebrauch dürfen Krankheitserreger nicht in Konzentrationen enthalten sein, die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit darstellen. Falls der Unternehmer oder sonstige Betreiber einer Wasserversorgungsanlage mikrobielle Belastungen des Wassers feststellten, muss eine Aufbereitung, erforderlichenfalls unter Einschluss einer Desinfektion, erfolgen. Die TWVO gibt einen Überblick über die wesentlichen Konsequenzen, die sich daraus für Krankenhäuser als Betreiber von Hausinstallationen ergeben. Den Krankenhäusern wird eine eigenständige Verantwortung für die Qualität des Wassers in ihren Hausinstallationssystemen zugewiesen.

Die Verordnung definiert neben bestimmten chemischen Parametern die maximal zulässige Koloniezahl von Mikroorganismen, wie z. B. *E. coli*, coliformen Bakterien und Legionellen, die sich ebenfalls in Biofilmen vermehren können. Die Anforderungen der

Trinkwasserverordnung erfassen die meisten nosokomialen Krankheitserreger mit Ausnahme atypischer Mykobakterien, über die mehrmals als nosokomiale Krankheitserreger berichtet wurde (s. Kap. 1.7.4). Bei Bewertung der vorliegenden Studienergebnisse darf davon ausgegangen werden, dass die Kontamination mit atypischen Mykobakterien im Leitungswassersystem des Klinikums Signifikant ist und ein Risiko für schwere immunsupprimierte Patienten darstellt.

Es wäre daher, die Anforderungen der TWVO für besonders sensible Bereiche, wie Transplantationsstationen, enger zu fassen und ein Screening in Bezug auf atypische Mykobakterien zu fordern. Hierzu wäre es notwendig, zunächst Grenzwerte festzulegen, ab denen von einer erhöhten Gefahr für die Patienten ausgegangen werden muss. Ob eine quantitative PCR für diese Fragestellung geeignet ist, muss in weiteren Studien geklärt werden. In der vorliegenden Arbeit fand sich nur eine geringe Korrelation der kulturellen und der PCR-Daten, aber die PCR ist sicherlich geeignet, schnell einen Überblick über die generelle Belastung des Wassersystems mit atypischen Mykobakterien zu erhalten.

## 5. Zusammenfassung

Atypische Mykobakterien sind ubiquitär vorkommende Bakterien, die vornehmlich in natürlichen und künstlichen Wasserquellen, wie zum Beispiel Leitungswasser, gefunden werden. Sie werden immer häufiger als Ursache unterschiedlicher Krankheitsbilder, insbesondere bei immunsupprimierten Patienten, gesehen. Um zu klären, ob Leitungswasser als Kontaminations- oder Infektionsquelle von Bedeutung ist, wurde es auf ubiquitäre Mykobakterien mittels quantitativer LightCycler Real-time PCR und Kultur untersucht. Dabei wurde sowohl eine *Mycobacterium*-gattungsspezifische PCR als auch eine *M. xenopi*-spezifische PCR eingesetzt.

Insgesamt wurden 49 Kalt- und 44 Warmwasserproben von 53 Wasserhähnen aus den Kliniken Oberer Eselsberg, Michelsberg, Safranberg, Dermatologie Söflingen, Ambulanz Schillerstraße sowie aus der Zentralküche untersucht.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die Sensitivität der LightCycler Real-time PCR deutlich höher als die Kultur ist, zusätzlich erlaubt die LightCycler PCR eine schnellere Quantifizierung der Mykobakterien in den Wasserproben. Atypische Mykobakterien wurden in allen Leitungswasserproben der Kliniken mittels PCR nachgewiesen. Die Konzentration von Mykobakterien-DNA berechnet aus den quantitativen *Mycobacterium spp.*-spezifischer PCR-Ergebnissen lag zwischen  $38 \times 10^3$  und  $37 \times 10^7$  KBE/L Wasser.

Insgesamt wurden 9 verschiedene Mykobakterienarten kulturell isoliert. In 28 Wasserproben wurde *M. xenopi* nachgewiesen, damit war sie die mit Abstand am häufigsten gefundene Art, danach folgten *M. flavescens* (in 14 Wasserproben) und *M. gordonae* (in 12 Wasserproben). Ferner wurden sehr seltene bzw. bislang noch nie in Wasserproben nachgewiesene Arten (*M. frederiksbergense*, *M. moriokaense*) gefunden. Die Konzentration der kulturell isolierten Mykobakterien lag zwischen 2 und 8000 KBE/L Wasser.

Diese Arbeit zeigt, dass atypische ubiquitäre Mykobakterien im Trinkwasser am Universitätsklinikum Ulm z. T. in hohen Konzentrationen vorkommen. Demzufolge wird die Bedeutung prophylaktischer Maßnahmen, wie thermische Abtötung von Mykobakterien in Leitungswassersystem oder Verwendung von Wasserfiltern, in Krankenhäusern unterstrichen. Insbesondere in hoch sensiblen Bereichen, in denen schwer immunsupprimierte Patienten behandelt werden, sollte eine Expositionsprophylaxe der Patienten erfolgen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Abalain-Colloc ML, Guillerm D, Salaun M, Gouriou S, Vincent V and Picard B.** *Mycobacterium szulgai* isolated from a patient, a tropical fish and aquarium water. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 768-769 (2003)
2. **Adekambi T, Berger P, Raoult D and Drancourt M.** rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 133-143 (2006)
3. **Adekambi T, Foucault C, La Scola B and Drancourt M.** Report of two fatal cases of *Mycobacterium mucogenicum* central nervous system infection in immunocompetent patients. *J Clin Microbiol* 44: 837-840 (2006)
4. **Alugupalli S, Larsson L, Slosarek M and Jaresova M.** Application of gas chromatography-mass spectrometry for rapid detection of *Mycobacterium xenopi* in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 58: 3538-3541 (1992)
5. **Aronson T, Holtzman A, Glover N, Boian M, Froman S, Berlin OG, Hill H and Stelma G, Jr.** Comparison of large restriction fragments of *Mycobacterium avium* isolates recovered from AIDS and non-AIDS patients with those of isolates from potable water. *J Clin Microbiol* 37: 1008-1012 (1999)
6. **Astagneau P, Desplaces N, Vincent V, Chicheportiche V, Botharel A, Maugat S, Lebascle K, Leonard P, Desenclos J, Grosset J, Ziza J and Brucker G.** *Mycobacterium xenopi* spinal infections after discovertebral surgery: investigation and screening of a large outbreak. *Lancet* 358: 747-751 (2001)
7. **Band JD, Ward JI, Fraser DW, Peterson NJ, Silcox VA, Good RC, Ostroy PR and Kennedy J.** Peritonitis due to a *mycobacterium chelonae*-like organism associated with intermittent chronic peritoneal dialysis. *J Infect Dis* 145: 9-17 (1982)
8. **Bar T, Mishal J, Lewkowicz A and Nahlieli O.** Osteomyelitis of the mandible due to *Mycobacterium abscessus*: a case report. *J Oral Maxillofac Surg* 63: 841-844 (2005)
9. **Begg N, O'Mahony M, Penny P and Richardson EA.** *Mycobacterium chelonae* associated with a hospital hydrotherapy pool. *Community Med* 8: 348-350 (1986)

10. **Bennett SN, Peterson DE, Johnson DR, Hall WN, Robinson-Dunn B and Dietrich S.** Bronchoscopy-associated *Mycobacterium xenopi* pseudoinfections. Am J Respir Crit Care Med 150: 245-250 (1994)
11. **Beran V, Matlova L, Dvorska L, Svastova P and Pavlik I.** Distribution of mycobacteria in clinically healthy ornamental fish and their aquarium environment. J Fish Dis 29: 383-393 (2006)
12. **Bercovier H, Kafri O and Sela S.** Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. Biochem Biophys Res Commun 136: 1136-1141 (1986)
13. **Bolan G, Reingold AL, Carson LA, Silcox VA, Woodley CL, Hayes PS, Hightower AW, McFarland L, Brown JW, III and Petersen NJ.** Infections with *Mycobacterium chelonae* in patients receiving dialysis and using processed hemodialyzers. J Infect Dis 152: 1013-1019 (1985)
14. **Brooks RW, Parker BC, Gruft H and Falkinham JO, III.** Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. V. Numbers in eastern United States soils and correlation with soil characteristics. Am Rev Respir Dis 130: 630-633 (1984)
15. **Brown-Elliott BA and Wallace RJ, Jr.** Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clin Microbiol Rev 15: 716-746 (2002)
16. **Buijtels PC, Petit PL, Verbrugh HA, van Belkum A and van Soolingen D.** Isolation of nontuberculous mycobacteria in Zambia: eight case reports. J Clin Microbiol 43: 6020-6026 (2005)
17. **Caroli G, Levre' E, Armani G, Biffi-Gentili S and Molinari G.** Search for acid-fast bacilli in bottled mineral waters. J Appl Bacteriol 58: 461-463 (1985)
18. **Carson LA, Bland LA, Cusick LB, Favero MS, Bolan GA, Reingold AL and Good RC.** Prevalence of nontuberculous mycobacteria in water supplies of hemodialysis centers. Appl Environ Microbiol 54: 3122-3125 (1988)
19. **Chang CT, Wang LY, Liao CY and Huang SP.** Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism. Appl Environ Microbiol 68: 3159-3161 (2002)
20. **Chapman JS and Guy LR.** Scrofula caused by atypical Mycobacteria. Pediatrics 23: 323-331 (1959)

21. **Characklis WG and Marshall KC.** Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. In : Characklis, W. G.; K. C. Marshall (Hrsg): Biofilms. John Wiley, New York (1990)
22. **Cloud JL, Meyer JJ, Pounder JI, Jost KC, Jr., Sweeney A, Carroll KC and Woods GL.** *Mycobacterium arupense* sp. nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1413-1418 (2006)
23. **Coitinho C, Brandes E, Pardinás M and Rivas C.** [Disseminated mycobacterial infections in patients with HIV/AIDS. Evaluation of blood cultures]. *Rev Argent Microbiol* 37: 196-198 (2005)
24. **Collins CH, Grange JM and Yates MD.** Mycobacteria in water. *J Appl Bacteriol* 57: 193-211 (1984)
25. **Collins CH and Yates MD.** Infection and colonisation by *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium xenopi*: aerosols as a possible source? *J Infect* 8: 178-179 (1984)
26. **Collins FM.** Mycobacteria as cofactors in AIDS. *Res Microbiol* 143: 369-372 (1992)
27. **Colville A.** Retrospective review of culture-positive mycobacterial lymphadenitis cases in children in Nottingham, 1979-1990. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12: 192-195 (1993)
28. **Conger NG, O'Connell RJ, Laurel VL, Olivier KN, Graviss EA, Williams-Bouyer N, Zhang Y, Brown-Elliott BA and Wallace RJ, Jr.** *Mycobacterium simiae* outbreak associated with a hospital water supply. *Infect Control Hosp Epidemiol* 25: 1050-1055 (2004)
29. **Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL and Stelma GN, Jr.** Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 65: 2492-2496 (1999)
30. **Cox R, deBorja K and Bach MC.** A pseudo-outbreak of *Mycobacterium chelonae* infections related to bronchoscopy. *Infect Control Hosp Epidemiol* 18: 136-137 (1997)
31. **Dailoux M, Albert M, Laurain C, Andolfatto S, Lozniewski A, Hartemann P and Mathieu L.** *Mycobacterium xenopi* and drinking water biofilms. *Appl Environ Microbiol* 69: 6946-6948 (2003)

32. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser und Scklammuntersuchung. Allgemein Angaben Gruppe A. Deutsches Institut für Normung (DIN) ISO 38402-19 (2006)
33. **Dostal S, Richter E and Harmsen D.** Concise Guide to Mycobacteria and their Molecular Differnetiation, Ridom Press, Würzburg, Germany (2003)
34. **Du Moulin GC, Stottmeier KD, Pelletier PA, Tsang AY and Hedley-Whyte J.** Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. JAMA 260: 1599-1601 (1988)
35. **Du Moulin GC and Stottmeire KD.** Waterborne mycobacteria- an increasing threat to health. ASM News 52: 525-529 (1986)
36. **El Sahly HM, Septimus E, Soini H, Septimus J, Wallace RJ, Pan X, Williams-Bouyer N, Musser JM and Graviss EA.** *Mycobacterium simiae* pseudo-outbreak resulting from a contaminated hospital water supply in Houston, Texas. Clin Infect Dis 35: 802-807 (2002)
37. **Elsayed S and Read R.** *Mycobacterium haemophilum* osteomyelitis: case report and review of the literature. BMC Infect Dis 6: 70 (2006)
38. **Embil J, Warren P, Yakrus M, Stark R, Corne S, Forrest D and Hershfield E.** Pulmonary illness associated with exposure to *Mycobacterium-avium* complex in hot tub water. Hypersensitivity pneumonitis or infection? Chest 111: 813-816 (1997)
39. **Falkinham JO, III.** Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev 9: 177-215 (1996)
40. **Falkinham JO, III.** Mycobacterial aerosols and respiratory disease. Emerg Infect Dis 9: 763-767 (2003)
41. **Falkinham JO, III, Norton CD and LeChevallier MW.** Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. Appl Environ Microbiol 67: 1225-1231 (2001)
42. **Farhi DC, Mason UG, III and Horsburgh CR, Jr.** Pathologic findings in disseminated *Mycobacterium avium-intracellulare* infection. A report of 11 cases. Am J Clin Pathol 85: 67-72 (1986)

43. **Feldman WH, Hutchinson DW and Schwarting VM.** Juvenile tuberculosis infection, possibly of avian type. *Tubercle* 29: 45 (1948)
44. **Feldman WH, Davies R, Moses HE and Andberg W.** An unusual *Mycobacterium* isolated from pulmonary disease of long duration. *AM Rev Tuberculosis* 48: 82-93 (1943)
45. **Feldmann C.** Fakultativ pathogene Mykobakterien in Dentaleinheiten, Med Dissertation, Medizinische Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. (1999)
46. **Fischeder R, Schulze-Robbecke R and Weber A.** Occurrence of mycobacteria in drinking water samples. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 192: 154-158 (1991)
47. **Fraser VJ, Jones M, Murray PR, Medoff G, Zhang Y and Wallace RJ, Jr.** Contamination of flexible fiberoptic bronchoscopes with *Mycobacterium chelonae* linked to an automated bronchoscope disinfection machine. *Am Rev Respir Dis* 145: 853-855 (1992)
48. **Gillissen G.** Die Familie der *Mycobacteriaceae*. In : Brandis H, Pulverer G (Hrsg). *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. Stuttgart-New York: Gustav Fischer Verlag. Stuttgart - New York: Gustav Fischer Verlag, 454-471 (1988)
49. **Glover N, Holtzman A, Aronson T, Froman S, Berlin OG, Dominguez P, Kunkel KA, Overture G, Stelma G, Jr., Smith C and Yakrus M.** The isolation and identification of *Mycobacterium avium* complex (MAC) recovered from Los Angeles portable water, a possible source of infection in ADIS patients. *Int Journal of Environmental Health Research* 4: 63-72 (1994)
50. **Greinert U.** Klinik atypischer Mykobakteriosen. *Immun Infekt* 20: 32-35 (2006)
51. **Gruft H, Falkinham JO, III and Parker BC.** Recent experience in the epidemiology of disease caused by atypical mycobacteria. *Rev Infect Dis* 3: 990-996 (1981)
52. **Gruft H, Loder A, Osterhout M, Parker BD and Falkinham JO, III.** Postulated sources of *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum* infection: isolation of mycobacteria from estuaries and ocean waters. *Am Rev Respir Dis* 120: 1385-1388 (1979)
53. **Hahn H.** Mykobakterien . In :Hahn,H; Falke,D.; Klein,P.(Hrsg): *Medizinische Mikrobiologie*, 2, Auflage, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong-Kong, Barcelona, Budapest:Springer- Verlag. s. 435-455 (1994)

54. **Hall-Stoodley L and Lappin-Scott H.** Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*. FEMS Microbiol Lett 168: 77-84 (1998)
55. **Havelaar AH, Berwald LG, Groothuis DG and Baas JG.** Mycobacteria in semi-public swimming-pools and whirlpools. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [B] 180: 505-514 (1985)
56. **Jin BW, Saito H and Yoshii Z.** Environmental mycobacteria in Korea. I. Distribution of the organisms. Microbiol Immunol 28: 667-677 (1984)
57. **Kauppinen J, Nousiainen T, Jantunen E, Mattila R and Katila ML.** Hospital water supply as a source of disseminated *Mycobacterium fortuitum* infection in a leukemia patient. Infect Control Hosp Epidemiol 20: 343-345 (1999)
58. **Kazda J, Muller K and Irgens LM.** Cultivable mycobacteria in sphagnum vegetation of moors in South Sweden and coastal Norway. Acta Pathol Microbiol Scand [B] 87B: 97-101 (1979)
59. **Kazda JF.** The principles of the ecology of mycobacteria. . in: C. Ratledge, J. Stanford (Hrsg): The Biology of Mycobacteria. Immunological and Environmental Aspects 2: 323-341 (1983)
60. **Kennedy TP and Weber DJ.** Nontuberculous mycobacteria. An underappreciated cause of geriatric lung disease. Am J Respir Crit Care Med 149: 1654-1658 (1994)
61. **Kentrup H, Biesterfeld F and Hasse G.** Nichttuberkulöse Mykobakterien als Ursache zervikaler Lymphadeniten im Kindesalter. Dt Ärztebl 94: 2416-2419, (1997)
62. **Kline S, Cameron S, Streifel A, Yakrus MA, Kairis F, Peacock K, Besser J and Cooksey RC.** An outbreak of bacteremias associated with *Mycobacterium mucogenicum* in a hospital water supply. Infect Control Hosp Epidemiol 25: 1042-1049 (2004)
63. **Kubin M.** Distribution and ecology of non-living reservoirs opportunists and pathogens. In G. P. Kubica and L. G. Wayne (Hrsg), The mycobacteria: a sourcebook, Part B. Marcel Dekker, Inc., New York. p. 1313-1338 (1984)
64. **Lachnik J, Ackermann B, Bohrsen A, Maass S, Diephaus C, Puncken A, Stermann M and Bange FC.** Rapid-cycle PCR and fluorimetry for detection of mycobacteria. J Clin Microbiol 40: 3364-3373 (2002)

65. **Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S and Vincent V.** Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. *Appl Environ Microbiol* 68: 1025-1032 (2002)
66. **Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S and Vincent V.** Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 68: 5318-5325 (2002)
67. **Lowry PW, Jarvis WR, Oberle AD, Bland LA, Silberman R, Bocchini JA, Jr., Dean HD, Swenson JM and Wallace RJ, Jr.** *Mycobacterium chelonae* causing otitis media in an ear-nose-and-throat practice. *N Engl J Med* 319: 978-982 (1988)
68. **Miyamoto M, Yamaguchi Y and Sasatsu M.** Disinfectant effects of hot water, ultraviolet light, silver ions and chlorine on strains of *Legionella* and nontuberculous mycobacteria. *Microbios* 101: 7-13 (2000)
69. **Neumann M, Schulze-Robbecke R, Hagenau C and Behringer K.** Comparison of Methods for Isolation of Mycobacteria from Water. *Appl Environ Microbiol* 63: 547-552 (1997)
70. **O'Brien RJ, Geiter LJ and Snider DE, Jr.** The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States. Results from a national survey. *Am Rev Respir Dis* 135: 1007-1014 (1987)
71. **Olalla J, Pombo M, Aguado JM, Rodriguez E, Palenque E, Costa JR and Rioperez E.** *Mycobacterium fortuitum* complex endocarditis-case report and literature review. *Clin Microbiol Infect* 8: 125-129 (2002)
72. **Parashar D, Chauhan DS, Sharma VD, Chauhan A, Chauhan SV and Katoch VM.** Optimization of procedures for isolation of mycobacteria from soil and water samples obtained in northern India. *Appl Environ Microbiol* 70: 3751-3753 (2004)
73. **Parker BC, Ford MA, Gruft H and Falkinham JO, III.** Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. IV. Preferential aerosolization of *Mycobacterium intracellulare* from natural waters. *Am Rev Respir Dis* 128: 652-656 (1983)
74. **Pelletier PA, Du Moulin GC and Stottmeier KD.** Mycobacteria in public water supplies: comparative resistance to chlorine. *Microbiol Sci* 5: 147-148 (1988)
75. **Peters M, Muller C, Rusch-Gerdes S, Seidel C, Gobel U, Pohle HD and Ruf B.** Isolation of atypical mycobacteria from tap water in hospitals and homes: is this a

- possible source of disseminated MAC infection in AIDS patients? *J Infect* 31: 39-44 (1995)
76. **Portaels F, Deneff M and Larsson L.** Pulmonary disease caused by *Mycobacterium malmoense*. Comments on the possible origin of infection and methods for laboratory diagnosis. *Tubercle* 72: 218-222 (1991)
77. **Primm TP, Lucero CA and Falkinham JO, III.** Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 17: 98-106 (2004)
78. **Pryor M, Springthorpe S, Riffard S, Brooks T, Huo Y, Davis G and Sattar SA.** Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes. *Water Sci Technol* 50: 83-90 (2004)
79. **Reuter S, Sigge A, Wiedeck H and Trautmann M.** Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets. *Crit Care Med* 30: 2222-2228 (2002)
80. **Richter E, Rusch-Gerdes S and Hillemann D.** Evaluation of the GenoType *Mycobacterium* Assay for Identification of Mycobacterial Species from Cultures. *J Clin Microbiol* 44: 1769-1775 (2006)
81. **Rodriguez-Lazaro D, D'Agostino M, Herrewegh A, Pla M, Cook N and Ikononopoulos J.** Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in water and milk. *Int J Food Microbiol* 101: 93-104 (2005)
82. **Rosenstraus M, Wang Z, Chang SY, DeBonville D and Spadoro JP.** An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. *J Clin Microbiol* 36: 191-197 (1998)
83. **Runyon EH.** Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am* 43: 273-290 (1959)
84. **Safranek TJ, Jarvis WR, Carson LA, Cusick LB, Bland LA, Swenson JM and Silcox VA.** *Mycobacterium chelonae* wound infections after plastic surgery employing contaminated gentian violet skin-marking solution. *N Engl J Med* 317: 197-201 (1987)
85. **Sarkola A, Makinen J, Marjamaki M, Marttila HJ, Viljanen MK and Soini H.** Prospective evaluation of the GenoType assay for routine identification of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 642-645 (2004)

86. **Schmidt-Hülsmann MH.** Ubiquitäre Mykobakterien im Leitungswasser, Med Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Ulm. (1997)
87. **Schmitz-Buhl G.** Modell zur Untersuchung der Absterbekinetik atypischer Mykobakterien in Biofilmen. Med Dissertation, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. (1993)
88. **Schulze-Robbecke R.** [Mycobacteria in the environment]. *Immun Infekt* 21: 126-131 (1993)
89. **Schulze-Robbecke R and Buchholtz K.** Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Appl Environ Microbiol* 58: 1869-1873, 1992.
90. **Schulze-Robbecke R, Janning B and Fischeder R.** Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. *Tuber Lung Dis* 73: 141-144 (1992)
91. **September SM, Brozel VS and Venter SN.** Diversity of nontuberculoïd *Mycobacterium* species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 70: 7571-7573 (2004)
92. **Shojaei H, Goodfellow M, Magee JG, Freeman R, Gould FK and Brignall CG.** *Mycobacterium novocastrense* sp. nov., a rapidly growing photochromogenic mycobacterium. *Int J Syst Bacteriol* 47: 1205-1207 (1997)
93. **Shrestha NK, Tuohy MJ, Hall GS, Reischl U, Gordon SM and Procop GW.** Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 41: 5121-5126 (2003)
94. **Slosarek M, Kubin M and Pokorny J.** Water as a possible factor of transmission in mycobacterial infections. *Cent Eur J Public Health* 2: 103-105 (1994)
95. **Sniadack DH, Ostroff SM, Karlix MA, Smithwick RW, Schwartz B, Sprauer MA, Silcox VA and Good RC.** A nosocomial pseudo-outbreak of *Mycobacterium xenopi* due to a contaminated potable water supply: lessons in prevention. *Infect Control Hosp Epidemiol* 14: 636-641 (1993)
96. **Steinert M, Birkness K, White E, Fields B and Quinn F.** *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl Environ Microbiol* 64: 2256-2261 (1998)

97. **Tasara T and Stephan R.** Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in milk. *Appl Environ Microbiol* 71: 5957-5968 (2005)
98. **Taylor RH, Falkinham JO, III, Norton CD and LeChevallier MW.** Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol* 66: 1702-1705 (2000)
99. **Timpe A and Runyon EH.** The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. *J Lab Clin Med* 44: 202-209 (1954)
100. **Tobin-D'Angelo MJ, Blass MA, del Rio C, Halvosa JS, Blumberg HM and Horsburgh CR, Jr.** Hospital water as a source of *Mycobacterium avium* complex isolates in respiratory specimens. *J Infect Dis* 189: 98-104 (2004)
101. **Tokars JI, McNeil MM, Tablan OC, Chapin-Robertson K, Patterson JE, Edberg SC and Jarvis WR.** *Mycobacterium gordonae* pseudoinfection associated with a contaminated antimicrobial solution. *J Clin Microbiol* 28: 2765-2769 (1990)
102. **Torvinen E, Suomalainen S, Lehtola MJ, Miettinen IT, Zacheus O, Paulin L, Katila ML and Martikainen PJ.** Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Appl Environ Microbiol* 70: 1973-1981 (2004)
103. **Tsintzou A, Vantarakis A, Pagonopoulou O, Athanassiadou A and Papapetropoulou M.** Environmental mycobacteria in drinking water before and after replacement of the water distribution network. *Water, Air, and Soil Pollut* 120: 273-282 (2000)
104. **Tsitko I, Rahkila R, Priha O, Ali-Vehmas T, Terefework Z, Soini H and Salkinoja-Salonen MS.** Isolation and automated ribotyping of *Mycobacterium lentiflavum* from drinking water distribution system and clinical specimens. *FEMS Microbiol Lett* 256: 236-243 (2006)
105. **Tsukamura M.** The "non-pathogenic" species of mycobacteria - their distribution and ecology in non-living reservoirs. In G. P. Kubica and L. G. Wayne (Hrsg), *The mycobacteria: a sourcebook, Part B.* Marcel Dekker, Inc., New York. p. 1339-13359 (1984)
106. **Vaerewijck MJ, Huys G, Palomino JC, Swings J and Portaels F.** Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev* 29: 911-934 (2005)

107. **Vijayaraghavan R, Chandrashekar R, Sujatha Y and Belagavi CS.** Hospital outbreak of atypical mycobacterial infection of port sites after laparoscopic surgery. *J Hosp Infect* 64: 344-347 (2006)
108. **von Reyn CF, Maslow JN, Barber TW, Falkinham JO, III and Arbeit RD.** Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet* 343: 1137-1141 (1994)
109. **von Reyn CF, Waddell RD, Eaton T, Arbeit RD, Maslow JN, Barber TW, Brindle RJ, Gilks CF, Lumio J, Lahdevirta J and .** Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya. *J Clin Microbiol* 31: 3227-3230 (1993)
110. **Vuorio R, Andersson MA, Rainey FA, Kroppenstedt RM, Kampf P, Busse HJ, Viljanen M and Salkinoja-Salonen M.** 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 Pt 1: 25-35 (1999)
111. **Wallace RJ, Jr., Brown BA and Griffith DE.** Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* 52: 453-490 (1998)
112. **Wallace RJ, Swenson JM, Silcox VA, Good RC, Taschen JA and Stone MS.** Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. *Infect Dis* 5: 657-679 (1983)
113. **Wayne L.** On the identity of *Mycobacterium gordonae* Bojalil and the so-called water scotochromogen. *Int J Syst Bacteriol* 20: 149-153 (1970)
114. **Wellinghausen N, Frost C and Marre R.** Detection of legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. *Appl Environ Microbiol* 67: 3985-3993 (2001)
115. **Wright EP, Collins CH and Yates MD.** *Mycobacterium xenopi* and *Mycobacterium kansasii* in a hospital water supply. *J Hosp Infect* 6: 175-178 (1985)
116. **Yamazaki Y, Danelishvili L, Wu M, Macnab M and Bermudez LE.** *Mycobacterium avium* genes associated with the ability to form a biofilm. *Appl Environ Microbiol* 72: 819-825 (2006)

- 
117. **Zhang Q, Kennon R, Koza MA, Hulten K and Clarridge JE, III.** Pseudoepidemic due to a unique strain of *Mycobacterium szulgai*: genotypic, phenotypic, and epidemiological analysis. J Clin Microbiol 40: 1134-1139 (2002)

## 7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau **Prof. Dr. Nele Wellinghausen** für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und für die große Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen sowie für ihre engagierte Betreuung bedanken. Ganz besonders danke ich ihr für ihre Einführung in die Grundlagen und Methoden klinischer Forschung.

Herrn **Prof. Dr. Steffen Stenger**, dem Ärztlichen Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universität Ulm, danke ich für die weitere Betreuung meiner Arbeit und die stets freundliche Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse und beim Abfassen der Dissertation.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Frau **Beate Wirths** bedanken, die mich in sämtliche Methoden einwies, mir bei der Laborarbeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mit Engelsgeduld half Probleme zu lösen.

Außerdem danke ich Herrn **Prof. Dr. Reinhard Marre**, dem ehemaligen Ärztlichen Direktor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universität Ulm, für die Aufnahme in sein Institut.

Mein Dank gilt auch allen anderen medizinisch-technischen Assistentinnen und Mitarbeitern des Institutes für die freundliche Aufnahme und stete Hilfsbereitschaft.

Besonders bedanken möchte ich mich jedoch bei meiner Frau, die mir in dieser nicht immer leichten Zeit stets beigestanden hat.