

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	- 1 -
2	LITERATUR	- 2 -
2.1	Die Familie der Mycobacteriaceae.....	- 2 -
2.1.1	Taxonomie und Nomenklatur	- 2 -
2.1.2	Die Gattung <i>Mycobacterium</i>	- 2 -
2.1.3	Der <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> -Komplex (MAIC)	- 7 -
2.1.4	Vorkommen, Epidemiologie und Bedeutung der Mykobakterien bei Tier und Mensch	- 8 -
2.1.4.1	Vorkommen und Epidemiologie (insbesondere beim Schwein).....	- 8 -
2.1.4.2	Mykobakterien beim Schwein.....	- 12 -
2.1.4.3	Mykobakterien beim Rind.....	- 15 -
2.1.4.4	Mykobakterien beim Geflügel.....	- 16 -
2.1.4.5	Mykobakterien bei anderen Tierarten	- 17 -
2.1.4.6	Mykobakterien beim Menschen.....	- 18 -
2.1.5	Pathologie und Klinik (Schwein)	- 22 -
2.1.5.1	Pathogenese	- 22 -
2.1.5.2	Pathomorphologie	- 23 -
2.1.5.3	Histopathologie.....	- 24 -
2.1.5.4	Klinische Symptomatik	- 25 -
2.1.6	Fleischhygienerechtliche Bestimmungen	- 27 -
2.1.6.1	Rechtsgrundlage	- 27 -
2.1.6.2	Fleischuntersuchungsstatistik.....	- 29 -
2.2	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	- 31 -
2.2.1	Grundlagen der PCR.....	- 31 -
2.2.2	Nachweis des amplifizierten Produktes	- 32 -
2.2.3	Faktoren, die die PCR beeinflussen	- 32 -
2.2.3.1	Temperatur und Zeit.....	- 32 -
2.2.3.2	Reaktionskomponenten.....	- 33 -
2.2.3.3	Primer.....	- 34 -
2.2.3.4	Target-DNA	- 34 -
2.2.3.5	Kontaminationen	- 35 -
2.2.3.6	Inhibitoren.....	- 36 -
2.3	Diagnostik von Mykobakterien.....	- 39 -
2.3.1	Konventionelle Diagnostik von Mykobakterien	- 40 -
2.3.1.1	Probenentnahme	- 40 -
2.3.1.2	Mikroskopie	- 40 -
2.3.1.3	Kulturelle Anzüchtung.....	- 41 -
2.3.1.4	Differenzierung von Mykobakterien	- 44 -
2.3.2	Molekularbiologische Diagnostik von Mykobakterien	- 46 -
2.3.2.1	Genetische Grundlagen des MAIC.....	- 46 -
2.3.2.2	Molekularbiologisch bedeutsame Zielsequenzen	- 47 -
2.3.2.3	Molekularbiologische Nachweismethoden.....	- 57 -
2.4	Fragestellungen dieser Arbeit	- 65 -

3	MATERIAL UND METHODEN	- 66 -
3.1	Arbeitsmaterialien	- 66 -
3.1.1	Verwendete Mikroorganismen	- 66 -
3.1.2	Nährmedien zur Stammhaltung und Kultivierung	- 66 -
3.1.3	Reagenzien zur Isolierung der DNA und für die PCR	- 67 -
3.1.4	Arbeitsgeräte und Labormaterial	- 69 -
3.2	Untersuchungsablauf	- 70 -
3.2.1	Untersuchungsschema	- 70 -
3.2.1.1	Vorversuch: Überprüfung der in der Literatur beschriebenen PCR-Protokolle	- 70 -
3.2.1.2	Hauptversuch (Teil A): Vorgehen zur Ermittlung der Nachweisgrenzen bei Verwendung von Reinkulturen	- 71 -
3.2.1.3	Hauptversuch (Teil B): Vorgehen zur Ermittlung der Nachweisgrenzen bei Vorhandensein von Lymphknotenmatrix	- 72 -
3.2.2	Methoden der DNA-Freisetzung	- 75 -
3.2.2.1	Kochen	- 75 -
3.2.2.2	Chloroform/ Phenol-Extraktion	- 76 -
3.2.2.3	Ultraschallbehandlung mit anschließendem Kochen	- 78 -
3.2.2.4	High Pure PCR Template Kit	- 78 -
3.2.3	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	- 80 -
3.2.3.1	Durchführung der PCR (allgemein)	- 80 -
3.2.3.2	Primerabhängige PCR-Bedingungen	- 81 -
3.2.3.3	Gelelektrophorese	- 84 -
4	ERGEBNISSE	- 86 -
4.1	Keimzahlbestimmung der verwendeten Mykobakterien-Bouillonkulturen	- 86 -
4.2	Vorversuch: Mögliche Primer-/ Stammkombinationen	- 89 -
4.3	Hauptversuch (Teil A): Ergebnisse bei der Verwendung von Reinkulturen	- 90 -
4.4	Hauptversuch (Teil B): Ergebnisse bei Vorhandensein von Lymphknotenmatrix	- 98 -
4.5	Berechnung der Nachweisgrenzen	- 105 -
5	DISKUSSION	- 114 -
5.1	Fragestellung/ Versuchsziel	- 114 -
5.2	Versuchsaufbau	- 115 -
5.3	Eingesetzte Stämme	- 116 -
5.4	Eingesetzte Zellaufschlussverfahren	- 118 -
5.5	Bewertung der Primer	- 121 -
5.6	Bewertung der erzielten Nachweisraten	- 124 -
5.7	Folgerungen/ Konsequenzen	- 125 -
6	ZUSAMMENFASSUNG	- 126 -
7	SUMMARY	- 128 -
8	LITERATURVERZEICHNIS	- 130 -
9	ANHANG	- 160 -
10	DANKSAGUNG	- 163 -