

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.,
angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und
Lebensmittelsicherheit
in Oberschleißheim
(Dr. Stefan Hörmansdorfer)

**Validierung molekularbiologischer und
immunologischer Nachweisverfahren für die
Tuberkulose bei Rindern und
Tuberkulosemonitoring beim Rotwild**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Eva Maria Gerstmair, geb. Schmidbauer
aus Gräfelfing

München 2011

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Straubinger
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Förster

Tag der Promotion:

30. Juli 2011

Für Toni

The greatest trick the Devil ever pulled
was convincing the world
he didn't exist.

Zitat aus dem Film „The Usual Suspects“

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Das Genus <i>Mycobacterium</i>	3
1.1	Taxonomie und Merkmale	3
1.2	Vorkommen und Bedeutung	4
2	Der <i>Mycobacterium-tuberculosis</i>-Komplex	4
2.1	Begriffsbestimmung	4
2.2	Bedeutung als Krankheitserreger beim Menschen	5
2.3	Bedeutung als Krankheitserreger bei Tieren	5
3	Rindertuberkulose	6
3.1	<i>Mycobacterium bovis</i> und <i>Mycobacterium caprae</i> als Erreger der Rindertuberkulose	6
3.2	Verbreitung der Rindertuberkulose	6
3.3	Epidemiologie und zoonotisches Potential	8
3.4	Bekämpfung der Rindertuberkulose	9
4	Tuberkulose bei Wildtieren	10
4.1	Rindertuberkulose bei Dachsen in Großbritannien	12
4.2	Rindertuberkulose bei Wildschweinen in Europa	13
4.3	Rindertuberkulose beim Damwild in Europa	14
4.4	Rindertuberkulose beim Rotwild	14
4.4.1	Prävalenz der Rindertuberkulose beim Rotwild in Europa	15
4.4.2	Rindertuberkulose beim Rotwild im Grenzgebiet Bayern- Österreich	16
4.5	Pathologische Besonderheiten der Rindertuberkulose bei Wildtieren	17
5	Diagnostik der Rindertuberkulose	17
5.1	Diagnostik am lebenden Tier	17
5.1.1	Klinische Diagnose	17
5.1.2	Intrakutantest (Tuberkulinprobe)	18
5.1.3	BOVIGAM [®] -Test (Nachweis von Interferon- γ)	19
5.1.3.1	Prinzip des BOVIGAM [®] -Tests	19

5.1.3.2	Möglichkeiten und Grenzen des BOVIGAM®-Tests	20
5.1.4	Serologischer Nachweis.....	23
5.2	Diagnostik aus Gewebeproben des toten Tieres	24
5.2.1	Pathologisch-anatomische Diagnostik	24
5.2.2	Mikrobiologische Diagnostik.....	24
5.2.2.1	Mikroskopie.....	24
5.2.2.2	Kultureller Nachweis	24
5.2.3	Molekularbiologischer Nachweis	25
5.2.3.1	Molekularbiologischer Nachweis des MTC	25
5.2.3.2	Differenzierung der Mykobakterienspezies des <i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplexes mit molekularbiologischen Methoden.....	26
5.2.4	Molekularbiologische Methoden und Epidemiologie	26
III	MATERIAL UND METHODEN	29
1	Probenmaterial	29
1.1	Gewebe- und Blutproben von Rindern	29
1.1.1	Gewebeproben von Rindern	29
1.1.2	Blutproben von Rindern	30
1.1.3	Kombinierte Blut- und Gewebeproben von Rindern.....	31
1.2	Gewebeproben vom Rotwild	32
2	Material und Geräte.....	33
2.1	Material für die Probennahme	33
2.2	Material und Geräte für die Laboruntersuchungen.....	34
2.2.1	Puffer, Lösungen, Wasser.....	34
2.2.2	Nährböden und Reagenzien	34
2.2.3	Primer und Sonden	35
2.2.4	Verbrauchsmaterial	36
2.2.5	Geräte	37
2.2.6	Labor-Kits.....	38
2.2.7	Software	38
3	Untersuchungsmethoden.....	38
3.1	Pathologisch-anatomische Untersuchung und Probennahme beim Rotwild	38

3.2	Molekularbiologischer Nachweis von Erregern des <i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplexes direkt aus Gewebeproben	39
3.2.1	Real-time PCR zum Nachweis von DNA von Erregern des <i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplexes in Gewebe.....	39
3.2.1.1	Lyse des Gewebes und DNA-Extraktion	39
3.2.1.2	Real-time PCR	41
3.2.1.2.1	Real-time PCR MTC-IS1081+IC (duplex)-Protokoll	42
3.2.1.2.2	Real-time PCR MTC-HELI+IC (duplex)-Protokoll.....	43
3.2.1.2.3	Cycler-Programm für die Real-time PCR	43
3.2.2	GenoType [®] Mycobacteria Direct von HAIN Lifescience.....	43
3.3	Mikroskopischer Nachweis von Mykobakterien.....	44
3.4	Kultureller Nachweis von Mykobakterien aus Gewebeproben	44
3.5	Molekularbiologische Differenzierung von Mykobakterien aus der Kultur.....	45
3.6	Molekularepidemiologische Untersuchungen.....	46
3.7	Tenazität von <i>Mycobacterium caprae</i> in salzhaltigem Substrat.....	46
3.7.1	Vorbereitung	46
3.7.2	Versuchsdurchführung	47
3.8	Untersuchung von Blutproben mit dem BOVIGAM [®] -Test (Nachweis von Interferon- γ)	48
3.9	Durchführung des BOVIGAM [®] ELISA und Auswertung des BOVIGAM [®] -Tests.....	49
4	Statistik	50
4.1	Sensitivität.....	51
4.2	Spezifität	51
4.3	Diagnostic Odds Ratio	51
4.4	Tests für Lagealternativen.....	51
4.5	Analyse von Häufigkeiten.....	52
IV	ERGEBNISSE	53
1	Vergleich von verschiedenen Methoden der Gewebe- und DNA-Aufbereitung	53

2	Vergleich verschiedener Nachweisverfahren bei der Untersuchung von Gewebeproben.....	55
3	Vermehrungsfähigkeit von <i>Mycobacterium caprae</i> nach Inkubation mit Salz und/oder Speichel	63
4	Vergleich der Ergebnisse des Interferon-γ-Nachweises im BOVIGAM[®]-Test mit denen anderer Diagnosemethoden ..	67
4.1	Ergebnisse des BOVIGAM [®] -Tests	67
4.2	Reproduzierbarkeit der BOVIGAM [®] -Ergebnisse aus Plasma .	67
4.3	Validität des BOVIGAM [®] -Tests	69
4.4	Einfluss der Simultanuntersuchung auf den BOVIGAM [®] -Test	70
4.5	Ergebnisse des BOVIGAM [®] -Tests nach Stimulation der Blutproben in Röhrchen des QuantiFERON [®] -TB Gold In-Tube-Tests	76
5	Vorkommen von <i>Mycobacterium caprae</i> beim Rotwild in den Landkreisen Oberallgäu, Ostallgäu und Bad Tölz	78
5.1	Altersstruktur und Herkunft der beprobten Rothirsche	78
5.2	Zusammensetzung der Einzelorganproben der Rothirsche	78
5.3	Repräsentativität der Stichprobe	79
5.4	Nachweis von Mykobakterien beim Rotwild	81
5.5	Verteilung der nachgewiesenen <i>Mycobacterium caprae</i> auf die Organe der Rothirsche	83
5.6	Regionale Zuordnung des <i>Mycobacterium-caprae</i> -positiven Rotwilds sowie der Mykobakterien-Isolate	84
5.7	Prävalenz von <i>Mycobacterium caprae</i> beim Rotwild in den Landkreisen und gesamt.....	85
V	DISKUSSION.....	87
1	Validierung des BOVIGAM[®]-Tests	87
1.1	Bemerkungen zur Statistik	87
1.2	Validität des BOVIGAM [®] -Tests im Vergleich zur und in Kombination mit der Simultanuntersuchung.....	88
1.3	BOVIGAM [®] -Test bei Blutentnahme unmittelbar vor dem Setzen und beim Ablesen des Simultantests	91
1.4	Vor- und Nachteile des BOVIGAM [®] -Tests	93

1.5	QuantiFERON®-TB Gold In-Tube Methode zur Stimulierung des Vollbluts.....	94
2	Zuverlässigkeit molekularbiologischer Methoden bei der Diagnostik der Rindertuberkulose.....	95
2.1	Auswertung der verschiedenen Methoden zur Gewebelyse und der DNA-Anreicherung.....	95
2.2	Auswertung der Diagnosemethoden beim toten Tier.....	96
3	Bedeutung des Vorkommens von <i>Mycobacterium caprae</i> beim bayerischen Rotwild.....	99
3.1	Repräsentativität der beprobten Rothirsche.....	99
3.2	<i>Mycobacterium-caprae</i> -positives Rotwild.....	99
3.3	Prävalenz der Rindertuberkulose beim Rotwild	100
3.4	Auswertung der epidemiologischen Ergebnisse der Untersuchung des <i>Mycobacterium-caprae</i> -positiven Rotwilds	101
3.5	Überlegungen zur Ausbreitung von <i>Mycobacterium caprae</i> im Allgäu	103
3.6	Tenazität von <i>Mycobacterium caprae</i> in Salzlecksteinmatrix	104
VI	ZUSAMMENFASSUNG.....	107
VII	SUMMARY	109
VIII	LITERATURVERZEICHNIS.....	111
IX	ANHANG	125
1	Tabellenverzeichnis.....	125
2	Abbildungsverzeichnis.....	129
3	Begleitschein der Gewebeproben vom Rotwild	131
X	DANKSAGUNG	133

Abkürzungsverzeichnis

α	Signifikanzniveau
Abb.	Abbildung
ACT	β -Actin
AE-Puffer	Probenpuffer von Qiagen
AGES	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Aqua dest.	aqua destillata
ASL-Puffer	Probenpuffer von Qiagen
BCG	bacille Calmette-Guérin
BHQ	black hole quencher
C	Kohlenstoffatom
CD	clusters of differentiation
CFP-10	10 kDa culture filtrate protein
CT	cycle threshold
DNA	deoxyribonucleic acid
DOR	diagnostic odds ratio
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESAT-6	6 kDa early secretory antigenic target
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
F	forward
FAM	6-carboxy-Fluorescein
frag	fraglich
GT MD	GenoType [®] Mycobacteria Direct
gyrB-Gen	Gen, das die Untereinheit B der DNA-Gyrase kodiert
HELI	hypothetische Helikase
HIV	human immunodeficiency virus
HS	Hemmstoff
IC	internal control
IS	Insertionselement
ITS	internal transcribed spacer
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LIMS	Labor-Informations- und Management-System

LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
M	Methode
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MBP	<i>Mycobacterium bovis</i> -Protein
MGIT	mycobacteria growth indicator tube
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Mi.	Mikroskopie
min	Minute
MIRU	mycobacterial interspersed repetitive unit
MTC	<i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplex
n	Anzahl
n.a.	nicht auswertbar
neg	negativ
NIL	nihil (Negativkontrolle)
OD	optical density
OIE	Office International des Epizooties (World Organisation for Animal Health)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit / Signifikanzwert
P	Wahrscheinlichkeit
PACT	Selektivsupplement aus Polymyxin B, Amphotericin B, Carbenicillin und Trimethoprim
PBS	phosphate buffered saline solution
PCR	polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
pos	positiv
PPD	purified protein derivate(s)
PPD-A	PPD von Erregern aviärer Tuberkulose
PPD-B	PPD von Erregern boviner Tuberkulose
PWM	Pokeweed mitogen
R	reverse
RD	region of difference
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
S	Svedberg
ssp.	Subspezies
ST	Simultantest
StMUG	Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit
Tab.	Tabelle
TB	Tuberkulose
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
T _H 1	CD4 ⁺ T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TSN	Tierseuchennachrichten

U	Umdrehung
VNTR	variable number of tandem repeats
YAK	Yakima yellow

I EINLEITUNG

„Tollwut? Ach nein, Tuberkulose?! Was ist das?“ oder im besten Fall noch „Tuberkulose ... war das nicht früher eine Lungenkrankheit?“ – übliche Reaktionen auf meine Antwort auf die Frage, womit ich mich in meiner Arbeit beschäftige. Es scheint, dass die Tuberkulose und erst recht die Rindertuberkulose aus dem Bewusstsein der meisten Menschen verschwunden ist. Die Tierseuche und Zoonose gilt in Deutschland bereits seit fast einem halben Jahrhundert als getilgt, die regelmäßigen flächendeckenden Hauttests der Rinder mit Tuberkulin wurden 1997 abgeschafft.

In den letzten Jahren wurden jedoch in einigen Bundesländern wie Bayern und Niedersachsen wieder verstärkt Ausbrüche von Rindertuberkulose festgestellt. In Bayern war besonders das Allgäu betroffen, hier wurde vor allem *Mycobacterium caprae* nachgewiesen.

Um sich der Herausforderung eines möglichen Wiederaufkeimens der Rindertuberkulose stellen zu können, sind gute Diagnostikverfahren eine grundlegende Voraussetzung. In der vorliegenden Arbeit werden deshalb klassische und innovative Diagnosemethoden verglichen und bewertet.

Für die Diagnostik am lebenden Tier steht dabei die Validierung des BOVIGAM®-Tests, eines immunologischen Testverfahrens, im Zentrum. Für die postmortale Diagnostik der Rindertuberkulose soll vor allem die Zuverlässigkeit molekularbiologischer Methoden geprüft werden.

Darüber hinaus liefert diese Arbeit einen Beitrag zur Epidemiologie der Rindertuberkulose in Bayern, speziell zur Rolle von *Mycobacterium caprae* als Tuberkulose-Erreger mit Vorkommen beim Rotwild.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Das Genus *Mycobacterium*

1896 schlugen LEHMANN und NEUMANN vor, den von Robert KOCH 1882 beschriebenen Tuberkelbacillus in *Mycobacterium tuberculosis* umzubenennen und zusammen mit *Mycobacterium leprae* zu einem neuen Genus *Mycobacterium* in der Familie Mycobacteriaceae zusammenzufassen.

1.1 Taxonomie und Merkmale

Da die damals festgelegten Charakteristika Stäbchenform, Unbeweglichkeit sowie Säure- und Alkoholfestigkeit nicht ausreichten, um das Genus *Mycobacterium* von nah verwandten Genera wie *Nocardia*, *Rhodococcus* und *Corynebacterium* abzugrenzen, wurden zusätzliche Kriterien eingeführt. Die Minimalbedingungen, die ein Bakterium heute erfüllen muss, um dem Genus *Mycobacterium* zugeordnet zu werden, sind (SHINNICK, 1994):

- Säure- und Alkoholfestigkeit
- das Vorkommen von Mycolsäuren, die 60 bis 90 Kohlenstoffatome enthalten und durch Pyrolyse in C22- bis C26-Fettsäuremethylester gespalten werden können und
- ein Gehalt von Guanin und Cytosin von 61 bis 71 mol % in der DNA

Die Spezies des Genus *Mycobacterium* können grob eingeteilt werden in:

- Mykobakterienspezies des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes
- *Mycobacterium leprae*, humanpathogener Erreger der Lepra, bisher nicht in vitro kultivierbar
- Mykobakterienspezies, die nicht zu den vorgenannten Spezies gehören: diese werden als „mycobacteria other than tubercle bacilli“ (MOTT) bzw. atypische oder nicht tuberkulöse Mykobakterien (NTM) bezeichnet.

RUNYON (1959) unterteilte diese Mykobakterienspezies in folgende vier Gruppen:

- Gruppe 1: langsam wachsende photochrome Spezies
- Gruppe 2: langsam wachsende skotochrome Spezies
- Gruppe 3: langsam wachsende pigmentfreie Spezies
- Gruppe 4: schnell wachsende Spezies

1.2 Vorkommen und Bedeutung

Die meisten der gegenwärtig mehr als 150 bekannten Mykobakterienspezies sind Saprophyten, die ubiquitär in der Umwelt vorkommen und in der Regel nur unter bestimmten Bedingungen als Infektionserreger auftreten (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2009a). Obligat pathogene Mykobakterien wie die Mitglieder des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes, die rein parasitär leben und sich in der Umwelt nicht vermehren, sind die Ausnahme im Genus *Mycobacterium* (*M.*).

2 Der *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex

2.1 Begriffsbestimmung

Unter dem Begriff *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTC) werden die klassischen Tuberkulose-Erreger bei Säugetieren zusammengefasst (BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002):

- *M. tuberculosis*
- *M. bovis*
- *M. bovis BCG*
- *M. africanum*
- *M. canettii*
- *M. caprae*
- *M. microti*

COUSINS und Mitarbeiter schlugen 2003 vor, *M. pinnipedii* als Spezies in den MTC aufzunehmen.

2.2 Bedeutung als Krankheitserreger beim Menschen

Die Tuberkulose ist weltweit verbreitet und gehört neben HIV/AIDS und Malaria zu den weltweit häufigsten Infektionskrankheiten. Zirka zwei Milliarden Menschen weltweit sollen mit Tuberkulose-Erregern infiziert sein, wobei ca. 5 bis 10 % der infizierten immunkompetenten Erwachsenen an Tuberkulose erkranken. Bei Infizierten mit einer eingeschränkten Immunabwehr (z. B. bei HIV-Positiven) liegt das Erkrankungsrisiko deutlich höher.

Das zunehmende Auftreten resistenter Tuberkulose-Erreger – besonders in Osteuropa und den Ländern der ehemaligen Sowjetunion – stellt ein ernst zu nehmendes Problem dar (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2009a).

In Deutschland lag im Jahr 2008 die Inzidenz bei 5,5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner, dabei wurde in 11,6 % der Fälle ein resistenter Erreger festgestellt, in 1,5 % der Fälle sogar ein multiresistenter (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2010).

2.3 Bedeutung als Krankheitserreger bei Tieren

Neben *M. microti*, *M. pinipedi*, *M. bovis* und *M. caprae* wurde auch *M. tuberculosis* mit seinen regionalen Formen bei Tieren nachgewiesen (TESINK, 1970; BERG et al., 2009). Die größte Anpassungsfähigkeit an verschiedene Wirte scheinen die Erreger der Rindertuberkulose zu zeigen. Sie kommen als Krankheitserreger bei einer Vielzahl von Tierarten sowie beim Menschen vor (O'REILLY & DABORN, 1995).

Das Überleben der meisten Arten scheint durch Infektionen mit den oben genannten Tuberkulose-Erregern nicht bedroht zu sein, da die Krankheit meist erst zusammen mit anderen Faktoren ausbricht, die das Immunsystem negativ beeinflussen, wie Auszehrung, hohes Alter oder Co-Infektionen. Ausnahmen davon stellen Tierarten dar, die bereits vom Aussterben bedroht sind und auf engem Raum in entsprechenden Schutzgebieten leben wie der Iberische Luchs (PENA et al., 2006; ROMERO et al., 2008).

Die größte Bedeutung der Tuberkulose bei Tieren liegt heute bei Nutztieren wie Rindern in den wirtschaftlichen Schäden durch

Handelsbeschränkungen, Seuchenbekämpfung und -prophylaxe sowie im zoonotischen Potential. Darüber hinaus sind in letzter Zeit einige Wildtierarten in den Verdacht geraten, Tuberkulose auf Nutztiere zu übertragen (Review durch GAVIN und Mitarbeiter, 2009).

3 Rindertuberkulose

Das Tierseuchenrecht versteht unter Rindertuberkulose die Infektion von Boviden mit *M. bovis* oder *M. caprae*. Es handelt sich dabei um eine anzeigepflichtige Tierseuche (Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen, Stand 18.12.2009).

3.1 *Mycobacterium bovis* und *Mycobacterium caprae* als Erreger der Rindertuberkulose

Seit 1970 bezeichnet ***M. bovis*** das *Mycobacterium tuberculosis* Typus *bovinus*, das seit dem Anfang des 20. Jahrhunderts vom Erreger der Humantuberkulose *Mycobacterium tuberculosis* Typus *humanus* differenziert wurde (KARLSON & LESSEL, 1970).

M. caprae wurde 1999 erstmals nachgewiesen und wird seit 2003 als eigene Spezies des MTC geführt – nicht zuletzt wegen Untersuchungen zur Phylogenese des MTC mit dem Ergebnis, dass *M. caprae* phylogenetisch älter sein könnte als *M. bovis* (BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002). Von 1999 bis 2003 wurde *M. caprae* nacheinander als Subspezies von *M. tuberculosis* (ARANAZ et al., 1999) und *M. bovis* (NIEMANN et al., 2002) geführt.

M. bovis und *M. caprae* sind in Deutschland zu gleichen Teilen für die Rindertuberkulose verantwortlich (FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2009), wobei im Süden Deutschlands mehr Fälle durch *M. caprae* als durch *M. bovis* hervorgerufen werden (ARANAZ et al., 2003).

3.2 Verbreitung der Rindertuberkulose

In den Jahren 2004 bis 2009 wurden in Bayern 55 % aller Ausbrüche von Rindertuberkulose in der Bundesrepublik Deutschland verzeichnet (43/78), wobei rund 42 % der bayerischen Ausbrüche im Jahr 2009 zu verzeichnen waren (siehe Tab. II.1).

Mit Ausnahme eines Jahres lag dabei der Anteil der bei der Fleischuntersuchung am Schlachthof entdeckten Ausbrüche bei höchstens der Hälfte der Gesamtzahl (siehe Tab. II.2).

Da im Zeitraum von Anfang 1997 (seit der Abschaffung der regelmäßigen flächendeckenden Tuberkulinisierung der Rinder) bis September 2007 von 31 Ausbrüchen in Bayern 20 in Schwaben zu verzeichnen waren, wurde von Oktober 2007 bis März 2009 eine flächendeckende Tuberkulinisierung von rund 187.000 Rindern – älter als 3 Jahre – in rund 7.100 Betrieben im Allgäu durchgeführt. Insgesamt wurde für 308 Rinder in 23 Betrieben Entschädigung geleistet (GÖTZ, 2010).

Tab. II.1: Ausbrüche von Rindertuberkulose in Bayern und Deutschland von 2004 bis 2009 (Datenquelle: TSN)

	Rindertuberkulose in Bayern (Bestände)	Rindertuberkulose in Deutschland (Bestände)
2004	5	10
2005	3	5
2006	2	5
2007	7	12
2008	8	23
2009	18	23

Tab. II.2: Anteil der Ausbrüche von Rindertuberkulose in Deutschland, die bei der Fleischuntersuchung entdeckt wurden (Datenquelle: TSN)

	Rindertuberkuloseausbrüche in Deutschland (Bestände)	davon entdeckt bei der Fleischuntersuchung
2004	10	8
2005	5	3
2006	5	3
2007	12	3
2008	23	3
2009	23	8

3.3 Epidemiologie und zoonotisches Potential

Erkrankte Rinder können Erreger ausscheiden, nachdem diese in kanalikuläre Systeme eingebrochen sind. In der Regel ist dies erst im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf der Fall. Eine Erregerausscheidung ist möglich über die Atemluft (bei Lungentuberkulose), mit dem Kot (abgeschluckte Keime oder bei Darmtuberkulose), über den Harn- und Geschlechtsapparat (besonders massiv bei Uterustuberkulose) und mit der Milch (ROLLE & MAYR, 1993).

Die ausgeschiedenen Erreger haben eine hohe Tenazität. In Versuchen wurde nachgewiesen, dass *M. bovis* je nach Futtermittel und Lagertemperatur eine minimale Überlebenszeit von sieben Tagen im Heu und bis zu 112 Tagen in Äpfeln, Getreide und Kartoffeln hatte (PALMER & WHIPPLE, 2006). Je niedriger dabei die Temperatur war, desto länger waren die Mykobakterien infektiös. Weitere Einflüsse wie Feuchtigkeit oder UV-Licht wurden in diesem Versuch nicht berücksichtigt. DUFFIELD und YOUNG (1985) führten Versuche mit experimentell kontaminierter Erde durch: In feuchtem und trockenem Boden in 80 % Schatten konnte *M. bovis* für mindestens vier Wochen überleben, während bei Sonnenschein nach vier Wochen keine lebenden Mykobakterien mehr nachgewiesen werden konnten.

Die Übertragung auf Menschen und Tiere erfolgt über den Atmungstrakt (durch Tröpfcheninfektion oder erregerhaltigen Staub) oder durch orale Aufnahme – vor allem mit unzureichend erhitzter Milch. Kontaminiertes Fleisch spielt in den EU-Mitgliedsländern seit Mitte der 90er Jahre keine Rolle mehr als Überträger von Tuberkuloseinfektionen auf den Menschen (EFSA, 2003).

Der weltweite Anteil boviner Tuberkulosefälle beim Menschen wird auf zehn Prozent geschätzt (EU-VETERINÄRWOCHE, 2009), der genaue Anteil von Rindertuberkulose-Erregern an den Humantuberkulosefällen ist nur schwer festzustellen. In den meisten Entwicklungsländern ist aufgrund limitierter Labormöglichkeiten die Speziesdiagnostik nur eingeschränkt möglich, wobei jedoch besonders in Gebieten mit pastoraler Tradition der Anteil an der Rindertuberkulose relativ hoch sein dürfte (JOCKS & ERSCHIG, 2009). Aber auch in den Industrienationen ist der Nachweis

von Tuberkulose-Erregern auf Speziesebene nicht immer selbstverständlich. Ein Audit in England und Wales ergab, dass ein Fünftel der Laboratorien keine Nährmedien mit Pyruvat einsetzt oder die Bebrütungszeit von mindestens acht Wochen nicht einhält (DROBNIEWSKI et al., 2003).

In Deutschland waren von 3.209 gemeldeten, humanen Tuberkulosefällen im Jahr 2007 lediglich 43 Fälle (1,3 %) auf eine Infektion mit *M. bovis* zurückzuführen (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2009b). Da geschätzt wird, dass es sich heute bei 75 % der Tuberkuloseerkrankungen beim Menschen in Deutschland um Reaktivierungen alter Infektionen handelt (HOF & DÖRRIES, 2005), ist das Risiko einer Erkrankung durch eine Neuinfektion mit Rindertuberkulose beim Menschen als gering einzustufen.

KUBICA und Mitarbeiter (2003) gingen der Prävalenz von *M. caprae* bei Fällen von boviner Tuberkulose bei Menschen in Deutschland im Zeitraum von 1999 bis 2001 nach. Von 176 Isolaten erwiesen sich 55 (31 %) als *M. caprae*. Es war ein deutliches Nord-Süd-Gefälle erkennbar: über 60 % der Tuberkulosefälle im Süden Deutschlands erwiesen sich als *M.-caprae*-Infektionen, während es in Norddeutschland weniger als 20 % waren. Es handelte sich überwiegend um die Reaktivierung latenter Infektionen, so dass sich die Patienten vermutlich schon in den 1950er Jahren mit *M. caprae* angesteckt hatten.

Die Übertragung der Rindertuberkulose von Mensch zu Mensch ist beschrieben (EVANS et al., 2007), außerdem können erkrankte Menschen auch Rinder infizieren, es handelt sich also um eine Anthroponose (TESINK, 1970).

3.4 Bekämpfung der Rindertuberkulose

Am 17. Dezember 1996 wurde Deutschland von der EU der Status „amtlich frei von Rindertuberkulose“ zuerkannt (Entscheidung der Kommission 97/76/EG). Aufgrund dieser Entscheidung wurden die regelmäßigen flächendeckenden Intrakutantests bei Rindern mit der Änderung der Tuberkuloseverordnung vom 13. März 1997 eingestellt.

Nachdem in den letzten Jahren vermehrt Fälle von Tuberkulose bei Rindern aufgetreten sind, hat das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz vorgeschlagen, die flächendeckenden Intrakutantests bei Rindern wieder einzuführen. Dieser Vorschlag wurde vom Bundesrat am 12. Juni 2009 abgelehnt. Stattdessen wurde mit der Änderung der Tuberkuloseverordnung vom 17. Juni 2009 das Verfahren zur Erkennung der Rindertuberkulose um den molekularbiologischen Nachweis im Gewebe erweitert und großes Gewicht auf die Kontrolle im Rahmen der Fleischuntersuchung gelegt.

4 Tuberkulose bei Wildtieren

In den letzten Jahren konnten bei verschiedenen Wildtierarten weltweit Erreger der Rindertuberkulose isoliert und auch Zusammenhänge mit Infektionen von Nutztieren gezeigt werden. RODRÍGUEZ und Mitarbeiter (2010) konnten nach Auswertung molekularer Diagnostikergebnisse von 6.215 *M.-bovis*-Stämmen, die zwischen 1992 und 2007 aus verschiedenen Wirten in Spanien isoliert wurden, zeigen, dass Spoligotyping (*Spacer Oligonucleotide Typing*, DNA-Fingerprinting basierend auf einem DNA-Polymorphismus in der Direct repeat-Region des mykobakteriellen Genoms) als standardisierte Technik für epidemiologische Untersuchungen nützlich ist und dass 12 von 15 der häufigsten Spoligotypen bei Rindern in Spanien auch bei mindestens einer Wildpaarhuferart wie Rotwild, Damwild und Gämse vorkommen. DUARTE und Mitarbeiter (2008) konnten mittels Spoligotyping und MIRU-VNTR Typisierung zeigen, dass Rinder und Rotwild einer Region in Portugal mit dem gleichen *M.-bovis*-Stamm infiziert waren. Bei der MIRU- (mycobacterial interspersed repetitive unit) bzw. VNTR- (variable number of tandem repeats) Typisierung handelt es sich um eine Typisierung anhand von kurzen repetitiven Sequenzen, die über das Genom verteilt an verschiedenen Loci vorkommen.

Systematische Studien, um die Prävalenz von Tuberkulose bei Wildtieren sinnvoll abschätzen zu können, wurden jedoch nur wenige durchgeführt. Darüber hinaus bedeutet das Vorhandensein von Tuberkuloseinfektionen in einer Wildtierpopulation nicht zwingend ein signifikantes

Wildtierreservoir. So spielen verwilderte Hausschweine und asiatische Hauswasserbüffel in Australien keine Rolle in der Epidemiologie der Tuberkulose, obwohl die Populationen regional eine Prävalenz von bis zu 40 % bzw. über 25 % aufweisen (CORNER, 2006).

Selbst wenn bestimmte Wildtierarten im Verdacht stehen, für die Übertragung der Rindertuberkulose bedeutsam zu sein, kann oft eine dritte Tierart nicht ausgeschlossen werden, da der Übertragungsweg oft unklar ist, wie beim Weißwedelhirsch und bei Rindern in Michigan (CORNER, 2006). Womöglich müssen bei der Suche nach den Übertragungswegen auch bisher unbeachtete Faktoren berücksichtigt werden. So wiesen WHITE und Mitarbeiter (2010) *M. avium* ssp. *paratuberculosis* aus freilebenden Amöben eines Feldes nach, das weder als Weide für Rinder verwendet noch mit Rinderkot gedüngt worden war, während EISENBERG und Mitarbeiter (2010) die Verbreitung von *M. avium* ssp. *paratuberculosis* mit dem Stallstaub auch außerhalb des Stalls beobachten konnten.

Einem Review von GAVIN und Mitarbeitern (2009) ist zu entnehmen, dass die einzelnen Studien zum Vorkommen von Tuberkulose bei Wildtieren nicht standardisiert und deshalb nur sehr schwer vergleichbar sind: Während bei Untersuchungen an toten Tieren manchmal nur zufällig tot aufgefundene Wildtiere beprobt wurden, waren es in anderen Studien gejagte Tiere oder in Fallen gefangene. Davon wurden wiederum entweder alle Tiere untersucht oder nur die anatomisch-pathologisch verdächtigen. Darüber hinaus variieren die Untersuchungsmethoden beim toten Tier von pathologisch-histologischer Untersuchung oder Immunhistochemie über PCR oder Kultur bis zu einer Kombination von verschiedenen Methoden. Bei lebenden Tieren werden die serologische Untersuchung oder der Nachweis von Interferon- γ verwendet, der Tuberkulin-Hauttest spielt bei Wildtieren keine Rolle. In manchen Studien an lebenden Tieren (zum Beispiel bei Dachsen) wird auch Probenmaterial wie Faeces oder Urin verwendet.

In Europa wurden lediglich in einigen Ländern Dachse, Wildschweine und Hirsche soweit untersucht, dass eine Schätzung der Prävalenz vorgenommen werden kann (Review durch GAVIN et al., 2009). Dabei

wurde nur bei Dachsen in Großbritannien ein Monitoring über einen längeren Zeitraum durchgeführt.

4.1 Rindertuberkulose bei Dachsen in Großbritannien

In Großbritannien ist die Eradikation der Tuberkulose bei Rindern nicht nur bis heute nicht gelungen, die Inzidenz steigt sogar kontinuierlich an (HOUSE OF COMMONS, 2008). Endemische Tuberkuloseinfektionen in Dachspopulationen sollen dabei eine Rolle spielen. Im Rahmen des von 1998 bis 2005 in Großbritannien durchgeführten „Randomized Badger Culling Trial“ wurden von 8.052 untersuchten Dachsen 1.166 (14 %) als tuberkulosepositiv befundet (JENKINS et al., 2008). Da 78 % dieser tuberkulosepositiven Dachse Läsionen im Kopf-, Brust- oder Lungenbereich zeigten, geht man von Infektionen über den Respirationstrakt aus. Es wurde per DNA-Fingerprinting nachgewiesen, dass *M.-bovis*-Isolate aus Dachsen, Rotwild und Rindern jeweils regional ähnlichen Typen angehören, so dass auf eine Übertragung zwischen den Spezies geschlossen werden kann (COSTELLO et al., 1999). Immer noch unbekannt ist die genaue Art und Weise der Übertragung. Empfohlen wird, Rinder von Dachslatrinen (DELAHAY et al., 2007) und Dachse von Rinderfutter fernzuhalten (DEFRA, 2007), zum Beispiel durch Elektrozäune, erhöhte Futtertröge und dachssichere Türen.

Wiederholte Versuche in den letzten 30 Jahren, die Tuberkulose bei Rindern durch eine Dezimierung der Dachse einzudämmen, schlugen fehl. DONELLY und Mitarbeiter (2007) stellten fest, dass das Ausmerzen der Dachse in einem Gebiet zwar zu einem Rückgang der Tuberkulosefälle bei den Rindern in diesem Gebiet führte, in den umliegenden Gebieten die Tuberkulosefälle bei Rindern jedoch zunahmen, so dass sich die Gesamtzahl der Tuberkulosefälle bei Rindern nicht änderte. Dass durch das Dezimieren der Dachse die Ausbreitung der Rindertuberkulose über größere Entfernungen beschleunigt wird, beschrieben auch JENKINS und Mitarbeiter (2007). Dieser Effekt kann auf dem Zusammenbrechen der festgelegten Territorien und Sozialkontakte und einer entsprechenden Bewegung in der Dachspopulation beruhen (WOODROFFE et al., 2006).

Weitere Lösungsansätze sind die Tuberkulose-Impfung oder die Fruchtbarkeitskontrolle der Dachse. Ein Tuberkulose-Impfstoff zur oralen Anwendung bei Dachsen wird allerdings nicht vor 2014 einsatzfähig sein (BOVINE TB ADVISORY GROUP, 2009). Eine Impfung der Rinder gegen Tuberkulose ist ebenfalls im Gespräch, würde aber eine Änderung der EU-Gesetzgebung voraussetzen (HOUSE OF COMMONS, 2008). Der Einsatz eines effektiven Medikamentes zur Fruchtbarkeitskontrolle der Dachse, mit der die Populationen dezimiert werden könnten, ohne die oben beschriebene Umverteilung der Rindertuberkulose auszulösen, ist in Ermangelung eines entsprechend getesteten und sicheren Wirkstoffs noch nicht möglich (GAVIN et al., 2009).

4.2 Rindertuberkulose bei Wildschweinen in Europa

Bei Wildschweinen in Europa waren innerhalb der letzten Jahre Prävalenzen von Rindertuberkulose zwischen 1 % und 52 % zu verzeichnen (siehe Tab. II.3). Auch bei Wildschweinen wurden mittels DNA-Fingerprinting gleiche Muster in *M.-bovis*- und *M.-caprae*-Stämmen von Wildschweinen, anderen Wildtieren und Nutztieren gefunden (ARANAZ et al., 2004; GORTAZAR et al., 2005; PARRA et al., 2006; ROMERO et al., 2008). Auch hier sind die Übertragungswege letztlich nicht geklärt.

Tab. II.3: Prävalenzen von Rindertuberkulose bei Wildschweinen in Europa nach einem Review von GAVIN und Mitarbeitern (2009)

Land	Region	Prävalenz	n	Autor
Deutschland	Mecklenburg-Vorpommern	1,37 %	7.419	SCHULTZ et al., 1992
Frankreich	Nordwesten	37,5 %	240	ZANELLA et al., 2008a
		~ 31 %	255	MAEDER et al., 2009
Italien	Nordwesten	11,4 %	2.488	BOLLO et a., 2000
	Sardinien	1,1 %	90	ZANETTI et al., 2008
	Sizilien	9,4 %	149	DI MARCO et al., 2008
Kroatien		1,45 %	69	MACHACKOVA et al., 2003
Portugal		11,1 %	162	SANTOS et al., 2009
Slowakien	West und Ost	19,6 %	46	MACHACKOVA et al., 2003
Spanien	Doñana NP	52,4 %	65	GORTAZAR et al., 2008
	Extremadura	3,92 %	8.478	ROMERO et al., 2008 HERMOSO DE
	Madrid	46,1 %	52	MENDOZA et al., 2006
	Süd-Zentral	42,5 %	1.060	ARANAZ et al., 2004 VICENTE et al., 2006

4.3 Rindertuberkulose beim Damwild in Europa

Rindertuberkulose bei Hirschen ist in Europa weit verbreitet. Beim Damwild liegen die aktuellen Schätzungen zur Prävalenz nach einem Review von GAVIN und Mitarbeitern (2009)

- in Irland zwischen 3 % und 15 % (O'REILLY & DABORN, 1995),
- in Großbritannien zwischen 1,2 % und 20,5 % (PATERSON, 2008; SYMMONS, 2008; DELAHAY et al., 2002 und 2007; SIMPSON, 2000),
- in Spanien im Doñana Nationalpark bei 18,5 % (GORTAZAR et al., 2008).

4.4 Rindertuberkulose beim Rotwild

Rindertuberkulose beim Rotwild wurde bereits in allen Kontinenten außer der Antarktis nachgewiesen (MARTÍN-HERNANDO et al., 2009). Die höchsten Prävalenzen (über 50 %) kamen beim Farmwild in Neuseeland

vor (MACKINTOSH et al., 2000), während die Prävalenz in Wildpopulationen kaum jemals über 20 % lag (VINCENTE et al., 2006; DELAHAY et al., 2007; ZANELLA et al., 2008a).

4.4.1 Prävalenz der Rindertuberkulose beim Rotwild in Europa

Beim Rotwild in Europa wird die Prävalenz von Rindertuberkulose laut neueren Untersuchungen auf folgende Werte geschätzt:

- im Südwesten Großbritanniens auf unter 1 % bzw. auf 1,06 % (n = 136 bzw. 196) (PATERSON, 2008; DELAHAY et al., 2007)
- in der Normandie auf 24 % (n = 138) (ZANELLA et al., 2008a)
- im Doñana Nationalpark in Spanien auf 15,5 % bzw. 27,4 % (n = 168 bzw. 95) (ROMERO et al., 2008; GORTAZAR et al., 2008)

Infizierte Rothirsche wurden außerdem gefunden in Dänemark, Deutschland, Irland, Italien, Österreich, Portugal, Tschechien, Ungarn und in der Schweiz (Review durch GAVIN und Mitarbeiter (2009)).

Die Ansteckung zwischen Rotwild und Rindern erfolgt häufig über den Respirationstrakt (DELAHAY et al., 2002). Sogar bei der Infektion von experimentell infiziertem Rotwild auf nicht infiziertes Rotwild über Futter gingen PALMER und Mitarbeiter (2004) von einer alimentär-aerogenen Infektion durch staubförmige Feinanteile aus.

In der Normandie wurde derselbe *M.-bovis*-Stamm, der seit mindestens 1995 in Rinderherden in der Region zirkuliert, nicht nur beim Rotwild, sondern auch in Rehen, Wildschweinen und Füchsen nachgewiesen (ZANELLA et al., 2008a). Dass die Infektion innerhalb der Wildtierpopulation aufrechterhalten wird, ist wahrscheinlich. Unklar ist allerdings, ob die Infektion innerhalb der Rotwildpopulation ohne Beteiligung anderer infizierter Tierarten aufrechterhalten werden könnte (ARANAZ et al., 2004). 2002 wurden in der Normandie folgende Maßnahmen für das Rotwild getroffen: Reduzierung der Population durch vermehrtes Jagen, Verbot der Fütterung, unschädliche Beseitigung der Eingeweide nach Jagden und Errichten von Zäunen, um die Kontaktmöglichkeiten zwischen Rindern und Rotwild zu beschränken. Die Prävalenz der Tuberkulose beim Rotwild stieg seitdem von 13 % (9 von

72) 2001/2002 auf 24 % (33 von 138) 2005/2006. (ZANELLA et al., 2008a).

4.4.2 Rindertuberkulose beim Rotwild im Grenzgebiet Bayern-Österreich

Im Grenzgebiet Bayern-Österreich kommt es offensichtlich immer wieder zur Übertragung der Rindertuberkulose zwischen Rindern und Rotwild: In Westösterreich wurden 12 durch *M. caprae* verursachte Infektionen bei Rotwild, Rindern und Menschen beobachtet, eine Analyse mittels DNA-Fingerprinting (Spoligotyping und IS6110-RFLP (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus)) deutete auf eine Übertragung sowohl innerhalb der Arten als auch artübergreifend hin (PRODINGER et al., 2002). Identisch mit diesen Stämmen waren zwei *M.-caprae*-Stämme, die bei Rindern aus zwei Betrieben in einem Ort in Bayern nachgewiesen wurden (ERLER et al., 2003). Da die Rinder aus Österreich und aus einem Bestand in Bayern auf der gleichen Alpe weideten, auf der das von PRODINGER und Mitarbeitern (2002) beschriebene infizierte Hirschkalb gefunden wurde, wird die Wildpopulation als Überträger angesehen (ERLER et al., 2003).

GLAWISCHNIG und Mitarbeiter (2003) wiesen in sieben Tuberkulosefällen bei Rothirschen in den nördlichen Kalkalpen *M. caprae* nach. Mittels DNA-Fingerprinting (Spoligotyping und IS6110 – RFLP) wurde bei sechs Isolaten aus einem bayerischen Jagdrevier an der österreichischen Grenze eine weitgehende Übereinstimmung gefunden, so dass die Erreger vermutlich bereits über längere Zeit innerhalb der Population weitergegeben wurden. Das siebente Isolat von einem Hirschkalb aus dem Bezirk Reutte unterschied sich wesentlich von den anderen, stimmte allerdings mit dem Isolat von Tuberkulose-infizierten Rindern in einem 20 km entfernten Milchbetrieb überein.

Laut AGES (2009) zeigen Isolate von *M. caprae* von Rindern aus dem Bezirk Landeck und Reutte Übereinstimmung mit jenen Isolaten, welche bei Rindern und freilebendem Rotwild aus dem Tiroler Lechtal, bei Rotwild aus dem Bezirk Bludenz in Vorarlberg sowie bei Rindern im Allgäu festgestellt wurden.

4.5 Pathologische Besonderheiten der Rindertuberkulose bei Wildtieren

Beim infizierten Rotwild zeigen neben den Retropharyngeallymphknoten, den thorakalen und abdominalen Lymphknoten vor allem auch die Tonsillen typische pathologisch-anatomische Veränderungen (MARTÍN-HERNANDO et al., 2009).

Die Veränderungen beim infizierten Rotwild reichen von makroskopisch nicht erkennbar über sichtbare Granulome bis hin zu dünnwandigen Abszessen mit bis zu 30 cm Durchmesser, während Verkalkungen kaum beobachtet werden. Diese Abszesse mit flüssigem Inhalt und dünner Wand sind der Hauptunterschied der Läsionen bei Rindern und Rotwild (PALMER et al., 2002). Durch diese dünnwandigen Abszesse scheint Rotwild eine Neigung zur offenen Tuberkulose und somit zur Streuung der Infektion aufzuweisen (ZANELLA et al., 2008b). Die Tatsache, dass tuberkulöses Wild in der pathologisch-anatomischen Untersuchung oft keine sichtbaren Läsionen zeigt, wurde auch beim Dachse festgestellt. MURPHY und Mitarbeiter (2010) fanden 12,1 % von 215 untersuchten Dachsen pathologisch auffällig, während sich 36,3 % der Dachse in der Kultur als positiv herausstellten.

5 Diagnostik der Rindertuberkulose

5.1 Diagnostik am lebenden Tier

Für die Diagnostik am lebenden Tier stehen die klinische Diagnostik und immunologische Methoden zur Verfügung.

5.1.1 Klinische Diagnose

Da klinische Symptome erst spät auftreten und schwer interpretierbar sind, ist die klinische Diagnose nicht geeignet, um infizierte Tiere sicher aufzuspüren, bevor sie die Erkrankung weiter verbreiten. Eine genaue Inkubationszeit lässt sich nicht angeben. Je nach Lokalisation treten unterschiedliche Symptome auf: Atembeschwerden wie Husten und Rasseln bei Lungentuberkulose, chronischer Durchfall oder Verstopfung bei Darmtuberkulose, eitriger Scheidenausfluss bei Gebärmuttertuberku-

lose und langsame Vergrößerung und höckerige Verhärtung von Eutervierteln bei Eutertuberkulose. Es kommt zum Leistungsrückgang unklarer Genese, in fortgeschrittenem Stadium magern die Tiere ab (ASSMUS et al., 1995).

5.1.2 Intrakutantest (Tuberkulinprobe)

Der Intrakutantest beruht auf einer Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV), ausgelöst durch bovines Tuberkulin (PPD-B = purified protein derivatives von Erregern boviner Tuberkulose), das intrakutan appliziert wird. An der Injektionsstelle dringen inflammatorische CD4⁺ T-Zellen (T_H1) in das Gewebe ein. Nur T_H1-Zellen, die durch einen vorhergehenden Kontakt mit dem Antigen geprägt wurden, erkennen entsprechende Peptid:MHC-Klasse-II-Komplexe auf antigenpräsentierenden Zellen. Es kommt zur Aktivierung der T_H1-Zellen, die in der Folge inflammatorische Cytokine wie Interferon- γ und TNF- β freisetzen. Diese Mediatoren aktivieren lokale Endothelzellen und locken inflammatorische Zellen, hauptsächlich Makrophagen an, was zu einer Ansammlung von Flüssigkeit und Proteinen an dieser Stelle führt. Jede dieser Phasen dauert mehrere Stunden. (MURPHY et al., 2009)

Die Richtlinie 64/432/EWG, Anhang B, Nummer 2.2 schreibt vor, wie der Intrakutantest durchgeführt und ausgewertet werden muss. Die Reaktion wird 72 Stunden nach der intrakutanen Injektion gemessen.

Da die korrekte Messung der Hautdicke mit dem Kutimeter der Übung bedarf und nie unabhängig vom Untersucher ist, gibt es Versuche, den Intrakutantest über Thermographie auszuwerten (JOHNSON & DUNBAR, 2008).

DE LA RUA-DOMENECH und Mitarbeiter (2006) fassten Ergebnisse verschiedener Studien zusammen: die Sensitivität des Intrakutantests beim Rind lag zwischen 75 % und 95,5 %.

Der Intrakutantest kann entweder nur durch intrakutane Injektion von PPD-B ausgeführt werden (Monotest) oder es kann zusätzlich an einer anderen Körperstelle aviäres Tuberkulin (PPD-A = purified protein derivatives von Erregern aviärer Tuberkulose) appliziert werden

(Simultantest). Zur Auswertung des Simultantests wird die Hautreaktion auf das PPD-A von der Reaktion auf das PPD-B abgezogen. Damit werden falsch-positive Reaktionen bei Tieren mit immunologischem Kontakt zu aviären Mykobakterien abgegrenzt (höhere Spezifität). Die Sensitivität des Intrakutantests leidet jedoch bei der Durchführung als Simultantest, da durch eine gleichzeitige *M.-avium*-Infektion eine Infektion mit Rindertuberkulose maskiert werden kann (THOM et al., 2008).

5.1.3 BOVIGAM[®]-Test (Nachweis von Interferon- γ)

Der BOVIGAM[®]-Test der Firma Prionics ist ein *in vitro*-Bluttest für Rinder, der zur Diagnose der Rindertuberkulose eingesetzt wird. Der BOVIGAM[®]-Test ist durch die OIE zugelassen als Zusatztest zur Tuberkulinisierung. Die Richtlinie 64/432/EWG (Stand: 09.01.2004) stellt den Mitgliedstaaten frei, zusätzlich zur Tuberkulinprobe den „Gamma-Interferon-Assay“ zu genehmigen, um möglichst viele infizierte und kranke Tiere zu ermitteln.

In Deutschland hat der BOVIGAM[®]-Test keine Zulassung nach § 17c Tierseuchengesetz. In Europa wird der BOVIGAM[®]-Test routinemäßig in Irland, Italien, Spanien und Großbritannien eingesetzt (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006).

Testsysteme nach demselben Wirkprinzip sind kommerziell erhältlich für den Menschen (QuantiFERON[®]), für nichthumane Primaten (PRIMAGAM[®]) und für Hirsche (CERVIGAM[®]).

5.1.3.1 Prinzip des BOVIGAM[®]-Tests

Das Prinzip des BOVIGAM[®]-Tests beruht auf der Freisetzung von Interferon γ durch T-Lymphozyten (CD4⁺ T-Zellen) nach Restimulierung mit PPD-B. Diese Reaktion entspricht im Prinzip der unter 5.1.2 beschriebenen Hypersensitivitätsreaktion. PPD-B wird jedoch direkt mit Vollblut in Kontakt gebracht, die Menge des gebildeten Interferon- γ kann bereits nach einer Inkubationszeit von 16 bis 24 Stunden gemessen werden.

Für die Durchführung des Tests wird eine Vollblutprobe des Probanden mit lebenden und teilungsfähigen T-Lymphozyten benötigt. Die Menge des nach Stimulation freigesetzten Interferon- γ wird mittels ELISA gemessen

und mit entsprechenden Kontrollen verglichen. Bei den Kontrollen handelt es sich um eine Negativkontrolle, um eine unspezifische Reaktion der Lymphozyten auszuschließen, und um die Stimulation mit PPD-A, um kein falsch-positives Ergebnis nach Kontakt mit atypischen Mykobakterien zu erhalten. Der BOVIGAM[®]-Test wird nur als positiv beurteilt, wenn die Menge an Interferon- γ , die nach Stimulation mit PPD-B gebildet wurde, einen definierten Wert höher liegt als in der Negativkontrolle und nach Stimulation mit PPD-A.

Durch die zusätzliche Stimulation der Vollblutprobe mit PWM wird außerdem eine Positivkontrolle durchgeführt. Ein negatives Ergebnis wird nur als negativ gewertet, wenn die Positivkontrolle ein positives Ergebnis geliefert hat, da sonst nicht auszuschließen wäre, dass die Lymphozyten in der Blutprobe nicht mehr lebensfähig waren.

5.1.3.2 Möglichkeiten und Grenzen des BOVIGAM[®]-Tests

Erste Feldstudien in Australien zeigten, dass der BOVIGAM[®]-Test sensitiver ist (93,6 %) als der Mono-Intrakutantest (65,6 %), wobei die Kombination von beiden Tests die Sensitivität auf 95,2 % ansteigen ließ (WOOD et al., 1991). Seit damals sind verschiedene Studien durchgeführt worden. Die Sensitivität des BOVIGAM[®]-Tests lag abhängig von den unterschiedlichen Gegebenheiten und Interpretationen zwischen 55 % und 100 %, während in tuberkulosefreien Herden eine Spezifität von 85 % bis 99,6 % festgestellt wurde (GORMLEY et al., 2006; VORDERMEIER et al., 2006; DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006).

Die Entschlüsselung des genetischen Codes verschiedener Mykobakterien des MTC erlaubt mittlerweile, gezielt Antigene zu suchen, die bei der Stimulation der Blutproben eine spezifischere Reaktion als bei der Stimulation mit PPD-B auslösen. Die Antigene ESAT-6 (6 kDa early secretory antigenic target, ein sekretorisches Protein und potentes T-Zell-Antigen) und CFP-10 (10 kDa culture filtrate protein) zum Beispiel sind codiert in der RD1 (RD = region of difference) (VAN INGEN et al., 2009), die bei *M. bovis* BCG und bei den meisten atypischen Mykobakterien fehlt (WARREN et al., 2006). ESAT-6 und CFP-10 tragen zum Überleben der Mykobakterien im Phagosom bei (AHMAD, 2010).

Durch eine Stimulation des Vollbluts mit ESAT-6 und CFP-10 können mit *M. bovis* BCG geimpfte Tiere von infizierten Tieren unterschieden werden (VORDERMEIER et al., 2001), wobei nicht alle infizierten Tiere auf beide Antigene reagieren, so dass ein Cocktail aus mehreren Antigenen wiederum zu einer besseren Sensitivität führen kann – wie zum Beispiel die Kombination von ESAT-6, CFP-10 und Rv3615c (Protein von *M. bovis*) (SIDDEERS et al., 2008; VORDERMEIER et al., 2009).

JONES und Mitarbeiter (2010) untersuchten überlappende Peptide, die 119 Antigene von *M. bovis* repräsentierten, auf ihre Fähigkeit, *in vitro* eine Interferon- γ -Produktion auszulösen bei der Stimulation von Vollblut aus *M.-bovis*-infizierten Rindern, nicht aber aus *M. bovis* BCG-geimpften Rindern. Es sind jedoch größere Feldstudien nötig, um festzustellen, welche Peptide in Kombination mit ESAT-6 und CFP-10 wirklich geeignet sind, um mit Tuberkulose infizierte Tiere sicher von geimpften oder mit Paratuberkulose infizierten Tieren unterscheiden zu können (JONES et al., 2010).

Einen Vergleich verschiedener Stimulationsmöglichkeiten an natürlich infizierten Rindern führten COAD und Mitarbeiter (2008) durch: Im Simultantest negative Rinder aus Tuberkulosebeständen wurden isoliert und bei allen Rindern wurde innerhalb von 14 Tagen ein Interferon- γ -Bluttests nach Stimulation mit PPD-B, PPD-A, ESAT-6 und CFP-10 durchgeführt. Nach sieben Wochen wurden alle Rinder ein zweites Mal mittels Simultantest getestet. Die Rinder wurden anschließend getötet und pathologisch-anatomisch, pathologisch-histologisch und kulturell untersucht.

Von 174 Rindern liegen alle Testresultate vor. Während mit dem Interferon- γ -Test nach Stimulation mit PPD-B und PPD-A 13 von 20 (65 %) durch Kultur und/oder Histopathologie bestätigte tuberkulosepositive Rinder erkannt wurden, waren es bei der Stimulation mit ESAT-6 und CFP-10 lediglich 11 (55 %). Die Spezifität war jedoch bei der Stimulation mit PPD-B und PPD-A geringer (85,7 %) als bei der Stimulation mit Peptiden (94,2 %). Das entspricht auch den Ergebnissen anderer Studien, die belegen, dass die Spezifität des BOVIGAM[®]-Tests ansteigt, wenn ausschließlich ESAT-6 und CFP-10 als Antigene verwendet werden

(BUDDLE et al., 2009), während die Sensitivität höher ist, wenn als Antigen PPD-B verwendet wird (DALLEY et al., 2008).

Eine schlechtere Sensitivität des BOVIGAM[®]-Tests bei Stimulation mit PPD-B und PPD-A gegenüber der Stimulation mit ESAT-6 und CFP-10 ergibt sich jedoch bei Rindern mit einer Doppelinfection mit Rindertuberkulose und Paratuberkulose (ALVAREZ et al., 2008 und 2009; AAGAARD et al., 2010; BEZOS et al., 2010). Die Immunantwort nach Stimulation mit ESAT-6 und CFP-10 wurde kaum durch eine gleichzeitige *M.-avium-ssp.-paratuberculosis*-Infektion beeinflusst (WATERS et al., 2004; AAGAARD et al., 2010).

Bei dem Versuch von COAD und Mitarbeitern (2008) registrierten beim zweiten Intrakutantest drei Rinder positiv. Diese drei Rinder waren bereits im BOVIGAM[®]-Test nach Stimulation mit PPD-B und PPD-A als tuberkulosepositiv erkannt worden. Ein weiterer späterer Intrakutantest hätte also keine Vorteile gegenüber dem BOVIGAM[®]-Test gebracht. Dass im Intrakutantest negative, jedoch im BOVIGAM[®]-Test positive Rinder eine höhere Wahrscheinlichkeit aufweisen, zu einem späteren Zeitpunkt im Intrakutantest positiv zu werden, beobachteten auch GOURMLEY und Mitarbeiter (2006).

Der BOVIGAM[®]-Test kann in einem späteren Krankheitsstadium oder aufgrund anderer Faktoren, die das Immunsystem schwächen, wie einer Co-Infektion oder der systemischen Gabe von Kortikosteroiden, ebenso wie der Intrakutantest falsch-negativ ausfallen (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006; DOHERTY et al., 1995).

Kälber (Rinder unter 6 Monaten) sollen nicht mittels BOVIGAM[®]-Test getestet werden, da die Wahrscheinlichkeit besteht, dass bei diesen jungen Tieren Natürliche Killerzellen aufgrund einer unspezifischen Reaktion auf die mykobakteriellen Antigene Interferon- γ ausschütten und es so zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann (OLSEN et al., 2005).

5.1.4 Serologischer Nachweis

Spezifische aus Mykobakterien gewonnene Antigene wie die Proteine ESAT-6, CFP-10, MBP70 oder MBP83 (MBP = *M.-bovis*-Protein) können für die serologische Diagnostik von Tuberkuloseinfektionen genutzt werden. Dabei werden Antigene wie ESAT-6 und CFP-10 sowohl von *M. tuberculosis* als auch von *M. bovis* exprimiert, andere dagegen wie MBP nur von *M. bovis* (HEWINSON et al., 2006).

HARRINGTON und Mitarbeiter (2008) konnten das Paradigma, dass Antikörper bei einer Infektion mit Tuberkulose-Erregern erst spät oder nie auftreten, widerlegen. Bei experimentell infizierten Hirschen wurden vier Wochen nach der Infektion bereits Antikörper gegen die Antigene MBP83, ESAT-6 und CFP-10 nachgewiesen. Womöglich handelt es sich aber auch um tierartsspezifische Eigenheiten. So wurde bei Infektionsversuchen mit *M. bovis* an 35 Rothirschen und 43 Rindern festgestellt, dass nach gleicher Inkubationszeit bei Rindern vor allem die zelluläre Immunantwort auf eine Tuberkuloseinfektion hindeutet, während beim Rotwild auch die humorale Immunantwort Hinweise liefert (GRIFFIN et al., 2006).

LYASHCHENKO und Mitarbeiter (2000) haben einen Multi-Antigen Print Immunoassay für die serologische Diagnostik von Tuberkuloseinfektionen in Rindern und Wildtieren entwickelt. Mit dieser Methode können Seren von infizierten Tierarten daraufhin untersucht werden, welche Antikörper am häufigsten vorkommen und wie sich diese Antikörper-Muster im Laufe der Infektion womöglich verändern, um entsprechende Schnelltests entwickeln zu können (LYASHCHENKO et al., 2008; HARRINGTON et al., 2008). Momentan ist allerdings die Sensitivität der serologischen Diagnostik oft noch nicht zufriedenstellend (O'BRIEN et al., 2009).

Vorteile des serologischen Nachweises sind sowohl die Schnelligkeit der Tests als auch die Stabilität der Antikörper beim Transport, bei der Lagerung und beim Umgang im Labor (GREEN et al., 2009). So gelingt der serologische Nachweis auch aus gefrorenem Serum und ist deshalb retrospektiv möglich.

5.2 Diagnostik aus Gewebeproben des toten Tieres

5.2.1 Pathologisch-anatomische Diagnostik

Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung kann aufgrund makroskopisch erkennbarer tuberkuloseverdächtiger Veränderungen des Tierkörpers oder der -organe ein Verdacht auf eine Tuberkuloseinfektion ausgesprochen werden. Diese Untersuchungsmethode ist jedoch nur für fortgeschrittene Krankheitsstadien geeignet, frühe Stadien werden bei post mortem Untersuchungen nicht sicher aufgespürt (GORMLEY et al., 2006). CORNER und Mitarbeiter (1994) berichten, dass bis zu 53 % der im Hauttest positiven Tiere in der pathologischen Untersuchung nicht als tuberkuloseverdächtig erkannt werden.

5.2.2 Mikrobiologische Diagnostik

5.2.2.1 Mikroskopie

Vorteile der Mikroskopie sind die Schnelligkeit und die niedrigen Kosten. Es werden jedoch lediglich säurefeste Stäbchen nachgewiesen, eine Aussage über die Bakterienspezies ist nicht möglich. Ein weiterer Nachteil ist die Nachweisgrenze von 10^3 bis 10^4 Keimen pro ml, was einer zirka hundertfach geringeren Sensitivität gegenüber der Kultur entspricht und die Gefahr falsch-negativer Ergebnisse in sich birgt (KÜHNEN & RÜSCHGERDES, 1999).

5.2.2.2 Kultureller Nachweis

Der kulturelle Nachweis gilt als „Goldstandard“ in der Diagnostik der Mykobakterien, die Nachweisgrenze liegt bei 10 Keimen/ml (BANGE et al., 2009).

Positive Kulturen werden zunächst – auf Festnährböden – aufgrund ihrer Vermehrungsgeschwindigkeit, Koloniemorphologie und Pigmentierung differenziert. Anschließend können die Mykobakterien durch verschiedene biochemische und molekularbiologische Tests weiter unterschieden werden.

5.2.3 Molekularbiologischer Nachweis

Die Mitglieder des MTC unterscheiden sich kaum bezüglich ihrer 16S rRNA Gensequenz (ROGALL et al., 1990), was die Zugehörigkeit zu einer gemeinsamen Spezies nahe legen würde. Auch die Genome mit einer Größe von ca. 4,4 Millionen Basenpaaren (COLE et al., 1998), unterscheiden sich kaum voneinander. So hat sich zum Beispiel nach der Sequenzierung der Gesamtgenome von *M. tuberculosis* und *M. bovis* gezeigt, dass die Genome zu 99,95 % identisch sind (GARNIER et al., 2003). Die Unterschiede in der Physiologie sind offensichtlich auf eine unterschiedliche Genexpression, die nur 6 % des Gesamtgenoms betrifft, zurückzuführen (REHREN et al., 2007).

Die Nachweisgrenze für den molekularbiologischen Nachweis liegt bei 10^3 Keimen/ml.

5.2.3.1 Molekularbiologischer Nachweis des MTC

Als Zielsequenzen für den Nachweis des MTC eignen sich Genabschnitte des 16S rRNA-Gens (RINGUET et al., 1999), des 32 kDa Protein-Gens (SOINI et al., 1994), des 65-kDa-Hitzeschockproteins (KAPUR et al., 1995), des Insertionselements IS1081 (TAYLOR et al., 2007), der Hypothetischen Helikase (HELI) (RODRÍGUEZ et al., 1995) sowie die 16S-23S ITS-Region (ITS = internal transcribed spacer) (ROTH et al., 1998). Eine Unterscheidung zwischen den Spezies des MTC ist dadurch jedoch nicht möglich.

Auch mittels Spoligotyping können Mykobakterien des MTC nachgewiesen werden, wobei Spoligotyping gleichzeitig die Möglichkeit einer Differenzierung innerhalb des MTC sowie innerhalb der Spezies bietet (KAMERBEEK et al., 1997).

Es wurde eine Vielzahl von PCR-Assays entwickelt und entsprechende Kits sind kommerziell erhältlich. Für die zeitkritischen Untersuchungen am Schlachthof wurde vom nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabor für Tuberkulose des Friedrich-Loeffler-Instituts eine Real-time PCR entwickelt, die zwei Genorte nachweisen kann: HELI und IS1081. Nur wenn beide nachgewiesen werden, gilt die PCR als positiv, wird lediglich einer

der beiden nachgewiesen, ist das Ergebnis fraglich. Diese PCR erzielt aus tuberkuloseverdächtigen Organen eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 73 % (KÖHLER, 2010).

5.2.3.2 Differenzierung der Mykobakterienspezies des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes mit molekularbiologischen Methoden

Den Durchbruch, um eine molekularbiologische Speziesdifferenzierung innerhalb des MTC durchführen zu können, brachte die Identifizierung des Insertionselements IS6110 (THIERRY et al., 1990). Der Nachweis erfolgt über RFLP oder PCR (HADDAD et al., 2004).

Ebenfalls geeignet zur Differenzierung der Spezies des MTC sind die DR-Regionen (GROENEN et al., 1993; HERMANS et al., 1991). Diese Regionen sind gekennzeichnet durch kurze repetitive DNA-Sequenzen, die unterbrochen sind durch ebenso kurze nicht repetitive Sequenzen, sogenannte Spacer. Als Methoden eignen sich die RFLP, das Spoligotyping (KAMERBEEK et al., 1997) sowie die Amplifikation (WARREN et al., 2006; PINSKY & BANAEI, 2008).

Weitere Methoden, die sich für die Differenzierung innerhalb des MTC eignen, sind die DNA-Sequenzanalyse auf der Basis von Punktmutationen einzelner Basen im *gyrB*-Gen (NIEMANN et al., 2000) und die Amplifikation einer hypervariablen Region des 16S rRNA-Gens (LEUNG et al., 2009).

5.2.4 Molekularbiologische Methoden und Epidemiologie

Um Infektketten und Zusammenhänge zwischen Ausbrüchen oder mögliche Laborkontaminationen aufzuklären, stehen verschiedene molekularbiologische Methoden zur Verfügung, die die Erreger des MTC unterhalb der Speziesebene differenzieren können. Für eine höhere Unterscheidungsfähigkeit gegenüber einzeln angewandten Methoden werden die Methoden auch kombiniert angewandt:

- Die RFLP-Analyse der unterschiedlichen Anzahl und Verteilung des mobilen Insertionselements IS6110, das nur im Genom der Mitglieder des MTC vorkommt. Da bei dieser Methode keine Amplifizierung des

Genoms stattfindet, sind als Ausgangsmaterial gut bewachsene Kulturen nötig. RFLP-IS6110 wird immer noch als Referenzmethode zur Typisierung von *M.-tuberculosis*-Isolaten verwendet. Für *M.-bovis*-Isolate, die meistens nur über wenige Kopien dieses Insertionselements verfügen, werden andere Bereiche wie die DR-Region bevorzugt (HADDAD et al., 2004).

- Das Spoligotyping (KAMERBEEK et al., 1997) basiert auf einem DNA-Polymorphismus in der DR-Region des mykobakteriellen Genoms. Das Muster von vorhandenen oder fehlenden Spacer-Sequenzen ermöglicht die Differenzierung sowohl zwischen einzelnen Spezies als auch innerhalb einer Spezies. Da es sich um eine Methode mit Amplifizierung der entsprechenden Genabschnitte handelt, ist keine gut bewachsene Kultur nötig.
- Die MIRU-VNTR-Typisierung (MIRU = mycobacterial interspersed repetitive unit; VNTR = variable number of tandem repeats) wurde 1998 von FROTHINGHAM und MEEKER-O'CONNELL beschrieben. MIRU sowie VNTR bezeichnen kurze repetitive Sequenzen, die über das Genom verteilt an verschiedenen Loci vorkommen. Mittels einer PCR wird die Anzahl von Repeats pro Locus festgestellt.

Von 128 untersuchten *M.-caprae*-Stämmen konnten mittels MIRU-VNTR-Typisierung (Untersuchung von 12 Loci) 78 unterschiedliche Muster differenziert werden, durch Spoligotyping jedoch nur 17, während die RFLP-IS6110 – Analyse und die MIRU-VNTR-Methode aus einer Untermenge von 103 Stämmen jeweils ähnliche Ergebnisse lieferten (PRODINGER, 2005).

III MATERIAL UND METHODEN

1 Probenmaterial

1.1 Gewebe- und Blutproben von Rindern

1.1.1 Gewebeprobe von Rindern

Mit den Gewebeprobe eines tuberkuloseverdächtigen Schlachtrindes aus dem Oberallgäu sowie von 65 weiteren, nach Bestätigung dieses Tuberkuloseausbruchs getöteten und unschädlich beseitigten Rindern (siehe Tab. III.1) konnten insgesamt 361 Organproben entnommen und pathologisch-anatomisch, mikroskopisch, molekularbiologisch und kulturell untersucht werden. Die Organproben der getöteten Rinder (Zusammensetzung siehe Abb. III.1) wurden bei der Schlachtung bzw. der Sektion in der Tierkörperbeseitigungsanstalt entnommen und zur weiteren Untersuchung zum LGL transportiert.

Tab. III.1: Herkunft und Anzahl der Rinder, von denen Organproben untersucht wurden

Herkunft der Rinder, von denen Gewebeprobe untersucht wurden	Anzahl
tuberkuloseverdächtiges Schlachtrind	1
getötete Rinder, die sich mit dem Schlachtrind im Stall und auf der Hausweide befunden hatten	28
getötete Rinder aus dem Herkunftsbestand, die sich zum Zeitpunkt des Tuberkuloseausbruchs auf der Alpe befanden	15
getötete Rinder aus anderen Beständen, die sich mit Rindern aus dem Herkunftsbestand auf der Alpe befunden hatten	16
getötete Rinder auf der Nachbaralpe	2
getötete Rinder in Kontaktbetrieben	4
Summe	66

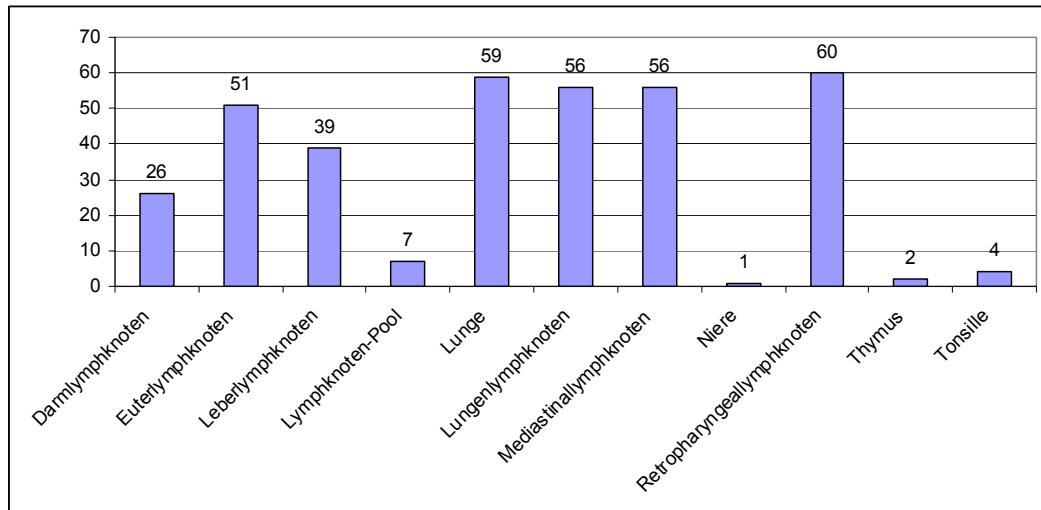


Abb. III.1: Zusammensetzung der Einzelorganproben (n = 361) der untersuchten Rinder

1.1.2 Blutproben von Rindern

Blutproben wurden begleitend zu den von den Amtstierärzten in tuberkuloseverdächtigen Beständen durchgeführten Intrakutanuntersuchungen entnommen. Es handelte sich um heparinisierte Blutproben aus der Schwanzvene (*Vena coccygea medialis*), die unverzüglich und ungekühlt zur Durchführung des BOVIGAM[®]-Tests zum LGL transportiert wurden.

Die Blutproben wurden jeweils unmittelbar vor dem Setzen des Intrakutantests und/oder beim Ablesen des Simultantests entnommen.

Es wurden insgesamt 131 Rinder aus zehn tuberkuloseverdächtigen Beständen (Bestände A bis K, siehe Abb. III.2) beprobt. Bei 29 dieser 131 Rinder konnte jeweils zweimal Blut entnommen werden, einmal vor dem Setzen des Simultantests und ein zweites Mal beim Ablesen des Simultantests.

Außerdem wurden Blutproben von 42 Rindern aus einem tuberkuloseunverdächtigen Bestand (Bestand L) für den BOVIGAM[®]-Test entnommen – jeweils vor und nach einer Simultanuntersuchung.

Aus 28 Plasmaproben (Bestand A) wurde der BOVIGAM[®]-Test zweimal nacheinander aus dem gleichen Plasma durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen.

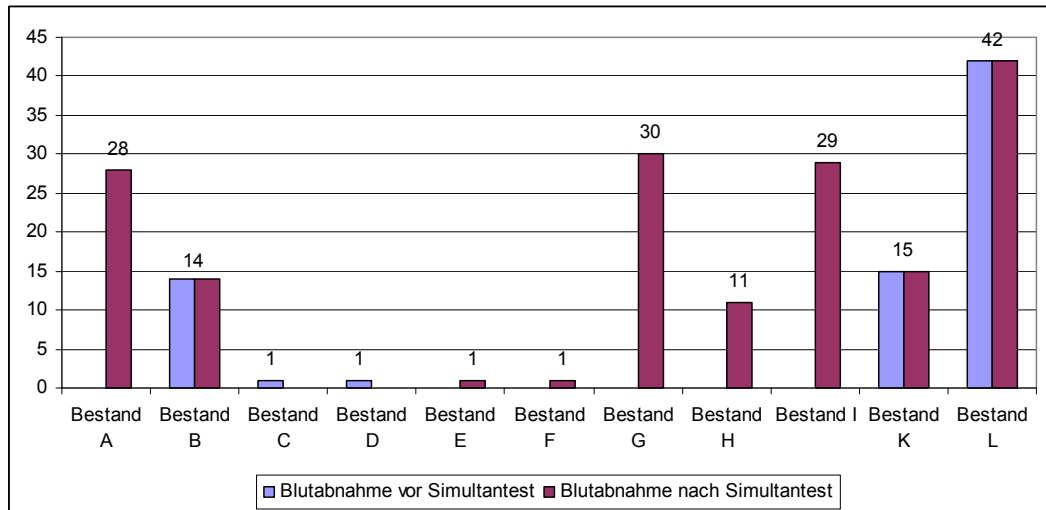


Abb. III.2: Blutproben (n = 244) von Rindern (n = 173) in den Beständen A bis L vor und nach der Simultanuntersuchung

1.1.3 Kombinierte Blut- und Gewebeproben von Rindern

Bei 52 Rindern aus vier Beständen, von denen Blutproben untersucht wurden, konnten bei der Tötung Organproben entnommen werden, so dass für diese Rinder neben dem Simultan- und BOVIGAM[®]-Test auch pathologisch-anatomische, mikroskopische, molekularbiologische und kulturelle Untersuchungen durchgeführt wurden. Abbildung III.3 gibt einen Überblick über den Anteil der Rinder in den vier Beständen A, B, E und G, bei denen neben Blutproben auch Organproben untersucht wurden.

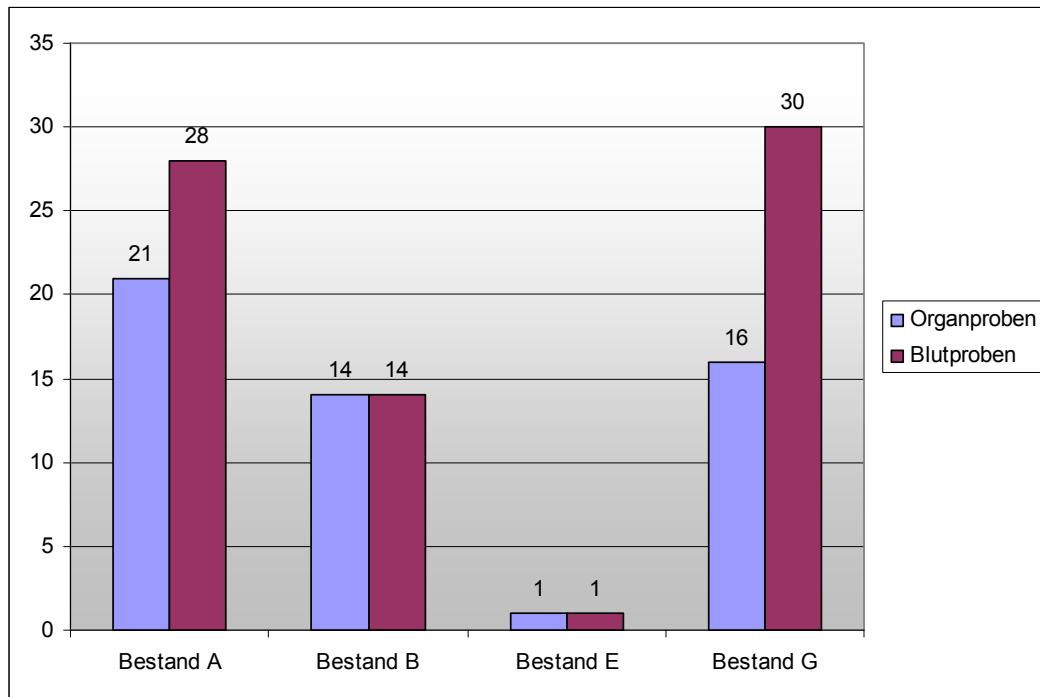


Abb. III.3: Anzahl kombinierter Blut- und Organproben aus vier Rinderbeständen

1.2 Gewebeproben vom Rotwild

Die Gewebeproben vom Rotwild stammten von nach Jagdrecht erlegtem Rotwild aus den Landkreisen Oberallgäu, Ostallgäu und Bad Tölz-Wolfratshausen. Rotwild wird in Alterskategorien eingeteilt (vgl. Tab. III.2); das rechnerische Lebensjahr reicht jeweils vom 1. April bis zum 31. März des Folgejahres (NÜßLEIN, 1988). Die Jagdsaison beim Rotwild in Bayern dauert für Schmalspießer (2-jährige männliche Tiere) und Schmaltiere (2-jährige weibliche Tiere) vom 1. Juni bis zum 31. Januar, für Alttiere, Hirsche und Kälber vom 1. August bis zum 31. Januar. Da in der Jagdsaison 2009/2010 erst im Oktober mit der Probennahme begonnen wurde, wurde die Probennahme in die Jagdsaison 2010/2011 ausgedehnt. Von Oktober 2009 bis Dezember 2010 wurden insgesamt 332 Rothirsche untersucht.

Tab. III.2: Bezeichnungen der Alterklassen beim Rotwild (NÜßLEIN, 1988; Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, 1988)

Alter	männlich		weiblich
1-jährig	Hirschkalb		Wildkalb
2-jährig	III Hirsch	Schmalspießer	Schmaltier
3-jährig			Alttier
4- 9-jährig	II Hirsch		
10-jährig und älter	I Hirsch		

Die Probennahme vor Ort erfolgte durch die Jagd ausübungs berechtigten. Ein komplettes Probenset, begleitet von einem Probenbegleitschein (siehe Anhang IX.3) bestand aus folgenden Teilen:

- zusammenhängend an einem Stück Zunge und Kehlkopf inklusive Tonsillen, Retropharyngeallymphknoten, Luft- und Speiseröhre, Lunge mit Lymphknoten, Mittelfell mit Lymphknoten
- kompletter Darm mit Ileozökal- und Mesenteriallymphknoten
- weiteren Organen, falls Veränderungen erkennbar waren

Die Proben wurden an das jeweilige Veterinäramt gebracht, das für den weiteren Proben transport verantwortlich war. Je nach Probenaufkommen wurden die Proben entweder sofort nach der Entnahme zum LGL transportiert, maximal drei Tage vor Transport bei 4 – 6 °C gelagert bzw. bei -20 °C eingefroren. Bei Drückjagden im Oberallgäu wurden die Proben von der Verfasserin entnommen und umgehend zum LGL transportiert.

2 Material und Geräte

2.1 Material für die Probennahme

Für die Blutproben wurden Primavetten® V Lithium-Heparin 10 ml der Firma KABE Labortechnik (Nr. 0959 7042) verwendet.

2.2 Material und Geräte für die Laboruntersuchungen

2.2.1 Puffer, Lösungen, Wasser

physiologische Kochsalzlösung

NaCl	9 g
Aqua dest.	1000 ml

N-Acetyl-L-Cystein-NaOH-Lösung (NALC):

Na ₃ -Citrat x 2 H ₂ O, 2,9 %ige Lösung, steril	50 ml
NaOH, 4 %ige Lösung, steril	50 ml
N-Acetyl-L-Cystein	500 mg

Natriumcitratlösung und NaOH werden gemischt und N-Acetyl-L-Cystein dazugegeben. Die Lösung ist instabil und muss täglich frisch angesetzt werden.

Phosphatpuffer (nach Sörensen; pH 6,8)

KH ₂ PO ₄	4,84 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	5,53 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

PBS-Puffer (phosphate buffered saline solution), steril
(Nr. P0261) Sigma Aldrich

TE-Puffer 1x pH 8,0 Low EDTA (Nr. A8569.0500) AppliChem

ASL-Puffer (Nr. 19082) QIAGEN

DX Antifoaming Reagent (Nr. 19088) QIAGEN

Wasser für Injektionszwecke, Ampullen zu 5 ml
(Nr. 10110125) Grünenthal

2.2.2 Nährböden und Reagenzien

Flüssignährboden

MGIT™ Kulturmedium, 7 ml (Nr. 2451222)	Becton Dickinson
MGIT™ Wachstums-Supplement (Nr. 245124)	Becton Dickinson

Festnährböden

Löwenstein-Jensen Schrägschichtmedium mit Glycerin und PACT, 5,5 ml (Nr. 510r)	Heipha
Stonebrink Kulturmedium mit PACT 5,5 ml (Nr. 513r)	Heipha

Antigene

Bovine PPD Stimulation Antigen (0,3 mg/ml) (Nr. 63313)	Prionics
Avian PPD Stimulation Antigen (0,3 mg/ml) (Nr. 63314)	Prionics
Lectin from <i>Phytolacca americana</i> (PWM) (Nr. L 9379)	Sigma

2.2.3 Primer und Sonden

MTC-IS1081-Mix5-FAM (Zielgen: IS1081, Quelle: Friedrich-Loeffler-Institut, 2010)

Primer MTC-IS1081-5F

Sequenz: CTC TCG ACG TTC ATC GCC G Eurogentec

Primer MTC-IS1081-5R

Sequenz: TGG CGG TAG CCG TTG CGC Eurogentec

Sonde MTC-IS1081-5FAM

Sequenz: FAM-ATT GGA CCG CTC ATC GCT Eurogentec
GCG TTC-BHQ1

MTC-HELI-Mix4-FAM (Zielgen: HELI, Quelle: Friedrich-Loeffler-Institut, 2010)

Primer: MTC-HELI-4F

Sequenz: TTG ATC AGG TCG ACG ATG TAG Eurofins

Primer: MTC-HELI-4R

Sequenz: TCA CCA CCG ACA AAG CGT C Eurofins

Sonde: MTC-HELI-4FAM

Sequenz: FAM-TCA ACG ACC CCA ACG ACT Eurofins
GGT GC-BHQ1

Actin-DNA-Mix-YAK (Zielgen: β -Actin, Quelle: Friedrich-Loeffler-Institut, 2010)

Primer: ACT2-1030-F_DNA

Sequenz: AGC GCA AGT ACT CCG TGT G Eurogentec

Primer: ACT-1135-R

Sequenz: CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T Eurogentec

Sonde: ACT-1081-1105-YAK

Sequenz: YakimaYellow-TCG CTG TCC ACC TTC Eurogentec
CAG CAG ATG T-BHQ1

2.2.4 Verbrauchsmaterial

30-ml Plastikschaubröhrchen (Nr. 62543001)	Sarstedt
Auramin O (SS-061CA)	Kreienbaum
Cellstar 24 Well Cell Culture Plates (Nr. 662160)	Greiner bio-one
Einmalimpfösen (Nr. EA90.1)	Roth
Einmalpinzetten (Nr. 504000)	J. Söllner
Einmalskalpelle (Nr. 5518091)	Aesculap AG
Fluorescence Decolorizer Concentrate (Nr. SS161AF)	Kreienbaum
Glaskügelchen Durchmesser 250 μ m (Nr. 59202)	Sigma-Aldrich
Glaskügelchen Durchmesser 5 mm / 3 mm / 1 mm (Nr. Z143944 / Z143928 / Z273619)	Sigma-Aldrich
Methylen Blau (Nr. SS-061BMB)	Kreienbaum
MicroAmp [®] 96-Well Optical Reaction-Plate (Nr. 4306737)	Applied Biosystems
MicroAmp [®] Optical Adhesive Film (Nr. 4311971)	Applied Biosystems
Mikro-Schaubröhrchen, 1,5 ml und 2 ml , PP (Nr. 72692005 bzw. 72693005)	Sarstedt
Objektträger (Nr. 030060)	R. Langenbrinck

Pathologie-Schraubgefäße 100 ml mit Deckel (Nr: 053653)	Kabe Labortechnik
Petri-Schalen (Nr. EL491)	Sarstedt
Pipettenspitzen, Dualfilter, PCR clean/sterile	Eppendorf
QuantiFERON®-TB Gold In-Tube Röhrchen (Nr. 05900301)	Cellestis
Safe-Lock® Tubes, 1,5 ml und 2 ml (Nr. 0030121589 bzw. 0030121597)	Eppendorf
Salzleckstein „salec“ 10 kg	Südsalz
Stahlkügelchen, Durchmesser 5 mm (Nr. 69989)	Qiagen
Transferpipetten, 3,5 ml (Nr. 861170010)	Sarstedt

frischer Rinderspeichel aus dem Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim

2.2.5 Geräte

BACTEC™ MGIT™ 960 Bebrütungssystem	Becton Dickinson
Densimat	bioMérieux
Ein- und Mehrkanalpipetten	Eppendorf
Fluoreszenzmikroskop LaborLux	Leitz
Megafuge 1.0	Thermo Electron
Mikrohomogenisatoren (Nr. K9941)	Roth
Mikrotiterplatten-Photometer “Sunrise Basic” mit Filter 450 nm und 620 – 650 nm	Tecan
Multifuge 3s	Heraeus
Real-time PCR-Gerät Mx3005P™	Stratagene
Thermomixer comfort	Eppendorf
TissueLyser LT	QIAGEN
Ultraschallbad T460H	Elma, Singen

Waschgerät „hydroflex“	Tecan
Zentrifuge 5417C (1,5 / 2 ml)	Eppendorf
Zentrifuge 5804 mit Ausschwingrotor A-4-44	Eppendorf

2.2.6 Labor-Kits

BOVIGAM <i>Mycobacterium bovis</i> Gamma Interferon Test Kit for Cattle (Nr. 63316) Kit Lot 6331601901 und 6332600601	Prionics
DNA Blood & Tissue Kit (Nr. 69506)	QIAGEN
GenoType [®] MTBC (Nr. 301)	HAIN Lifescience
GenoType [®] Mycobacteria Direct (Nr. 4000GTX)	HAIN Lifescience
GenoType [®] Mycobacterium AS (Nr. 298)	HAIN Lifescience
GenoType [®] Mycobacterium CM (Nr. 299)	HAIN Lifescience
Quantitect Multiplex PCR Kit No ROX 200 (Nr. 204743)	QIAGEN
LOOXSTER [®] (Nr. 2010010020)	SIRS-Lab

2.2.7 Software

MxPro™ QPCR Software	Stratagene
PASW [®] Statistics 18	IBM [®]
PrioPresto	PlugIt

3 Untersuchungsmethoden

3.1 Pathologisch-anatomische Untersuchung und Probennahme beim Rotwild

Frische oder gekühlte Proben wurden zeitnah weiter verarbeitet, eingefrorene Proben wurden vor der weiteren Bearbeitung über zirka 24 Stunden bei Raumtemperatur aufgetaut.

Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung wurden die Form, die Beschaffenheit und die Oberfläche der Organe im Gesamtüberblick

beurteilt. Danach wurden die Tonsillen, Retropharyngeal-, Mediastinal-, Lungen-, Mesenterial- und Ileoazälymphknoten pathologisch-anatomisch untersucht und in jedem Fall jeweils zwei Proben für weitere Untersuchungen entnommen. Eine Probe wurde in vierprozentiger Formaldehydlösung für die pathologisch-histologische Untersuchung fixiert, die zweite Probe noch am selben Tag der kulturellen Untersuchung (vgl. 3.4) zugeführt. Die Lunge wurde palpatorisch auf Verhärtungen geprüft und anschließend in ca. 0,5 bis 1 cm dicke Scheiben geschnitten und die Schnittflächen adspektorisch auf verdächtige Herde untersucht. Organproben der Lunge wurden nur entnommen, wenn das Lungengewebe verdächtige Veränderungen aufwies.

Angesichts der großen Anzahl der Proben wurde die pathologisch-histologische Untersuchung nur für Organe von in der Kultur positiven Tieren durchgeführt. Die in Formalin eingelegten Proben wurden routinemäßig aufgearbeitet und die Gewebeschnitte jeweils einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowie einer Färbung nach Fite-Faraco (FARACO, 1938; FITE et al., 1947) unterzogen. Die Färbung nach Fite-Faraco wurde gewählt, da es sich um eine sehr schonende Methode handelt, die sich erfahrungsmäßig gut eignet für Mykobakterien, deren Wachshülle durch das Entparaffinieren der Schnitte womöglich in Mitleidenschaft gezogen würde.

3.2 Molekularbiologischer Nachweis von Erregern des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes direkt aus Gewebeproben

3.2.1 Real-time PCR zum Nachweis von DNA von Erregern des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes in Gewebe

3.2.1.1 Lyse des Gewebes und DNA-Extraktion

Ein reiskorngroßes Stück des zu untersuchenden Gewebes wurde mit einem Einmalskalpell fein zerkleinert und in ein 2 ml Mikroschraubröhrchen mit einem Stahlkugelchen (Durchmesser 5 mm) gegeben. Falls eine Läsion sichtbar war, wurde das Gewebestück aus dem gesunden Gewebe vom Rand der Läsion entnommen, da an dieser

Stelle die Anwesenheit von Mykobakterien wahrscheinlich, die Lyse des Gewebes jedoch nicht durch Verkalkungen behindert ist. 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase (aus dem DNeasy Blood & Tissue Kit) wurden zugegeben, der Ansatz für 2 mal 3 Minuten bei 30 Hertz im Tissue Lyser homogenisiert und 2 bis 18 Stunden bei 56 °C im Thermomixer inkubiert. Zur Inaktivierung der Mykobakterien wurde der Ansatz bei 98 °C über mindestens 15 Minuten im Thermomixer erhitzt.

Anschließend wurde die DNA-Extraktion mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Lediglich am Ende der Extraktion wurde nach einer Arbeitsanweisung des Friedrich-Loeffler-Instituts wie folgt modifiziert: 200 µl AE-Puffer wurden fünf Minuten auf der Säule belassen, danach wurde zentrifugiert, das Filtrat nochmals auf die gleiche Säule gegeben und vor dem endgültigen Abzentrifugieren nochmals für 5 Minuten inkubiert. Das Filtrat enthielt gereinigte DNA, die anschließend in der PCR eingesetzt werden konnte.

Versuche zur Verbesserung dieser Methode

Um festzustellen, ob Veränderungen der Lysemethode oder eine Behandlung der extrahierten DNA mit LOOXSTER® zu einem besseren Nachweis von Mykobakterien-DNA in der PCR führen kann, wurden bezüglich der Lyse des Gewebes mit zwei bereits nach der oben beschriebenen Methode positiv getesteten Lymphknoten verschiedene Versuche durchgeführt. Dazu wurde die vierfache benötigte Menge an Lymphknoten jeweils mit dem Einmalskalpell so zerkleinert und vermischt, dass man nach der Trennung in die vier unterschiedlich zu behandelnden Teile davon ausgehen konnte, womöglich enthaltene Mykobakterien gleichmäßig in den vier Proben verteilt zu haben.

Methode 1

wie oben beschrieben, lysieren über Nacht

Methode 2

wie oben beschrieben, lysieren für zwei Stunden

Methode 3

Zum zerkleinerten Gewebe wurden 360 µl ASL-Puffer und 1 µl DX
40

Antifoaming Reagent gegeben. Geschreddert wurde im Tissue Lyser zuerst 3 Minuten bei 30 Hz mit verschiedenen großen Glaskügelchen (eines mit Durchmesser 5 mm, drei mit Durchmesser 3 mm und einige mit Durchmesser 1 mm), anschließend noch einmal bei der gleichen Einstellung nach Zugabe von ca. 100 µl Glaskügelchen mit 250 µm Durchmesser. Danach wurden 20 µl Proteinase zugegeben, alles 10 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend die Mykobakterien durch Erhitzen bei 98 °C über mindestens 15 Minuten inaktiviert.

Methode 4

wie Methode 3, ohne den zweiten Schredderschnitt mit Glaskügelchen mit 250 µm Durchmesser

Mit den Lysaten wurde die DNA-Extraktion mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit wie oben beschrieben durchgeführt. 5 µl des Filtrats wurden sofort für die Real-time PCR verwendet. Das restliche Filtrat (195 µl) wurde einer DNA-Anreicherung mit LOOXSTER[®] unterzogen und anschließend 5 µl davon in der Real-time PCR eingesetzt. Das LOOXSTER[®] Kit wurde gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet.

3.2.1.2 Real-time PCR

Die PCR wurde nach der Vorschrift der Amtlichen Methodensammlung des FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUTS (2010) durchgeführt und ausgewertet. Es werden gleichzeitig zwei PCRs durchgeführt: „Real-time PCR MTC – IS1081 + IC (duplex)“ (IC = intern control) zum Nachweis von IS1081 und „Real-time PCR MTC – HELI + IC (duplex)“ zum Nachweis der Hypothetischen Helicase (HELI). Für ein positives Ergebnis müssen beide Genorte nachgewiesen werden, der Nachweis nur eines der Genorte liefert ein fragliches Ergebnis. Bei jedem der beiden Ansätze wird als Hemmstoffkontrolle (IC) die genomische DNA des β-Actin-Gens nachgewiesen, um das Vorhandensein von PCR-inhibierenden Stoffen auszuschließen.

3.2.1.2.1 Real-time PCR MTC-IS1081+IC (duplex)-ProtokollReaktionansatz

	Menge	Endkonzentration im Ansatz
RNase freies Wasser	3,5 µl	
2x QuantiTect Multiplex Master Mix	12,5 µl	
MTC-IS1081-5F (100 pmol/µl) CTC TCG ACG TTC ATC GCC G		0,8 pmol/µl
MTC-IS1081-5R (100 pmol/µl) TGG CGG TAG CCG TTG CGC		0,8 pmol/µl
MTC-IS1081-5FAM (100 pmol/µl) FAM-ATT GGA CCG CTC ATC GCT GCG TTC-BHQ1		0,1 pmol/µl
ACT2-1030-F_DNA (100 pmol/µl) AGC GCA AGT ACT CCG TGT G		0,2 pmol/µl
ACT-1135-R (100 pmol/µl) CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T		0,2 pmol/µl
ACT-1081-1105-YAK (100 pmol/µl) Yakima Yellow-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-BHQ1		0,1 pmol/µl
Master-Mix	20,0 µl	
Template-Probe	5,0 µl	
Totalvolumen Reaktionsansatz	25,0 µl	

Die Primer und Sonden wurden in 0,1x TE-Puffer pH 8,0 gelöst.

3.2.1.2.2 Real-time PCR MTC-HELI+IC (duplex)-ProtokollReaktionsansatz

	Menge	Endkonzentration im Ansatz
RNase freies Wasser	3,5 µl	
2x QuantiTect Multiplex Master Mix	12,5 µl	
MTC-HELI-4F (100 pmol/µl) TTG ATC AGG TCG ACG ATG TAG		0,8 pmol/µl
MTC-HELI-4R (100 pmol/µl) TCA CCA CCG ACA AAG CGT C		0,8 pmol/µl
MTC-HELI-4FAM (100 pmol/µl) FAM-TCA ACG ACC CCA ACG ACT GGT GC-BHQ1		0,1 pmol/µl
ACT2-1030-F_DNA (100 pmol/µl) AGC GCA AGT ACT CCG TGT G		0,2 pmol/µl
ACT-1135-R (100 pmol/µl) CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T		0,2 pmol/µl
ACT-1081-1105-YAK (100 pmol/µl) Yakima Yellow-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-BHQ1		0,1 pmol/µl
Master-Mix	20,0 µl	
Template-Probe	5,0 µl	
Totalvolumen Reaktionsansatz	25,0 µl	

Die Primer und Sonden wurden in 0,1x TE-Puffer pH 8,0 gelöst.

3.2.1.2.3 Cyclor-Programm für die Real-time PCR

Für beide PCRs wird das gleiche Cyclor-Programm verwendet:

Aktivierung der HotStar Taq DNA-Polymerase bei 95 °C für 15 min;
anschließend 45 Zyklen mit folgendem Profil:

Denaturierung	95 °C	60 sec
Primer-Hybridisierung (Annealing)	60 °C	30 sec
Elongation	72 °C	30 sec

3.2.2 GenoType[®] Mycobacteria Direct von HAIN Lifescience

Der Nachweis von Mykobakterien des MTC direkt aus Gewebe wurde für Rinder-Gewebeproben parallel zur Real-time PCR auch mit dem Geno-

Type[®] Mycobacteria Direct-Test der Firma HAIN Lifescience durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde dekontaminiertes Material aus der Vorbereitung der Gewebeproben für den kulturellen Nachweis (vgl. 3.4) verwendet. Der Test wurde gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet.

3.3 Mikroskopischer Nachweis von Mykobakterien

Für den mikroskopischen Nachweis wurde Material aus der Vorbereitung der Gewebeproben für den kulturellen Nachweis (vgl. 3.4) auf einen Objektträger aufgebracht und zu einer möglichst dünnen Schicht ausgezogen.

Der Objektträger wurde nach dem Lufttrocknen in der Gasflamme hitzefixiert und zur Inaktivierung der Mykobakterien für 20 Minuten bei 98 °C im Brutschrank inkubiert. Das Präparat wurde einer Auramin-Fluoreszenzfärbung (nach ISENBERG, 2004) unterzogen und anschließend im Fluoreszenzmikroskop auf säurefeste Stäbchen untersucht.

3.4 Kultureller Nachweis von Mykobakterien aus Gewebeproben

Von jeder Einzelorganprobe wurde ein ca. 1 cm³ großes Stück Gewebe mit dem Skalpell fein zerkleinert, in ein 30-ml Plastikschraubröhrchen gegeben, mit physiologischer Kochsalzlösung auf 5 ml aufgefüllt und mit einem Mikrohomogenisator homogenisiert. Zum Dekontaminieren wurde mit NALC auf 10 ml aufgefüllt, gründlich gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei 250 U/min inkubiert. Sofort anschließend wurde zur Neutralisation der NALC-Lösung 20 ml Sörensen-Puffer zugegeben und gründlich gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 3.500 U/min für 20 Minuten wurde der Überstand verworfen.

Bei den Rinderproben wurde für den mikroskopischen Nachweis mit einer Einmalöse aus dem Pellet ein Ausstrich auf einem Objektträger angefertigt und weiter behandelt wie unter 3.3 beschrieben.

Das Pellet wurde bei Rinderproben mit 1,5 ml, bei Rotwildproben mit 1 ml Sörensen-Puffer resuspendiert. Die gut gemischte Suspension wurde wie folgt aufgeteilt:

- 0,5 ml wurden in ein MGIT-Röhrchen mit 800µl Wachstumssupplement PANTA gegeben und im BACTEC™ MGIT™ 960-System inkubiert.
- Je 20 µl wurden auf ein Stonebrink- und ein Löwenstein-Jensen-Festnährmedium gegeben und im Brutschrank bei 37 °C unter aeroben Bedingungen bebrütet.
- Bei Rinderproben wurden 0,5 ml in ein 1,5-ml Mikro-Schraubröhrchen abgenommen und für den GenoType® Mycobacteria Direct-Test verwendet (vgl. 3.2.2)

Im BACTEC™ MGIT™ 960-System werden positive Kulturen durch die Zunahme der Fluoreszenz nach Abnahme des Sauerstoffgehalts automatisch detektiert und angezeigt. Die Festnährböden wurden wöchentlich visuell auf Wachstum von Mykobakterienkulturen überprüft. Falls nach sechs Wochen auf keinem der drei Nährböden Wachstum festgestellt werden konnte, wurde die Kultur als negativ abgeschlossen.

3.5 Molekularbiologische Differenzierung von Mykobakterien aus der Kultur

Sobald in einer Kultur Wachstum festgestellt wurde, wurden von der Flüssigkultur 1,5 ml abgenommen bzw. von der Kultur auf festen Nährböden eine Öse in einem 1,5-ml Mikro-Schraubröhrchen mit 1,5 ml Wasser für Injektionszwecke suspendiert. Nach einer Zentrifugation bei 10.000 U/min für 15 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl Wasser für Injektionszwecke resuspendiert.

Das 1,5-ml Mikro-Schraubröhrchen wurde für 20 Minuten im Thermomixer auf 98 °C erhitzt und danach zum Zellaufschluss für 15 Minuten ins Ultraschallbad gegeben (Ultraschall-Frequenz 35 kHz, Hochfrequenz-Spitzenleistung 170 Watt).

Nach einem Zentrifugationsschritt bei 13.000 U/min für 5 Minuten wurde der Überstand abgenommen und eine Speziesbestimmung mit folgenden Testen der Fa. HAIN Lifescience gemäß deren Vorgaben durchgeführt:

- Der GenoType® Mycobacterium CM grenzt das Vorliegen von Mykobakterien des MTC von dem anderer Mykobakterienarten ab und identifiziert 14 verschiedene atypische Mykobakterienarten.

- Der GenoType[®] MTBC differenziert Mykobakterien des MTC in *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. bovis BCG* und *M. caprae*.
- Der GenoType[®] Mycobacterium AS identifiziert zusätzlich zum GenoType[®] Mycobacterium CM weitere 16 atypische Mykobakterienarten.

Isolate, die mit Hilfe dieser Methoden nicht identifiziert werden konnten, wurden zur weiteren Speziesdifferenzierung mittels Sequenzierung der 16S rRNA an den Sachbereich GE 2.3 des LGL bzw. an das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene an der Universität Regensburg gegeben.

3.6 Molekularepidemiologische Untersuchungen

Die molekularepidemiologische Überprüfung von *M.-caprae*-Isolaten erfolgte mittels MIRU-VNTR an der Sektion Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Universität Innsbruck.

3.7 Tenazität von *Mycobacterium caprae* in salzhaltigem Substrat

Die Überlebensfähigkeit von *M. caprae* im Substrat von Salzlecksteinen wurde wie folgt überprüft.

3.7.1 Vorbereitung

Für diesen Versuch wurden 2-g Salzstücke verwendet, da diese gut in den 30-ml Plastikschraubröhrchen inkubiert und dort direkt für die Vorbereitung zur Kultur weiter verarbeitet werden konnten. Die Menge von 0,3 ml Rinderspeichel pro Ansatz wurde gewählt, weil diese Menge Speichel das Salzstück zwar gut befeuchtet, aber nicht aufweicht. Die Menge an *M. caprae* wurde mehr oder weniger willkürlich ausgewählt, da nicht bekannt ist, welche Mengen an *M. caprae* bei infizierten Tieren mit dem Speichel ausgeschieden werden können. Die Konzentration ist womöglich etwas hoch gewählt, eine zu niedrige Konzentration hätte aber womöglich die damals ohnehin knappe Bebrütungskapazität für die Kulturen im S3-Labor belegt, ohne dass es überhaupt zu einem positiven Ergebnis kommen hätte können.

Ein *M.-caprae*-Stamm, der im Jahr 2010 aus einem Schmaltier aus dem Oberallgäu isoliert wurde, wurde auf sechs Stonebrink-Nährböden angezüchtet, nach einer Anzuchtzeit von vier Wochen abgeerntet, in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und im Densimat auf eine McFarland I-Verdünnung (300.000.000 Keime/ml, standardisiert auf *E. coli*) eingestellt.

Von einem Salzleckstein wurden 27 Stücke von je ca. 2 g abgespalten und je ein Salzstück in ein 30-ml Plastikschraubröhrchen gegeben.

Der Rinderspeichel wurde kurz vor dem Versuch gewonnen. Bei einem Rind im Lehr- und Versuchsgut in Oberschleißheim wurde durch Massage der Kauplatte der Speichelfluss angeregt, ca. 30 ml Speichel in ein Pathologie-Schraubgefäß aufgefangen und umgehend für den Versuch verwendet.

3.7.2 Versuchsdurchführung

Insgesamt 42 30-ml Plastikschraubröhrchen wurden wie folgt bestückt:

- 13 Plastikschraubröhrchen enthielten je ein 2-g Stück des Salzlecksteins und 0,1 ml der McFarland I Verdünnung des *M.-caprae*-Stamms.
- 13 Plastikschraubröhrchen enthielten je ein 2-g Stück des Salzlecksteins, 0,3 ml Rinderspeichel und 0,1 ml der McFarland I Verdünnung des *M.-caprae*-Stamms.
- 13 Plastikschraubröhrchen enthielten je 0,3 ml Rinderspeichel und 0,1 ml der McFarland I Verdünnung des *M.-caprae*-Stamms.
- 1 Plastikschraubröhrchen enthielt nur ein 2-g Stück des Salzlecksteins (Negativkontrolle).
- 1 Plastikschraubröhrchen enthielten nur 0,3 ml Rinderspeichel (Negativkontrolle).
- 1 Plastikröhrchen enthielt nur 0,1 ml der McFarland I Verdünnung des *M.-caprae*-Stamms (Positivkontrolle).

Zusätzlich wurden jeweils 0,1 ml der McFarland I Verdünnung in 12 MGIT-Röhrchen mit jeweils 800µl Wachstumssupplement gegeben.

Die Positiv- und beide Negativkontrollen, sowie der Inhalt je eines der 13 unterschiedlich bestückten 30-ml Plastikschaubröhrchen wurden sofort (Tag 0) dekontaminiert und kultiviert. Dazu wurde jeweils direkt in das 30-ml Plastikschaubröhrchen 5 ml physiologische Kochsalzlösung gegeben und der Inhalt des Röhrchens mit einem Mikrohomogenisator homogenisiert. Ab diesem Punkt des Homogenisierens wurde weiter verfahren wie unter 3.4 beschrieben. Es wurde jedoch nur auf einem Stonebrink-Festnährboden angezüchtet und der mikrobiologische Nachweis wurde nicht mit dem GenoType[®] Mycobacteria Direct-Test, sondern mit der Real-time PCR durchgeführt. Dazu wurde nach einer Zentrifugation bei 10.000 U/min für 15 Minuten der Überstand verworfen und das Pellet mit 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase (aus dem DNeasy Blood & Tissue Kit) resuspendiert. Nach der Inkubation bei 56 °C für mindestens 2 Stunden und der anschließenden Inaktivierung der Mykobakterien durch Erhitzen bei 98 °C über mindestens 15 Minuten wurde die DNA mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit extrahiert und in der Real-time PCR eingesetzt (vgl. 3.2.1).

Die restlichen drei mal zwölf 30-ml Plastikschaubröhrchen wurden so aufgeteilt, dass jeweils vier Röhrchen mit gleichem Inhalt und vier MGIT-Röhrchen bei 31 °C im Brutschrank, bei 20 °C und bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert wurden.

In wöchentlichen Abständen (Tag 7, 14, 21 und 28) wurde der Inhalt von neun Röhrchen angezüchtet wie oben für die Kontrollen beschrieben, und zwar aus jedem der drei unterschiedlichen Temperaturbereiche jeweils drei Röhrchen mit den drei unterschiedlichen Inhalten. Dazu wurde in jeder Woche aus jedem Temperaturbereich ein MGIT-Röhrchen zum Bebrüten in das BACTEC[™] MGIT[™] 960-System gegeben.

3.8 Untersuchung von Blutproben mit dem BOVIGAM[®]-Test (Nachweis von Interferon- γ)

Insgesamt 244 Blutproben von 173 Rindern wurden im Bovigam[®]-Test untersucht. Das Testprinzip ist der Nachweis einer spezifischen Ausschüttung von Interferon- γ durch T-Lymphozyten nach Restimulierung mit Mykobakterien-Antigen. Die Menge des ausgeschütteten Interferon- γ

wird mittels ELISA bestimmt. Für den Test wurde heparinisiertes Vollblut, das bei 22 ± 5 °C gelagert wurde, innerhalb von 18 Stunden nach Entnahme bearbeitet.

Stimulierung der Blutproben

Im Labor wurden die Blutproben vorsichtig durchgemischt und in einer sterilen 24 Well-Zellkultur-Platte in vier Portionen à 1,5 ml aufgeteilt. Zu jeweils einem der vier Aliquots wurde zugegeben:

- 0,1 ml Bovine PPD Stimulation Antigen (0,3 mg/ml) (= PPD-B)
- 0,1 ml Avian PPD Stimulation Antigen (0,3 mg/ml) (= PPD-A)
- 0,1 ml PBS (Negativkontrolle = NIL)
- Lectin aus *Phytolacca americana* (PWM = Pokeweed mitogen), Endkonzentration in der Blutprobe 5 µl/ml (Positivkontrolle)

Bei 34 der im BOVIGAM[®]-Test getesteten Blutproben wurde die Stimulation der T-Lymphozyten parallel zur oben beschriebenen Methode zusätzlich mit den Antigenen des QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube-Tests (Test zum immunologischen Nachweis einer Infektion mit *M. tuberculosis* beim Menschen) vorgenommen. Nach Erteilung einer entsprechenden Ausnahmegenehmigung nach § 17c Abs. 4 Nr. 1 Tierseuchengesetz durch das StMUG wurden die Rinder hierfür willkürlich ausgewählt.

Es wurde jeweils 1 ml Rinderblut in jedes der drei QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube-Röhrchen gegeben, von denen eines mit MTC-spezifischen Antigenen (Mixtur aus synthetischen Peptiden der Proteine ESAT-6, CFP-10 und TB7.7) beschichtet ist, ein zweites mit Mitogen (Positivkontrolle) und ein drittes Röhrchen als Negativkontrolle unbeschichtet ist.

Die stimulierten Blutproben wurden für 16 bis 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.9 Durchführung des BOVIGAM[®] ELISA und Auswertung des BOVIGAM[®]-Tests

Der Nachweis des bovinen Interferon- γ erfolgte im rinderspezifischen BOVIGAM[®]-ELISA nach Angaben des Herstellers.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm PrioPresto. Neben der Messung der OD-Werte (OD = optical density) der einzelnen Proben überprüfte das Programm sowohl die Validität der Messung der kompletten ELISA-Platte durch Kontrolle der testinternen Positiv- und Negativkontrollen als auch die Validität der einzelnen Plasmaproben anhand der Positiv- (PWM) und Negativkontrolle (NIL).

Ein zu geringer OD-Wert der Positivkontrolle zeigt eine Schädigung der Lymphozyten oder nicht reaktive Lymphozyten des Wirtes (Immunsuppression, zum Beispiel in der Niederbruchsphase oder durch Medikamente) an, ein zu hoher OD-Wert der Negativkontrolle eine unspezifische Reaktion der T-Lymphozyten (zum Beispiel Stimulation durch Verunreinigung). Beides führt dazu, dass die Messung dieser Proben ungültig wird. Bei ungültigen Messwerten wurde der Bovigam[®]-ELISA aus den Plasmaproben wiederholt. Ein dennoch nicht auswertbares Ergebnis lag bei 3 der 244 Proben vor.

Die gültigen Tests wurden weiter ausgewertet. Eine positive Reaktion lag vor, wenn die Differenz der ODs der mit PPD-B stimulierten Probe und der Negativkontrolle (OD (PPD-B) – OD (NIL)) und der mit PPD-B stimulierten Probe und der mit PPD-A stimulierten Probe (OD (PPD-B) – OD (PPD-A)) $\geq 0,1$ war. Eine negative Reaktion lag vor, wenn die Differenz der ODs der mit PPD-B stimulierten Probe und der Negativkontrolle oder der mit PPD-B stimulierten Probe und der mit PPD-A stimulierten Probe $< 0,1$ war.

4 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm PASW[®] Statistics 18 (Version 18.0.0, IBM[®]) durchgeführt.

Alle Tests wurden zweiseitig zum Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$ durchgeführt. Ist die Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) kleiner oder gleich dem Signifikanzniveau α , bestehen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

4.1 Sensitivität

Die Sensitivität gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein infiziertes Tier auch tatsächlich als positiv erkannt wird (GLAS et al., 2003):

Sensitivität = Anzahl der richtig Positiven/Anzahl aller Positiven

4.2 Spezifität

Die Spezifität gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein nicht infiziertes Tier auch tatsächlich als negativ erkannt wird (GLAS et al., 2003):

Spezifität = Anzahl der richtig Negativen/Anzahl aller Negativen

4.3 Diagnostic Odds Ratio

Odds sind Quotienten aus der Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis A eintritt ($P(A)$) und der Wahrscheinlichkeit, dass es nicht eintritt ($1-P(A)$).

Die Diagnostic Odds Ratios (DOR) sind die Quotienten aus den Odds der richtig Positiven und den Odds der falsch Positiven. Die DOR kann als einzelne Maßzahl zur Beschreibung der Testgüte verwendet werden, da ein enger Zusammenhang zu anderen Gütekriterien besteht, z.B. $DOR = (Anzahl\ der\ richtig\ Positiven / Anzahl\ der\ falsch\ Negativen) / (Anzahl\ der\ falsch\ Positiven / Anzahl\ der\ richtig\ Negativen) = (Sensitivität / (1-Sensitivität)) / (1-Spezifität) / Spezifität$.

Der Wertebereich der DOR erstreckt sich von 0 bis $+\infty$, wobei Werte < 1 bedeuten, dass eine Fehlinterpretation der Testergebnisse erfolgt und Werte $= 1$, dass der Test keine Diskriminationsfähigkeit besitzt. Je größer die Werte der DOR, umso besser ist die Testgüte. Die DOR kann auf verschiedene Arten berechnet werden, zum Beispiel: $DOR = (Anzahl\ der\ richtig\ Positiven / Anzahl\ der\ falsch\ Negativen) / (Anzahl\ der\ falsch\ Positiven / Anzahl\ der\ richtig\ Negativen)$ oder $(Sensitivität / (1-Sensitivität)) / (1-Spezifität) / Spezifität$ (GLAS et al., 2003).

4.4 Tests für Lagealternativen

Der t -Test für unabhängige Stichproben prüft, ob sich zwei unabhängige, normalverteilte Stichproben hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz unterscheiden.

Für verbundene Stichproben wird der t -Test für abhängige Stichproben verwendet, falls die Differenzen der Variablenwerte normalverteilt sind. Liegt keine Normalverteilung vor oder handelt es sich um kleine Stichproben, sollten nonparametrische Verfahren durchgeführt werden.

Als nonparametrisches Pendant zum t -Test für unabhängige Stichproben dient der Mann-Whitney-U-Test, bei verbundenen Stichproben prüft der nonparametrische Wilcoxon-H-Test, ob Unterschiede hinsichtlich der zentralen Tendenz bestehen (FAHRMEIR et al., 2010; BORTZ et al., 2000).

Box Plots

Die Box-Plots zeigen das Minimum, das untere Quartil, den Median, das obere Quartil und das Maximum der Werte (FAHRMEIR et al., 2010):

Die dunkle Linie in der Mitte der Box zeigt den Median. Im unteren Bereich der Box wird das untere Quartil dargestellt, in dem 25 % aller Werte liegen, im oberen Bereich das obere Quartil, in dem ebenfalls 25 % aller Werte liegen. Innerhalb der Box liegen also 50 % der Werte. Innerhalb der Whisker (T-Balken) und der Box liegen bei einer Normalverteilung 95 % der Daten. Ausreißer sind durch Punkte, extreme Ausreißer durch Sterne gekennzeichnet.

4.5 Analyse von Häufigkeiten

Der χ^2 -Test für Kontingenztafeln testet auf Häufigkeitsunterschiede zwischen unabhängigen Stichproben, wobei mindestens 80 % der erwarteten Häufigkeiten größer fünf und keine der erwarteten Häufigkeiten gleich null sein sollten. Sind die Voraussetzungen für den χ^2 -Test nicht erfüllt, erfolgt die Analyse mit dem exakten Test nach Fisher. Für den Vergleich von mehr als zwei Stichproben wird der Fisher-Freeman-Halton-Test verwendet (BORTZ et al., 2000).

IV ERGEBNISSE

1 Vergleich von verschiedenen Methoden der Gewebe- und DNA-Aufbereitung

Zwei Rinderlymphknoten (ein Darm- und ein Lungenlymphknoten) wurden mit vier verschiedenen Methoden (M1 bis M4) lysiert. Dabei wurden der eingesetzte Puffer, die Größe der Glaskügelchen zur Homogenisierung sowie die Zeitdauer des Proteinase-Verdaus variiert. Die DNA wurde sowohl direkt als auch nach einer DNA-Anreicherung mit LOOXSTER[®] in der Real-time PCR eingesetzt. Zum Vergleich der Effektivität der verschiedenen Methoden zur Lyse des Gewebes und der DNA-Anreicherung mit LOOXSTER[®] wurden die CT-Werte der Real-time PCR verglichen (CT = cycle threshold = Zyklenzahl, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Fluoreszenz über das Grundrauschen ermittelt wird).

Die CT-Werte zwischen den verschiedenen Lysemethoden unterschieden sich kaum, die Behandlung mit LOOXSTER[®] führte jedoch beim Nachweis der Genorte IS1081 und HELI bei drei von vier Proben des Darmlymphknotens tendenziell zu einer Verbesserung der CT-Werte (vgl. Tab. IV.1). Beim Lungenlymphknoten konnten die Genorte IS1081 und HELI in keiner der vier Proben – weder vor noch nach DNA-Anreicherung – nachgewiesen werden (vgl. Tab. IV.2), obwohl in einer früheren Untersuchung dieses Lymphknotens bereits beide Mykobakteriengene nachgewiesen worden waren.

Tab. IV.1 Ergebnisse der Real-time PCR (Angabe der CT-Werte) zum Vergleich verschiedener Gewebelyseverfahren und der DNA-Anreicherung mit LOOXSTER® bei einem Darmlymphknoten vom Rind; M1-M4 = Methode 1 bis 4

	Darmlymphknoten Rind							
	PCR-Ergebnis vor LOOXSTER®				PCR-Ergebnis nach LOOXSTER®			
	IS1081 MTC	HELI MTC	IS1081 β-Actin	HELI β-Actin	IS1081 MTC	HELI MTC	IS1081 β-Actin	HELI β-Actin
M1	29.25	29.11	21.06	21.12	25.90	26.47	18.58	18.54
M2	29.88	29.82	21.09	20.79	26.82	27.09	18.52	18.18
M3	30.59	30.35	20.67	20.66	27.05	27.60	17.92	17.58
M4	29.84	29.94	19.76	20.27	30.96	31.22	21.64	21.49

Tab. IV.2 Ergebnisse der Real-time PCR (Angabe der CT-Werte) zum Vergleich verschiedener Gewebelyseverfahren und der DNA-Anreicherung mit LOOXSTER® bei einem Lungenlymphknoten vom Rind; M1-M4 = Methode 1 bis 4

	Lungenlymphknoten Rind							
	PCR-Ergebnis vor LOOXSTER®				PCR-Ergebnis nach LOOXSTER®			
	IS1081 MTC	HELI MTC	IS1081 β-Actin	HELI β-Actin	IS1081 MTC	HELI MTC	IS1081 β-Actin	HELI β-Actin
M1	No CT	No CT	20.46	20.22	No CT	No CT	20.88	20.98
M2	No CT	No CT	21.01	20.86	No CT	No CT	19.08	19.21
M3	No CT	No CT	20.27	20.28	No CT	No CT	17.61	17.49
M4	No CT	No CT	30.03	20.09	No CT	No CT	17.83	18.93

2 Vergleich verschiedener Nachweisverfahren bei der Untersuchung von Gewebeproben

Von den 361 Organproben von Rindern lagen eindeutige und auswertbare Ergebnisse vor bei

- 352 Proben in der pathologisch-anatomischen Untersuchung,
- 361 Proben in der mikroskopischen sowie der kulturellen Untersuchung,
- 341 Proben in der Untersuchung mittels Real-time PCR
- 268 Proben in der Untersuchung mittels GenoType[®] Mycobacteria Direct-Test.

Alle Untersuchungsergebnisse sind nach Art der Organproben sortiert in den Tabellen IV.3 bis IV.14 aufgeführt.

In der kulturellen Untersuchung konnte bei 39 der 361 Organproben *M. caprae* nachgewiesen werden, andere Erreger des MTC wurden aus keiner Organprobe nachgewiesen. *M. caprae* wurde nachgewiesen in

- 7 von 26 Darmlymphknoten,
- 1 von 51 Euterlymphknoten,
- 7 von 38 Leberlymphknoten,
- 9 von 55 Lungenlymphknoten,
- 7 von 56 Mediastinallymphknoten,
- 2 von 60 Retropharyngeallymphknoten,
- 4 von 59 Lungenproben,
- 1 von 5 Tonsillenproben und
- 1 von 7 Lymphknotenpools.

In einer Leber-, einer Nieren- und zwei Thymusproben wurde *M. caprae* nicht nachgewiesen.

Mit der Kultur als Referenz (Goldstandard) wurden für die Untersuchungsmethoden GenoType[®] Mycobacteria Direct-Test und Real-time PCR die Sensitivität und Spezifität sowie die DOR sowohl für alle Gewebeproben (vgl. Tab IV.15) als auch nur für die typisch pathologisch-anatomisch veränderten Gewebeproben (vgl. Tab. IV.16) berechnet.

Sensitivität und Spezifität einzelner Nachweismethoden

Beim Vergleich der Diagnosemethoden wurde bei der Real-time PCR eine Sensitivität von 59 %, beim GenoType® Mycobacteria Direct-Test eine Sensitivität von 41 % und bei der Mikroskopie (Nachweis säurefester Stäbchen) eine Sensitivität von 50 % festgestellt. Die Spezifität lag jeweils bei 99 %.

Sensitivität und Spezifität einzelner Nachweismethoden unter der Voraussetzung eines positiven Ergebnisses in der pathologisch-anatomischen Untersuchung

Unter der Voraussetzung, dass in der pathologisch-anatomische Untersuchung tuberkuloseartige Veränderungen festgestellt werden konnten, lag die Sensitivität der Real-time PCR bei 68 % (n = 36), des GenoType® Mycobacteria Direct-Tests bei 48 % (n = 41), der Mikroskopie (Nachweis säurefester Stäbchen) bei 59 % (n = 42). Die Spezifitäten lagen jeweils bei 75 % bzw. 63 % bzw. 88 %.

Tab. IV.3 Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Darmlymphknoten von Rindern (n = 26)

Anzahl Proben	Mikroskopie	GenoType® Mycobacteria Direct	Real-time PCR	Kultur	pathologisch-anatomische Untersuchung
11	negativ	---	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
4	negativ	negativ	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
4	positiv	MTC	MTC	M. caprae	Hinweis auf TB
1	negativ	nicht auswertbar	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
1	negativ	MTC	MTC	M. caprae	Hinweis auf TB
1	positiv	negativ	MTC	M. caprae	Hinweis auf TB
1	positiv	negativ	MTC	negativ	Hinweis auf TB
1	positiv	MTC	MTC	negativ	Hinweis auf TB
1	positiv	MTC	fraglich	M. caprae	Hinweis auf TB
1	negativ	---	nicht auswertbar	negativ	kein Hinweis auf TB

positive Mikroskopie = Nachweis von säurefesten Stäbchen; negative Kultur = keine Erreger des MTC nachgewiesen; --- = nicht durchgeführt

Tab. IV.4 Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Organprobe von der Leber eines Rindes (n = 1)

Anzahl Proben	Mikroskopie	GenoType [®] Mycobacteria Direct	Real-time PCR	Kultur	pathologisch-anatomische Untersuchung
1	negativ	MTC	negativ	negativ	Hinweis auf TB

negative Kultur = keine Erreger des MTC nachgewiesen; --- = nicht durchgeführt

Tab. IV.5 Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Euterlymphknoten von Rindern (n = 51)

Anzahl Proben	Mikroskopie	GenoType [®] Mycobacteria Direct	Real-time PCR	Kultur	pathologisch-anatomische Untersuchung
38	negativ	negativ	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	negativ	<i>M. caprae</i>	kein Hinweis auf TB
2	negativ	nicht auswertbar	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
9	negativ	---	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
1	negativ	---	nicht auswertbar	negativ	kein Hinweis auf TB

negative Kultur = keine Erreger des MTC nachgewiesen; --- = nicht durchgeführt

Tab. IV.6 Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Leberlymphknoten von Rindern (n = 38)

Anzahl Proben	Mikroskopie	GenoType [®] Mycobacteria Direct	Real-time PCR	Kultur	pathologisch-anatomische Untersuchung
15	negativ	negativ	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
8	negativ	---	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
3	negativ	negativ	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
2	negativ	negativ	negativ	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
2	negativ	nicht auswertbar	nicht auswertbar	negativ	kein Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	MTC	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	fraglich	negativ	kein Hinweis auf TB
1	positiv	MTC	MTC	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	negativ	<i>M. caprae</i>	kein Hinweis auf TB
1	negativ	nicht auswertbar	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	negativ	<i>M. caprae</i>	kein Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	nicht auswertbar	negativ	kein Hinweis auf TB
1	positiv	negativ	negativ	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB

positive Mikroskopie = Nachweis von säurefesten Stäbchen; negative Kultur = keine Erreger des MTC nachgewiesen; --- = nicht durchgeführt

Tab. IV.7 Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Organproben von Lungen von Rindern (n = 59)

Anzahl Proben	Mikroskopie	GenoType [®] Mycobacteria Direct	Real-time PCR	Kultur	pathologisch-anatomische Untersuchung
39	negativ	negativ	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
2	positiv	MTC	MTC	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
1	positiv	MTC	negativ	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
1	positiv	MTC	MTC	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	negativ	negativ	Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	nicht auswertbar	negativ	kein Hinweis auf TB
1	negativ	nicht auswertbar	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	negativ	negativ	fraglich
11	negativ	---	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
1	negativ	---	nicht auswertbar	negativ	kein Hinweis auf TB

positive Mikroskopie = Nachweis von säurefesten Stäbchen; negative Kultur = keine Erreger des MTC nachgewiesen; --- = nicht durchgeführt

Tab. IV.8 Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Lungenlymphknoten von Rindern (n = 55)

Anzahl Proben	Mikroskopie	GenoType [®] Mycobacteria Direct	Real-time PCR	Kultur	pathologisch-anatomische Untersuchung
31	negativ	negativ	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
6	negativ	---	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
3	negativ	---	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
2	positiv	negativ	MTC	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
2	negativ	negativ	fraglich	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
2	negativ	negativ	negativ	negativ	Hinweis auf TB
2	negativ	negativ	negativ	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
2	negativ	---	nicht auswertbar	negativ	kein Hinweis auf TB
1	negativ	MTC	MTC	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	MTC	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
1	positiv	negativ	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
1	negativ	nicht auswertbar	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	MTC	<i>M. caprae</i>	fraglich

positive Mikroskopie = Nachweis von säurefesten Stäbchen; negative Kultur = keine Erreger des MTC nachgewiesen; --- = nicht durchgeführt

Tab. IV.9 Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Lymphknoten-Pools von Rindern (n = 7)

Anzahl Proben	Mikroskopie	GenoType [®] Mycobacteria Direct	Real-time PCR	Kultur	pathologisch-anatomische Untersuchung
6	negativ	negativ	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
1	positiv	MTC	fraglich	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB

positive Mikroskopie = Nachweis von säurefesten Stäbchen; negative Kultur = keine Erreger des MTC nachgewiesen

Tab. IV.10 Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Mediastinallymphknoten von Rindern (n = 56)

Anzahl Proben	Mikroskopie	GenoType [®] Mycobacteria Direct	Real-time PCR	Kultur	pathologisch-anatomische Untersuchung
32	negativ	negativ	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
12	negativ	---	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
2	negativ	nicht auswertbar	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	negativ	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	negativ	negativ	Hinweis auf TB
1	negativ	MTC	MTC	negativ	Hinweis auf TB
1	negativ	MTC	MTC	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	MTC	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	negativ	negativ	fraglich
1	positiv	MTC	MTC	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
1	positiv	negativ	negativ	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
1	positiv	nicht auswertbar	negativ	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	negativ	<i>M. caprae</i>	kein Hinweis auf TB

positive Mikroskopie = Nachweis von säurefesten Stäbchen; negative Kultur = keine Erreger des MTC nachgewiesen; --- = nicht durchgeführt

Tab. IV.11 Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Organprobe von einer Niere eines Rindes (n = 1)

Anzahl Proben	Mikroskopie	GenoType [®] Mycobacteria Direct	Real-time PCR	Kultur	pathologisch-anatomische Untersuchung
1	negativ	negativ	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB

negative Kultur = keine Erreger des MTC nachgewiesen

Tab. IV.12 Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Retropharyngeallymphknoten von Rindern (n = 60)

Anzahl Proben	Mikroskopie	GenoType [®] Mycobacteria Direct	Real-time PCR	Kultur	pathologisch-anatomische Untersuchung
37	negativ	negativ	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
10	negativ	----	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
4	negativ	nicht auswertbar	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
2	negativ	negativ	nicht auswertbar	negativ	kein Hinweis auf TB
2	negativ	---	nicht auswertbar	negativ	kein Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	negativ	negativ	fraglich
1	negativ	negativ	fraglich	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
1	positiv	MTC	fraglich	<i>M. caprae</i>	Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	fraglich	verunreinigt	Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	negativ	negativ	Hinweis auf TB

positive Mikroskopie = Nachweis von säurefesten Stäbchen; negative Kultur = keine Erreger des MTC nachgewiesen; --- = nicht durchgeführt

Tab. IV.13 Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Organproben vom Thymus von Rindern (n = 2)

Anzahl Proben	Mikroskopie	GenoType [®] Mycobacteria Direct	Real-time PCR	Kultur	pathologisch-anatomische Untersuchung
2	negativ	negativ	negativ	negativ	fraglich

negative Kultur = keine Erreger des MTC nachgewiesen

Tab. IV.14 Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Organproben von den Tonsillen von Rindern (n = 5)

Anzahl Proben	Mikroskopie	GenoType [®] Mycobacteria Direct	Real-time PCR	Kultur	pathologisch-anatomische Untersuchung
4	negativ	negativ	negativ	negativ	kein Hinweis auf TB
1	negativ	negativ	negativ	<i>M. caprae</i>	fraglich

negative Kultur = keine Erreger des MTC nachgewiesen

Tab. IV.15: Ergebnisse der Validität der Diagnosemethoden GenoType® Mycobacteria Direct-Test und Real-time PCR (bezogen auf das Ergebnis der Kultur; n = 268 bzw. 341 Organproben); 95 %-Konfidenzintervall in eckigen Klammern

	GenoType® Mycobacteria Direct- Test	Real-time PCR
Diagnostic Odds Ratio (DOR)	52,41 [14,20; 193,37]	217,86 [46,28; 1025,53]
Sensitivität	0,41 [0,26; 0,58]	0,59 [0,41; 0,75]
Spezifität	0,99 [0,96; 1,00]	0,99 [0,98; 1,00]

Tab. IV.16 Ergebnisse der Validität der Diagnosemethoden GenoType® Mycobacteria Direct-Test und Real-time PCR unter der Voraussetzung, dass in der pathologisch-anatomischen Untersuchung typische Veränderungen festgestellt werden konnten (bezogen auf das Ergebnis der Kultur; n = 41 bzw. 36 Organproben); 95 %-Konfidenzintervall in eckigen Klammern

	GenoType® Mycobacteria Direct- Test	Real-time PCR
Diagnostic Odds Ratio (DOR)	1,57 [0,32; 7,66]	6,33 [1,06; 37,78]
Sensitivität	0,48 [0,31; 0,66]	0,68 [0,48; 0,84]
Spezifität	0,63 [0,24; 0,91]	0,75 [0,35; 0,97]

3 Vermehrungsfähigkeit von *Mycobacterium caprae* nach Inkubation mit Salz und/oder Speichel

Der verwendete *M.-caprae*-Stamm wurde auf Salz und/oder Rinderspeichel bei verschiedenen Temperaturen (4 °C, 20 °C und 31 °C) in Mehrfachansätzen zwischen ein und vier Wochen inkubiert. Anschließend wurde durch kulturelle Untersuchung überprüft, ob überlebende Mykobakterien vorhanden waren und somit grundsätzlich die Gefahr einer Übertragung von *M. caprae* zwischen Tieren über gemeinsam genutzte Salzlecksteine vorhanden sein könnte.

Am Tag 0 wurden die Positivkontrollen (*M. caprae*, *M. caprae* auf Salz, *M. caprae* in Rinderspeichel sowie *M. caprae* auf Salz mit Rinderspeichel) und Negativkontrollen (nur Salz und nur Rinderspeichel) angezchtet. Die

Positivkontrollen zeigten Wachstum, das über die Real-time PCR als MTC identifiziert werden konnte, während die Kultur der Negativkontrollen nach acht Wochen negativ abgeschlossen wurde.

Die weiteren Positivkontrollen (MGIT-Röhrchen), die jede Woche aus je einem der Temperaturbereiche direkt zur Bebrütung in das BACTEC™ MGIT™ 960-System gegeben wurden, zeigten alle Wachstum, das ebenfalls über die Real-time PCR als MTC identifiziert werden konnte.

Bei der weiteren Auswertung wurde unterschieden, ob innerhalb von acht Wochen nach Anzucht des auf unterschiedlichem Substrat inkubierten *M. caprae*-Stamms Wachstum festzustellen war (also Mykobakterien überlebt hatten) oder nicht. Bei sieben von neun unterschiedlichen Inkubationsbedingungen konnte auch nach vier Wochen noch Wachstum festgestellt werden: Inkubation bei 20 °C und 31 °C auf Salz mit Speichel sowie nur auf Speichel und bei 4 °C auf Salz, Salz mit Speichel und nur auf Speichel.

Bei der Verwendung von reinem Salz als Substrat waren vermehrungsfähige Mykobakterien nach maximal einer Woche (bei 20 °C) bzw. gar nicht mehr nachweisbar (bei 31 °C) (siehe Abb. IV.1).

Die Überlebensfähigkeit unter den verschiedenen Bedingungen wurde mittels Fisher-Freeman-Halton-Test statistisch ausgewertet, da die Voraussetzung für den χ^2 -Test nicht erfüllt ist. Eventuell vorhandene Wechselwirkungen zwischen den Bedingungen dieses Tests werden in diesem Test nicht berücksichtigt.

Weder die Temperatur (bei Flüssig- und Festnährboden $p = 0,124$; Fisher-Freeman-Halton-Test, $n = 36$) während der Inkubation, noch die Zeitdauer (bei Flüssig- und Festnährboden $p = 0,999$; Fisher-Freeman-Halton-Test, $n = 36$) der Inkubation hatten einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von *M. caprae*. Zwischen dem Wachstum des *M. caprae*-Stamms und dem Substrat bei der Inkubation (Salz und/oder Rinderspeichel) bestand allerdings ein höchst signifikanter Zusammenhang (bei Flüssig- und Festnährboden $p < 0,001$; Fisher-Freeman-Halton-Test, $n = 36$). Nur gut 40 % (5 von 12) der ausschließlich mit Salz inkubierten Proben zeigten nach der Anzucht Wachstum

gegenüber 100 % der auf Salz und Rinderspeichel oder nur mit Rinderspeichel inkubierten Proben (vgl. Abb. IV.2). Die Temperatur während der Inkubation spielte dabei eine entscheidende Rolle: Während *M. caprae* nach der Inkubation mit Salz bei einer Temperatur von 4 °C auch nach 4 Wochen noch vermehrungsfähig war, konnten lebende Erreger bei einer Inkubationstemperatur von 20 °C nur noch in der ersten Woche nachgewiesen werden, bei einer Inkubationstemperatur von 31 °C gar nicht (vgl. Abb. IV.1).

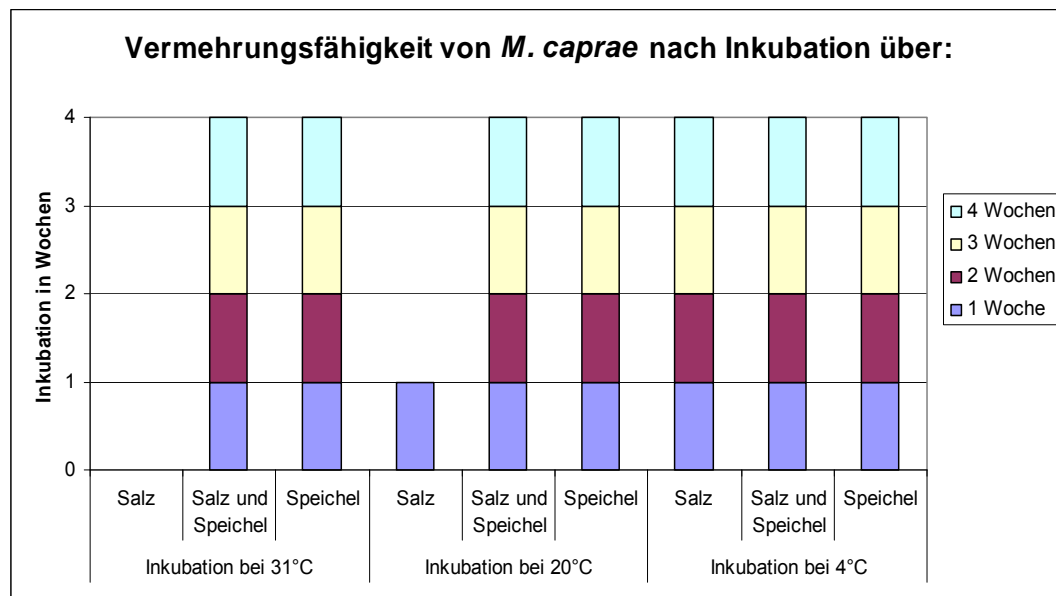


Abb. IV.1: Wachstum von *M. caprae* nach Inkubation unter verschiedenen Bedingungen (n = 36)

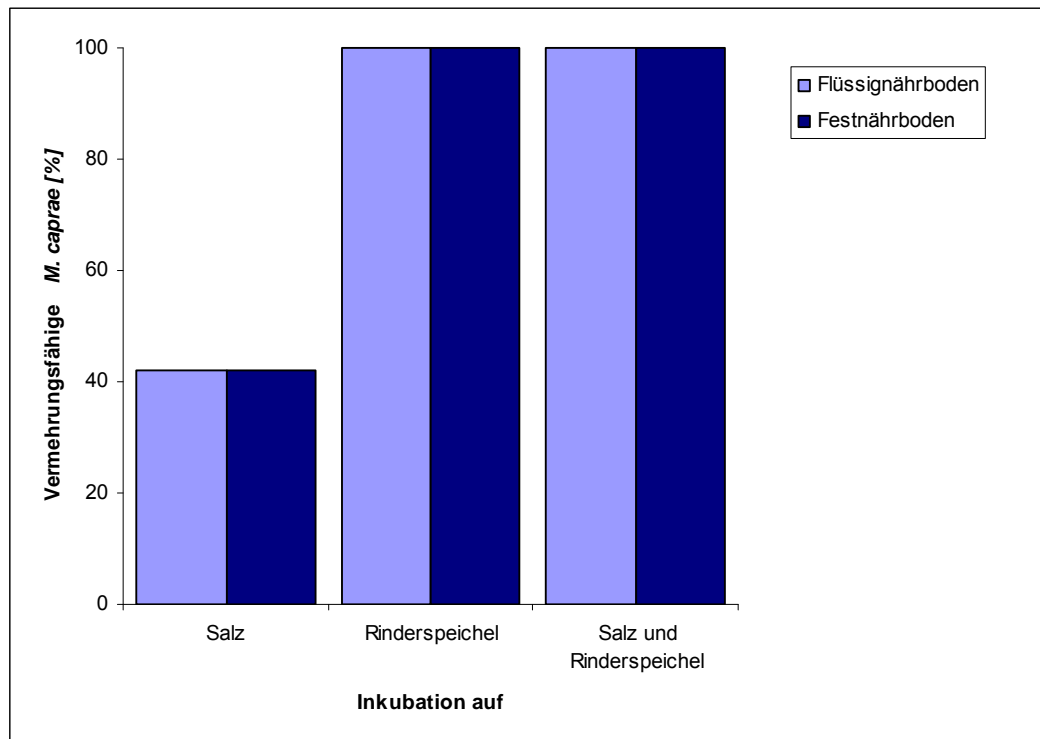


Abb. IV.2: Zusammenhang zwischen dem Überleben von *M. caprae* auf Flüssig- und Festnährböden abhängig von dem Vorhandensein von Salz, Rindenspeichel bzw. Salz und Rindenspeichel bei der Inkubation (36 Proben insgesamt, jeweils 12 Proben mit unterschiedlicher Inkubationstemperatur und -dauer auf Salzstein, Rindenspeichel bzw. Salzstein und Rindenspeichel)

4 Vergleich der Ergebnisse des Interferon- γ -Nachweises im BOVIGAM[®]-Test mit denen anderer Diagnosemethoden

4.1 Ergebnisse des BOVIGAM[®]-Tests

Alle 173 Rinder, von denen Blutproben mit dem BOVIGAM[®]-Test untersucht wurden, sind in Tabelle IV.17 aufgeführt. Dabei wurden die Einzeltiere der Übersichtlichkeit halber entsprechend der erhaltenen Ergebniskombinationen gruppiert.

4.2 Reproduzierbarkeit der BOVIGAM[®]-Ergebnisse aus Plasma

Der BOVIGAM[®]-ELISA zum Nachweis von Interferon- γ wurde an den 28 Blutproben aus Bestand A direkt nach der Stimulation der Blutproben durchgeführt und zusätzlich ein zweites Mal innerhalb von 24 Stunden aus demselben Ansatz. Das Plasma wurde in der Zwischenzeit im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die Ergebnisse der beiden BOVIGAM[®]-Tests entsprachen sich bei 27 Plasmaproben, eine Plasmaprobe veränderte das Ergebnis von negativ im ersten zu positiv im zweiten Test. Die Differenz der Werte OD (PPD-B) und OD (PPD-A) lag bei der zweiten Messung um 0,06 über dem Wert der ersten Messung.

Tab. IV.17 Ergebnisse aller durchgeführten Untersuchungen in Relation zu den im BOVIGAM®-Test untersuchten Rinderblutproben

Bestand/ Anzahl Rinder	Mi.	GT MD	Real- time PCR	Kultur	BOVIGAM®-Test		Simul- tantest (ST)	anatomisch- pathologische Untersuchung
					vor ST	nach ST		
A/7	---	---	---	---	---	neg	frag	---
A/3	neg	neg	neg	neg	---	neg	frag	kein Hinweis auf TB
A/2	neg	neg	neg	neg	---	pos	neg	kein Hinweis auf TB
A/1	neg	neg	neg	<i>M.caprae</i>	---	pos	pos	Hinweis auf TB
A/1	neg	neg	neg	neg	---	pos	pos	kein Hinweis auf TB
A/1	neg	neg	MTC	<i>M.caprae</i>	---	pos	pos	Hinweis auf TB
A/1	neg	neg	neg	<i>M.caprae</i>	---	pos	pos	Hinweis auf TB
A/1	pos	MTC	MTC	<i>M.caprae</i>	---	neg	pos	Hinweis auf TB
A/1	neg	neg	neg	neg	---	neg	pos	Hinweis auf TB
A/1	pos	MTC	MTC	<i>M.caprae</i>	---	neg	neg	Hinweis auf TB
A/1	neg	neg	neg	neg	---	pos	frag	frag
A/1	neg	neg	neg	neg	---	pos	frag	kein Hinweis auf TB
A/1	pos	MTC	frag	<i>M.caprae</i>	---	pos	neg	Hinweis auf TB
A/1	pos	MTC	MTC	<i>M.caprae</i>	---	pos	neg	Hinweis auf TB
A/1	neg	neg	neg	neg	---	frag	frag	kein Hinweis auf TB
A/1	neg	neg	frag	verunreinigt	---	neg	frag	Hinweis auf TB
A/1	neg	neg	neg	neg	---	neg	frag	frag
A/1	neg	neg	frag	<i>M.caprae</i>	---	neg	frag	Hinweis auf TB
A/1	neg	neg	neg	neg	---	n.a.	frag	kein Hinweis auf TB
B/2	pos	MTC	MTC	<i>M.caprae</i>	pos	pos	pos	Hinweis auf TB
B/2	neg	neg	neg	neg	pos	pos	frag	kein Hinweis auf TB
B/1	pos	neg	MTC	<i>M.caprae</i>	pos	pos	frag	Hinweis auf TB
B/1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	kein Hinweis auf TB
B/1	pos	neg	MTC	<i>M.caprae</i>	pos	pos	pos	Hinweis auf TB
B/1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	frag	kein Hinweis auf TB
B/1	pos	neg	MTC	neg	frag	frag	frag	Hinweis auf TB
B/1	neg	neg	neg	neg	pos	pos	frag	kein Hinweis auf TB
B/1	pos	neg	MTC	<i>M.caprae</i>	neg	neg	pos	Hinweis auf TB
B/1	pos	MTC	MTC	neg	pos	pos	pos	Hinweis auf TB
B/1	pos	MTC	MTC	<i>M.caprae</i>	pos	pos	pos	Hinweis auf TB
B/1	pos	neg	neg	<i>M.caprae</i>	pos	pos	pos	Hinweis auf TB
C/1	neg	---	---	---	neg	---	frag	---
D/1	---	---	---	---	neg	---	neg	---
E/1	neg	neg	neg	neg	---	neg	frag	kein Hinweis auf TB
F/1	neg	---	---	---	---	neg	neg	---
G/12	neg	---	neg	neg	---	neg	neg	kein Hinweis auf TB
G/7	---	---	---	---	---	neg	neg	---
G/4	---	---	---	---	---	neg	neg	---
G/4	neg	neg	neg	neg	---	neg	neg	kein Hinweis auf TB
G/2	neg	HS	neg	neg	---	neg	neg	kein Hinweis auf TB
G/1	---	---	---	---	---	n.a.	neg	---
G/1	---	---	---	---	---	neg	frag	---
G/1	---	---	---	neg	---	neg	neg	---
H/11	---	---	---	---	---	neg	neg	---
I/11	---	---	---	---	---	pos	neg	---
I/10	---	---	---	---	---	neg	neg	---
I/6	---	---	---	---	---	pos	frag	---
I/2	---	---	---	---	---	pos	pos	---
K/7	---	---	---	---	pos	pos	pos	---
K/3	---	---	---	---	pos	pos	frag	---
K/2	---	---	---	---	pos	pos	neg	---
K/2	---	---	---	---	neg	pos	pos	---
K/1	---	---	---	---	neg	pos	frag	---
L/41	---	---	---	---	neg	neg	neg	---
L/1	---	---	---	---	n.a.	neg	neg	---

Mi. = Mikroskopie, GT MD = GenoType® Mycobacteria Direct – Test, neg = negativ, pos = positiv, frag = fraglich, n.a. = nicht auswertbar, --- = nicht durchgeführt, TB = Tuberkulose, HS = Hemmstoff; positive Mikroskopie = Nachweis von säurefesten Stäbchen; negative Kultur = keine Erreger des MTC nachgewiesen

4.3 Validität des BOVIGAM[®]-Tests

Von 52 der 173 Rinder, von denen Blutproben im BOVIGAM[®]-Test untersucht wurden, konnten insgesamt 307 Organe kulturell untersucht werden. Bei mindestens einem in der Kultur tuberkulosepositiven Organ wurde das betreffende Rind als tuberkulosepositiv angenommen. Zweiundvierzig Rinder aus einem absolut unverdächtigem Bestand (Bestand L) wurden als kulturell negative Rinder in den Test miteinbezogen.

Nach Ausschluss nicht auswertbarer Proben und fraglicher Testergebnisse konnten bei 90 Rindern Ergebnisse des BOVIGAM[®]-Tests, bei 78 Rindern Ergebnisse des Simultantests und bei 52 Rindern eine Kombination beider Tests bezogen auf das Ergebnis der Kultur der Organproben ausgewertet werden.

Bezogen auf das Ergebnis der Kultur als Goldstandard lagen sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität des Simultantests (77 % bzw. 95 %) über denen des BOVIGAM[®]-Tests (73 % bzw. 88 %). Bei der Oder-Verknüpfung von BOVIGAM[®]-Test und Simultantest (positives Ergebnis, wenn mindestens ein Test ein positives Ergebnis liefert) stieg die Sensitivität auf 81 %, während die Spezifität auf 72 % abfiel. Eine Und-Verknüpfung beider Tests (positives Ergebnis, wenn beide Tests positiv sind) brachte eine Sensitivität von 50 % und eine Spezifität von 94 %. Alle Ergebnisse unter Angabe des 95 %-Konfidenzintervalls sind in Tabelle IV.18 zusammengefasst.

Tab. IV.18: Validität der Diagnosemethoden BOVIGAM[®]-Test, Simultanuntersuchung sowie der Kombination von beiden als Und- und Oder-Verknüpfung (bezogen auf das Ergebnis der Kultur); 95 %-Konfidenzintervall in eckigen Klammern

	BOVIGAM [®] - Test (n = 90)	Simultan- untersuchung (n = 78)	BOVIGAM [®] - Test und Simultanun- tersuchung (n = 52)	BOVIGAM [®] - Test oder Simultanun- tersuchung (n = 52)
DOR	20,17 [5,28; 76,99]	68,89 [12,16; 390,17]	17 [3,01; 95,92]	11,27 [2,64; 48;12]
Sen- sitivität	0,73 [0,45; 0,92]	0,77 [0,46; 0,95]	0,50 [0,25; 0,75]	0,81 [0,54; 0,96]
Spe- zifität	0,88 [0,78; 0,94]	0,95 [0,87; 0,99]	0,94 [0,81; 0,99]	0,72 [0,55; 0,86]

4.4 Einfluss der Simultanuntersuchung auf den BOVIGAM[®]-Test

Blutproben für den BOVIGAM[®]-Test wurden bei den Rindern unmittelbar vor dem Setzen und/oder beim Ablesen des Simultantests entnommen. Um festzustellen, ob der Zeitpunkt der Blutentnahme (vor bzw. 72 Stunden nach dem Simultantest) möglicherweise einen Einfluss auf das Ergebnis des BOVIGAM[®]-Tests hat, wurden jeweils die OD (PPD-B)- und OD (PPD-A)-Werte des BOVIGAM[®]-Tests sowie deren Differenzen bei Rindern, bei denen beim Setzen und beim Ablesen des Simultantests Blut entnommen wurde, verglichen.

Zur besseren Lesbarkeit und Übersichtlichkeit des weiteren Textes werden folgende Formulierungen verwendet: „Vor Simultantest“ bedeutet, dass die Blutprobe unmittelbar vor dem Setzen des Simultantests, „ nach Simultantest“, dass die Blutprobe beim Ablesen des Simultantests (72 Stunden nach dem Setzen) entnommen wurde.

Bei den OD (PPD-A)- und OD (PPD-B)-Werten handelt es sich um verbundene Stichproben, da die Messungen an gleichen Rindern zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfanden. Voraussetzung für die Verwendung des *t*-Tests für verbundene Messungen ist, dass die Differenzen der Variablen normalverteilt sind.

Zur Überprüfung der Normalverteilung der Differenzen wurden die Daten grafisch und mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov- und des Shapiro-Wilk-

Tests überprüft. Da von einer Normalverteilung der Differenzen bei den vorliegenden Daten nicht ausgegangen werden kann, wird für die Auswertung der nonparametrische Wilcoxon-Test bei verbundenen Stichproben verwendet. Dieser Test prüft die Nullhypothese, dass der Median der Differenzen zwischen den Variablen gleich null ist.

Beim Vergleich der OD (PPD-B) vor und nach dem Simultantest gab es signifikante Unterschiede zwischen den Werten ($p = 0,013$), beim Vergleich der OD (PPD-A) sogar hoch signifikante ($p < 0,001$). Bei den Differenzen OD (PPD-B) – OD (PPD-A), die letztendlich zur Auswertung herangezogen werden, gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede vor und nach dem Simultantest ($p = 0,547$) (vgl. Tab. IV.19 und Abb. IV.3 und IV.4).

Wenn man nur die nach dem Simultantest positiven BOVIGAM[®]-Ergebnisse betrachtet, gab es bei Blutabnahme vor und nach dem Simultantest keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten OD (PPD-B) ($p = 0,694$) und OD (PPD-A) ($p = 0,849$) sowie deren Differenzen ($p = 0,439$) (vgl. Tab. IV.20 und Abb. IV.5 und IV.6).

Obwohl sich die OD-Werte bei Blutabnahme vor und nach dem Simultantest nicht signifikant veränderten, stieg die Sensitivität des BOVIGAM[®]-Tests – bezogen auf das Ergebnis des Simultantests – von 81 % bei Blutabnahme vor dem Simultantest auf 97 % bei Blutabnahme nach dem Simultantest, während die Spezifität gleichbleibend bei 95 % lag (vgl. Tab. IV.23).

Drei Rinder aus dem Bestand K, in dem bei Blutabnahme nach dem Simultantest alle Rinder ein positives BOVIGAM[®]-Ergebnis zeigten, waren bei Blutabnahme vor dem Simultantest negativ im BOVIGAM[®]-Test (vgl. Tab. IV.17). Die OD (PPD-B)-Werte der Plasmaproben dieser Rinder lagen bei Blutabnahme vor dem Simultantest im Schnitte bei 0,199 und damit im Box-Plot unterhalb der Box, die 50 % der Werte abdeckt, bei Blutabnahme nach dem Simultantest mit einem Schnitt von 0,573 jedoch innerhalb der Box (vgl. Tab. IV.22 und Abb. IV.5).

Bei den nach dem Simultantest negativen BOVIGAM[®]-Ergebnissen zeigten sowohl die Werte OD (PPD-B) und OD (PPD-A) vor und nach dem

Simultantest signifikante Unterschiede (beide $p < 0,0001$) als auch deren Differenzen ($p = 0,003$) (vgl. Tab. IV.21 sowie Abb. IV.7 und IV.8).

Tab. IV.19: BOVIGAM[®]-Test: Vergleich der Optical density (OD)-Werte nach Stimulation mit PPD-B bzw. PPD-A vor und nach einem Simultantest (ST); KI = Konfidenzintervall; n = 69

	OD (PPD-B) vor ST	OD (PPD-B) nach ST	OD (PPD-A) vor ST	OD (PPD-A) nach ST
Mittelwert	0,54	0,51	0,20	0,14
Standard- abweichung	0,86	0,82	0,23	0,20
95 %-KI Mittelwert	[0,34; 0,75]	[0,31; 0,70]	[0,14; 0,25]	[0,09; 0,19]
Median	0,17	0,11	0,14	0,09

Tab. IV.20: BOVIGAM[®]-Test: Vergleich der Optical density (OD)-Werte nach Stimulation mit PPD-B bzw. PPD-A vor und nach einem Simultantest (ST); nur für nach dem ST positive BOVIGAM[®]-Ergebnisse; KI = Konfidenzintervall; n = 26

	OD (PPD-B) vor ST	OD (PPD-B) nach ST	OD (PPD-A) vor ST	OD (PPD-A) nach ST
Mittelwert	1,19	1,22	0,31	0,27
Standard- abweichung	1,15	0,99	0,34	0,27
95 %-KI Mittelwert	[0,73; 1,65]	[0,82; 1,62]	[0,17; 0,45]	[0,16; 0,38]
Median	0,69	0,75	0,19	0,20

Tab. IV.21: BOVIGAM[®]-Test: Vergleich der Optical density (OD)-Werte nach Stimulation mit PPD-B bzw. PPD-A vor und nach einem Simultantest (ST); nur für nach dem ST negative BOVIGAM[®]-Ergebnisse; KI = Konfidenzintervall; n = 43

	OD (PPD-B) vor ST	OD (PPD-B) nach ST	OD (PPD-A) vor ST	OD (PPD-A) nach ST
Mittelwert	0,15	0,07	0,13	0,06
Standard- abweichung	0,02	0,05	0,02	0,04
95 %-KI Mittelwert	[0,14; 0,16]	[0,06; 0,09]	[0,13; 0,14]	[0,04; 0,07]
Median	0,15	0,05	0,13	0,05

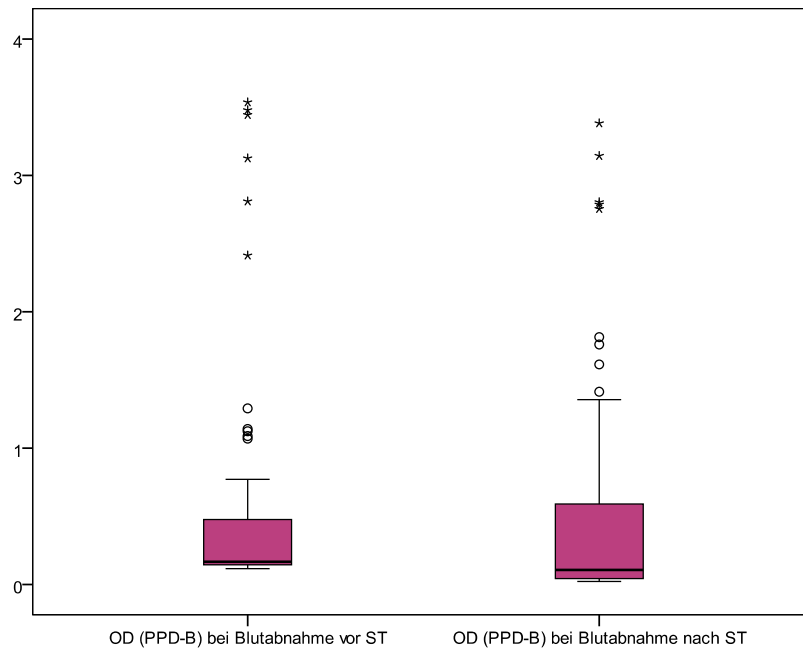


Abb. IV.3: BOVIGAM[®]-Test: Box Plots der Optical density (OD)-Werte bei Stimulation mit PPD-B vor (Median = 0,17) und nach (Median = 0,11) einem Simultantest (ST)

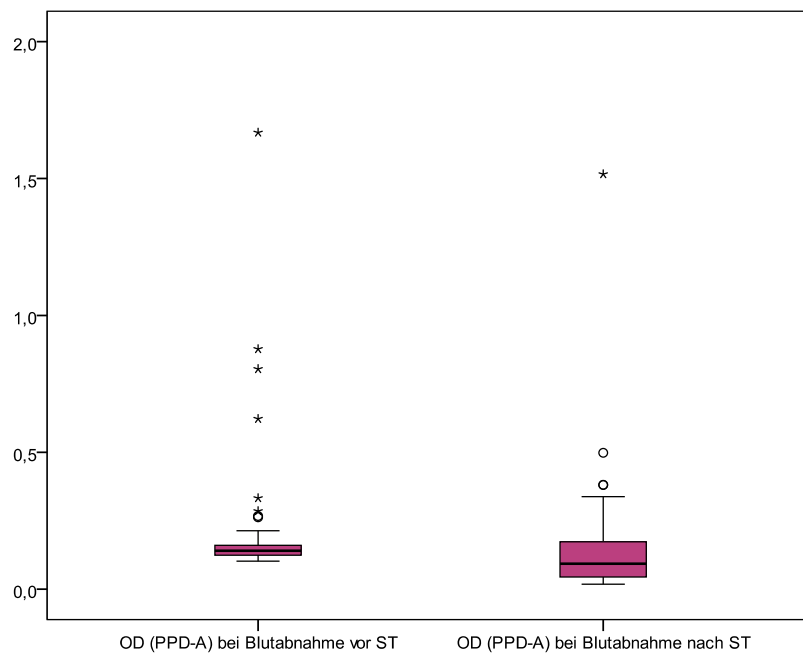


Abb. IV.4: BOVIGAM[®]-Test: Box Plots der Optical density (OD)-Werte bei Stimulation mit PPD-A vor (Median = 0,14) und nach (Median = 0,09) einem Simultantest (ST)

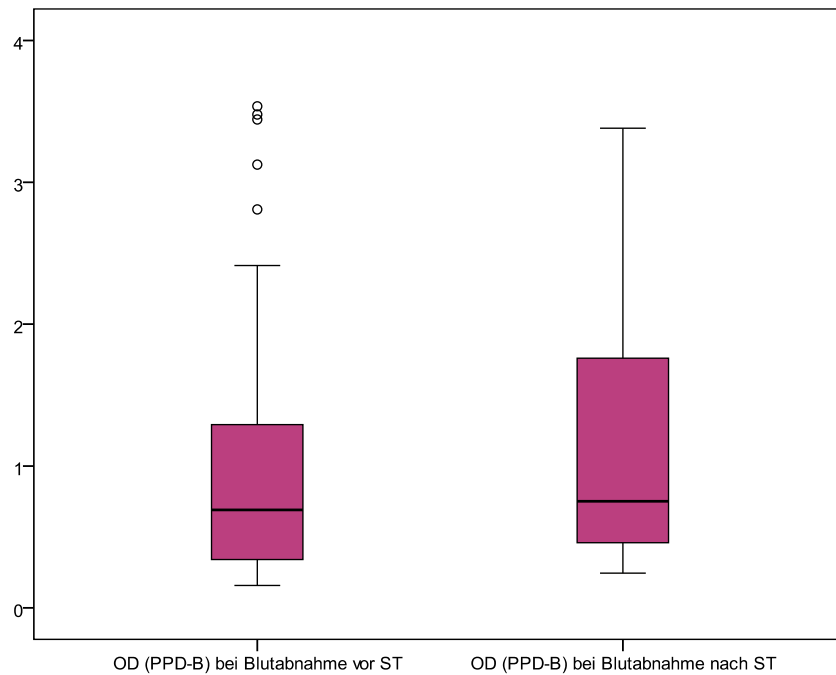


Abb. IV.5: BOVIGAM[®]-Test: Box Plots der Optical density (OD)-Werte bei Stimulation mit PPD-B vor (Median = 0,69) und nach (Median = 0,75) einem Simultantest (ST) nur für nach dem ST positive BOVIGAM[®]-Ergebnisse

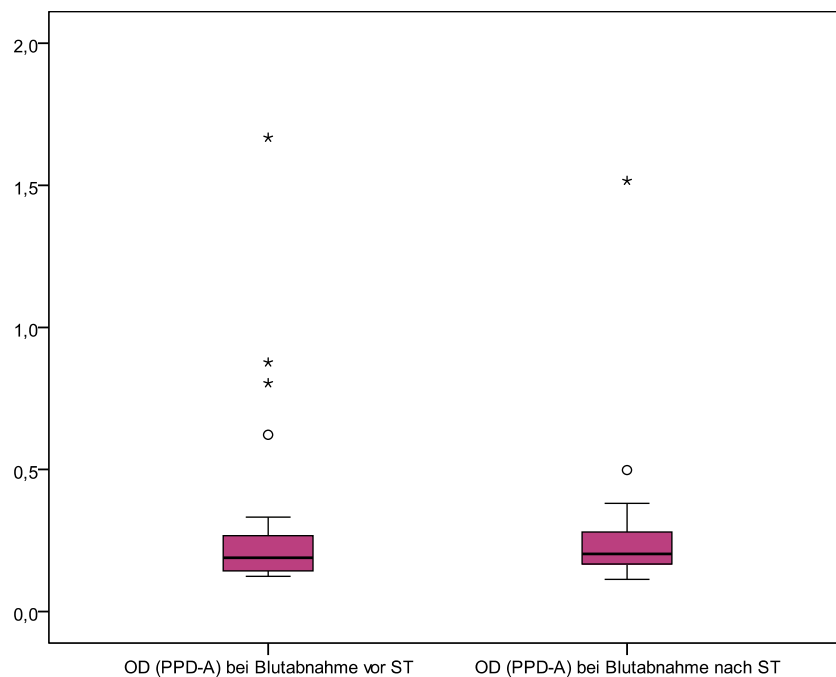


Abb. IV.6: BOVIGAM[®]-Test: Box Plots der Optical density (OD)-Werte bei Stimulation mit PPD-A vor (Median = 0,19) und nach (Median = 0,20) einem Simultantest (ST) nur für nach dem ST positive BOVIGAM[®]-Ergebnisse

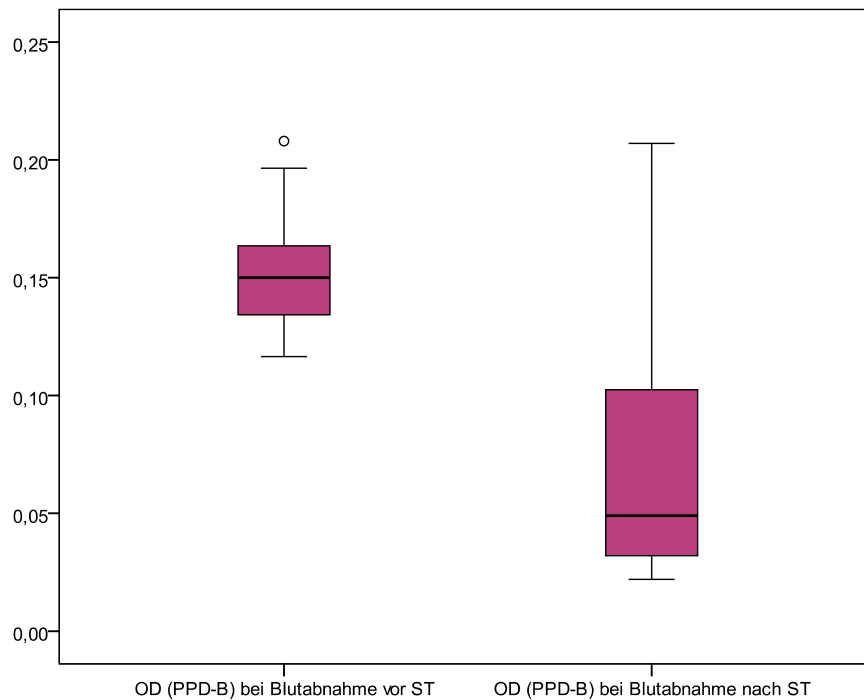


Abb. IV.7: BOVIGAM[®]-Test: Box Plots der Optical density (OD)-Werte bei Stimulation mit PPD-B vor (Median = 0,15) und nach (Median = 0,05) einem Simultantest (ST) nur für nach dem ST negative BOVIGAM[®]-Ergebnisse

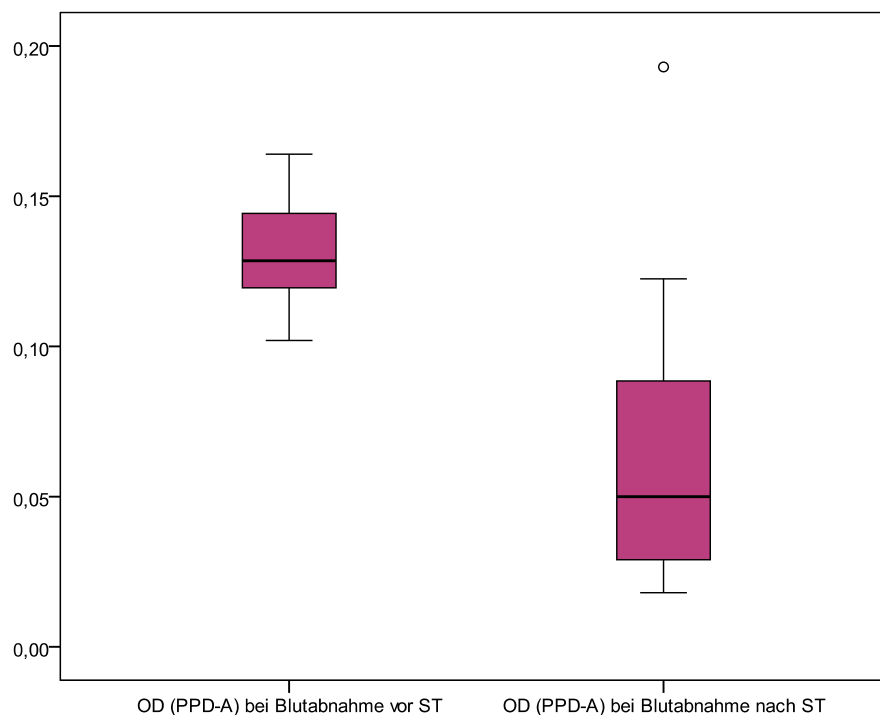


Abb. IV.8: BOVIGAM[®]-Test: Box Plots der Optical density (OD)-Werte bei Stimulation mit PPD-A vor (Median = 0,13) und nach (Median = 0,05) einem Simultantest (ST) nur für nach dem ST negative BOVIGAM[®]-Ergebnisse

Tab. IV.22: BOVIGAM[®]-Test: OD (PPD-B) und OD (PPD-B) - OD (PPD-A) aus Blutabnahme vor und nach Simultantest (ST) bei drei Rindern aus einem tuberkulosepositiven Bestand mit einem vor ST negativen, nach ST positivem BOVIGAM[®]-Ergebnis

	OD (PPD-B) vor ST	OD (PPD-B) nach ST	OD (PPD-B)- OD (PPD-A) vor ST	OD (PPD-B)- OD (PPD-A) nach ST
Rind 1	0,230	0,735	0,071	0,562
Rind 2	0,158	0,582	0,018	0,356
Rind 3	0,210	0,403	0,085	0,117

Tab. IV.23: BOVIGAM[®]-Test: Vergleich der Ergebnisse des Bovigam-Tests vor und nach einem Simultantest (ST), bezogen auf ST; 95 %-Konfidenzintervall in eckigen Klammern; n = 60

	BOVIGAM [®] -Test vor ST	BOVIGAM [®] -Test nach ST
DOR	91,0 [13,69; 604,93]	539,4 [24,51; 11868,9]
Sensitivität	0,81 [0,54; 0,96]	0,97 [0,74; 1,00]
Spezifität	0,95 [0,85; 0,99]	0,95 [0,84; 0,99]

4.5 Ergebnisse des BOVIGAM[®]-Tests nach Stimulation der Blutproben in Röhrchen des QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube-Tests

Mit Blutproben von 17 Rindern wurde jeweils vor und nach dem Simultantest neben der Stimulation mit den Antigenen PPD-B und PPD-A auch eine Stimulation mit den Antigenen des humanmedizinischen QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube-Tests (ESAT-6, CFP-10 und TB7.7) durchgeführt.

Vier Rinder stammten aus einem tuberkuloseverdächtigen Bestand, der aufgrund der Ergebnisse des Simultantests gekeult wurde. Diese vier Rinder zeigten sowohl nach der Stimulation mit den Antigenen PPD-B und PPD-A, als auch nach der Stimulation mit den Antigenen des humanmedizinischen QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube-Tests jeweils aus den Blutproben, die unmittelbar vor dem Setzen und beim Ablesen des

Simultantests entnommen wurden, ein positives Testergebnis im BOVIGAM[®]-ELISA. Im Simultantests waren zwei dieser Rinder positiv, eines negativ und eines fraglich.

Die übrigen 13 Rinder stammten aus einem tuberkuloseunverdächtigem Bestand, in dem alle 42 Rinder des Bestandes ein negatives Ergebnis im Simultantest und im BOVIGAM[®]-Test zeigten. Nach Stimulation mit den Antigenen des QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube-Tests der Blutproben, die vor dem Simultantest entnommen wurden, waren alle 13 getesteten Rinder im anschließenden BOVIGAM[®] ELISA ebenfalls als negativ zu beurteilen. Bei den Blutproben, die beim Ablesen des Simultantests entnommen wurden, war jedoch die Plasmaprobe eines Rindes nach Stimulation mit den Antigenen des QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube-Tests als positiv zu bewerten:

Blutabnahme unmittelbar vor dem Setzen des Simultantests

- Stimulation mit PPD-B und PPD-A
 $OD(PPD-B) = 0,181$; $OD(PPD-A) = 0,154$; $OD(NIL) = 0,150$;
 $OD(PPD-B) - OD(NIL) = 0,031 < 0,1$ oder $OD(PPD-B) - OD(PPD-A) = 0,027 < 0,1$ entspricht negativem Ergebnis
- Stimulation mit ESAT-6, CFP-10, TB7.7
 $OD(ESAT-6, CFP-10, TB7.7) = 0,357$; $OD(NIL) = 0,056$;
 $OD(TB\ Antigen) - OD(NIL) = 0,301 < 0,35$ entspricht negativem Ergebnis

Blutabnahme beim Ablesen des Simultantests

- Stimulation mit PPD-B und PPD-A:
 $OD(PPD-B) = 0,184$; $OD(PPD-A) = 0,193$; $OD(NIL) = 0,080$;
 $OD(PPD-B) - OD(NIL) = 0,009 < 0,1$ oder $OD(PPD-B) - OD(PPD-A) = 0,104 < 0,1$ (negativ) entspricht negativem Ergebnis
- Stimulation mit ESAT-6, CFP-10, TB7.7
 $OD(ESAT-6, CFP-10, TB7.7) = 0,618$; $OD(NIL) = 0,134$;
 $OD(TB\ Antigen) - OD(NIL) = 0,484 \geq 0,35$ entspricht positivem Ergebnis

5 Vorkommen von *Mycobacterium caprae* beim Rotwild in den Landkreisen Oberallgäu, Ostallgäu und Bad Tölz

5.1 Altersstruktur und Herkunft der beprobten Rothirsche

Von Oktober 2009 bis Dezember 2010 wurden 332 Rothirsche verschiedener Altersstufen aus den Landkreisen Oberallgäu, Ostallgäu und Bad Tölz-Wolfratshausen beprobt (siehe Tab. IV.24).

Tab. IV.24: Altersstruktur des beprobten Rotwilds nach Landkreisen

	Oberallgäu	Ostallgäu	Bad Tölz	Gesamt
Hirschkälber	27	15	12	54
III Hirsche	37	15	8	60
IIa/IIb Hirsche	4	5	0	9
I Hirsche	6	4	0	10
Wildkälber	31	21	10	62
Schmaltiere	20	20	3	43
Alttiere	56	15	10	81
ohne Angabe	8	0	5	13
Summe	189	95	48	332

5.2 Zusammensetzung der Einzelorganproben der Rothirsche

Von allen 332 Rothirschen wurden insgesamt 1.638 Einzelorganproben untersucht. Nicht von allen Tieren lag das vollständige Probenset vor. Als Gründe hierfür kommen unter anderem Gewebszerstörung durch die Schussverletzung, die Notwendigkeit, ein schwer zu bergendes Tier bereits an unzugänglichen Stellen auszuweiden oder hereinbrechende Dunkelheit in Frage. Abb. IV.9 zeigt die Zusammensetzung der Einzelorganproben.

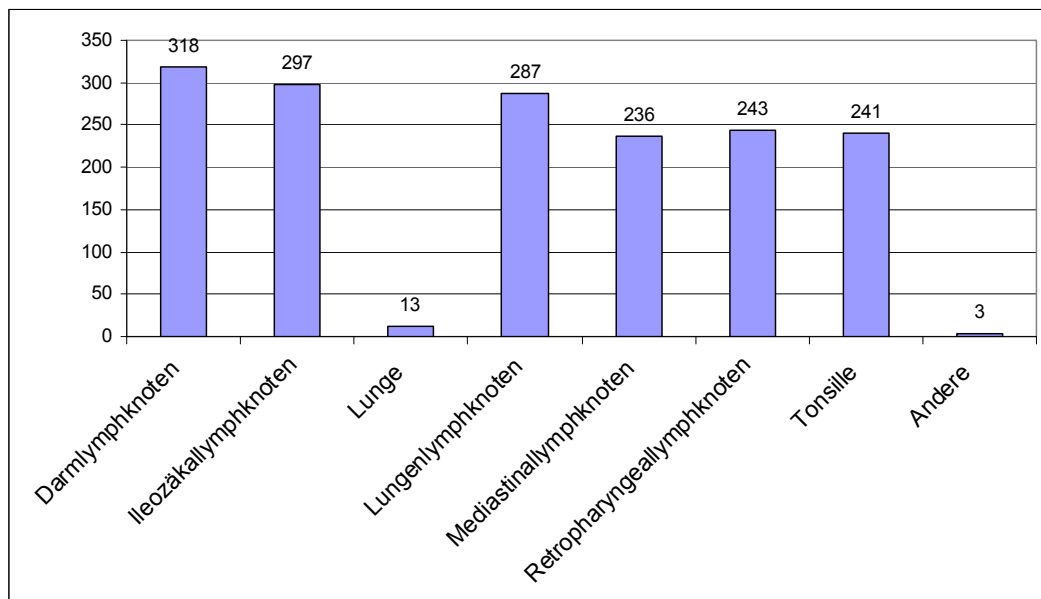


Abb. IV.9: Zusammensetzung der untersuchten Einzelorganproben beim Rotwild (n = 1.638)

5.3 Repräsentativität der Stichprobe

Um festzustellen, ob es sich bei den beprobten Rothirschen hinsichtlich des Alters und des Geschlechts um eine repräsentative Stichprobe aller erlegten Rothirsche in den Landkreisen handelt, wurden diese den in der Jagdsaison 2009/2010 amtlich erfassten, erlegten Rothirschen gegenübergestellt (vgl. Tab. IV.25 bis IV.27). Da in den Abschusszahlen meist nicht zwischen Wild- und Hirschkälbern unterschieden wird, wurden weibliche und männliche Kälber zusammengefasst.

Der exakte Test nach Fisher entspricht dem χ^2 -Test, ist jedoch an keine Voraussetzungen gebunden und liefert in der Regel genauere Ergebnisse. Da es in den Rotwilddaten Fälle gibt, in denen die Voraussetzungen des χ^2 -Tests nicht erfüllt sind (mindestens 80 % der erwarteten Häufigkeiten sind ≥ 5) und der exakte Test nach Fisher genauere Ergebnisse liefert, wird für alle Vergleiche der exakte Test nach Fisher durchgeführt.

Repräsentativität von Stichproben kann in der Regel durch eine reine Zufallsauswahl sichergestellt werden. Mit dem exakten Test nach Fisher wird geprüft, ob sich die Häufigkeiten in zwei Gruppen unterscheiden. Wenn sich die Häufigkeiten der untersuchten Tiere nicht signifikant von denen der erlegten Tiere in jeder Kategorie unterscheiden, kann man annehmen, dass es sich um eine repräsentative Stichprobe handelt. Bei

den durchgeführten Tests erhält man lediglich bei den Proben aus dem Landkreis Oberallgäu signifikante Abweichungen, alle anderen Ergebnisse waren nicht signifikant (p liegt bei allen Kategorien bei über 0,05), weshalb man davon ausgehen kann, dass es sich bei diesen untersuchten Proben um eine repräsentative Stichprobe aus der Menge der erlegten Rothirsche handelt. Im Landkreis Oberallgäu wurden hoch signifikant ($n = 248/244$; $p < 0,01$) relativ zu viele Alttiere und zu wenige Schmaltiere beprobt.

Tab. IV.25: Repräsentativität der Stichprobe der untersuchten Rothirsche aus dem Landkreis Oberallgäu (hoch signifikante Abweichungen ($p < 0,01$; $\alpha = 0,05$) markiert mit *)

Kategorie	Tiere untersucht (n)	Tiere untersucht (%)	Tiere erlegt (n)	Tiere erlegt (%)	Exakter Test nach Fisher (p)
Kälber	58	30,69	422	32,46	0,677
III Hirsche	37	19,58	305	23,46	0,267
II Hirsche	4	2,12	37	2,85	0,811
I Hirsche	6	3,17	44	3,38	0,999
Schmaltiere	20	10,58	248	19,08	0,004*
Alttiere	56	29,63	244	18,77	0,001*
ohne Angabe	8	4,23	0	0	
Summe	189		1300		

Tab. IV.26: Repräsentativität der Stichprobe der untersuchten Rothirsche aus dem Landkreis Ostallgäu (keine signifikanten Abweichungen ($p < 0,05$; $\alpha = 0,05$))

Kategorie	Tiere untersucht (n)	Tiere untersucht (%)	Tiere erlegt (n)	Tiere erlegt (%)	Exakter Test nach Fisher (p)
Kälber	36	37,89	176	32,65	0,346
III Hirsche	15	15,79	100	18,55	0,567
II Hirsche	5	5,26	15	2,78	0,203
I Hirsche	4	4,21	19	3,53	0,765
Schmaltiere	20	21,05	133	24,68	0,516
Alttiere	15	15,79	96	17,81	0,770
ohne Angabe	0	0	0	0	
Summe	95		539		

Tab. IV.27: Repräsentativität der Stichprobe der untersuchten Rothirsche aus dem Landkreis Bad Tölz-Wolfratshausen (keine signifikanten Abweichungen ($p < 0,05$; $\alpha = 0,05$))

Kategorie	Tiere untersucht (n)	Tiere untersucht (%)	Tiere erlegt (n)	Tiere erlegt (%)	Exakter Test nach Fisher (p)
Kälber	22	45,83	306	39,28	0,367
III Hirsche	8	16,67	172	22,08	0,472
II Hirsche	0	0	16	2,05	0,617
I Hirsche	0	0	13	1,67	0,999
Schmaltiere	3	6,25	122	15,66	0,095
Alttiere	10	20,83	150	19,26	0,850
ohne Angabe	5	10,42	0	0	
Summe	48		779		

5.4 Nachweis von Mykobakterien beim Rotwild

Neben verschiedenen atypischen Mykobakterien in den Landkreisen Ober- und Ostallgäu (vgl. Tab. IV.28) konnten bei einem Schmaltier und einem I Hirsch aus dem Landkreis Oberallgäu und bei einem III Hirsch aus dem Landkreis Bad Tölz-Wolfratshausen Mykobakterien des MTC nachgewiesen werden. Es handelte sich bei allen Stämmen um *M. caprae* (vgl. Tab. IV.29).

Tab. IV.28: Nachweis von atypischen Mykobakterien beim Rotwild in den Landkreisen Oberallgäu, Ostallgäu und Bad Tölz ¹

Landkreis	Kategorie	Tiere untersucht	Tiere positiv	nachgewiesene Mykobakterienspezies
Oberallgäu	Hirschkälber	27	1	<i>M. vaccae</i>
	III Hirsche	37	0	
	IIa/IIb Hirsche	4	1	<i>M. vaccae</i>
	I Hirsche	6	0	
	Wildkälber	31	1	<i>M. bohemicum</i>
	Schmaltiere	20	1 1	<i>M. bohemicum</i> <i>M. bohemicum</i> und <i>M. avium</i>
	Alttiere	56	1 1 1	<i>M. arupense</i> <i>M. avium</i> <i>M. nonchromogenicum</i>
	ohne Angabe	8	1	<i>M. nonchromogenicum</i>
	Summe	189	9	
Ostallgäu	Hirschkälber	15	0	
	III Hirsche	15	1	<i>M. interjectum</i>
	IIa/IIb Hirsche	5	0	
	I Hirsche	4	0	
	Wildkälber	21	0	
	Schmaltiere	20	0	
	Alttiere	15	0	
	ohne Angabe	0	0	
	Summe	95	1	
Bad Tölz	Hirschkälber	12	0	
	III Hirsche	8	0	
	IIa/IIb Hirsche	0	0	
	I Hirsche	0	0	
	Wildkälber	10	0	
	Schmaltiere	3	0	
	Alttiere	10	0	
	ohne Angabe	5	0	
	Summe	48	0	
Gesamt		332	10	

¹ Für die Durchführung der Sequenzierungen sei den Mitarbeitern des Sachbereichs GE 2.3 des LGL und Herrn Dr. Udo Reischl an der Universität Regensburg sowie seinen Mitarbeitern herzlich gedankt

Tab. IV.29 Nachweis von Mykobakterien des MTC beim Rotwild in den Landkreisen Oberallgäu, Ostallgäu und Bad Tölz

Landkreis	Kategorie	Tiere untersucht	Tiere positiv	nachgewiesene Mykobakterienspezies
Oberallgäu	Hirschkälber	27	0	
	III Hirsche	37	0	
	IIa/IIb Hirsche	4	0	
	I Hirsche	6	1	<i>M. caprae</i>
	Wildkälber	31	0	
	Schmaltiere	20	1	<i>M. caprae</i>
	Alttiere	56	0	
	ohne Angabe	8	0	
	Summe	185	2	
Ostallgäu	Hirschkälber	15	0	
	III Hirsche	15	0	
	IIa/IIb Hirsche	5	0	
	I Hirsche	4	0	
	Wildkälber	21	0	
	Schmaltiere	20	0	
	Alttiere	15	0	
	ohne Angabe	0	0	
	Summe	95	0	
Bad Tölz	Hirschkälber	12	0	
	III Hirsche	8	1	<i>M. caprae</i>
	IIa/IIb Hirsche	0	0	
	I Hirsche	0	0	
	Wildkälber	10	0	
	Schmaltiere	3	0	
	Alttiere	10	0	
	ohne Angabe	5	0	
	Summe	48	1	
Gesamt		332	3	<i>M. caprae</i>

5.5 Verteilung der nachgewiesenen *Mycobacterium caprae* auf die Organe der Rothirsche

Bei den *M.-caprae*-positiven Rothirschen waren nicht alle untersuchten Organproben gleichermaßen von der Infektion betroffen. Regelmäßig waren dies aber Tonsillen und Retropharyngeallymphknoten (siehe Tab. IV.30). Eine histologische Untersuchung aller Organe wurde beim III

Hirsch und beim Schmaltier durchgeführt². Ein Hinweis auf Tuberkulose in Form einer granulomatösen Entzündung wurde dabei nur im Retropharyngeallymphknoten des Schmaltiers festgestellt. Makroskopische Hinweise auf tuberkuloseartige Veränderungen zeigte keines der Organe. Der Mediastinallymphknoten des Schmaltiers war unspezifisch vergrößert, beim I Hirsch zeigte sich erst nach dem Anschneiden des rechten Retropharyngeallymphknoten ein erbsengroßer Abszess.

Tab. IV.30: Befall der einzelnen Organe mit *M. caprae* beim Rotwild

	Tonsille	Retro-pharyngeal-lymphknoten	Media-stinal-lymphknoten	Lungen-lymphknoten.	Darm-lymphknoten	Ileo-zäkal-lymphknoten
I Hirsch Oberallgäu	<i>M. caprae</i>	<i>M. caprae</i>	---	<i>M. caprae</i>	negativ	negativ
Schmaltier Oberallgäu	<i>M. caprae</i>	<i>M. caprae</i>	<i>M. caprae</i>	<i>M. caprae</i>	negativ	negativ
III Hirsch Bad Tölz	<i>M. caprae</i>	<i>M. caprae</i>	---	---	negativ	negativ

--- = nicht beprobt

5.6 Regionale Zuordnung des *Mycobacterium-caprae*-positiven Rotwilds sowie der Mykobakterien-Isolate³

Landkreis Oberallgäu

Bei der oft geringen Größe der einzelnen Jagdreviere haben oft mehrere Jagdreviere an dem gleichen Wildbestand teil. In solchen Fällen wird die Hege und Abschussplanung erst sinnvoll, wenn sich die Beteiligten zu Hegeringen zusammenschließen. Die beprobten Tiere im Landkreis Oberallgäu wurden diesen Hegeringen zugeordnet. Der I Hirsch wurde im

² Der dritte positive Rothirsch konnte aufgrund von Zeitmangel nicht mehr histologisch untersucht werden.

³ Für die Durchführung der molekularbiologischen Typisierung sei Herrn Prof. Dr. Prodingner (Sektion Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Universität Innsbruck) und seinen Mitarbeitern herzlich gedankt.

Hegering Ehrenschwang erlegt, das Schmaltier im Hegering Rohrmoos. Die beiden *M.-caprae*-Stämme zeigten Übereinstimmung mit einem *M.-caprae*-Isolat aus den Organen eines Schlachtrindes aus dem Oberallgäu (25 von 25 Loci in der MIRU-VNTR-Typisierung). Bei diesem Schlachtrind handelt es sich um das Rind, das den Tuberkuloseausbruch auslöste, in dessen Folge alle Organproben von Rindern für diese Arbeit genommen werden konnten. Dasselbe Muster konnte bereits früher bei *M.-caprae*-Stämmen von Rindern aus dem Oberallgäu festgestellt werden. Es handelt sich um einen *M.-caprae*-Stamm, der sich vom österreichischen Lechtal-Typ unterscheidet und bisher nur in Bayern bei Rindern und Rotwild nachgewiesen wurde.

Landkreis Bad Tölz-Wolfratshausen

Der III Hirsch wurde in Vorderriß erlegt. Dieses *M.-caprae*-Isolat zeigte ein anderes Muster als die Stämme vom Rind und den beiden Rothirschen aus dem Oberallgäu. Es gleicht mit einer Übereinstimmung von 24 von 25 Loci in der MIRU-VNTR-Typisierung dem Muster von *M.-caprae*-Stämmen des Karwendel-Typs, das bisher nur unter den dortigen Hirschen nachgewiesen wurden.

5.7 Prävalenz von *Mycobacterium caprae* beim Rotwild in den Landkreisen und gesamt

Aufgrund der hier untersuchten Tiere ergibt sich insgesamt eine Prävalenz von *M. caprae* beim Rotwild von 0,91 % (KI₉₅ [0,19; 2,62]). Die Prävalenz im Oberallgäu liegt bei 1,06 % (KI₉₅ [0,13; 3,77]), im Landkreis Bad Tölz-Wolfratshausen bei 2,08 % (KI₉₅ [0,05; 11,07]).

V DISKUSSION

1 Validierung des BOVIGAM[®]-Tests

Für die Diagnostik am lebenden Tier stand die Validierung des BOVIGAM[®]-Tests, eines Untersuchungsverfahrens zum Nachweis der Interferon- γ -Sekretion durch selektierte, sensibilisierte, spezifische T-Lymphozyten, einer spezifischen, zellulären Immunreaktion, im Zentrum.

1.1 Bemerkungen zur Statistik

Validitätsmaße sind immer nur relativ zu einer Bezugsgröße gültig. In der Tuberkulosedagnostik gilt der kulturelle Erregernachweis nach wie vor als Goldstandard (WILLIAMS, 2004). Die Validität der Ergebnisse des Simultan- und des BOVIGAM[®]-Tests wurden daher jeweils auf die Ergebnisse der kulturellen Untersuchung der Organe als Goldstandard bezogen – mit Ausnahme der 42 Rinder aus einem unverdächtigen Bestand, die als nicht infiziert (= kulturell negativ) angenommen wurden. Bei Organen, die in der kulturellen Untersuchung ein negatives Ergebnis aufweisen, wird dieses Ergebnis nicht immer dem wahren Zustand entsprechen, da Mykobakterien nicht homogen in den Organen verteilt und deshalb – insbesondere beim Fehlen makroskopisch sichtbarer Entzündungsherde – nicht in jedem untersuchten Aliquot nachweisbar sind. Andererseits kann ein Rind mit positivem kulturellem Ergebnis als sehr sicher infiziert gelten. In Humanstudien werden Patienten mit behandlungsbedürftiger, offener Tuberkulose als Positivkontrollen verwendet, was bei Rindern nicht durchführbar ist, da positive Tiere entsprechend der Tierseuchengesetzgebung unverzüglich getötet und unschädlich beseitigt werden müssen.

Die Konfidenzintervalle der Diagnostic Odds Ratio (DOR) sind bei den Ergebnissen dieser Untersuchung sehr breit. Die Intervalle können bedingt durch nur kleine Änderungen in Sensitivität bzw. Spezifität sehr groß werden (vgl. Tab. V.1). Da in den Ergebnissen nicht sehr viele tuberkulosepositive Tiere vorhanden sind, die Spezifität aber sehr hoch ist, kann die Ungenauigkeit bei der Schätzung der Sensitivität diese großen

Streuungen in der DOR bewirken. Zur Bewertung der Validität des BOVIGAM[®]-Tests werden im Folgenden die Sensitivität und Spezifität verwendet.

Tab. V.1: Beispiele der Diagnostik Odds Ratio abhängig vom Zusammenspiel aus Sensitivität und Spezifität (DEEKS, 2001); von oben nach unten ist die Spezifität aufgetragen, von rechts nach links die Sensitivität, jeweils von 0,5 bis maximal 0,99

Specificity	Sensitivity						
	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	0,95	0,99
0,5	1	2	2	4	9	19	99
0,6	2	2	4	6	14	29	149
0,7	2	4	5	9	21	44	231
0,8	4	6	9	16	36	76	396
0,9	9	14	21	36	81	171	891
0,95	19	29	44	76	171	361	1881
0,99	99	149	231	396	891	1881	9801

1.2 Validität des BOVIGAM[®]-Tests im Vergleich zur und in Kombination mit der Simultanuntersuchung

Die Spezifität des BOVIGAM[®]- und des Simultantests dürften jeweils höher liegen als in dieser Untersuchung berechnet (88 % bzw. 95 %), da ein negatives Ergebnis der kulturellen Untersuchung nicht sicher ein nicht infiziertes Tier kennzeichnet.

Die Sensitivität des BOVIGAM[®]-Tests lag in verschiedenen Studien zwischen 55 % und 100 %, während in tuberkulosefreien Herden eine Spezifität von 85 % bis 99,6 % festgestellt wurde (GORMLEY et al., 2006; VORDERMEIER et al., 2006; DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006). Die Sensitivität (73 %) und Spezifität (88 %) des BOVIGAM[®]-Tests in der vorliegenden Untersuchung liegen im Rahmen der obengenannten Studien.

GORMLEY und Mitarbeiter (2006) ermittelten bei 767 infizierten Rindern eine Sensitivität des BOVIGAM[®]-Tests von 88 %, gegenüber 74 % des Mono-Intrakutantests und 93 % bei der Kombination aus BOVIGAM[®]-Test und Mono-Intrakutantest. Diese Steigerung der Sensitivität durch die Kombination von Intrakutantest und BOVIGAM[®]-Test konnte auch in

dieser Untersuchung nachgewiesen werden: die Sensitivität der Kombination von Simultantest und BOVIGAM[®]-Test liegt mit 81 % über den Sensitivitäten der Einzeltests (Simultantest 77 %, BOVIGAM[®]-Test 73 %).

GORMLEY und Mitarbeiter (2006) empfehlen, den BOVIGAM[®]-Test nicht routinemäßig in tuberkulosefreien Herden einzusetzen, hier ist der Intrakutantest das Mittel der Wahl. Ist jedoch ein begründeter Verdacht auf tuberkulöse Tiere vorhanden, kann der BOVIGAM[®]-Test zusätzlich zum Intrakutantest durchgeführt werden, um sicherheitshalber alle Tiere, die in mindestens einem der beiden Tests positiv reagieren, aus dem Bestand zu entfernen.

In Neuseeland wird ähnlich vorgegangen. Zusätzlich werden in Herden, von denen angenommen wird, dass sie tuberkulosefrei sind, im Intrakutantest positiv reagierende Rinder anschließend mittels BOVIGAM[®]-Test untersucht, um falsch-positive Simultantest-Ergebnisse aufzufinden (BUDDLE et al., 2009).

In den Ergebnissen dieser Untersuchung sind keine positiven Simultantestergebnisse in tuberkuloseunverdächtigen Beständen vorgekommen. In tuberkuloseverdächtigen Beständen waren von drei im Simultantest positiven und im BOVIGAM[®]-Test negativen Rindern zwei infiziert mit *M. caprae* (Nachweis durch Kultur aus Organproben). Das dritte Rind war negativ in der Kultur, jedoch lagen bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung Hinweise auf Tuberkulose vor. Eine Beurteilung nur nach dem Ergebnis des BOVIGAM[®]-Tests hätte fatale Folgen nach sich gezogen.

Eine höhere Spezifität bei der Auswertung der Ergebnisse des Simultan- und des BOVIGAM[®]-Tests mit einer Und-Verknüpfung der Ergebnisse (Ergebnis nur positiv, wenn beide Ergebnisse positiv) gegenüber der Ergebnisse des Simultantests konnte in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls nicht bestätigt werden (94 % gegenüber 95 %).

Gerade für diesen Anwendungszweck der Freitestung nach falsch-positiven Ergebnissen im Intrakutantest könnte eine Stimulation mit spezifischeren Antigenen als PPD-B wie zum Beispiel ESAT-6 und CFP-

10 geeignet sein (BUDDLE et al., 2009). Durch die Stimulation mit PPD-A beim BOVIGAM[®]-Test werden zwar falsch-positive Ergebnisse nach Kontakt mit aviären Mykobakterien verringert, andererseits besteht die Gefahr der Maskierung einer Infektion mit Rindertuberkulose.

Die alleinige Stimulation mit MTC-spezifischen Peptiden könnte ein Ausweg aus diesem Dilemma sein. In jedem Fall sind größere Feldstudien nötig, um festzustellen, welche Peptide in Kombination mit ESAT-6 und CFP-10 geeignet sind, um neben der sicheren Unterscheidung mit Tuberkulose infizierter Tiere von geimpften oder mit Paratuberkulose infizierten Tieren eine hinreichende Sensitivität zu erreichen (JONES et al., 2010).

HOULIHAN und Mitarbeiter (2008) beschreiben eine höhere Sensitivität des BOVIGAM[®]-Tests gegenüber dem Simultantest vor allem bei frischen Infektionen. Diese höhere Sensitivität konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Allerdings ist unbekannt, wie lange die Rinder bereits infiziert waren, während in der Untersuchung von HOULIHAN und Mitarbeitern (2008) der Anteil der Kälber relativ hoch war, die Infektion aufgrund des Alters also noch frisch sein musste.

Beim BOVIGAM[®]-Test scheint es sich um einen guten Herdentest zu handeln. In dieser Untersuchung waren positive Ergebnisse nur in verdächtigen Herden festzustellen, in denen jeweils immer auch weitere Tiere im Simultan- und BOVIGAM[®]-Test positiv reagierten und dort, wo Organproben untersucht wurden, auch immer positive Kulturergebnisse im Bestand vorkamen. Umgekehrt waren alle BOVIGAM[®]-Ergebnisse der Rinder aus dem unverdächtigen Bestand negativ.

Für einen zuverlässigen Test auf Einzeltierebene sind jedoch Verbesserungen auf allen Ebenen wichtig, vor allem da die Tuberkuloseverordnung die Diagnostik bei einzelnen Tieren voraussetzt. Momentan ist die Serologie in der Diagnostik der Tuberkulose zwar ohne Bedeutung (FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2010), könnte jedoch in Zukunft womöglich wertvolle Dienste leisten. Bei Milchkühen könnte ein Antikörpernachweis aus dem Kolostrum versucht werden, da diese Rinder ein höheres Alter als Masttiere erreichen und damit eine höhere

Wahrscheinlichkeit für eine Infektion und Erkrankung aufweisen, im Kolostrum die Antikörperkonzentration sehr hoch ist und das Probenmaterial ohne großen Aufwand gewonnen werden kann.

1.3 BOVIGAM®-Test bei Blutentnahme unmittelbar vor dem Setzen und beim Ablesen des Simultantests

Um zu prüfen, inwieweit ein vorhergehender Simultantest das Ergebnis des BOVIGAM®-Tests beeinflussen kann, wurden die Werte OD (PPD-B) und OD (PPD-A) sowie deren Differenzen jeweils bei Blutabnahme unmittelbar vor dem Setzen und beim Ablesen des Simultantests 72 Stunden später verglichen.

Bei den 42 Rindern aus dem unverdächtigem Bestand lagen die OD-Werte und deren Differenzen aus Blut, das beim Ablesen des Simultantests entnommen wurde, signifikant unter den Werten der Ergebnisse aus Blut, das beim Setzen des Simultantests entnommen wurde.

Nach der Durchführung des BOVIGAM®-Tests aus Blut, das vor dem Simultantest entnommen wurde, und vor der Durchführung des BOVIGAM®-Tests aus Blut, das nach dem Simultantest entnommen wurde, wurde ein neues BOVIGAM®-Kit eingesetzt. Offensichtlich hat dieser Wechsel des Labormaterials zur Veränderung der Ergebnisse dieser Rinder geführt. Laut telefonischer Aussage der Fa. Prionics kann es durch einen Chargenwechsel zu einem solchen Effekt kommen.

Ein Vergleich von OD-Werten zwischen BOVIGAM®-Tests, die mit Kits aus verschiedenen Chargen durchgeführt wurden, ist demnach nicht sinnvoll. Aus diesem Grund ist in der vorliegenden Untersuchung der Vergleich der OD-Werte und deren Differenzen bei Blutabnahme vor und nach dem Simultantest über alle Ergebnisse (positive und negative) nicht aussagekräftig.

Bei der Betrachtung nur der nach dem Simultantest positiven Ergebnisse des BOVIGAM®-Tests zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Differenzen der OD-Werte vor und nach dem Simultantest. Da bei allen diesen Ergebnissen die gleichen Labormaterialien verwendet

wurden, kann festgestellt werden, dass ein vorhergehender Simultantest die OD-Werte des BOVIGAM[®]-Tests sowie deren Differenzen nicht signifikant verändert. Allerdings stieg die Sensitivität des BOVIGAM[®]-Tests im Vergleich zum Ergebnis des Simultantests von 81 % bei Blutentnahme vor dem Simultantest auf 97 % bei Blutentnahme nach dem Simultantest bei gleichbleibender Spezifität von 95 %.

SCHILLER und Mitarbeiter (2010b) fassten in einem Review zusammen, dass bei experimentell mit *M. bovis* infizierten Rindern ein vorhergehender Monotest zwar die PPD-B induzierte Interferon- γ -Produktion bis zu sieben Tage nach dem Test steigert, das Ergebnis des BOVIGAM[®]-Tests jedoch nicht beeinflusst wird, da auch die PPD-A induzierte Interferon- γ -Produktion ansteigt. Bei natürlich infizierten Rindern erhöht ein mindestens drei Tage zurückliegender Monotest die PPD-B induzierte Interferon- γ -Produktion jedoch relativ zur PPD-A-Antwort.

Das Ergebnis des BOVIGAM[®]-Tests scheint also vor allem bei natürlich infizierten Rindern aussagekräftiger zu sein, wenn die Blutproben beim Ablesen des Intrakutantests genommen werden (bessere Sensitivität bei gleicher Spezifität). In der vorliegenden Untersuchung konnte dieser Effekt bei drei Rindern aus dem tuberkuloseverdächtigen Bestand K beobachtet werden. In diesem Bestand waren bei der Blutabnahme vor dem Simultantest 12 von 15 Rindern im BOVIGAM[®]-Test positiv, drei negativ. Im BOVIGAM[®]-Test aus Blut, das nach dem Simultantest entnommen wurde, waren schließlich alle 15 Rinder des Bestandes positiv. Die OD (PPD-B)-Werte aus dem Blut, das vor dem Simultantest entnommen wurde, liegen weit unterhalb des Medians, während diese Werte bei Blutabnahme nach dem Simultantest kaum vom Median abweichen.

Um abzuklären, wie sich der Intrakutantest bei natürlich infizierten, aber nur schwach reagierenden Rindern und vor allem auch bei nicht infizierten Rindern auf das Ergebnis eines nachfolgenden BOVIGAM[®]-Tests auswirkt, sind weitere Versuche nötig (SCHILLER et al., 2010b). In der vorliegenden Untersuchung hatte der Simultantest bei 42 Rindern aus einem tuberkuloseunverdächtigem Bestand keine Auswirkung auf das Ergebnis des BOVIGAM[®]-Tests bei Blutabnahme nach dem Simultantest. Allerdings konnte eine Sensibilisierung bei einem Rind beobachtet

werden, die jedoch bei der Berechnung des BOVIGAM[®]-Ergebnisses durch die Subtraktion des ebenfalls erhöhten OD (PPD-A)-Wertes wieder ausgeglichen wurde.

1.4 Vor- und Nachteile des BOVIGAM[®]-Tests

Zu den Vorteilen des BOVIGAM[®]-Tests im Vergleich zum Simultantest gehört, dass er das Immunsystem des Rindes nicht beeinflusst, nur einen Besuch auf dem Betrieb erfordert und eine objektive Auswertung bietet. Da die Sensitivität des BOVIGAM[®]-Tests jedoch höher ist, wenn das Blut beim Ablesen des Simultantests entnommen wird, ist ein parallel durchgeführter Simultantest durchaus sinnvoll – und damit der BOVIGAM[®]-Test mit einem zweiten Besuch im Betrieb und einer Beeinflussung des Immunsystem des Rindes verbunden.

Ein weiterer Vorteil des BOVIGAM[®]-Tests gegenüber dem Simultantest ist die Positivkontrolle, die sicherstellen soll, dass falsch-negative Resultate aufgrund Immunsuppression durch Medikamente oder schwerer Krankheit (Co-Infektion oder Niederbruchphase der Tuberkulose) ausgeschlossen werden.

Die Gefahr der Maskierung der zellulären Immunreaktion auf Erreger des MTC nach Kontakt der Rinder mit atypischen Mykobakterien (wie für den Simultantest beschrieben) besteht sowohl beim Simultan- als auch beim BOVIGAM[®]-Test, da bei beiden Tests die gleichen Antigene zur Stimulation verwendet werden. Der Vorteil des BOVIGAM[®]-Tests gegenüber dem Simultantest ist hier die Möglichkeit, spezifische Antigene des MTC wie ESAT-6 und CFP-10 einzusetzen. Bei einem Einsatz solcher Antigene im Simultantest wären große Mengen an Antigenen nötig, was den Test sehr teuer machen würde (BUDDLE et al., 2009).

Ein Nachteil des BOVIGAM[®]-Tests ist der zeitkritische Transport, um die Weiterbearbeitung der Blutproben im Labor innerhalb von 20 Stunden zu gewährleisten. Dieser Transport kann erfahrungsgemäß bereits innerhalb von Bayern ein logistisches Problem und vor allem einen erheblichen Kostenfaktor darstellen.

Ein weiterer Nachteil des BOVIGAM[®]-Tests ist, dass eine Wiederholung

des Tests nur aus dem Plasma der bereits stimulierten Zellen möglich ist, da die Stimulation des Vollbluts zum Zeitpunkt X nur einmal durchgeführt werden kann.

Beim QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube-Test, dem entsprechenden Test aus der Humanmedizin, werden jeweils drei Röhrchen direkt bei der Blutentnahme mit je 1 ml Blut befüllt. Ein Röhrchen ist mit Mitogen beschichtet (Positivkontrolle), ein Röhrchen mit einer Mischung von Peptiden der MTC-spezifischen Proteine ESAT-6, CFP-10 und TB7.7, ein Röhrchen bleibt als Negativkontrolle unbeschichtet. Die Röhrchen werden innerhalb von 16 Stunden nach der Entnahme für 16 bis 24 Stunden bei 37 °C bebrütet und können dann bis zu drei Tage zwischen 2 °C und 27 °C aufbewahrt und während dieser Zeit zum Labor transportiert werden. Bei dieser Vorgehensweise wird ein verändertes Testergebnis durch widrige Transportbedingungen des Vollbluts vor der Stimulation weitgehend ausgeschlossen. Außerdem wird dem Test die zeitkritische Komponente genommen.

Eine grundsätzliche Verbesserung bei der Auswertung des BOVIGAM[®]-Tests könnte sein, zwischen den OD-Werten für eindeutig positive bzw. negative BOVIGAM[®]-Ergebnisse einen Zwischenbereich einzuführen, in dem die Ergebnisse als fraglich eingestuft werden und die betroffenen Rinder nochmals untersucht werden sollten. So zeigte der BOVIGAM[®]-Test bei einem Rind aus Bestand A aus demselben Plasma innerhalb von 24 Stunden ein negatives, gefolgt von einem positiven Ergebnis. Die Differenz der OD-Werte betrug nur 0,06.

Ein solcher Wertebereich, in dem die Ergebnisse als fraglich eingestuft werden, ist beim QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube-Test festgelegt. Patienten mit einem Ergebnis in diesem Wertebereich werden erneut untersucht.

1.5 QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube Methode zur Stimulierung des Vollbluts

Bei 16 von 17 Rindern waren die Ergebnisse aus Blutproben, die vor dem Simultantest und beim Ablesen des Simultantests gewonnen wurden, nach Stimulation mit den Antigenen des QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube-

Tests und PPD-B und PPD-A gleich. Ein Rind aus einem tuberkuloseunverdächtigem Bestand zeigte bei der Blutabnahme beim Ablesen der Simultanuntersuchung und nach Stimulation mit den Antigenen des QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube-Tests im BOVIGAM[®] ELISA ein positives Ergebnis.

Der Kontakt des Rindes mit Tuberkulin beim Simultantest könnte zu einer Sensibilisierung auf PPD-B und PPD-A und auf die PPD-B-Komponenten ESAT-6, CFP-10 und TB7.7 geführt haben. Bei der Stimulation mit PPD-B verhinderte der ebenfalls erhöhte OD (PPD-A)-Wert ein positives Testergebnis. Anders bei der Stimulation mit ESAT-6, CFP-10 und TB7.7.

Um die beschriebenen Vorteile der Stimulation mit spezifischen Antigenen (höhere Spezifität ohne Gefahr der Maskierung) nutzen zu können, sollte eine Stimulation mit spezifischen Antigenen nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung nicht nach einem Simultantest durchgeführt werden. Andererseits kann damit die von SCHILLER und Mitarbeitern (2010b) beschriebene erhöhte Sensitivität des BOVIGAM[®]-Tests bei Blutabnahme beim Ablesen des Simultantests im Vergleich zur Blutabnahme vor dem Simultantest nicht genutzt werden. Um die Vor- und Nachteile der Stimulation mit spezifischen Antigenen unter unterschiedlichen Bedingungen abwägen zu können, sind weitere Untersuchungen nötig.

2 Zuverlässigkeit molekularbiologischer Methoden bei der Diagnostik der Rindertuberkulose

2.1 Auswertung der verschiedenen Methoden zur Gewebelyse und der DNA-Anreicherung

Die CT-Werte der Real-time PCR mit unterschiedlich lysiertem Gewebe unterschieden sich kaum. Die angewandte Methode zur Lyse des Gewebes scheint also bei der molekularbiologischen Diagnostik keine entscheidende Rolle zu spielen. Die nachfolgende Behandlung mit LOOXSTER[®] führte jedoch beim Darmlymphknoten bei drei von vier Proben beim Nachweis von IS1081 und HELI zu einer Verbesserung der CT-Werte um zirka drei Zyklen. Da diese CT-Werte optimalerweise bei 32,

oft jedoch höher liegen, kann eine solche Verbesserung in manchen Fällen zu einer effektiveren Diagnostik beitragen, zum Beispiel, indem Wiederholungen von PCR-Läufen bei fraglichen Ergebnissen verhindert werden.

Andererseits ist die DNA-Anreicherung mit einem erheblichen Mehraufwand und entsprechenden Kosten verbunden, so dass LOOXSTER[®] nicht für die Routinediagnostik geeignet ist. Womöglich könnte ein Einsatz bei ausgewählten Proben sinnvoll sein.

Beim Lungenlymphknoten konnten die Gene IS1081 und HELI in der Real-time PCR weder vor noch nach der DNA-Anreicherung nachgewiesen werden, obwohl in einer früheren Untersuchung dieses Lymphknotens beide Gene bereits nachgewiesen worden waren. Diese Tatsache verdeutlicht das Problem, dass nicht so sehr die Art und Weise der Vorbehandlung und Lyse des Gewebes von Bedeutung zu sein scheint, als vielmehr die Wahrscheinlichkeit, dass sich Mykobakterien, die nicht homogen im Gewebe verteilt sind, in der bearbeiteten Probe befinden.

Jede der Methoden wurde jeweils nur einmal pro Lymphknoten durchgeführt, weswegen die Ergebnisse nicht als repräsentativ gelten können. Das Problem bei einer größer angelegten Versuchsreihe liegt im Ausgangsmaterial. Es würde eine größere Menge homogenisierten Lymphknotengewebes benötigt, die Mykobakterien-DNA in einer ausreichenden Menge enthält. Bei den Resten bereits positiv getesteter Lymphknoten ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass – gerade bei sichtbaren Läsionen – die entsprechend infizierten Gewebeteile bereits bei der ersten Beprobung entfernt wurden. Je größer die homogenisierte Menge, desto größer ist zudem der Verdünnungseffekt.

2.2 Auswertung der Diagnosemethoden beim toten Tier

Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der Methoden jeweils auf das Ergebnis der Kultur als Goldstandard bezogen.

Die Real-time PCR aus der Amtlichen Methodensammlung des FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUTS (2010) wies in der vorliegenden

Untersuchung eine Sensitivität von 59 % und eine Spezifität von 99 % auf. KÖHLER und Mitarbeiter (2010) wiesen für diese Real-time PCR eine Sensitivität von 73 % und eine Spezifität von 100 % nach, allerdings aus Organproben, die tuberkulose typische Veränderungen aufwiesen. Bei der Berechnung der Ergebnisse dieser Untersuchungsmethode nur für die in der vorliegenden Untersuchung pathologisch-anatomisch verdächtigen Organproben stieg die Sensitivität auf 68 %. Mit dieser gleichen Voraussetzung von verdächtigen Organproben und damit einer gezielteren Probennahme für die PCR liegt die Sensitivität nah an der von KÖHLER und Mitarbeitern (2010) erzielten Sensitivität.

Dass das Vorhandensein von sichtbaren Läsionen und eine entsprechend gezielte Probennahme die Sensitivität einer molekularbiologischen Untersuchung verbessert, stellten auch PARRA und Mitarbeiter (2008) fest: Bei der Schlachtieruntersuchung mit einer Real-time PCR basierend auf dem Nachweis der 16S-23S ITS (Intragenic Spacer Region) betrug die Sensitivität im Schnitt 73,87 %, wobei die Sensitivität bei Lymphknoten mit sichtbaren Läsionen um fast 20 % höher lag als bei solchen ohne sichtbare Läsionen.

Dieser Effekt war auch beim Einsatz des GenoType[®] Mycobacteria Direct-Tests zu beobachten. Der Test zeigte eine Sensitivität von 41 %, die Spezifität lag bei 99 %. Unter der Voraussetzung, dass in der anatomisch-pathologischen Untersuchung tuberkulose typische Veränderungen festgestellt werden konnten, stieg die Sensitivität des GenoType[®] auf 48 %. Die geringere Sensitivität im Vergleich zur Real-time PCR mag darin begründet sein, dass mit diesem Test RNA nachgewiesen wird und diese RNA instabiler ist als die in der Real-time PCR nachgewiesene DNA.

Bei einem positiven Ergebnis der PCR direkt aus einer Gewebeprobe kann eine Infektion mit Mykobakterien des MTC in kürzester Zeit diagnostiziert werden. Gerade bei der Diagnostik von Tierseuchen kann hier wertvolle Zeit im Vergleich zur Kultur gewonnen werden. Anzeigepflichtig sind zwar bei Rindern nur Infektionen mit *M. bovis* und *M. caprae*, eine Simultanuntersuchung im Herkunftsbestand wird jedoch in jedem Fall nach Vorliegen eines positiven PCR-Ergebnisses auf MTC durchgeführt.

Für eine ausreichende Sensitivität sollten jedoch weitere Diagnosemethoden miteinbezogen werden, da ein negatives PCR-Ergebnis alleine nicht aussagekräftig ist.

Übertragung dieser Ergebnisse auf die Untersuchungen von tuberkuloseverdächtigen Organproben aus dem Schlachthof

Mit der Änderung der Rindertuberkuloseverordnung vom 17. Juni 2009 wurde der Schlachtkörperuntersuchung ein hoher Stellenwert bei der Bekämpfung der Rindertuberkulose zugewiesen. Damit besteht auch die Notwendigkeit, eine schnelle labordiagnostische Abklärung des Verdachtsfalles zu gewährleisten. Nachdem kulturelle Methoden zwischen zwei und sechs Wochen für ein sicheres Ergebnis benötigen, ist eine zuverlässige molekularbiologische Nachweismethode, die innerhalb von wenigen Stunden oder Tagen ein verlässliches Ergebnis liefert, von großer Bedeutung.

Durch die momentane Vorgehensweise einer alleinigen molekularbiologischen Untersuchung von Verdachtsproben aus dem Schlachthof werden mehr als ein Viertel aller bei der Schlachtung auffälliger, tuberkulosepositiver Rinder, die in der kulturellen Untersuchung identifiziert werden könnten, nicht als solche erkannt. Diese Zahl ist umso bedenklicher, als eine Schlachtieruntersuchung eher ungeeignet für eine Früherkennung ist und somit am Schlachthof nur die Spitze des Eisbergs aller tuberkuloseinfizierten Rinder überhaupt erkannt werden kann.

Bis eine entsprechend zuverlässige molekularbiologische Diagnosemethode einsatzfähig ist, sollte die kulturelle Untersuchung der verdächtigen Schlachthofproben auch nach Freigabe des Schlachtkörpers aufgrund eines negativen PCR-Ergebnisses durchgeführt werden. Tuberkulosepositive Rinder würden zu einem höheren Prozentsatz identifiziert. Eine Untersuchung und wenn nötig Sanierung des Herkunftsbestand könnte eingeleitet werden, bevor sich die Seuche unerkannt weiter verbreiten kann.

Dieses Vorgehen widerspricht nicht den Vorgaben des EU-Hygienepakets (Verordnung (EG) Nr. 854/2004 Anhang I Abschnitt IV Kapitel IX Buchstabe E Nummer 2 Satz 2), nach denen bei tuberkuloseverdächtigen

Rindern lediglich befallene Organe bzw. Körperstellen und zugehörige Lymphknoten als genussuntauglich erklärt werden müssen. Bei einem positiven PCR-Ergebnis kommt dieses Vorgehen nicht in Betracht, nach einem negativen PCR-Ergebnis sollte jedoch die Kultur weitergeführt werden, gelangt doch das Fleisch beim momentanen Vorgehen ebenfalls in die Lebensmittelkette – allerdings ohne die Chance der Seuchenkontrolle im Herkunftsbetrieb.

3 Bedeutung des Vorkommens von *Mycobacterium caprae* beim bayerischen Rotwild

3.1 Repräsentativität der beprobten Rothirsche

Die Probenauswahl und Probennahme in den Landkreisen Ostallgäu und Bad Tölz erfolgte grundsätzlich durch die Jagdausübungsberechtigten. Im Oberallgäu wurde über ein Drittel der Tiere, die beprobt wurden, bei großen Drückjagden erlegt. Dabei wurden die Proben von der Verfasserin vor Ort genommen und die Tierkörper dabei adspektorisch untersucht.

In Bezug auf die Alters- und Geschlechtsverteilung entsprachen die beprobten Tiere in den Landkreisen Ostallgäu und Bad Tölz-Wolfratshausen einer repräsentativen Stichprobe aus der Menge der erlegten Rothirsche. Im Oberallgäu wurden im Verhältnis zum Anteil der Alttiere und Schmaltiere an allen erlegten Tieren relativ zu viele Alttiere und zu wenige Schmaltiere untersucht. Da Tuberkulose vor allem bei älteren Rothirschen nachgewiesen werden kann (GLAWISCHNIG, 2009), wurde die Prävalenz dadurch wahrscheinlich eher zu hoch als zu niedrig berechnet.

Der Anteil der untersuchten Rothirsche an allen in der Jagdsaison 2009/2010 erlegten Rothirschen betrug im Oberallgäu 14,54 %, im Ostallgäu 17,63 % und im Landkreis Bad Tölz-Wolfratshausen 6,16 %.

3.2 *Mycobacterium-caprae*-positives Rotwild

Neben dem Vorkommen von verschiedenen atypischen Mykobakterien konnte bei insgesamt drei der 332 beprobten Tiere *M. caprae* isoliert werden: bei einem Schmaltier aus dem Hegering Rohrmoos und einem

I Hirsch aus dem Hegering Ehrenschwang (beide Oberallgäu) sowie bei einem III Hirsch, der in Vorderriß (Landkreis Bad Tölz-Wolfratshausen) erlegt wurde.

Keiner der drei Rothirsche zeigte eine tuberkulose typische Veränderung, die bei der Fleischuntersuchung durch den Jagdausübungsberechtigten sichtbar gewesen wäre. Bei einer Untersuchung nur von Tieren mit verdächtigen Läsionen wäre keiner der Rothirsche als *M.-caprae*-positiv erkannt worden. GAVIER-WIDÉN und Mitarbeiter (2009) fordern die Kultur als Standarduntersuchung für eine sinnvolle Abschätzung der Prävalenz von Tuberkulose bei Wildtieren. Die Prävalenz würde deutlich unterschätzt, wenn nur Tiere mit sichtbaren Läsionen beprobt werden.

Bei keinem der drei tuberkulose positiven Rothirsche konnte *M. caprae* in den Darm- oder Ileoazakallymphknoten nachgewiesen werden. Die Erreger befanden sich nur in Tonsillen, Retropharyngeal-, Mediastinal- und Lungenlymphknoten. Diese Verteilung deutet auf eine Aufnahme der Erreger über den Respirationstrakt hin.

Da keines der Tiere, bei denen *M. caprae* isoliert wurde, in der pathologisch-anatomischen Untersuchung einen Hinweis auf eine offene Tuberkulose zeigte, ist eine Erregerausscheidung durch diese Tiere nicht anzunehmen. Auffällig ist, dass bei allen drei Tieren mehr als ein Lymphzentrum befallen war, was darauf schließen lässt, dass eine tuberkulöse Erkrankung mit Erregerdisseminierung in einer frühen Phase vorgelegen hat.

3.3 Prävalenz der Rindertuberkulose beim Rotwild

Während in der vorliegenden Untersuchung eine Prävalenz von *M. caprae* beim Rotwild von 0,91 % nachgewiesen werden konnte, ergab sich laut dem Zwischenbericht einer entsprechenden Studie im grenznahen österreichischen Lech- und Tannheimertal eine Prävalenz von 6,7 % (9 positive von 133 untersuchten Rothirschen) (BAUERNZEITUNG, 2009).

Die höhere Prävalenz von *M.-caprae*-Infektionen beim Rotwild im grenznahen Österreich könnte darauf zurückzuführen sein, dass die 139 insgesamt zu beprobenden Rothirsche eine andere Alters- und

Geschlechtsstruktur aufweisen als die Rothirsche, die für die vorliegende Arbeit untersucht wurden: 21 % III Hirsche, 20 % II Hirsche, 7 % I Hirsche, 27 % Alttiere, 8 % Schmaltiere und 17 % Kälber (SCHÖPF, 2009).

Laut GLAWISCHNIG (2009) sind vor allem ältere und männliche Tiere von Tuberkulose betroffen, da die Erregerübertragung nicht nur an der Fütterung, sondern vor allem auch während der Brunft stattfinden soll. Bei der Festlegung der Sollstückzahlen für die österreichische Rotwildstudie wurde offensichtlich Wert darauf gelegt, die stärker von Tuberkulose betroffenen Alters- und Geschlechtsgruppen vermehrt mit einzubeziehen.

Ein weiterer Grund für die höhere Prävalenz in der österreichischen Rotwildstudie könnte die höhere Rotwilddichte in Österreich sein: Während im Lechtal bis zu 10 Stück Rotwild auf 100 Hektar kommen (SCHÖPF, 2009), liegt die Rotwilddichte in den Allgäuer Alpen zwischen 4 und 7 Stück, in den übrigen bayerischen Alpengebieten zwischen 1,5 und 4 Stück pro 100 Hektar (DEUTSCHE WILDTIERSTIFTUNG, 2010).

Bei einer höheren Tierdichte ist die Wahrscheinlichkeit einer sich selbst unterhaltenden Infektion innerhalb der Population und damit der Anteil der infizierten Tiere höher, da die Persistenz einer Infektion innerhalb einer Wildtierart nicht nur von der Ausscheidung der Erreger, sondern auch von ökologischen Faktoren wie Populationsdichte und Möglichkeiten zur gegenseitigen Infektion abhängt (ARANAZ et al., 2004).

3.4 Auswertung der epidemiologischen Ergebnisse der Untersuchung des *Mycobacterium-caprae*-positiven Rotwilds

Das MIRU-VNTR-Muster des *M. caprae*-Stamms, der aus dem Hirsch aus dem Landkreis Bad Tölz-Wolfratshausen isoliert wurde, gleicht dem des Karwendel-Typs. Dieser Karwendel-Typ wurde von SCHÖNBAUER und Mitarbeitern (2004) beschrieben: Seit rund 30 Jahren kommen im Karwendel „Kugelhirsche“ vor, die sich durch besonders große Hodensäcke („Brunftkugeln“) auszeichnen, in denen immer wieder *M. caprae* nachgewiesen werden konnte.

Bei dem Stamm, der im Rahmen der Untersuchungen für diese Arbeit isoliert wurde, handelt es sich um den ersten Nachweis in Bayern. Der

Stamm wurde bisher nur bei Rothirschen im Karwendel nachgewiesen (PRODINGER, E-Mail).

Beide *M.-caprae*-Stämme der positiven Rothirsche aus dem Oberallgäu zeigten in der MIRU-VNTR-Typisierung das gleiche Muster. Dieses Muster entspricht dem Muster des *M.-caprae*-Stamms aus den Organen des Schlachtrindes, die für diese Arbeit untersucht wurden. Da alle weiteren Rinder, die für diese Arbeit beprobt wurden, in direktem Zusammenhang mit diesem Tuberkuloseausbruch getötet wurden, ist anzunehmen, dass die *M.-caprae*-Stämme aller anderen Rinderorganproben ebenfalls dieses oder ein sehr ähnliches Muster zeigen. Dieses Muster wurde in Österreich bisher weder bei *M.-caprae*-Stämmen von Rindern noch vom Rotwild nachgewiesen. Allerdings lassen sich *M.-caprae*-Stämme von sieben Rindern aus drei Beständen im Allgäu aus früheren Untersuchungen eben diesem Muster zuordnen (PRODINGER, E-Mail). Dieser „Allgäu-Typ“ entspricht nicht dem Lechtal-Typ, der bereits bei Rindern aus dem Bezirk Landeck und Reutte, bei Rindern und freilebendem Rotwild aus dem Tiroler Lechtal, bei Rotwild aus dem Bezirk Bludenz in Vorarlberg sowie bei Rindern im Allgäu festgestellt wurde (AGES, 2009; PRODINGER, E-Mail).

Da sowohl der Lechtal-Typ als auch der „Allgäu-Typ“ beim Rotwild und bei Rindern im österreichisch-bayerischen Grenzgebiet isoliert wurden, lässt sich darauf schließen, dass sich die Rothirsche und die Rinder jeweils entweder untereinander infiziert haben oder die Ansteckung auf eine gemeinsame Quelle zurückgeht. Auf die Richtung der Infektionsübertragung oder den Infektionsherd lässt das Ergebnis keine Rückschlüsse zu.

Aufgrund der in dieser Untersuchung ermittelten niedrigen Prävalenz von *M.-caprae*-Infektionen beim bayerischen Rotwild scheint es unwahrscheinlich, dass Rotwild eine wesentliche Rolle als Erregerreservoir oder als maßgebliche Infektionsquelle für die Rinderpopulation spielt – umso mehr, als bei keinem der Rothirsche Hinweise auf eine offene Tuberkulose gefunden wurden.

3.5 Überlegungen zur Ausbreitung von *Mycobacterium caprae* im Allgäu

Rinder, die für diese Arbeit beprobt wurden, zeigten in der pathologisch-anatomischen Untersuchung deutliche Hinweise auf Tuberkulose, Fälle von offener Tuberkulose waren nicht auszuschließen.

Bei der Untersuchung der Alp-Rinder reagierten von 14 Rindern aus dem Herkunftsbestand des Schlachtrindes im Simultantest sieben positiv und sechs fraglich, im BOVIGAM[®]-Test (Bestand B) zehn positiv. Von weiteren 41 Rindern (Bestände G und H), die sich auf der gleichen Alpe befunden hatten, zeigte kein Rind im Simultan- oder BOVIGAM[®]-Test ein positives Ergebnis. Dass nur Rinder dieses einen Bestandes betroffen waren, macht es sehr wahrscheinlich, dass in diesem Fall die Rinder die Tuberkuloseinfektion bereits aus dem Herkunftsbestand mit auf die Alpe gebracht hatten.

Das besagte Schlachtrind war im November 2007 im Rahmen der flächendeckenden Tuberkulinisierung im Allgäu negativ getestet worden. Die Quelle der in der Zwischenzeit stattgefundenen Infektion ist unbekannt. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Infektion des betroffenen Bestandes auf Rotwild oder andere Wildtiere zurückgeht. Für die Rinder auf der Alpe ist nach den Ergebnissen dieser Untersuchung jedoch eine größere Infektionsgefahr von den tuberkulosepositiven Rindern auf der Alpe ausgegangen als vom Rotwild.

Deshalb sollten sowohl die Rinder als auch das Rotwild und womöglich auch andere Wildtiere entsprechend überwacht werden. Aus diesem Grund fordert zum Beispiel auch die BOVINE TB ADVISORY GROUP (2009) zur Bekämpfung der Rindertuberkulose in Großbritannien, dass nicht nur ein Augenmerk auf das Reserviertier Dachs gerichtet werden soll, sondern vor allem ein koordiniertes Untersuchen von Rindern, vor allem vor einem Transport, realisiert werden muss, damit die Rindertuberkulose eingedämmt werden kann.

3.6 Tenazität von *Mycobacterium caprae* in Salzlecksteinmatrix

Eine Übertragung von Tuberkulose zwischen Rindern und Wildtieren kann erfolgen durch räumlich überlappende Territorien (Weiden, Wassertrog), Persistenz der Mykobakterien nach dem Tod des Wirtes (Übertragung auf Tiere, die an Kadavern schnüffeln) und ausgeschiedene Tuberkulose-Erreger, die in der Umgebung überleben (ARANAZ et al., 2004).

Da vor allem auch Salzlecksteine auf Rinderweiden von Rotwild frequentiert werden, wurde für diese Arbeit untersucht, ob *M. caprae* nach Inkubation auf Salz und/oder Rinderspeichel bei verschiedenen Temperaturen und über verschiedene Zeiträume vermehrungsfähig und damit potentiell infektiös bleibt.

Voraussetzung für eine Übertragung von *M. caprae* über Salzlecksteine ist eine entsprechende Kontamination des Salzlecksteins. Da tuberkuloseinfiziertes Rotwild zur Abszessbildung und deshalb zur offenen Tuberkulose tendiert (ZANELLA et al., 2008b) und – wie in dieser Untersuchung gezeigt – Tonsillen und Retropharyngeallymphknoten von der Infektion betroffen sein können, liegt es im Bereich des Möglichen, dass *M. caprae* mit dem Speichel ausgeschieden wird. Darüber hinaus kann auch eine Ausscheidung der Tuberkulose-Erreger über Aerosole einen Salzleckstein kontaminieren. Eine Übertragung von Rindertuberkulose von experimentell infiziertem Rotwild auf nicht infiziertes Rotwild über Futter wurde nachgewiesen (PALMER et al., 2004).

Bei diesem Versuch konnten bei sieben von neun unterschiedlichen Inkubationsbedingungen nach einer Inkubation von vier Wochen noch vermehrungsfähige Mykobakterien festgestellt werden, und zwar nach Inkubation bei

- 20 °C auf Salz mit Speichel und nur auf Speichel
- 31 °C auf Salz mit Speichel und nur auf Speichel und
- 4 °C auf Salz, Salz mit Speichel und nur auf Speichel.

Bei der Verwendung von reinem Salz als Substrat waren vermehrungsfähige Mykobakterien lediglich nach maximal einer Woche

(Inkubationstemperatur 20 °C) bzw. gar nicht mehr nachweisbar (Inkubationstemperatur 31 °C).

Dies könnte womöglich mit dem alkalischen pH-Wert des Rinderspeichels zusammenhängen. SUNG und COLLINS (2000) stellten bei der Untersuchung von Auswirkungen bestimmter Einflüsse bei der Käseherstellung auf *M. avium* ssp. *paratuberculosis* fest, dass die Kombination von niedrigem pH-Wert und der Anwesenheit von Salz die pathogenen Bakterien abtöten konnte. Allerdings wurden beide untersuchten Stämme beim jeweils gleichen pH-Wert (getestet wurde bei pH 4, 5 und 6) nicht signifikant durch verschiedene Salzkonzentrationen beeinflusst. Bei pH 6, dem höchsten pH-Wert im Test, wurden die beiden Stämme überhaupt nicht vom Salzgehalt beeinflusst. Inwieweit diese Ergebnisse auf andere Mykobakterienspezies übertragbar sind, ist unklar. Womöglich könnte auch bei *M. caprae* der pH-Wert eine größere Rolle als der Salzgehalt spielen.

Auch der Flüssigkeitsgehalt der inkubierten Proben könnte von entscheidender Bedeutung sein. In allen Proben, die Rinderspeichel enthielten, waren 0,4 ml Flüssigkeit enthalten, während Proben auf Salz ohne Rinderspeichel nur 0,1 ml Flüssigkeit enthielten. Dass das Wachstum der Mykobakterien bei den Proben, die bei 4 °C gelagert wurden, uneingeschränkt möglich war, kann daran liegen, dass bei der tiefen Temperatur die Flüssigkeit weniger schnell verdunsten konnte als bei der Inkubation bei 20 °C oder gar bei 31°.

Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass *M. caprae* bei niedrigen Temperaturen die Stoffwechselaktivität und damit alle Lebensfunktionen so verlangsamt, dass es selbst bei schwierigen Umweltbedingungen wie einem reinen Salzsubstrat zur Konservierung kommt.

Der Versuch wurde wegen der begrenzten Möglichkeiten im S3-Labor nicht parallel mit Speichel verschiedenener Rinder und/oder mit unterschiedlichen Konzentrationen der *M.-caprae*-Verdünnung durchgeführt. Es konnte aber gezeigt werden, dass *M. caprae* bei einer Inkubation auf Salz vor allem bei niedrigen Temperaturen auch über Wochen vermehrungsfähig und damit infektionstüchtig bleiben kann. Die

Übertragung von *M. caprae* zwischen verschiedenen Tieren über gemeinsam benutzte Salzlecksteine kann daher nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden.

Unbeachtet bleiben musste bei dem Versuch der Einfluss des UV-Lichts auf *M. caprae*. Da bereits KOCH (1908) auf den Einfluss des direkten Sonnenlichts bei der Abtötung der Tuberkelbazillen hingewiesen hatte, könnte zusätzlich zur Empfehlung, Salzlecksteine möglichst unzugänglich für Wildtiere aufzustellen, geraten werden, Salzlecksteine nicht im Schatten aufzustellen, um so das Risiko einer Erregerübertragung durch die Einwirkung von UV-Licht entsprechend zu minimieren. Darüberhinaus wäre Sonneneinstrahlung und die damit verbundene höhere Temperatur und niedrigere Feuchtigkeit bei allen hier diskutierten Theorien von Nachteil für die Überlebensfähigkeit der Mykobakterien.

VI ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Untersuchung wurden innovative Diagnosemethoden der Rindertuberkulose bewertet: der BOVIGAM[®]-Test, ein immunologischer Test zur Diagnostik am lebenden Tier und eine Real-time PCR zur postmortalen Diagnostik aus Gewebeproben. Darüber hinaus wurde das Vorkommen von Tuberkulose beim bayerischen Rotwild untersucht und mögliche Zusammenhänge mit einem Ausbruch von Rindertuberkulose im Oberallgäu überprüft.

Bei der Verwendung des BOVIGAM[®]-Tests konnte keine Verbesserung der Sensitivität oder Spezifität gegenüber der des Simultantests festgestellt werden. Der Einsatz einer Kombination von Simultantest und BOVIGAM[®]-Test verbesserte jedoch die Sensitivität gegenüber den Einzeltests. Beide Tests lieferten gute Ergebnisse in der Herdendiagnostik.

Die vom Friedrich-Loeffler-Institut als amtliche Untersuchungsmethode empfohlene Real-time PCR sichert im positiven Fall eine schnelle und sichere Diagnose über das Vorhandensein von DNA von Mykobakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (Spezifität 99 %). Die Sensitivität der PCR lag bei 59 %, unter der Voraussetzung des Vorliegens verdächtiger Läsionen bei 68 %. Bezüglich Nachweissicherheit bleibt die klassische kulturelle Untersuchung, die in dieser Untersuchung als Referenzmethode verwendet wurde, der Real-time PCR überlegen.

Die PCR-Diagnostik von verdächtigen Rinderproben aus dem Schlachthof als tragende Säule der Bekämpfung der Rindertuberkulose könnte durch eine parallele kulturelle Untersuchung aller Proben (auch nach einem negativen PCR-Ergebnis und der folgenden Freigabe des Schlachttieres) im Sinne einer höheren Sensitivität und damit verbundenen effektiveren Tierseuchenbekämpfung verbessert werden, ohne die Vorgaben des EU-Hygienepakets zu verletzen.

Beim untersuchten bayerischen Rotwild wurde eine Tuberkuloseprävalenz von 0,91 % festgestellt (Landkreis Bad Tölz-Wolfratshausen 2,08 %, Oberallgäu 1,06 %, Ostallgäu 0 %). Hinweise auf eine offene Tuberkulose konnten beim Rotwild nicht festgestellt werden.

Aus allen tuberkulosepositiven Rindern und Rothirschen dieser Untersuchung wurde *Mycobacterium caprae* isoliert. DNA-Fingerprinting-Untersuchungen ergaben, dass die Stämme von Rindern und Rotwild aus dem Oberallgäu eine enge genetische Verwandtschaft aufweisen. Dies lässt darauf schließen, dass sich die Rothirsche und die Rinder jeweils entweder untereinander infiziert haben oder die Ansteckung auf eine gemeinsame Quelle zurückgeht. Auf die Richtung der Infektionsübertragung oder den Infektionsherd lässt das Ergebnis keine Rückschlüsse zu.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass weitere Verbesserungen vor allem in der Einzeltierdiagnostik der Rindertuberkulose wünschenswert sind. Ein Zusammenhang zwischen den Tuberkuloseinfektionen bei Rindern und Rotwild im Oberallgäu ist wahrscheinlich, wobei bisher kein epidemiologisch bedeutsames Reservoir von Rindertuberkulose im Rotwild festgestellt werden konnte.

VII SUMMARY

Innovative diagnostic measures of bovine tuberculosis have been evaluated in this study: the BOVIGAM® test, an immunological test for diagnostics in living animals and a real-time PCR for postmortem diagnostics of tissue samples. Furthermore, the occurrence of tuberculosis in Bavarian red deer has been investigated in order to elucidate a possible connection to the outbreak of bovine tuberculosis in the Upper Allgäu region.

The application of the BOVIGAM® test did not improve sensitivity or specificity versus the simultaneous skin test. However, a combined application of both the simultaneous skin test and the BOVIGAM® test resulted in an enhanced sensitivity, compared to the results of the individual tests. Both tests offer a good feasibility as herd-based diagnostics.

In the event of a positive result, the real-time PCR – an analytical method officially recommended by the National Reference, the Friedrich-Loeffler-Institut laboratory – ensures a rapid and sure diagnosis for the presence of DNA of the *Mycobacterium tuberculosis* bacteria complex (specificity 99%). The achieved sensitivity of the PCR protocol was 59% and increased to 68% under the condition that suspicious lesions were found. The classic cultural isolation, used as a reference method in this work, remains the more sensitive diagnostic method compared to the real-time PCR protocol.

The PCR diagnostics of suspicious bovine samples from the abattoir as the mainstay of the battle against bovine tuberculosis could be improved through a parallel cultural test of all samples (even after a negative PCR result and the following release of the slaughtered animal) to achieve a higher sensitivity and the related more effective control of animal diseases, without infringing upon the stipulations of the EU Hygiene Package.

Among the investigated samples from Bavarian red deer, a tuberculosis prevalence of 0.91 % was identified (region Bad Tölz – Wolfratshausen: 2.08 %, Upper Allgäu: 1.06 %, Eastern Allgäu: 0 %). Evidence of open tuberculosis could not be found in red deer.

From all positive tested samples derived from cattle and red deer in this work, *Mycobacterium caprae* was isolated. DNA fingerprinting revealed that strains from cattle and deer of the Upper Allgäu region show close genetic relations. This suggests that red deer and cattle either have infected one another, or that the infection is derived from a common source. This result does not allow for any conclusions on the direction of the disease propagation or on the source of infection.

In summary, it can be stated that further improvement, especially in individual animal diagnostics for bovine tuberculosis is preferable. A connection between tuberculosis infection among cattle and red deer in the Upper Allgäu region is to be presumed. However, no epidemiologically important reservoir of bovine tuberculosis in red deer could be detected so far.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- Aagaard, C., Govaerts, M., Meikle, V., Gutierrez-Pabello, J. A., McNair, J., Andersen, P., Suarez-Guemes, F., Pollock, J., Espitia, C., Cataldi, A. (2010). Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPD-B and ESAT-6/CFP10 specificity. *Prev Vet Med*, 96 (3-4): 161-169.
- AGES Jahresbericht 2009. http://www.ages.at/uploads/media/VET_Jahresbericht_2009_03.pdf, S. 9.
- Ahmad, S. (2010). New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. *Respir Res*, 11: 169
- Alvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Saez, J. L., Reviriego Gordejo, F. J., Briones, V., Moreno, M. A., Mateos, A., Dominguez, L., Aranaz, A. (2008). Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. *Vet Microbiol*, 128 (1-2): 72-80.
- Alvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Saez, J. L., Marques, S., Dominguez, C., Minguez, O., Fernandez-Mardomingo, B., Mateos, A., Dominguez, L., Aranaz, A. (2009). Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Vet Microbiol*, 135(3-4): 389-393.
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Dominguez, L. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53 (Pt 6): 1785-1789.
- Aranaz, A., De Juan, L., Montero, N., Sanchez, C., Galka, M., Delso, C., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Vela, A. I., Briones, V., Mateos, A., Dominguez, L. (2004). Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J Clin Microbiol*, 42 (6): 2602-2608
- Aranaz, A., Liebana, E., Gómez-Mampaso, E., Galán, J. C., Cousins, D., Ortega, A., Blázquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suárez, G., Domínguez, L. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol*, 49 Pt 3: 1263-1273.
- Assmus, G., Frerking, H., Geyer, K., Liebisch, A., Meermann, A., Rosenberger, G. *Buiatrik*, Bd. 2, Rinderkrankheiten. Verlag Schaper Hannover, 5. Auflage, 1995. S. 90.
- Bange, F.-Ch., Hahn, H., Kaufmann, S. H. E., Ulrichs T. in *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, S. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2009.
- BauernZeitung (2009). Entwarnung im Außerfern bei Tuberkulose für

- Rinder, Nr. 15 vom 9. April 2009, http://www.tirolerbauernbund.at/dataarchive/data4/tbz_15_09.pdf
- Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (1988). Richtlinien für die Hege und Bejagung des Schalenwildes in Bayern. Bekanntmachung des Bayerischen Staatsministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten vom 9. Dezember 1988 (AllIMBI 1989 S. 73), zuletzt geändert durch LMBek vom 23. März 2004 (AllIMBI S. 106). http://www.jagd-bayern.eu/fileadmin/_Allgemein/_Dokumente/jagd-gesetz-hegerichtlinie.pdf
- Berg, S., Firdessa, R. (2009). The burden of mycobacterial disease in ethiopian cattle: implications for public health. *PLoS One* 4 (4): e5068.
- Bezos, J., de Juan, L., Romero, B., Alvarez, J., Mazzucchelli, F., Mateos, A., Dominguez, L., Aranaz, A. (2010). Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals. *Vet Immunol Immunopathol*, 133 (2-4): 269-275.
- Bollo, E., Ferroglio, E., Dini, V., Mignone, W., Biolatti, B., Rossi, L. (2000). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in lymph nodes of wild boar (*Sus scrofa*) by a target-amplified test system. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 47 (5): 337-342.
- Bortz, J., Lienert, G.A., Boehnke, K. (2000) Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik (2. Aufl.). Springer Verlag, Heidelberg.
- Bovine TB Advisory Group (2009). Bovine Tuberculosis in England: Towards Eradication. Final Report of the Bovine TB Advisory Group, 8 April 2009. <http://www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/atoz/tb6/documents/tbag-finalreport.pdf>
- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, Brodin, M. P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., van Soolingen, D., Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (6): 3684-3689.
- Buddle, B. M., P. G. Livingstone, de Lisle, G. W. (2009). Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *N Z Vet, J* 57(4): 173-180.
- Cagiola, M., Feliziani, F., Severi, G., Pasquali, P., Rutili, D. (2004). Analysis of possible factors affecting the specificity of the gamma interferon test in tuberculosis-free cattle herds. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11 (5): 952-956.
- Coad, M., Downs, S. H., Durr, P. A., Clifton-Hadley, R. S., Hewinson, R. G., Vordermeier, H. M., Whelan, A. O. (2008). Blood-based assays to detect *Mycobacterium bovis*-infected cattle missed by tuberculin skin testing. *Vet Rec*, 162 (12): 382-384.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D.,

- Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393 (6685): 537-544.
- Corner, L. A. (1994). Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol*, 40 (1-2): 53-63.
- Corner, L. A. (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Vet Microbiol*, 112 (2-4): 303-312.
- Costello, E., O'Grady, D., Flynn, O., O'Brien, R., Rogers, M., Quigley, F., Egan, J., Griffin, J. (1999). Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *J Clin Microbiol*, 37 (10): 3217-3222.
- Cousins, D. V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D. M., Butler, W. R., Dawson, D., Rodriguez, D., Loureiro, J., Romano, M. I., Alito, A., Zumarraga, M., Bernardelli, A. (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53, Pt 5, 1305-1314.
- Dalley, D., Dave, D., Lesellier, S., Palmer, S., Crawshaw, T., Hewinson, R. G., Chambers, M. (2008). Development and evaluation of a gamma-interferon assay for tuberculosis in badgers (*Meles meles*). *Tuberculosis (Edinb)*, 88 (3): 235-243.
- de la Rua-Domenech, R., Goodchild, A. T., Vordermeier, H. M., Hewinson, R. G., Christiansen, K. H., Clifton-Hadley, R. S. (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci*, 81 (2): 190-210.
- Deeks, J.J., Systematic reviews in health care: Systematic reviews of evaluations of diagnostic and screening tests. *BMJ*, 2001. 323 (7305): 157-62.
- Defra (2007). Advice on keeping cattle and badgers apart: Do you know what's happening in your feed store? Defra Publications, reference PB124747C.
- Delahay, R. J., De Leeuw, A. N., Barlow, A. M., Clifton-hadley, R. S., Cheeseman, C. L. (2002). The status of *Mycobacterium bovis* infection in UK wild mammals: a review. *Vet J*, 164 (2): 90-105.
- Delahay, R. J., Smith, G. C., Barlow, A. M., Walker, N., Harris, A., Clifton-Hadley, R. S., Cheeseman, C. L. (2007). Bovine tuberculosis

- infection in wild mammals in the South-West region of England: a survey of prevalence and a semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. *Vet J*, 173 (2): 287-301.
- Deutsche Wildtierstiftung (2010). <http://www.deutschewildtierstiftung.de/de/schuetzen/arten-schuetzen/rothirsch/verbreitungskarte/>
- Di Marco, V., Marianelli, C., Russo, M., Aronica, V., Bollo, E., Amedeo, S., Valenza, F., Capucchio M. T. (2008). Black wild pigs of Nebrodi Park in Sicily: evidence of their possible role as reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex infection. European Society of Veterinary Pathology 26th Meeting 17-21 September, 2008, Dubrovnik, Croatia.
- Doherty, M. L., Monaghan, M. L., Bassett, H. F., Quinn, P. J. (1995). Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Res Vet Sci*, 58 (3): 217-221.
- Donnelly, C. A., Wei, G., Johnston, W. T., Cox, D. R., Woodroffe, R., Bourne, F. J., Cheeseman, C. L., Clifton-Hadley, R. S., Gettinby, G., Gilks, P., Jenkins, H. E., Le Fevre, A. M., McInerney, J. P., Morrison, W. I. (2007). Impacts of widespread badger culling on cattle tuberculosis: concluding analyses from a large-scale field trial. *Int J Infect Dis*, 11 (4): 300-308.
- Drobniewski, F., Strutt, M., Smith, G., Magee, J., Flanagan, P. (2003). Audit of scope and culture techniques applied to samples for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* by hospital laboratories in England and Wales. *Epidemiol Infect*, 130 (2): 235-237.
- Duarte, E. L., Domingos, M., Amado, A., Botelho, A. (2008). Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Vet Microbiol*, 130 (3-4): 415-421.
- Duffield, B. J., Young, D. A. (1985). Survival of *Mycobacterium bovis* in defined environmental conditions. *Vet Microbiol*, 10: 193-197.
- EFSA (2003). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards of the European Food Safety on a request from the Commission related on "Tuberculosis in Bovine Animals: Risks for human health and control strategies" (Question N° EFSA-Q-2003-025, adopted on 26 November 2003). *The EFSA Journal* (2003) 13, 1-52.
- Eisenberg, S. W., Nielen, M., Santema, W., Houwers, D. J., Heederik, D., Koets, A. P. (2010). Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. *Vet Microbiol*, 143 (2-4): 284-292.
- Erler, W., Kahlau, D., Martin, G., Naumann, L., Schimmel, D., Weber, A. (2003). Zur Epizootiologie der Rindertuberkulose in der Bundesrepublik Deutschland. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.*, 116 (7-8): 288-292.
- EU-Veterinärwoche (2009). Veranstaltung in Zusammenarbeit mit dem

- Europäischen Tierärzteverband (Federation of Veterinarians of Europe - FVE) vom 28. September bis 4. Oktober 2009. http://one-health.eu/ee/index.php/de/page/rindertuberkulose/eu_vet_week_2009
- Evans, J. T., Smith, E. G., Banerjee, A., Smith, R. M., Dale, J., Innes, J. A., Hunt, D., Tweddell, A., Wood, A., Anderson, C., Hewinson, R. G., Smith, N. H., Hawkey, P. M., Sonnenberg, P. (2007). Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet*, 369 (9569): 1270-1276.
- Fahrmeir, L., Künstler, R., Pigeot, I., Tutz G. (2010) Statistik. Der Weg zur Datenanalyse (7. Aufl.). Springer Verlag, Berlin.
- Fite, G.L., Cambre, P. J., Turner, M. H. (1947). Procedures for demonstrating lepra bacilli in paraffin sections. *Arch Pathol (Chic)* V43 (6): 624
- Faraco, J. (1938). *Rev. bras. Leprol.*, 6, 177.
- Friedrich-Loeffler-Institut (2010). Amtliche Methodensammlung, Stand 7.Juli 2010, <http://www.fli.bund.de/de/startseite/publikationen/amtliche-methodensammlung.html>, S. 396 – 411
- Friedrich-Loeffler-Institut. Jahresbericht 2009. http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/2009/de/FLI-Jahresbericht_2009.pdf. S. 58-63.
- Frothingham, R.; Meeker-O'Connell W. A. (1998). Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144 (Pt 5): 1189-1196.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J. C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P. R., Parkhill, J., Barrell, B. G., Cole, S. T., Gordon, S. V., Hewinson, R. G. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (13): 7877-7882.
- Gavier-Widen, D., Cooke, M. M., Gallagher, J., Chambers, M. A., Gortázar, C. (2009). A review of infection of wildlife hosts with *Mycobacterium bovis* and the diagnostic difficulties of the 'no visible lesion' presentation. *N Z Vet J*, 57 (3): 122-131
- Gavin, W., Broughan, J., Chambers, M., Clifton-Hadley, R., Crawshaw, T., de la Fuente, J., Delahay, R., Gavier-Widen, D., Gortazar, C., Hewinson, G., Jackson, V., Martín-Hernando, M. P., Neimanis, A., Salguero, F. J., Vicente, J., Ward, A., McDonald, R. (2009). Scientific Review on Tuberculosis in wildlife in the EU. EFSA-Q-2008-04992. <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/12e.htm>.
- Glas, A.S., Lijmer, J.G., Prins, M. H., Bonsel, G. J., Bossuyt, P. M. (2003) The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *Journal of Clinical Epidemiology*, 56 (2003): 1129-1135.

- Glawischnig, W. (2009). Tuberkulose bei Wildtieren. <http://www.vorarlberg.gv.at/pdf/tuberkulosebeiwildtieren.pdf>
- Glawischnig, W., Allerberger, F., Messner, C., Schönbauer, M., Prodingler, W. M. (2003). Tuberkulose-Endemie bei freilebendem Rotwild (*Cervus elaphus hippelaphus*) in den nördlichen Kalkalpen. *Vet Med Austria / Wien. Tierärztl. Mschr.*, 90 (2003): 38-44.
- Gormley, E., Doyle, M. B., Fitzsimons, T., McGill, K., Collins, J. D. (2006). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet Microbiol*, 112 (2-4): 171-179.
- Gortazar, C., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Vicente, J (2005). Disease risks and overabundance of game species. *European Journal of Wildlife Research*, 52: 81-87
- Gortazar, C., Torres, M. J., Vicente, J., Acevedo, P., Reglero, M., de la Fuente, J., Negro, J. J., Aznar-Martin, J. (2008). Bovine tuberculosis in Donana Biosphere Reserve: the role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds. *PLoS One* 3 (7): e2776.
- Götz, F. (2010). Tuberkulose – eine alte Krankheit mit aktueller Bedeutung. Vortrag im Rahmen des Symposiums zum Thema „Tuberkulose der Rinder“ der Stuttgarter Tierärztlichen Gesellschaft e.V. am 10.02.2010 in Fellbach.
- Green, L. R., Jones, C. C. (2009). Single-antigen serological testing for bovine tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*, 16 (9) 1309-1313.
- Griffin, J. F., Rodgers, C. R., Liggett, S., Mackintosh, C. G. (2006). Tuberculosis in ruminants: characteristics of intra-tonsillar *Mycobacterium bovis* infection models in cattle and deer. *Tuberculosis (Edinb)*, 86 (6): 404-418.
- Groenen, P. M., Bunschoten, A. E., van Solingen, D., van Embden, J. D. (1993). Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol*, 10 (5): 1057-1065.
- Haddad, N., Masselot, M., Durand, B. (2004). Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Res Vet Sci*, 76 (1): 1-18.
- Harrington, N. P., Surujballi, O. P., Prescott, J. F., Duncan, J. R., Waters, W. R., Lyashchenko, K., Greenwald, R. (2008). Antibody responses of cervids (*Cervus elaphus*) following experimental *Mycobacterium bovis* infection and the implications for immunodiagnosis. *Clin Vaccine Immunol*, 15 (11): 1650-1658.
- Hermans, P. W., van Soolingen, D., Bik, E. M., de Haas, P. E., Dale, J. W., van Embden, J. D. (1991). Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun*, 59 (8): 2695-2705.

- Hermoso de Mendoza, J., Parra, A., Tato, A., Alonso, J. M., Rey, J. M., Peña, J., García-Sánchez, A., Larrasa, J., Teixidó, J., Manzano, G., Cerrato, R., Pereira, G., Fernández-Llario, P., Hermoso de Mendoza, M. (2006). Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992-2004). *Prev Vet Med*, 74 (2-3): 239-247
- Hewinson, R. G., Vordermeier, H. M., Smith, N. H., Gordon, S. V. (2006). Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: a feeling for the organism. *Vet Microbiol*, 112 (2-4): 127-139.
- Hof, H., Dörries R. (2005). *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 3. Auflage, S. 352.
- Houlihan, M. G., Dixon, F. W., Page, N. A. (2008). Outbreak of bovine tuberculosis featuring anergy to the skin test, udder lesions and milkborne disease in young calves. *Vet Rec*, 163 (12): 357-361.
- House of Commons – Environment, Food and Rural Affairs Committee (2008). Badgers and cattle TB: the final report of the Independent Scientific Group on Cattle TB. <http://www.publications.parliament.uk/pa/cm200708/cmselect/cmenvf/130/130i.pdf>, p. 3-20
- Isenberg, H. D. (2004). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, Washington, 7.2.3.
- Jenkins, H. E., Woodroffe, R., Donnelly, C. A. (2008). The effects of annual widespread badger culls on cattle tuberculosis following the cessation of culling. *Int J Infect Dis*, 12 (5): 457-465.
- Jenkins, H. E., Woodroffe, R., Donnelly, C. A., Cox, D. R., Johnston, W. T., Bourne, F. J., Cheeseman, C. L., Clifton-Hadley, R. S., Gettinby, G., Gilks, P., Hewinson, R. G., McInerney, J. P., Morrison, W. I. et al. (2007). Effects of culling on spatial associations of *Mycobacterium bovis* infections in badgers and cattle. *Journal of Applied Ecology* 44, 897-908.
- Jocks, P., Erschig, F. Rindertuberkulose – ein Problem, nicht nur in Afrika. *Dt. Tierärzteblatt* 11/2009, S. 1460 – 1466.
- Johnson, S.R., Dunbar, M.R., 2008. Use of Infrared Thermography as an Alternative Method to Evaluate the Comparative Cervical Test (CCT) in Cattle Sensitized to *Mycobacterium bovis* or *M. avian*. *Proceedings of 112th Annual Meeting of the United States Animal Health Association*, Greensboro, NC. 101-102.
- Jones, G. J., Hewinson, R. G., Vordermeier, H. M. (2010). Screening of predicted secreted antigens from *Mycobacterium bovis* identifies potential novel differential diagnostic reagents. *Clin Vaccine Immunol*, 17 (9): 1344-1348.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J. (1997). Simultaneous detection and strain

- differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, 35 (4): 907-914.
- Kapur, V., Li, L. L., Hamrick, M. R., Plikaytis, B. B., Shinnick, T. M., Telenti, A., Jacobs, W. R., Jr., Banerjee, A., Cole, S., Yuen, K. Y. et al. (1995). Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. *Arch Pathol Lab Med*, 119 (2): 131-138.
- Karlson, A. G., Lessel, E. F. (1970). *Mycobacterium bovis* nom. nov. *Int J Syst Bacteriol* 20, 273-282.
- Koch, R. (1882). Die Aetiologie der Tuberculose. *Berliner Klinische Wochenschrift*. Bd. 19, Nr. 15, 1882, S. 221–230.
- Koch, R. (1908) *Gesammelte Werke*, Leipzig 1912. Bd. II: 211-232
- Köhler, H., Hoffmann, B., Moser, I., Möbius, P. (2010). Novel probe-based real-time PCR for rapid diagnosis of bovine tuberculosis in tissue samples with suspect lesions. Poster auf der Tagung der DVG-FG Bakteriologie und Mykologie vom 22.6. bis 24.6.2010 in Jena.
- Kubica, T., Rüscher-Gerdes, S., Niemann, S. (2003). *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J Clin Microbiol*, 41 (7): 3070-3077.
- Kühnen E., Rüscher-Gerdes S. in Konietzko N., Loddenkemper R. (Hrsg). *Tuberkulose*. Georg Thieme Verlag 1999, S. 53 – 61.
- Lehmann, K. B., Neumann, R. O. *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik*. Lehmann, München 1896.
- Leung, K. L., Yip, C. W., Cheung, W. F., Lo, A. C., Ko, W. M., Kam, K. M. (2009). Development of a simple and low-cost real-time PCR method for the identification of commonly encountered mycobacteria in a high throughput laboratory. *J Appl Microbiol*, 107 (5): 1433-1439.
- Lyashchenko, K. P., Greenwald, R., Esfandiari, J., Chambers, M. A., Vicente, J., Gortazar, C., Santos, N., Correia-Neves, M., Buddle, B. M., Jackson, R., O'Brien, D. J., Schmitt, S., Palmer, M. V., Delahay, R. J., Waters, W. R. (2008). Animal-side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of free-ranging wildlife. *Vet Microbiol*, 132 (3-4): 283-292.
- Lyashchenko, K. P., Singh, M., Colangeli, R., Gennaro, M. L. (2000). A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *J Immunol Methods*, 242 (1-2): 91-100.
- Machackova, M., Matlova, L., Lamka, J., Smolik, J., Melicharek, I., Hanzlikova, M., Docekal, J., Cvetnic, Z., Nagy, G., Ocepek, M., Paclik, I. (2003). Wild boar (*Sus scrofa*) as a possible vector of

- mycobacterial infections: review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 to 2001. *Veterinary Medicine – Czech*, 48 (3): 51-56.
- Mackintosh, C. G., Qureshi, T., Waldrup, K., Labes, R. E., Dodds, K. G., Griffin, J. F. (2000). Genetic Resistance to Experimental Infection with *Mycobacterium bovis* in Red Deer (*Cervus elaphus*). *Infection and Immunity*, March 2000, p. 1620-1625, Vol. 68, No. 3.
- Maeder, S., Hars, J., Rambaud, T., Game, Y., Boschirolì, M.-L. (2009). Rôle du sanglier (*Sus scrofa*) dans l'épidémiologie de la tuberculose dans la forêt de Brotonne (France). Résultats de l'enquête épidémiologique 2006-2007. *Épidémiologie et Santé Animale*, 53: 129-144.
- Martin-Hernando, M. P., Torres, M. J., Aznar, J., Negro, J. J., Gandía, A., Gortázar, C. (2009). Distribution of lesions in red and fallow deer naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *J Comp Pathol*, 142 (1): 43-50.
- Mostowy, S., Cousins D., Brinkman, J., Aranaz, A., Behr, M. A. (2002). Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis*, 186 (1): 74-80.
- Murphy, D., Gormley, E., Costello, E., O'Meara, D., Corner, L. A. (2010). The prevalence and distribution of *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*) as determined by enhanced post mortem examination and bacteriological culture. *Res Vet SCI*, 88 (1): 1-5.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2009, 7. Auflage. S. 738-739.
- Niemann, S., Harmsen, D., Rüsç-Gerdes, S., Richter, E. (2000). Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 38 (9): 3231-3234.
- Niemann, S., Richter, E., Rüsç-Gerdes, S. (2002). Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52 (Pt 2): 433-436.
- Nüßlein, F. *Das praktische Handbuch der Jagdkunde*. 1962 BLV Verlagsgesellschaft mbH, München, 12., neubearbeitete Auflage, 1988, S. 225 – 228.
- Olsen, I., Boysen, P., Kulberg, S., Hope, J. C., Jungersen, G., Storset, A. K. (2005). Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infect Immun*, 73 (9): 5628-5635.
- O'Brien, D. J., Schmitt, S. M., Lyashchenko, K. P., Waters, W. R., Berry,

- D. E., Palmer, M. V., McNair, J., Greenwald, R., Esfandiari, J., Cosgrove, M. K. (2009). Evaluation of blood assays for detection of *Mycobacterium bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Michigan. *J Wildl Dis*, 45 (1): 153-164.
- O'Reilly, L. M., Daborn, C. J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis*, 76 Suppl 1: 1-46.
- Palmer, M. V., Whipple, D. L. (2006). Survival of *Mycobacterium bovis* on feedstuffs commonly used as supplemental feed for white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Wildl Dis*, 42 (4): 853-858.
- Palmer, M. V., Waters, W. R., Whipple, D. L. (2002). Lesion development in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Pathol*, 39 (3): 334-340.
- Palmer, M. V., Waters, W. R., Whipple, D. L. (2004). Investigation of the transmission of *Mycobacterium bovis* from deer to cattle through indirect contact. *Am J Vet Res*, 65 (11): 1483-1489.
- Parra, A., Garcia, A., Inglis, N. F., Tato, A., Alonso, J. M., Hermoso de Mendoza, M., Hermoso de Mendoza, J., Larrasa, J. (2006). An epidemiological evaluation of *Mycobacterium bovis* infections in wild game animals of the Spanish Mediterranean ecosystem. *Res Vet Sci*, 80 (2): 140-146.
- Parra, A., Garcia, N., Garcia, A., Lacombe, A., Moreno, F., Freire, F., Moran, J., Hermoso de Mendoza, J. (2008). Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet Microbiol*, 127 (3-4): 315-324.
- Paterson, A. (2008). Report of the 2006-2007 South-west England and Cotswolds survey of tuberculosis in deer. DEFRA, London.
- Pena, L., Garcia, P., Jimenez, M. A., Benito, A., Perez Alenza, M. D., Sanchez, B. (2006). Histopathological and immunohistochemical findings in lymphoid tissues of the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 29, 114-126.
- Pinsky, B. A. and N. Banaei (2008). Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex members to the species level. *J Clin Microbiol*, 46 (7): 2241-2246.
- Prodinger, W. M., Brandstatter, A., Naumann, L., Pacciarini, M., Kubica, T., Boschioli, M. L., Aranaz, A., Nagy, G., Cvetnic, Z., Ocepek, M., Skrypyk, A., Erler, W., Niemann, S., Pavlik, I., Moser, I. (2005). Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J Clin Microbiol*, 43 (10): 4984-4992.
- Prodinger, W. M., Eigentler, A., Allerberger, F., Schönbauer, M., Glawischnig, W. (2002). Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *J Clin Microbiol*, 40 (6): 2270-2272.

- Rehren, G., Walters, S., Fontan, P., Smith, I., Zarraga, A. M. (2007). Differential gene expression between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 87 (4): 347-359.
- Ringuet, H., Akoua-Koffi, C., Honore, S., Varnerot, A., Vincent, V., Berche, P., Gaillard, J. L., Pierre-Audigier, C. (1999). hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 37 (3): 852-857.
- Robert Koch-Institut (2009a). Ratgeber Infektionskrankheiten, Merkblätter für Ärzte „Tuberkulose“, Erstveröffentlichung im Epidemiologischen Bulletin 11/2000, aktualisierte Fassung vom März 2009. http://www.rki.de/cln_178/nn_196878/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__Tuberkulose.html#doc200728bodyText2.
- Robert Koch-Institut (2009b). Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2007. Robert Koch-Institut, Berlin 2009, S. 46.
- Robert Koch-Institut (2010). Epidemiologisches Bulletin Nr. 11, März 2010. http://www.rki.de/cln_178/nn_274324/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2010/11__10.html.
- Rodriguez, J. G., Mejia, G. A., Del Portillo, P., Patarroyo, M. E., Murillo, L. A. (1995). Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology*, 141 (Pt 9): 2131-2138.
- Rodriguez, S., Romero, B., Bezos, J., de Juan, L., Alvarez, J., Castellanos, E., Moya, N., Lozano, F., Gonzalez, S., Saez-Llorente, J. L., Mateos, A., Dominguez, L., Aranaz, A. (2010). High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Vet Microbiol*, 141 (1-2): 89-95.
- Rogall, T., Flohr, T., Bottger, E. C. (1990). Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *J Gen Microbiol*, 136 (9): 1915-1920.
- Rolle, M., Mayr, A. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 6. Auflage. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1993. S. 780-781
- Romero, B., Aranaz, A., Sandoval, A., Alvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Sanchez, C., Galca, M., Fernandez, P., Mateos, A., Dominguez, L. (2008). Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Donana National Park revealed by genotype variation. *Vet Microbiol*, 132 (1-2): 87-95.
- Roth, A., Fischer, M., Hamid, M. E., Michalke, S., Ludwig, W., Mauch, H. (1998). Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol*, 36 (1): 139-147.
- Runyon, E. H., Timpe, A. (1959). Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med. Clin. North Am.* 43, 273-290
- Santos, N., Correia-Neves, M., Ghebremichael, S., Källenius, G.,

- Svenson, S.B., Almeida, V. (2009). Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in wild boar (*Sus scrofa*) from Portugal. *J Wildl Dis*, 45 (4): 1048-1061.
- Schiller, I., Vordermeier, H. M., Waters, W. R., Kyburz, A., Cagiola, M., Whelan, A., Palmer, M. V., Thacker, T. C., Meijlis, J., Carter, C., Gordon, S., Egnuni, T., Hardegger, R., Marg-Haufe, B., Raeber, A., Oesch, B. (2010a). Comparison of tuberculin activity using the interferon-gamma assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet Rec*, 167 (9): 322-326.
- Schiller, I., Vordermeier, H. M., Waters, W. R., Whelan, A. O., Coad, M., Gormley, E., Buddle, B. M., Palmer, M., Thacker, T., McNair, J., Welsh, M., Hewinson, R. G., Oesch, B. (2010b). Bovine tuberculosis: effect of the tuberculin skin test on in vitro interferon gamma responses. *Vet Immunol Immunopathol*, 136 (1-2): 1-11.
- Schönbauer M., Glawischnig W., Traunmüller F., 09.03.2004. Endemische Tuberkulose beim Rotwild im Karwendel. www.ages.at/uploads/media/TBCROTHIRSCHE.pdf
- Schöpf, K. (2009). *Mycobacterium caprae* Infektionen in Tirol. Vortrag im Rahmen der Tuberkulose-Tagung in Bozen am 20. Mai 2009. http://www.ages.at/uploads/media/03_Schoepf.pdf.
- Schultz, G., Deuter, H., Dedek., J. (1992). Zum Vorkommen von *Mycobacterium bovis*-Infektionen beim freilebenden Schwarzwild. In: Proceedings of the 34th International Symposium on Diseases of Zoo and Wild Animals. Santander, Spain, p. 51-53. Akademie Verlag, Berlin.
- Shinnick, T. M., Good, R. C. (1994). Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 13 (11): 884-901.
- Sidders, B., Pirson, C., Hogarth, P. J., Hewinson, R. G., Stoker, N. G., Vordermeier, H. M., Ewer, K. (2008). Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Immun*, 76 (9): 3932-9
- Simpson, V. R. (2000). Veterinary advances in the investigation of wildlife diseases in Britain. *Res Vet Sci*, 69 (1): 11-16.
- Soini, H., Bottger, E. C., Viljanen, M. K. (1994). Identification of mycobacteria by PCR-based sequence determination of the 32-kilodalton protein gene. *J Clin Microbiol*, 32 (12): 2944-2947.
- Sung, N., Collins, M. T. (2000). Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. *Appl Environ Microbiol*, 66 (4): 1334-1339.
- Symmons, J. (2008). Deer and Bovine Tuberculosis in Wales. Project Report to Welsh Assembly Government Cardiff.
- Taylor, G. M., Worth, D. R., Palmer, S., Jahans, K., Hewinson, R. G. (2007). Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle

- lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet Res*, 3: 12.
- Tesink, J. (1970) Infection of cattle by humans with bovine-type tubercle bacteria. *Tijdschr. Ziekenverpl.*, 23: 824.
- Thierry, D., Brisson-Noel, A., Vincent-Levy-Frebault, V., Nguyen, S., Guesdon, J. L., Gicquel, B. (1990). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol*, 28 (12): 2668-2673.
- Thom, M., Howard, C. (2008). Consequence of prior exposure to environmental mycobacteria on BCG vaccination and diagnosis of tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)*, 88 (4): 324-334.
- Van Ingen, J., de Zwaan, I., Dekhuijzen, R., Boerree, M., von Soolingen, D. (2009). Region of Difference 1 in Nontuberculous *Mycobacterium* Species Adds a Phylogenetic and Taxonomical Character. *Journal of Bacteriology*, Sept. 2009, p. 5865-5867.
- Vicente, J., Hofle, U., Garrido, J. M., Fernandez-De-Mera, I. G., Juste, R., Barral, M., Gortazar, C. (2006). Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Vet Res*, 37 (1): 107-119.
- Vordermeier, H. M., Whelan, A., Cockle, P. J., Farrant, L., Palmer, N., Hewinson, R. G. (2001). Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8 (3): 571-578.
- Vordermeier, H. M., Whelan, A. O., Ewer, K., Goodchild, T., Clifton-Hadley, R., Williams, J., Hewinson, R. G. (2006). The BOVIGAM[®] assay as ancillary test to the tuberculin skin test. *Government Vet J*, 16, 72-80.
- Vordermeier, M., Gordon, S. V., Hewinson, A. R. (2009). Antigen mining to define *Mycobacterium bovis* antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected animals: A VLA perspective. *Transbound Emerg Dis*, 56 (6-7): 240-247.
- Warren, R. M., Gey van Pittius, N. C. Barnard, M., Hesseling, A., Engelke, E., de Kock, M., Gutierrez, M. C., Chege, G. K., Victor, T. C., Hoal, E. G., van Helden, P. D (2006). Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int J Tuberc Lung Dis*, 10 (7): 818-822.
- Waters, W. R., Nonnecke, B. J., Palmer, M. V., Robbe-Austermann, S., Bannantine, J. P., Stabel, J. R., Whipple, D. L., Payeur, J. B., Estes, D. M., Pitzer, J. E., Minion, F. C. (2004). Use of recombinant ESAT-6:CFP-10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11 (4): 729-735.
- White, C. I., Birtles, R. J., Wigley, P., Jones, P. H. (2010). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in free-living amoebae isolated from fields not used for grazing. *Vet Rec*, 166 (13): 401-402
- Williams, D. L. in "Tuberculosis" Edited by M. Monir Madkour, Springer

Verlag Berlin 2004, S. 199 ff

- Wood, P. R., Corner, L. A., Rothel, J. S., Baldock, C., Jones, S. L., Cousins, D. B., McCormick, B. S., Francis, B. R., Creeper, J., Tweddle, N. E. (1991). Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust Vet J* 68 (9): 286-290.
- Woodroffe, R., Donnelly, C. A., Cox, D. R., Bourne, F. J., Cheeseman, C. L., Delahay, R. J., Gettinby, G., McInerney, J. P., Morrison, W. I. (2006). Effects of culling on badger (*Meles meles*) spatial organization: implications for the control of bovine tuberculosis. *Journal of Applied Ecology*, 43, 1-10.
- Zanella, G., Durand, B., Hars, J., Moutou, F., Garin-Bastuji, B., Duvauchelle, A., Ferme, M., Karoui, C., Boschioli, M. L. (2008a). *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. *J Wildl Dis*, 44 (1): 99-108.
- Zanella, G., Duvauchelle, A., Hars, J., Moutou, F., Boschioli, M. L., Durand, B. (2008b). Patterns of lesions of bovine tuberculosis in wild red deer and wild boar. *Vet Rec*, 163 (2): 43-47.
- Zanetti, S., Bua, A., Mollicotti, P., Delogu, G., Mura, A., Ortu, S., Sechi, L. A. (2008). Identification of mycobacterial infections in wild boars in Northern Sardinia, Italy. *Acta Vet Hung*, 56 (2): 145-152

IX ANHANG

1 Tabellenverzeichnis

Tab. II.1: Ausbrüche von Rindertuberkulose in Bayern und Deutschland von 2004 bis 2009 (Datenquelle: TSN)	7
Tab. II.2: Anteil der Ausbrüche von Rindertuberkulose in Deutschland, die bei der Fleischuntersuchung entdeckt wurden (Datenquelle: TSN)	7
Tab. II.3: Prävalenzen von Rindertuberkulose bei Wildschweinen in Europa nach einem Review von GAVIN und Mitarbeitern (2009)	14
Tab. III.1: Herkunft und Anzahl der Rinder, von denen Organproben untersucht wurden	29
Tab. III.2: Bezeichnungen der Alterklassen beim Rotwild (NÜBLEIN, 1988; Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, 1988).....	33
Tab. IV.1 Ergebnisse der Real-time PCR (Angabe der CT-Werte) zum Vergleich verschiedener Gewebelyseverfahren und der DNA-Anreicherung mit LOOXSTER® bei einem Darmlymphknoten vom Rind; M1-M4 = Methode 1 bis 4	54
Tab. IV.2 Ergebnisse der Real-time PCR (Angabe der CT-Werte) zum Vergleich verschiedener Gewebelyseverfahren und der DNA-Anreicherung mit LOOXSTER® bei einem Lungenlymphknoten vom Rind; M1-M4 = Methode 1 bis 4	54
Tab. IV.3 Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Darmlymphknoten von Rindern (n = 26)	56
Tab. IV.4 Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Organprobe von der Leber eines Rindes (n = 1).....	57

Tab. IV.5	Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Euterlymphknoten von Rindern (n = 51)	57
Tab. IV.6	Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Leberlymphknoten von Rindern (n = 38).....	58
Tab. IV.7	Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Organproben von Lungen von Rindern (n = 59)	59
Tab. IV.8	Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Lungenlymphknoten von Rindern (n = 55).....	60
Tab. IV.9	Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Lymphknoten-Pools von Rindern (n = 7).....	60
Tab. IV.10	Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Mediastinallymphknoten von Rindern (n = 56).....	61
Tab. IV.11	Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Organprobe von einer Niere eines Rindes (n = 1)	61
Tab. IV.12	Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Retropharyngeallymphknoten von Rindern (n = 60)	62
Tab. IV.13	Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Organproben vom Thymus von Rindern (n = 2).....	62
Tab. IV.14	Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, mikroskopischen, molekularbiologischen und kulturellen Untersuchung der Organproben von den Tonsillen von Rindern (n = 5).....	62

Tab. IV.15: Ergebnisse der Validität der Diagnosemethoden GenoType [®] Mycobacteria Direct-Test und Real-time PCR (bezogen auf das Ergebnis der Kultur; n = 268 bzw. 341 Organproben); 95 %-Konfidenzintervall in eckigen Klammern	63
Tab. IV.16 Ergebnisse der Validität der Diagnosemethoden GenoType [®] Mycobacteria Direct-Test und Real-time PCR unter der Voraussetzung, dass in der pathologisch-anatomischen Untersuchung typische Veränderungen festgestellt werden konnten (bezogen auf das Ergebnis der Kultur; n = 41 bzw. 36 Organproben); 95 %-Konfidenzintervall in eckigen Klammern	63
Tab. IV.17 Ergebnisse aller durchgeführten Untersuchungen in Relation zu den im BOVIGAM [®] -Test untersuchten Rinderblutproben.....	68
Tab. IV.18: Validität der Diagnosemethoden BOVIGAM [®] -Test, Simultanuntersuchung sowie der Kombination von beiden als Und- und Oder-Verknüpfung (bezogen auf das Ergebnis der Kultur); 95 %-Konfidenzintervall in eckigen Klammern	70
Tab. IV.19: BOVIGAM [®] -Test: Vergleich der Optical density (OD)-Werte nach Stimulation mit PPD-B bzw. PPD-A vor und nach einem Simultantest (ST); KI = Konfidenzintervall; n = 69	72
Tab. IV.20: BOVIGAM [®] -Test: Vergleich der Optical density (OD)-Werte nach Stimulation mit PPD-B bzw. PPD-A vor und nach einem Simultantest (ST); nur für nach dem ST positive BOVIGAM [®] -Ergebnisse; KI = Konfidenzintervall; n = 26.....	72
Tab. IV.21: BOVIGAM [®] -Test: Vergleich der Optical density (OD)-Werte nach Stimulation mit PPD-B bzw. PPD-A vor und nach einem Simultantest (ST); nur für nach dem ST negative BOVIGAM [®] -Ergebnisse; KI = Konfidenzintervall; n = 43.....	72
Tab. IV.22: BOVIGAM [®] -Test: OD (PPD-B) und OD (PPD-B) - OD (PPD-A) aus Blutabnahme vor und nach Simultantest (ST) bei drei Rindern aus einem tuberkulosepositiven Bestand mit einem vor ST negativen, nach ST positivem BOVIGAM [®] -Ergebnis	76

Tab. IV.23: BOVIGAM®-Test: Vergleich der Ergebnisse des Bovigam-Tests vor und nach einem Simultantest (ST), bezogen auf ST; 95 %-Konfidenzintervall in eckigen Klammern; n = 60	76
Tab. IV.24: Altersstruktur des beprobten Rotwilds nach Landkreisen...	78
Tab. IV.25: Repräsentativität der Stichprobe der untersuchten Rothirsche aus dem Landkreis Oberallgäu (hoch signifikante Abweichungen ($p < 0,01$; $\alpha = 0,05$) markiert mit *)..	80
Tab. IV.26: Repräsentativität der Stichprobe der untersuchten Rothirsche aus dem Landkreis Ostallgäu (keine signifikanten Abweichungen ($p < 0,05$; $\alpha = 0,05$)).....	80
Tab. IV.27: Repräsentativität der Stichprobe der untersuchten Rothirsche aus dem Landkreis Bad Tölz-Wolfratshausen (keine signifikanten Abweichungen ($p < 0,05$; $\alpha = 0,05$)).....	81
Tab. IV.28: Nachweis von atypischen Mykobakterien beim Rotwild in den Landkreisen Oberallgäu, Ostallgäu und Bad Tölz	82
Tab. IV.29 Nachweis von Mykobakterien des MTC beim Rotwild in den Landkreisen Oberallgäu, Ostallgäu und Bad Tölz.....	83
Tab. IV.30: Befall der einzelnen Organe mit <i>M. caprae</i> beim Rotwild	84
Tab. V.1: Beispiele der Diagnostik Odds Ratio abhängig vom Zusammenspiel aus Sensitivität und Spezifität (DEEKS, 2001); von oben nach unten ist die Spezifität aufgetragen, von rechts nach links die Sensitivität, jeweils von 0,5 bis maximal 0,99	88

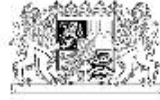
2 Abbildungsverzeichnis

Abb. III.1: Zusammensetzung der Einzelorganproben (n = 361) der untersuchten Rinder.....	30
Abb. III.2: Blutproben (n = 244) von Rindern (n = 173) in den Beständen A bis L vor und nach der Simultanuntersuchung	31
Abb. III.3: Anzahl kombinierter Blut- und Organproben aus vier Rinderbeständen.....	32
Abb. IV.1: Wachstum von <i>M. caprae</i> nach Inkubation unter verschiedenen Bedingungen (n = 36)	65
Abb. IV.2: Zusammenhang zwischen dem Überleben von <i>M. caprae</i> auf Flüssig- und Festnährböden abhängig von dem Vorhandensein von Salz, Rinderspeichel bzw. Salz und Rinderspeichel bei der Inkubation (36 Proben insgesamt, jeweils 12 Proben mit unterschiedlicher Inkubationstemperatur und -dauer auf Salzstein, Rinderspeichel bzw. Salzstein und Rinderspeichel).....	66
Abb. IV.3: BOVIGAM [®] -Test: Box Plots der Optical density (OD)-Werte bei Stimulation mit PPD-B vor (Median = 0,17) und nach (Median = 0,11) einem Simultantest (ST)	73
Abb. IV.4: BOVIGAM [®] -Test: Box Plots der Optical density (OD)-Werte bei Stimulation mit PPD-A vor (Median = 0,14) und nach (Median = 0,09) einem Simultantest (ST)	73
Abb. IV.5: BOVIGAM [®] -Test: Box Plots der Optical density (OD)-Werte bei Stimulation mit PPD-B vor (Median = 0,69) und nach (Median = 0,75) einem Simultantest (ST) nur für nach dem ST positive BOVIGAM [®] -Ergebnisse	74
Abb. IV.6: BOVIGAM [®] -Test: Box Plots der Optical density (OD)-Werte bei Stimulation mit PPD-A vor (Median = 0,19) und nach (Median = 0,20) einem Simultantest (ST) nur für nach dem ST positive BOVIGAM [®] -Ergebnisse	74

Abb. IV.7: BOVIGAM [®] -Test: Box Plots der Optical density (OD)-Werte bei Stimulation mit PPD-B vor (Median = 0,15) und nach (Median = 0,05) einem Simultantest (ST) nur für nach dem ST negative BOVIGAM [®] -Ergebnisse	75
Abb. IV.8: BOVIGAM [®] -Test: Box Plots der Optical density (OD)-Werte bei Stimulation mit PPD-A vor (Median = 0,13) und nach (Median = 0,05) einem Simultantest (ST) nur für nach dem ST negative BOVIGAM [®] -Ergebnisse	75
Abb. IV.9: Zusammensetzung der untersuchten Einzelorganproben beim Rotwild (n = 1.638).....	79

3 Begleitschein der Gewebeproben vom Rotwild

Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit



Untersuchungsantrag zum Tuberkulose-Monitoring beim Rotwild

Untersuchungsmaterial für die Pathologie

Einsender – Name und Anschrift:	LIMS-Eingangsnr. (wird intern vergeben): LIMS-Nr. (wird intern vergeben):
Revier – Name und Anschrift des Pächters:	zuständiges Veterinäramt:

Angaben zum Tier:

Alter und Geschlecht, bitte ankreuzen:

männlich

- ab dem 10. Kopf (I)
- 4. bis 9. Kopf (IIa und IIb)
- 1. bis 3. Kopf (III)
- Hirschkalb, unter 1 Jahr

weiblich

- Alttier, mindestens 2 Jahre
- Schmaltier, 1 bis 2 Jahre
- Wildkalb, unter 1 Jahr

Wann wurde das Tier erlegt:

Wo wurde das Tier erlegt:

Waren Veränderungen feststellbar:

- nein
- ja Bitte kurze Beschreibung:

Für die Untersuchung wird folgendes Probenmaterial benötigt:

- Kehlkopfbereich mit Retropharyngeallymphknoten
- Lunge, vollständig
- Darm, vollständig oder Mesenterial- und ileozäkallymphknoten (Bitte Darm unbedingt in extra Plastiktüte verpacken!)
- Ggf. andere veränderte Organe

Dienstszitz:
LGL
Eggenreuther Weg 43
91058 Erlangen

Telefon: 09131/764-0
Telefax: 09131/764-102

Dienststelle Oberschleißheim:
LGL, Dienststelle Oberschleißheim
Veterinärstr. 2
85764 Oberschleißheim

Telefon: 089/31560-0
Telefax: 089/31560-425

E-Mail und Internet
poststelle@lgl.bayern.de
www.lgl.bayern.de

Anfahrtskizze im Internet
Bahn: 31 Oberschleißheim
Bus: 282 Sonnenstraße
Haltestelle: Veterinärstr.

Seite 1 von 1
Bankverbindung
Bayerische Landesbank
Kto. 1275280
BLZ 700 500 00

X DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Dr. Stefan Hörmansdorfer und Herrn Prof. Dr. Dr. Mathias Büttner danke ich für die Hilfestellung während der Erstellung dieser Arbeit und für die Korrektur des Skripts.

Herrn Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger danke ich für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung und Hilfestellung.

Vielen Dank an das Bayerische Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz, das die Studien in Auftrag gegeben und finanziert hat (Projekte 09-19 und 09-20).

Ganz besonders bedanken möchte ich mich beim Team des Tuberkuloselabors am LGL – Anna Brücklmeier, Angela Huber, Dagmar Meitzler und Silvia Vetter – für ihre tatkräftige Hilfe und unerschöpfliche Geduld sowie bei Frau Dr. Ludmila Naumann für die fachkundige Einweisung in die Tuberkulosedagnostik.

Vielen herzlichen Dank an Susanne Gellert, Gabriele Reif und Heike Lang für die Anleitung zum Arbeiten im Labor und ihre freundliche Hilfe und praktische Unterstützung.

Frau Katharina Schneider am LGL herzlichen Dank für die statistische Beurteilung und Auswertung meiner Daten.

Für die Durchführung der pathologischen Untersuchungen der Rinder, die Hilfestellung bei der pathologisch-anatomischen Untersuchungen beim Rotwild sowie die Durchführung der pathologisch-histologischen Untersuchungen sei Frau Dr. Angela Hafner-Marx und ihrem Team herzlich gedankt. Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Udo Ebert, Frau Dr. Alexa Hagedorn, Frau Dr. Kim Weber, Herrn Helmut Emmer, Herrn Wolfgang Schmidt, Herrn Günther Grassl und Herrn Gerhard Numberger für ihre besondere Unterstützung und Frau Ursula Deen für die praktische Einführung in die Histologie.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Angela Hafner-Marx für ihre vielfältige Unterstützung bei der Organisation der Probennahme bei Rindern und Rotwild sowie der Dateneingabe in LIMS bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Johann Mages im Veterinäramt Oberallgäu für sein Engagement und seine tatkräftige Unterstützung bei der Materialsammlung bei Rindern und Rotwild, für das zur Verfügung stellen der Ergebnisse der Simultantests und für viele hilfreiche Tipps aus der Praxis.

Herrn Dr. David Piendl aus dem Veterinäramt Oberallgäu und Herrn Dr. Dietmar Schmid aus dem Veterinäramt Schwandorf danke ich für das zur Verfügung stellen der Ergebnisse der Simultantests sowie die Entnahme von Blutproben.

Bei den Mitarbeitern der Veterinärämter Bad Tölz-Wolfratshausen, Oberallgäu und Ostallgäu sowie Frau Ulrike Dannheimer aus dem Sachgebiet 34 des Landratsamts Oberallgäu möchte ich mich bedanken für die gute Zusammenarbeit beim Rotwildprojekt.

Ebenso danke ich der Jägerschaft und Herrn Dr. Reddemann vom Landesjagdverband Bayern e. V.

Für die Durchführung der molekularbiologischen Typisierung sei Herrn Prof. Dr. Prodingler (Sektion Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Universität Innsbruck) und seinen Mitarbeitern herzlich gedankt.

Für die Durchführung der Sequenzierungen bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Sachbereichs GE 2.3 des LGL und Herrn Dr. Udo Reischl an der Universität Regensburg sowie seinen Mitarbeitern.

Danke den Mitarbeitern der Fa. Prionics und der Fa. PlugIt dafür, dass sie bei Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herrn Dr. Christof Janko von der Technischen Universität München danke ich für die Geoinformationssystem-Daten, die leider wieder heraus genommen wurden.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Toni für seine liebevolle Unterstützung und unermüdliche Hilfe.

Meiner Tochter Sabrina danke ich für die kleinen Aufmerksamkeiten und die manchmal nötige Ablenkung und Zerstreuung.