

EPIDEMIOLOGISCHE STUDIE ZUM NACHWEIS
AUSGEWÄHLTER MYKOBAKTERIEN-SPEZIES BEI
WILDSCHWEINEN IN DEUTSCHLAND

CHRISTOPH CAPELLMANN



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,
Klinik für Wiederkäuer und Schweine
Professur für Schweinekrankheiten
(Innere Medizin und Chirurgie)
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

**Epidemiologische Studie zum Nachweis ausgewählter
Mykobakterien-Spezies bei Wildschweinen in Deutschland**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Christoph Capellmann

Tierarzt aus Troisdorf

Gießen 2011

Mit der Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner
Prof. Dr. M. Lierz

Tag der Disputation: 12.04.2011

Erklärungen

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit der Hilfe angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „ Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter Wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Niederkassel-Stockem, den 07.11.2010

(Christoph Capellmann)

Meinen Eltern und meinem Bruder

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Mykobakterien	3
2.2	<i>Mycobacterium avium complex (MAC)</i>	4
2.2.1	<i>Mycobacterium avium ssp. hominissuis,</i> <i>Mycobacterium avium ssp. avium</i>	5
2.2.1.1	Taxonomie.....	5
2.2.1.2	Vorkommen	6
2.2.1.3	Klinik, Pathologie und Epidemiologie der Mykobakteriosen bei Schweinen.....	6
2.2.2	<i>Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP)</i>	8
2.2.2.1	Taxonomie und Charakteristika.....	8
2.2.2.2	Vorkommen und Tenazität	9
2.2.2.3	Paratuberkulose: Klinik, Pathologie und Epidemiologie.....	11
2.3	<i>Mycobacterium tuberculosis complex (MTC)</i>	15
2.3.1	Taxonomie	15
2.3.2	Vorkommen und Tenazität.....	16
2.3.3	Klinik, Pathologie und Epidemiologie der Tuberkulose	18
2.4	Das Wildschwein als Erregerreservoir.....	22
2.4.1	Sozialstruktur, Populationsdichte und Lebensweise als wichtige Einflussfaktoren für die Verbreitung von Krankheitserregern	22
2.4.2	Einschätzung des Infektionsrisikos und wichtige Faktoren, welche die Übertragung beeinflussen	25
2.5	Diagnostische Verfahren zum Mykobakteriennachweis	26
2.5.1	Mikroskopischer Nachweis.....	26
2.5.2	Kultureller Nachweis	26
2.5.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27
3	Arbeitsthese.....	34
4	Material und Methoden.....	35
4.1	Probenmaterial	35
4.1.1	Entnahme und Konservierung der Proben	38
4.1.2	Zahnaltersschätzung.....	38
4.1.3	Gewichtsschätzung/-bestimmung	39

4.1.4	Geschlechtsbestimmung	39
4.1.5	Ernährungszustand	39
4.1.6	Sonstige Beobachtungen am Einzeltier	40
4.2	Bearbeitung des Probenmaterials	40
4.2.1	DNA-Isolierung aus Mesenteriallymphknoten	40
4.2.2	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	41
4.2.3	Probenbearbeitung für die kulturelle Anzucht	42
4.3	PCR.....	42
4.3.1	Konventionelle PCR.....	43
4.3.1.1	Spezifität.....	48
4.3.1.2	Analytische Sensitivität.....	49
4.3.1.3	Optimierung der Annealingtemperaturen.....	50
4.3.1.4	Auswahl der Primer	50
4.3.2	Real-time PCR	51
4.3.2.1	Spezifität.....	54
4.3.2.2	Analytische Sensitivität.....	54
4.3.2.3	Optimierung der Annealingtemperaturen.....	54
4.3.2.4	Bestimmung der mittleren Schmelztemperatur der PCR-Amplifikate	55
4.3.2.5	Ermittlung der Quantifizierungsgrenze	55
4.3.2.6	Optimierung der eingesetzten DNA-Menge	56
4.3.3	Nachweis von <i>M. bovis</i> , <i>M. tuberculosis</i> und von <i>M. africanum</i> , <i>M.</i> <i>caprae</i> , <i>M. pinnipedii</i> , <i>M. microti</i> mittels Real-time PCR	56
4.4	Kulturelle Anzucht.....	56
4.5	Sequenzierungsarbeiten.....	57
4.5.1	DNA-Sequenzierung (nach Sanger).....	57
4.5.2	Pyrosequencing™	58
4.5.2.1	Aufbereitung der PCR-Amplifikate für die Pyrosequenzierung	58
4.5.3	Überprüfung der Nukleinsäuresequenzen.....	59
4.6	Verwendete Internetdatenbanken.....	60
4.7	Statistische Auswertung	60
5	Ergebnisse	61
5.1	Tierkollektiv	61
5.2	Auswahl der Primer für die konventionelle PCR.....	61

5.3	Speziesdifferenzierung innerhalb des MTC-Komplexes mit der Real-Time PCR	65
5.3.1	Optimierung der Primerkonzentrationen	65
5.3.2	Spezifität und analytische Sensitivität	65
5.3.3	Bestimmung der mittleren Schmelztemperatur der Amplifikate.....	66
5.3.4	Bestimmung der Quantifizierungsgrenze	66
5.3.5	Optimierung der eingesetzten DNA-Menge.....	68
5.4	Prävalenzen von MTC	69
5.4.1	Zusammenhang zwischen MTC-Prävalenz und Alter	73
5.4.2	Zusammenhang zwischen Geschlecht und MTC- Prävalenzen	73
5.4.3	Zusammenhang zwischen Körpergewicht und MTC-Prävalenzen	73
5.4.4	Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Granulomen und MTC-Prävalenzen	74
5.5	Prävalenzen von <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis/BCG</i> und <i>M. microti/africanum/pinnipedii/caprae</i>	74
5.5.1	Quantifizierung der Erregermengen	77
5.5.2	Sequenzierung	79
5.6	Prävalenzen von MAC	81
5.7	Prävalenzen von <i>M. avium</i> ssp. <i>avium/silvaticum</i> , <i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i> und MAP	81
5.8	Kulturelle Anzucht.....	81
6	Diskussion	83
6.1	Methodenkritik	83
6.2	PCR.....	86
6.3	Kulturelle Anzucht.....	87
6.4	Prävalenzen	88
6.4.1	Prävalenzen von MTC beim Wildschwein	89
6.4.2	Prävalenzen von <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis/ bovis BCG</i> , <i>M. africanum/pinnipedii/microti/caprae</i>	92
6.4.3	Prävalenzen von <i>M. a. ssp. avium/silvaticum</i> , <i>M. a. ssp. hominissuis</i> , <i>M. a. ssp. paratuberculosis</i>	93
6.4.4	Prävalenzen von sonstigen Mykobakterien	93
6.5	Interaktionen zwischen Wildschweinen und Nutztieren	94
6.6	Zoonotische Aspekte	95

7	Fazit.....	97
8	Zusammenfassung	99
9	Summary	101
10	Literaturverzeichnis	103
11	Abkürzungen	140
12	Anhang	142
12.1	Ansätze für Lösungen.....	142
13	Danksagung	144

1 Einleitung

Das Wildschwein ist eine Wildart, die in den letzten Jahren in vielerlei Hinsicht öffentliches Interesse geweckt hat. Galt sie Anfang bis Mitte des 20. Jahrhunderts in einigen Teilen Deutschlands (Schleswig-Holstein, Bayern, Württemberg, Schwaben) als fast nicht existent, so ist das Schwarzwild heute nahezu flächendeckend in Deutschland vertreten. Die Schwarzwildstrecken sind sukzessive, anfangs linear, später exponentiell mit parallelem Anstieg der Wildschweinbestände angewachsen (BRIEDERMANN, 1986). Der enormen Entwicklung der Schwarzwildbestände liegen multifaktorielle Ursachen zugrunde, die vornehmlich auf Veränderungen der Lebens- und Ernährungsbedingungen sowie ihrer Reproduktionsdynamik beruhen.

Mit zunehmender Besiedlung und steigenden Bestandsdichten rücken besonders Fragen zur Rolle des Wildschweins als Überträger von Krankheiten in Haustierbeständen und als Überträger von Zoonosen in den Vordergrund. Die Verbreitung wichtiger Erreger von Infektionskrankheiten durch das Schwarzwild wie z.B. das Aujeszky Virus, das Porcine Circo Virus (PCV), das Virus der klassischen Schweinepest und die Verbreitung respiratorischer Krankheitserreger, sind bereits bekannt (RUIZ-FONS et al., 2008; REINER et al., 2009; KNELL et al., 2005). Infektionen durch Mykobakterien (M.) aus dem Mycobacterium avium complex (MAC) und dem Mycobacterium tuberculosis complex (MTC) können bei einer Vielzahl von Spezies tuberkulöse Veränderungen hervorrufen. Größte Bedeutung genießen hierbei vor allem *M. tuberculosis* und *M. bovis* aus dem MTC, den Tuberkulose-Erregern bei Mensch und Tier. Infektionen der Nutztierbestände haben einerseits Auswirkungen auf die öffentliche Gesundheit und andererseits große ökonomische Auswirkungen auf die hiesige landwirtschaftliche Produktion und den internationalen Handel mit Tieren und deren Produkten (MILIAN SUAZO et al., 2003). In den USA wird beispielsweise der volkswirtschaftliche Schaden durch an Paratuberkulose erkrankten Rindern (*M. avium* ssp. *paratuberculosis*) auf 200-250 Millionen US \$ pro Jahr geschätzt (OTT et al., 1999). Gerade für Industrieländer wie Deutschland, in denen bedeutende Infektionskrankheiten getilgt sind, ist es wichtig, Erhebungen in Wildtierpopulationen zu Krankheitserregern durchzuführen, um möglichst frühzeitig Gefahren, die die öffentliche Gesundheit und die Volkswirtschaft betreffen, abzuwenden. Studien zum Auftreten verschiedener Mykobakterienspezies in

Wildschweinpopulationen sind bereits in einigen Ländern der EU unter anderem in Ost-Europa, Spanien, Frankreich und Italien durchgeführt worden (MACHACHKOVA et al., 2003; NARANJO et al., 2007; ZANELLA et al., 2008a; BOLLO et al., 2000). In Deutschland liegen hingegen kaum Untersuchungen beim Wildschwein vor (MÜLLER et al., 2007, SCHULZ et al., 1992).

Die eigene Arbeit verfolgt das Ziel, das Vorkommen ausgewählter Mykobakterienspezies des MAC und MTC bei Wildschweinen in verschiedenen Bundesländern Deutschlands zu untersuchen. Die Untersuchung umfasst die Erreger *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, *M. avium* ssp. *avium/silvaticum* und *M. avium* ssp. *hominissuis*. Dabei wurde besonderen Wert auf den direkten Erreger-Nachweis mittels PCR-Verfahren (= Polymerase Kettenreaktion) gelegt. Dazu wurden verschiedenste Primer für den Direktnachweis aus Lymphknotengewebe auf eine möglichst hohe Spezifität und Sensitivität hin überprüft. Mit einer Auswahl von Lymphknoten PCR-positiver Tiere wurde eine kulturelle Anzucht der Erreger unternommen. Die Studie soll die sehr lückenhaften Prävalenzangaben zum Vorkommen von Mykobakterienspezies bei Wildschweinen in Teilen Deutschlands erweitern und ihre mögliche Rolle als Überträger erörtern.

2 Literaturübersicht

2.1 Mykobakterien

In der Ordnung *Actinomycetales* gehört zur Familie der *Mycobacteriaceae* als einziges das Genus *Mycobacterium* (M.). Der Gattung *Mycobacterium* gehören derzeit mehr als 120 Arten an (TORTOLI, 2006). Mykobakterien zählen als Erreger der Tuberkulosen bei Tier und Mensch zu den bedeutendsten bakteriellen Infektionserregern. Bereits 1882 wurden die Tuberkulosebakterien durch Robert Koch entdeckt. Wenige Jahre nach der Entdeckung von *M. tuberculosis*, konnte der Erreger der Rindertuberkulose, *Mycobacterium bovis*, der Erreger der Vogel- und Geflügeltuberkulose, *M. avium* und auch der Erreger der Johne'schen Krankheit, *M. paratuberculosis*, voneinander abgegrenzt werden. Neben den zuvor aufgeführten obligat pathogenen Mykobakterien kommen auch ubiquitäre, fakultativ pathogene Mykobakterien, vornehmlich in Oberflächengewässern und im Erdboden, vor (HORSBURGH, 1991; ICHIYAMA, 1988; PORTAELS, 1995). Heute werden die Erreger des Tuberkulosekomplexes (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. pinnipedii*, *M. africanum*, *M. canetti* und *M. microti*) von denen der sogenannten nicht tuberkulösen Mykobakterien oder auch MOTT (Mycobacteria other than tubercle bacilli) genannt, abgegrenzt. Die durch sie hervorgerufenen Erkrankungen werden als Mykobakteriosen bezeichnet. Die wichtigsten Spezies aus dieser Gruppe sind die Spezies aus dem *Mycobacterium avium complex* (MAC).

Mykobakterien sind grampositive, unbewegliche, gerade bis leicht gebogene Stäbchen. Die sogenannte Säure-Alkohol-Festigkeit, bei der die Entfärbung mit Salzsäure-Alkohol nach vorheriger Anfärbung mit Anilinfarbstoffen geprüft wird, ist charakteristisch für die Mykobakterien. Der hohe G/C Gehalt der DNA (62-70%) ist mit der anderer mykolsäurehaltiger Bakterien wie Nocardien (60-69%) oder Rhodokokken (59-69%) vergleichbar (METCHOCK et al., 1999). Der hohe Lipidgehalt ihrer Zellwände wird durch die Anwesenheit hochmolekularer Fettsäuren (Mykolsäuren), bestehend aus 60-90 C-Atomen erreicht (BRENNAN et al., 1995). In ihrer Zytoplasmamembran sind Exocheline und Mykobaktine enthalten, die wichtig für den Eisentransport sind. Das Mykobaktin J stellt eine besondere Wachstumsvoraussetzung für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)

dar. Mykobakterien zeigen ein aerobes bis mikroaerophiles Wachstum, wobei zwischen schnell und langsam wachsenden Spezies innerhalb der Gattung unterschieden wird (BLOBEL und SCHLIESSER, 1985; STAHL und URBANCE, 1990). Zu den langsam wachsenden Spezies gehören neben den Mykobakterien des Tuberkulose- auch die des Avium-Komplexes (WAYNE und KUBICA, 1986). Ihr langsames Wachstum und der Aufbau ihrer wenig permeablen Zellwand haben zudem hohen Einfluss auf ihre große Tenazität gegenüber Umweltfaktoren (GONZALEZ-Y-MERCHAND et al., 1997; BRENNAN et al., 1995).

Charakteristisch für Mykobakterien ist weiterhin das Vorkommen von zellwanddefekten Formen (= Spheroplasten), welche durch das Fehlen von Zellwandkomponenten gekennzeichnet sind (BERAN et al., 2006). Es wird davon ausgegangen, dass Spheroplasten das Ergebnis aus der Interaktion zwischen Mykobakterien und dem Immunsystem des Wirtes sind (BERAN et al., 2006). Diese Formen sind in der Lage lange im Makroorganismus zu überleben und dessen Immunantwort zu umgehen (ULRICHS und KAUFMANN, 2002; ZHANG, 2004). Die Fähigkeit, Bestandteile der Zellwand wie Peptidoglykane und andere Makromoleküle zu synthetisieren, bildet für die Spheroplasten die Grundlage sich wieder in zellwandintakte, säure-feste Stäbchen zurück zu entwickeln (MURTY und VENKITASUBRAMANIAN, 1984).

2.2 *Mycobacterium avium complex (MAC)*

Zum MAC gehören, *M. avium* ssp. *avium* (kurz: *M. avium*), *M. avium* ssp. *hominissuis* (kurz: *M. hominissuis*), *M. avium* ssp. *silvaticum* (kurz: *M. silvaticum*) und *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (kurz: *M. paratuberculosis*) (THOREL et al., 1990). *M. intracellulare* wird oftmals aufgrund seiner phänotypischen Eigenschaften zu MAC hinzugezählt. Die Arbeiten von BAESS et al., 1983, SAITO et al., 1989 und TURENNE et al., 2006 belegen jedoch die eindeutige genetische Diversivität.

Die MOTT`s sind bereits in den fünfziger Jahren von Runyon nach ihrer Pathogenität für Tier und Mensch, nach ihrer Wachstumsgeschwindigkeit, Pigmentbildung und Morphologie in vier Gruppen eingeteilt worden (GOOD, 1985; RUNYON, 1974; TIMPE and RUNYON, 1954). Unter der Runyon-Gruppe I werden alle langsam

wachsenden photochromogenen Mykobakterien zusammengefasst. Zu der Runyon-Gruppe II werden langsam wachsende skotochromogene Mykobakterien gezählt. Der *Mycobacterium avium complex* gehört in die Runyon-Gruppe III. Die Eigenschaften dieser Gruppe sind einerseits durch ein langsames Koloniewachstum, andererseits durch eine fehlende Pigmentbildung gekennzeichnet. Der Runyon Gruppe IV gehören die schnell wachsenden Mykobakterien an. *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* nimmt im Avium-Komplex in Bezug auf sein sehr langsames Koloniewachstum eine Sonderstellung ein.

Spezies des MAC besitzen im Gegensatz zu Spezies des MTC die Eigenschaft, sich auch in unterschiedlichen Biotopen zu vermehren ohne an Virulenz einzubüßen (BIET et al., 2005). Begünstigt wird dies einerseits durch ihre Fähigkeit sich bei verschiedenen Temperaturen (20-37°C) zu vermehren und andererseits auch enorme pH-Wert Schwankungen (pH 4-7,5) überleben zu können (CHAPMAN und BERNARD, 1962). Diese Eigenschaften zusammen mit dem zuvor beschriebenen charakteristischen Aufbau der Mykobakterienzellwand bilden die Grundlage für die große Widerstandsfähigkeit in der Umwelt. Mykobakterien des Avium-Komplexes sind in der Lage, eine Vielzahl von Substanzen als Nährboden zu nutzen, was durch den Nachweis ihres Wachstums in den unterschiedlichsten Medien bestätigt wird.

2.2.1 *Mycobacterium avium ssp. hominissuis/Mycobacterium avium ssp. avium*

2.2.1.1 Taxonomie

Ab ca. 1925 erlangte *M. avium ssp. avium/hominissuis* als Mykobakteriose bei Schweinen zunehmend an Bedeutung. Diese Spezies ist das derzeit am häufigsten nachgewiesene Mykobakterium bei Schlachtschweinen (SONGER und POST, 2005).

MIJS et al. (2002) stellten bei Vogel-Isolaten und bei Mensch/Schwein-Isolaten Unterschiede im IS1245 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP), in der Wachstumstemperatur sowie einzelne Nukleotidpolymorphismen bei der Sequenzierung der 16S-23S rDNA ITS (Internally transcribed spacer) fest. IS steht für Insertionssequenzen, das sind kurze DNA-Stücke, die im Genom bestimmter Mykobakterienspezies in unterschiedlicher Zahl vorkommen. Die Mensch/Schwein-

Isolate zeigen im Gegensatz zu den Vogel-Isolaten auch noch bei 24°C und 45°C kulturelles Wachstum (MIJS et al., 2002; DOMINGOS et al., 2009). Aufgrund dessen folgte die Differenzierung der Gattung in *M. avium* ssp. *avium* und *M. avium* ssp. *hominissuis*.

M. avium ssp. *avium* umfasst die Serotypen eins, zwei und drei aus dem MAC. Bei 95% aller Feldisolate tritt die Insertionssequenz (IS)901 auf (PAVLIK et al., 2000). Die IS901 liegt im Genom in sieben bis elf Kopien vor (RITACCO et al., 1998). Diese Serotypen sind pathogen für Vögel und Auslöser der aviären Tuberkulose. Die Serotypen vier bis sechs, acht bis elf und 21 werden zum Taxon *M. avium* ssp. *hominissuis* gezählt (MIJS et al., 2002). Diese sind nur teilweise pathogen für Vögel (CVETNIC et al., 2006). Ihnen fehlt die IS901, dafür findet sich die IS1245 in Schweine-Isolaten meist mit mindestens 20 Kopien (RITACCO et al., 1998).

2.2.1.2 Vorkommen

M. avium ssp. *avium/hominissuis* konnte bisher in Wildvögeln, Wirtschaftsgeflügel, Rindern, Wild- und Hausschweinen, Menschen, wechselwarmen Tieren (DVORSKA et al., 2002; MIJS et al., 2002) und Wirbellosen wie z.B. der Schwebfliege (*Eristalis tenax*) (FISCHER et al., 2005) nachgewiesen werden. Viele Subspezies des Mykobakterium avium Komplexes sind ubiquitär vorkommende Mykobakterien und wurden teilweise in großen Mengen in Oberflächengewässern, Trinkwasser, Aerosolen, Erde, Lebens- und Futtermitteln, Pflanzen und Pflanzenprodukten, Staub, Dünger und rohem Gemüse (FRY et al., 1986; ICHIYAMA et al., 1988; WALLACE et al., 1987; DVORSKA et al., 2002), Torf, Sägemehl (MATLOVA et al., 2004, 2005), Zigaretten und Tabakprodukten (KOMIJN et al., 1999; MIJS et al., 2002) vorgefunden.

2.2.1.3 Klinik, Pathologie und Epidemiologie der Mykobakterien bei Schweinen

Die typische Schweine-Mykobakteriose wird von *Mycobacterium avium* ssp. *avium/hominissuis* ausgelöst. Dennoch können auch andere Mykobakterien wie z.B. *M. fortuitum* und *M. chelonae* Mykobakterien beim Schwein hervorrufen (MATLOVA et al., 2004).

In der Regel werden Schweine über den oralen Weg infiziert. Die Mykobakterien passieren das Mukosa-Epithel vornehmlich im Bereich des Mukosa assoziierten Lymphgewebes (Mucosa associated lymphoid tissue, MALT) und manifestieren sich durch die Besiedelung der Makrophagen gewöhnlich sowohl in den Lymphknoten des Kopfes als auch des Intestinums, wo es zur Ausbildung von Granulomen kommen kann (LUGTON, 1999). In den seltensten Fällen leiden die Gesundheit oder der körperliche Zustand der Schweine darunter. Es ist schwierig die Mykobakteriose anhand von klinischen Erscheinungen zu diagnostizieren (SONGER und POST, 2005). Treten Veränderungen auf, so sind sie vornehmlich in den Kopf- und Mesenteriallymphknoten lokalisiert, weitaus seltener in den Bronchiallymphknoten und anderen Organen wie Milz und Nieren (MATLOVA et al., 2004, 2005; SZABO et al., 1975; PAVLIK et al., 2003a; ZANETTI et al., 2007). Die auftretenden Granulome sind meist von verkäsendem bis kalzifiziertem Charakter und können Durchmesser von 1-5 mm einnehmen (SIRIMALAISUWAN, 2004; RAY et al., 1972). Sie ähneln den Veränderungen der Tuberkulose so sehr, dass sie makroskopisch nicht von ihr zu unterscheiden sind (RAY et al., 1972). Anhand von experimentell mit *M. avium* infizierten Schweinen konnte belegt werden, dass diese den Erreger über die Faeces ausscheiden (ELLSWORTH et al., 1980). Nach wie vor ist die Bedeutung der Ausbreitung in und zwischen Schweineabteilen ungeklärt, wobei einige Autoren bereits in den achtziger Jahren von einem geringen Risiko zur Infektion über die Faeces ausgegangen waren (EVERITT et al., 1982; WINDSOR et al., 1984b; GARDNER und HIRD, 1989).

Ungeachtet des unscheinbaren Krankheitsverlaufs, nimmt das Schwein eine Rolle als potentielle Infektionsquelle für den Menschen ein. Schon häufig konnten Mykobakterien des Avium-Komplexes aus immunsupprimierten Personen, insbesondere HIV-Patienten, isoliert werden (DAWSON, 1990; NIGHTINGALE et al., 1992). Dennoch ist nach wie vor nicht geklärt, in wieweit der Erreger vom Schwein auf den Menschen übertragen werden kann. Die Möglichkeit einer solchen Infektion muss jedoch in Betracht gezogen werden, da eine hochgradige Ähnlichkeit zwischen den Isolaten von Mensch und Schwein besteht (KOMIJN et al., 1999; MÖBIUS et al., 2006; TIRKKONEN et al., 2007). Des Weiteren besteht auch kein Nachweis für die Übertragung von Wildschweinen auf Hausschweine. Von Wild- und Hausschweinen

wurden bisher *M. avium* ssp. *hominissuis* Stämme isoliert, die Ähnlichkeiten von 80% aufwiesen (DOMINGOS et al., 2009)

Das Auftreten von Mykobakteriosen bei Schweinen ist schon in vielen Ländern beschrieben worden, unter anderem auf Schweinefarmen in Kroatien (CVETNIC et al., 1998), Ungarn (SZABO et al., 1975), Polen (ZORAWSKI et al., 1983), Deutschland (DALCHOW et al., 1988), Niederlande (KOMIJN et al., 1999), Schweiz (OFFERMANN et al., 1999), Sardinien (ZANETTI et al., 2008), Norwegen (ALFREDSEN et al., 1992), Tschechien (PAVLIK et al., 2003a, 2005; MATLOVA et al., 2003, 2004), Portugal (DOMINGOS et al., 2009), Neuseeland (DE LISLE, 1994) und Brasilien (BALIAN et al., 1997). Tabelle 1 zeigt eine Auflistung der Prävalenzen in verschiedenen Ländern.

Tabelle 1: MAC-Prävalenz von Schlachtschweinen in verschiedenen Ländern

Land	Prävalenz in Schlachtschweinen (%)	Autoren
Tschechien	0,27	PAVLAS, 1998
Niederlande	0,5	KOMIJN et al., 1999
Deutschland	0,89	MEYER, 2007
Kroatien	0,24	CVETNIC et al., 2007
Schweiz	10,6	OFFERMANN et al., 1999

2.2.2 *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)

2.2.2.1 Taxonomie und Charakteristika

In der Literatur zum ersten Mal beschrieben wurde die Paratuberkulose 1894. Ein Tierarzt äußerte bei einer an Enteritis erkrankten Kuh den Verdacht auf intestinale Tuberkulose. Nach dem diese verstarb wurde deren Gastro-Intestinal-Trakt zur weiteren Diagnostik an das pathologische Institut der Universität Dresden geschickt (JOHNE und FROTINGHAM, 1895). Die Veterinärpathologen DR. H. A. JOHNE und DR. L. FROTINGHAM fanden 1895 säurefeste Stäbchen in besagtem Gastro-Intestinal-Trakt und schlussfolgerten, dass es sich um eine bis dato unbekannte Form der Darmtuberkulose handeln müsse. Sie gaben ihr den Namen „Pseudo-tuberkuläre Enteritis“ (JOHNE und FROTINGHAM, 1895). 1906 konnte BANG (1906)

beweisen, dass die von JOHNE und FROTINGHAM gefundenen säurefesten Bakterien keine Tuberkelbakterien waren. Er regte an die Krankheit, als „Johne`sche Krankheit“ zu benennen. Die erste kulturelle Anzüchtung gelang 1910/12 durch TWORT und INGRAM (1912). Es dauerte bis 1933 ehe nach einer experimentellen Infektion einer Rinderherde mit dem gleichen Mykobakterien-Stamm die charakteristischen Symptome erneut auftraten (HAGAN und ZEISSIG, 1933).

MAP gehört zum MAC (HURLEY et al., 1988) und stimmt genotypisch zu 95-97% mit *M. avium* ssp. *avium* überein (THOREL et al., 1990; BANNANTINE et al., 2003). MAP unterscheidet sich jedoch von den anderen Mykobakterien des Avium-Komplexes durch sein extrem langsames Wachstum mit entsprechend langer Generationszeit (LAMBRECHT et al., 1988) und einer Inkubationsdauer von mindestens 3 Wochen, die unter Umständen bis zu 5 Monate beträgt, ehe Kolonien makroskopisch auf festen Nährmedien sichtbar werden (SONGER und POST, 2005). Weiterhin ist für MAP die Abhängigkeit von Mykobaktin J charakteristisch, einem Eisen-Chelat-Bildner, den es nicht selber synthetisieren kann. Es gibt zwar Homologien zwischen den Genen, die Mykobaktin J im MAP-Genom und in anderen Mykobakterien codieren, diese sind in der MAP-DNA aber deutlich kürzer (ROWE et al., 2006).

2.2.2.2 Vorkommen und Tenazität

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* wurde bisher nicht nur bei Rindern, Schafen, Ziegen und Menschen isoliert sondern auch bei einer Vielzahl von anderen Haussäugetieren, Wildtieren und Vogelarten: Wildschwein (*sus scrofa*) (MACHACKOVA et al., 2003; TRCKA et al., 2006; KOPECNA et al., 2006 und 2008; ALVAREZ et al., 2005), Hausschwein (*sus scrofa*) (THOEN et al., 1975), Rotwild (*Cervus elaphus*), Rehwild (*Capreolus capreolus*), Mufflon (*Ovis musimon*), Gams (*Rupicapra rupicapra*), Wühlmaus (*Microtus arvalis*), Feldspitzmaus (*Crocidura suaveoleus*) (KOPECNA et al., 2008), Hermelin (*Mustela erminea*), Fuchs (*Vulpes vulpes*), Wiesel (*Mustela nivalis*), Saatkrähe (*Corvus frugilegus*), Krähe (*Corvus corone*), Dohle (*Corvus monedula*), Ratte (*Rattus norvegicus*), Maus (*Apodemus sylvaticus*), Feldhase (*Lepus europaeus*), Dachs (*Meles meles*) (BEARD et al., 2001a), Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) (BEARD et al., 2001b), Wildkaninchen

(*Oryctolagus cuniculus*) (GREIG et al., 1999), Braunbär (*Ursus arctos*) (KOPECNA et al., 2006), Neunbinden-Gürteltier (*Dasybus novemcinctus*), Opossum (*Didelphis virginiana*) (CORN et al., 2005) und Wildkatze (*Felis silvestris*) (PALMER et al., 2005). Selbst in der Familie der *Calliphoridae* (Gold- und Schmeißfliegen) bei *Lucilla sericata* und *Calliphora vicina* (FISCHER et al., 2004) wurde der Erreger entdeckt. Auch die Nymphen der Kakerlake *Blatta orientalis* (FISCHER et al., 2003) und die Larven von der Scheinbienen-Keilfleckschwebfliege (*Eristalis tenax*) (FISCHER et al., 2005) sowie Larvenstadien von Nematoden, die sich im Kot infizierter Schafe weiterentwickelten (WHITTINGTON et al., 2001), konnten als Träger von MAP identifiziert werden. Es ist sogar möglich, dass *M. avium* in im Trinkwasser lebenden Amöben (*Acanthamoeba castellanii*) vorkommt. Während ihrer Vermehrung dort kann eine Virulenzsteigerung erfolgen (CIRILLO et al., 1997). In der Umwelt ist MAP weit verbreitet und erweist sich als sehr widerstandsfähig, was in Tabelle 2 deutlich wird.

Tabelle 2: Tenazität von *M. avium* ssp. *paratuberculosis* in der Umwelt in unterschiedlichen Matrices und unter verschiedenen Bedingungen (aus FÜLLGRABE, 2008)

Matrix	Bedingungen	Überlebensdauer/ Prozentsatz überlebender MAP	Autor
Rinderkot	Gewöhnliche Wetter- bedingungen	246 Tage	LOVELL et al., 1944
Leitungswasser	-	17 Monate	LARSEN et al., 1956
Schweine- und Rindergülle	5°C	252 Tage	JORGENSEN, 1977
Rindergülle	15°C	98 Tage	
Wasser	pH 5,3	8-9 Monate	COLLINS et al., 2001
Boden	trocken	8 Wochen/ 30%	
	feucht	8 Wochen/ 100%	
Weide	trocken und schattig	55 Wochen	WHITTINGTON et al., 2004
Schlamm	pH 12,5	72 Stunden	FLYNN et al., 2005
Stauwasser	-	36 Wochen	WHITTINGTON et al., 2005
Rindergülle	-	56 Tage	GREWAL et al., 2006

2.2.2.3 Paratuberkulose: Klinik, Pathologie und Epidemiologie

In erster Linie ist die Paratuberkulose eine bei Wiederkäuern auftretende Krankheit, die nach Infektion mit *M. avium* ssp. *paratuberculosis* ausgelöst wird. Bisherigen Untersuchungen aus Spanien, Italien und Tschechien zufolge kann MAP zwar aus dem Wildschwein isoliert werden, es treten aber weder klinische Erscheinungen auf noch lassen sich in Sektionen spezifische Veränderungen nachweisen, die für eine MAP bedingte Erkrankung sprechen könnten (ALVAREZ et al., 2005; ZANETTI et al., 2008; MACHACKOVA et al., 2003; TRCKA et al., 2006). Nach BIET et al. (2005) können die Übertragungswege für MAP von den Nutztierbeständen auf die Wildtiere

übertragen werden. Aufgrund der fehlenden wissenschaftlichen Erkenntnisse zum Krankheitsbild und Infektionsweg der Paratuberkulose bei Schweinen bzw. Wildschweinen wird daher auf gesicherte Erkenntnisse zu MAP in Rinderpopulationen zurückgegriffen.

In der Regel erfolgt die Infektion mit MAP im juvenilen Alter. Der nach heutigem Wissen häufigste Infektionsweg ist die faeco-orale Übertragung (HARRIS und BARLETTA, 2001). Es besteht die Möglichkeit, dass die Kälber mit MAP infizierten Kot über beispielsweise die Einstreu oder verschmutzte Zitzen aufnehmen. Ferner können sie sich durch die Aufnahme von kontaminiertem Futter, Kolostrum, Milch oder Wasser infizieren (MERKAL, 1984; COCITO et al., 1994). Der vertikale Übertragungsweg ist auch nicht auszuschließen, da MAP bereits aus dem Uterus (KOPECKY et al., 1967; PEARSON et al., 1955) und aus Samenflüssigkeit (LARSEN et al., 1970) isoliert wurde. Zielgewebe für *M. avium* ssp. *paratuberculosis* ist, wie bei anderen obligat pathogenen Mykobakterien auch, das Mukosa assoziierte Lymphgewebe (LUGTON et al., 1999). Dazu dringen sie in die über den Peyer'schen Plaques gelegenen M-Zellen ein, wo sie von intraepithelialen und subepithelialen Makrophagen phagozytiert werden (FUJIMURA et al., 1996; LUGTON et al., 1999; MOMOTANI et al., 1988). In den Makrophagen hemmen sie die Ausbildung des Phagolysosomen-Komplexes (NEPAL et al., 2006; CLEMENS et al., 1995; OH et al., 1996). Im Zuge der Immunantwort strömen vermehrt mononukleäre Phagozyten, aktiviert durch die Zytokinausschüttung, in das Darmepithel ein (COCITO et al., 1994). Daraus resultiert eine starke Entzündungsreaktion. Es kommt zur Ausbildung einer hinwindungsartig verdickten Darmschleimhaut. Diese führt zu einer Malabsorption mit letztendlich resultierender chronischer Diarrhoe (KÖHLER et al., 2003). Die umgebenden Lymphknoten werden infiltriert und die Mykobakterien werden über die Lymphe weiter transportiert, so dass vereinzelt auch Leber und Niere betroffen werden können (HINES et al., 1987). Nach einer Inkubationszeit von mindestens 4 bis hin zu 15 Monaten (STEPHAN, 2007) entwickeln sich die ersten klinischen Symptome bei Kühen zwischen dem 4. und 6. Lebensjahr. Die Symptome zeigen sich besonders nach Kalbungen und bei Veränderungen in der Nährstoffversorgung (COUSINS et al., 2000). Durch die anhaltende Malabsorption und die damit verbundene Diarrhoe entwickelt sich ein rascher Gewichtsverlust bei erhaltenem Appetit und ungestörtem Allgemeinbefinden sowie physiologischer Körpertemperatur

(COLLINS, 1997). Neben dem Gewichtsverlust machen sich auch ein Rückgang der Milchleistung, eine verminderte Fruchtbarkeit und eine gesteigerte Infektionsanfälligkeit bemerkbar (COCITO et al., 1994). In Ausnahmefällen zeigen sich Alopezien, Farbveränderungen im Haarkleid oder Struppigkeit (COCITO et al., 1994; KLEE, 2006). Bei den kleinen Wiederkäuern und den Wildwiederkäuern hingegen wird das klinische Bild weniger von Diarrhoe bestimmt, die in ca. 15% der Fälle manifest wird, sondern vielmehr durch eine rein chronisch fortschreitende Abmagerung (DEUTZ et al., 2005).

In den letzten fünfzehn Jahren sind einige Untersuchungen zur Abschätzung der Paratuberkulose-Prävalenz in verschiedenen Ländern durchgeführt worden (s. Tabelle 3). In Schaf- und Ziegenbeständen in Westfalen-Lippe liegt die Herdenprävalenz bei 36% bzw. 27,8%, bei Einzeltierprävalenzen von 3,1% bzw. 3,8% (ADAMS et al., 2001). In Schottland wurden 17% der Wildkaninchenpopulation als MAP-positiv eingestuft (DANIELS et al., 2003).

In Deutschland gibt es zurzeit kein einheitliches, flächendeckendes Überwachungsschema (KÖHLER et al., 2003). Da die Untersuchungen im Hinblick auf ihre diagnostische Validität teilweise deutlich Unterschiede aufzeigen, müssen die Ergebnisse mitunter kritisch hinterfragt werden. Dennoch gehen BÜLTE et al. (2005) anhand blutserologischer Untersuchungen von Herdenprävalenzen von über 80 %, bei Einzeltierprävalenzen zwischen 1 bis 17 % aus.

Tabelle 3: Sero- und Einzeltierprävalenzen bei Rindern in Mitteleuropa

Land (Gebiet)	Seroprävalenz	Einzeltierprävalenz	Autoren
Deutschland (Bayern)	19 %		BÖTTCHER und GANGL, 2004
Deutschland (Mecklenburg- Vorpommern)	84,7 %	12,2 %	HACKER et al., 2004
Deutschland (Sachsen)	90,5 %	9,6 %	DONAT, 2005
Deutschland (Thüringen)	> 80 %		ELSCHNER und HORNER, 2003; HINGER et al., 2008
Deutschland (Arnsberg)	10-30 %		BÖTTCHER, 1997
Deutschland (Westfalen-Lippe)	17,3 %		BRENTROP und HEIMBERG, 2005
Österreich	1995-97: 6,97 % 2006: 19 %		BAUMGARTNER et al., 2005; DREIER et al., 2006
Belgien	17,4 %		BOELAERT et al., 2000
Wales	17,0 %		CETINKAYA et al., 1998
Schweiz	8,0 %		STÄRK et al., 1997
Niederlande	38,6 – 53,0 %		MUSKENS et al., 2003; VAN SCHAİK et al., 2003

2.3 *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC)

2.3.1 Taxonomie

1882 entdeckte Robert Koch den Erreger *M. tuberculosis*, erst 1901 unterschied er die Tuberkulose des Menschen von der Rindertuberkulose (ROLLE und MAYR, 1993). Kindinger erwähnte 1934 erstmals tuberkulöse Veränderungen bei Wildtieren in Deutschland. Heute werden zu dem *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) neben *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) und *M. africanum* auch *M. microti*, *M. pinnipedii* und *M. canetti* gezählt (ARANAZ et al., 2003; RICHTER et al., 2003; MILTGEN et al., 2002; VAN SOOLINGEN et al., 1997, 1998). Trotz ihrer ausgeprägten DNA-Homologie von 99-99,95 % (BROSCH et al., 2000; GARNIER et al., 2003; FEIZABADI et al., 1996; FROTHINGHAM et al., 1994; SREEVATSAN et al., 1997a), gibt es Unterschiede hinsichtlich ihres Wirtsspektrums, ihres Verbreitungsgebietes, ihrer Pathogenität, ihrer Koloniemorphologie und ihres Resistenzverhaltens (BROSCH et al., 2002; HUARD et al., 2003; WAYNE et al., 1986). Sie werden daher in verschiedene Spezies eingeteilt, entweder benannt nach ihren Hauptwirten oder nach ihrer Erstbeschreibung. Der natürliche Wirt für *M. tuberculosis* und *M. africanum* ist in der Regel der Mensch (WAYNE et al., 1986), wobei *M. tuberculosis* auch schon bei Schlacht- und Wildschweinen nachgewiesen worden ist (MOHAMED et al., 2009; PAVLIK, 2006; SERRAINO et al., 1999). *M. africanum* wird wegen seinem unterschiedlichen geographischen Ursprung und aufgrund von Untersuchungen über biochemische Charakteristika in *M. africanum* Subtyp I (West-Afrika) und Subtyp II (Ost-Afrika) unterteilt. Der Subtyp I ähnelt mehr *M. bovis*, wo hingegen der Subtyp II eher mit *M. tuberculosis* übereinstimmt (DAVID et al., 1978). Auch bei *M. bovis* werden zwei verschiedene Subspezies beschrieben. Zum Einen ist dies *M. bovis* ssp. *bovis* (kurz: *M. bovis*; resistent gegenüber Pyrazinamiden) und zum Anderen *M. bovis* ssp. *caprae* (kurz: *M. caprae*; empfänglich gegenüber Pyrazinamiden) (NIEMANN et al., 2002a). *M. bovis* BCG ist ein attenuierter Lebendimpfstoff, der zur Impfung von Menschen und zur Immuntherapie eingesetzt wurde und in Entwicklungsländern mit einer hohen Anzahl an humanen Tuberkuloseerkrankungen immer noch eingesetzt wird. *M. microti* wird häufiger bei Nagetieren, ausnahmsweise beim Menschen nachgewiesen (NIEMANN et al., 2000; VAN SOOLINGEN et al., 1998; WAYNE et al., 1986). *M. pinnipedii* wird

ausnahmslos bei Robben nachgewiesen (BROSCH et al., 2002; COUSINS et al., 2003). Alle bisher bekannten Fälle von *M. canetti* Infektionen stammen von am Horn von Afrika lebenden Menschen (MILTGEN et al., 2002). Aufgrund von evolutionsbiologischen Untersuchungen geht man heute davon aus, dass sich alle Subspezies aus *M. tuberculosis* bzw. *M. canetti* entwickelt haben (BROSCH et al., 2002). Zugrunde gelegt wurde das Auftreten beziehungsweise Fehlen von sogenannten *Regions of Difference* (RD). Mittlerweile sind 14 RDs bekannt (BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002) anhand derer die Unterscheidung der Subspezies erfolgen kann.

2.3.2 Vorkommen und Tenazität

Die Spezies des Mykobakterium tuberculosis Komplexes sind obligat pathogene, intrazellulär lebende Bakterien, die bereits in einer Vielzahl von Wildtieren wie zum Beispiel Kaffernbüffel (*Syncerus caffer*), Pavian (*Papio ursinus*), Bison (*Bison bison*), Schwarzbär (*Ursus americanus*), Fuchskusu (*Trichosurus vulpecula*), Gepard (*Acinonyx jubatus*), Koyote (*Canis latrans*), Großer Kudu (*Tragelaphus strepsiceros*), Leopard (*Panthera pardus*), Löwe (*Panthera leo*), Warzenschwein (*Pahcochoerus aethiopicus*) und Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*) nachgewiesen worden sind (DE LISLE et al., 2001, 2002). Besonders *M. bovis* hat ein sehr breites Wirtsspektrum. In der Tabelle 4 sind heimische Wildtiere aufgeführt, in denen *M. bovis* bereits nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 4: Nachweis von *M. bovis* in verschiedenen, europäischen Wildtieren

Organismus	Land	Literaturstelle
Wildschwein (<i>suis scrofa</i>)	Spanien Frankreich Italien Deutschland Ungarn, Kroatien, Tschechien, Bulgarien, Slowakei	NARANJO et al., 2007 ZANELLA et al., 2008a SERRAINO et al., 1999 MÜLLER et al., 2007; MACHACKOVA et al., 2003 BACHVAROVA et al., 1996 KALENSKY, 1992
Rotfuchs (<i>vulpes vulpes</i>)	Großbritannien, Frankreich, Spanien	DE LISLE et al., 2002; ZANELLA et al., 2008b; MARTIN-ATANCE et al., 2005
Dachs (<i>Meles meles</i>)	Irland, Großbritannien	EVES, 1999; NOLAN und WILESMITH, 1994;
Rotwild (<i>Cervus elaphus</i>)	Spanien Frankreich Großbritannien Deutschland Österreich	NARANJO et al., 2007; ZANELLA et al., 2008a; GOWTAGE- SEQUEIRA et al., 2009 SCHMIDBAUER et al., 2007 ; GLAWISCHNIG et al., 2003
Luchs (<i>Lynx lynx</i>)	Deutschland	SCHMIDBAUER et al., 2007
Rehwild (<i>Capreolus capreolus</i>)	Frankreich, Großbritannien	ZANELLA et al., 2008b; GOWTAGE- SEQUEIRA et al., 2009
Damwild (<i>Dama dama</i>)	Großbritannien	GOWTAGE-SEQUEIRA et al., 2009
Wanderratte (<i>Rattus norvegicus</i>)	Großbritannien	DELAHAY et al., 2001
Maulwurf (<i>Talpa europaea</i>)	Großbritannien	DELAHAY et al., 2001
Wildkatze (<i>Felis catus</i>)	Großbritannien	DELAHAY et al., 2001
Igel (<i>Erinaceus europaeus</i>)	Deutschland	BLOBEL und SCHLIESSER, 1985

Es existieren verschiedene Untersuchungen über die Überlebensfähigkeit von *M. bovis* unter verschiedenen Umweltbedingungen. In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Untersuchungen aufgeführt.

Tabelle 5: Tenazität von *M. bovis* in der Umwelt in unterschiedlichen Matrices und unter verschiedenen Bedingungen

Matrix	Bedingungen	Überlebensdauer	Autor
Ackerboden	Mit Gülle gedüngt	2 Jahre	KELLY und COLLINS, 1978
Leitungswasser	12-24°C	236 Tage	GENOV, 1965
Rettich und Radieschen	Mit Gülle gedüngt	11 Tage	DONSEL und LARKIN, 1979
Dachsfäeces	Dachsbau -	1-4 Wochen 14-28 Tage	ANON, 1981
Dachsgewebe	-	1 Woche	ANON, 1981
Dachsurin	Sommer : Winter:	3 Tage 28 Tage	ANON, 1981
Eiter aus Bronchien	In düngerhaltiger Erde	7-70 Tage 10,5 Monate	ANON, 1981; MADDOCK, 1933
Weide	-	49 Tage	MADDOCK, 1933
Rinderfäeces	Winter Frühjahr/Sommer Herbst	5 Monate 2 Monate 4 Monate	WILLIAMS und HOY, 1930
Dachskadaver	Offen auf der Weide Im Boden vergraben	2 Wochen 6 Wochen	LITTLE et al., 1982

2.3.3 Klinik, Pathologie und Epidemiologie der Tuberkulose

Der wohl bedeutendste Weg eines Tieres sich mit Mykobakterien des Tuberkulose Komplexes zu infizieren ist der direkte Tier zu Tier Kontakt (POLLOCK und NEILL, 2002). Es besteht zudem die Möglichkeit, ausgehend von der langen Überlebensfähigkeit der Mykobakterien in der Umwelt, sich indirekt über die

Ausscheidungen angesteckter Tiere zu infizieren (BIET et al., 2005). Die Aufnahme von infiziertem Aas durch Wildschweine gilt ebenfalls als bedeutende Übertragungsquelle (GORTAZAR et al., 2008; CORNER et al., 2006; ZANELLA et al., 2008; MACHACKOVA et al., 2003; NARANJO et al., 2008a; VICENTE et al., 2007). VICENTE et al. (2007) beschreiben, dass auch die vermehrte Frequentierung von Wasserstellen durch Wildschweine die Gefahr der Infektion gerade im Sommer signifikant erhöht. Als weniger bedeutsam wird die Infektion über kontaminierte Faeces, Weide (CORNER et al., 2006) oder Erde angesehen (ZANELLA et al., 2008).

Anhand der Lokalisation von Läsionen können Rückschlüsse über den möglichen Übertragungsweg gezogen werden (BIET et al., 2005). Demnach sind Tiere mit überwiegenden Läsionen im Respirationstrakt wahrscheinlich über die Inhalation von Aerosolen und Tiere mit überwiegenden Veränderungen in den gastro-intestinalen Lymphknoten über die Nahrungsaufnahme infiziert worden (POLLOCK und NEILL, 2002). Sowohl die Infektion des Wildschweins mit MTC über den Respirationstrakt als auch die Infektion über den Gastrointestinaltrakt gelten als gesichert (MARTIN-HERNANDO et al., 2007; ARANAZ et al., 2004; CORNER et al., 2006; NUGENT et al., 2002). Aussagen über den vorherrschenden Infektionsweg können jedoch nicht gemacht werden (NARANJO et al., 2008a). Derzeit ist die minimale Infektionsdosis von *M. bovis* für Wildschweine unbekannt (NARANJO et al., 2008a). Die für Rinder und Menschen erforderliche minimale Infektionsdosis über den Respirationstrakt liegt bei ein bis zehn Mykobakterien (NEILL et al., 1991; BALASUBRAMANIAN et al., 1994). Die minimale Infektionsdosis für Rinder über den Digestionstrakt liegt um ein vielfaches höher, nämlich ungefähr bei 10^7 Mykobakterien (O'REILLY und DABORN, 1995). Verantwortlich gemacht für diesen Unterschied wird die hohe Empfindlichkeit der MTC gegenüber den bakteriziden Effekten der gastralen Sekretionen (GAUDIER und GERNEZ-RIEUX, 1962). Wie bei den schon vorher beschriebenen Mykobakterienspezies, ist auch bei den MTC's das Mukosa assoziierte Lymphgewebe als Eintrittspforte für die Infektion anzusehen (LUGTON, 1999). Die Mykobakterien passieren die M-Zellen (LUGTON, 1999), und werden dort von Zellen des mononukleären Phagozytensystems phagozytiert. Die intrazelluläre Lebensweise der Mykobakterien stellt für die Makrophagen eine schwer zu beseitigende Noxe dar (MEURER und WOLF, 2007). Sie hemmen die Ausbildung des Phagolysosomenkomplexes (ARMSTRONG und HART, 1975). Es bilden sich in

der Regel eingekapselte Granulome von weiß-gräulicher bis gelblicher Farbe aus, die einen verkäsenden bis kalzifizierenden Charakter haben können (BOLLO et al., 2000; MACHACKOVA et al., 2003; FEIZABADI et al., 1996; GORTAZAR et al., 2003). Sie können Größen von 1 mm bis hin zu 5 cm erreichen (BOLLO et al., 2000; GORTAZAR et al., 2003; NUGENT et al., 2002). Im Gegensatz zu Infektionen durch MAP sind beim mit MTC infizierten Wildschwein nicht nur tuberkulöse Veränderungen in den Lymphknoten des Digestionstraktes sondern auch in den Lymphknoten des Respirationstraktes und vor allem in den Lymphknoten des Kopfbereiches (SERRAINO et al., 1999; BOLLO et al., 2000) zu finden (ZANELLA et al., 2008a; GORTAZAR et al., 2003; NUGENT et al., 2002; PARRA et al., 2003). Auf der anderen Seite können makroskopische Läsionen genauso gut fehlen (ZANELLA et al., 2008a; MARTIN-HERNANDO et al., 2007; ARANAZ et al., 2004; GAVIER-WIDEN et al., 2009). Das Auftreten von Läsionen außerhalb der beschriebenen Lokalisationen ist deutlich seltener. Treten Granulome auf, so können sie in Lunge, Leber, Milz, Unterkieferspeicheldrüse, Pleura, Peritoneum, Vorderlauf, Hinterlauf (GORTAZAR et al., 2003, PARRA et al., 2003) oder der Milchdrüse (MARTIN-HERNANDO et al., 2007) aufgefunden werden. Obwohl Wildschweine als sehr empfänglich für eine Infektion mit Mykobakterien aus dem Tuberkulose Komplex gelten (VICENTE et al., 2006; NUGENT et al., 2002), erkranken sie deutlich seltener als z.B. das Rotwild (ZANELLA et al., 2008a; VICENTE et al., 2006). Die klinische Erkrankung äußert sich hauptsächlich in einer starken Abmagerung betroffener Tiere (DE LISLE et al., 2002). Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der tuberkulösen Granulome im Wildschwein ergeben sich demzufolge verschiedene potentielle Exkretionsrouten. Neben der oben beschriebenen Ausscheidung über den Atmungstrakt ist, unterstützt durch Funde tuberkulöser Läsionen in Unterkieferspeichel- (GORTAZAR et al., 2003) und Milchdrüse (MARTIN-HERNANDO et al., 2007), die Erregerübertragung über den Speichel und die Milch als zusätzliche Infektionsquelle anzusehen (MARTIN-HERNANDO et al., 2007; NARANJO et al., 2008a). Die Ausscheidung über die Faeces wird zwar für den MAC beschrieben (ELLSWORTH et al., 1980), ist aber für den MTC nicht belegt (NARANJO et al., 2008a).

In der Tabelle 6 sind einerseits die Prävalenzen für *M. bovis* in Rinderherden und andererseits die Funde von *M. bovis* in Wildschweinpopulationen aufgeführt.

Tabelle 6: Auftreten von *M. bovis* in Rinderherden verglichen mit Funden in Wildschweinpopulationen

Land	<i>M. bovis</i> -Prävalenz in Rinderbeständen ¹ (%)	Kultur positive Wildschweine ² (Untersuchungsdatum, Gebiet)	Autoren
Frankreich	Seit 2001: <0,1	2001-02, Normandie: 29% 2005-06, Normandie: 42% 2006-07, Normandie: 31%	REVIRIEGO-GORDEJO und VERMEERSCH, 2006 ZANELLA et al., 2008a; MAEDER et al., 2008;
Spanien	1999: 4,3 2004: 1,8	1999-2004, Spanien: 42,5 %	VICENTE et al., 2005; REVIRIEGO-GORDEJO und VERMEERSCH, 2006
Australien	Seit 1997 TB frei ⁴	1972, Northern Territory: 19% 1992, Northern Territory: 0,25%	CORNER, 2006; MCINERNEY et al., 1995; COUSINS und ROBERTS, 2001
Neuseeland	-	1989-90, Otago: 6,4%	WAKELIN und CHURCHMAN, 1991
Italien	1999: 0,8 2004: 1,1	1993-95, Ligurien: 25,4% ⁶ 1995-96: Imperia und Savona: 43,6% ^{3,5}	SERRAINO et al., 1999; BOLLO et al., 2000; GORDEJO und VERMEERSCH, 2006
Deutschland	Seit 1997: <0,1	2003-05, Bayern: 20,65% ³ Mecklenburg-Vorpommern : 56 % ⁷	MÜLLER et al., 2007 ; SCHULZ et al., 1992; GORDEJO und VERMEERSCH, 2006

1: Bestimmung über intradermalen Tuberkulintest; 2: Kultur-positive Wildschweine, bei denen zuvor tuberkulöse Läsionen festgestellt wurden; 3: Nachweis des MTC mit Hilfe von PCR; 4: keine nähere Angabe über Nachweismethode; 5: Nachweis des MTC; 6: Nachweis von *M. bovis* und *M. tuberculosis*; 7: pathologisch anatomisches Untersuchungsergebnis kombiniert mit kulturellem Nachweis

2.4 Das Wildschwein als Erregerreservoir

Das Wildschwein ist eine Wildart, welche in den letzten Jahrzehnten in Europa und vor allem auch in Deutschland aus jagdlicher Sicht zunehmend an Bedeutung gewonnen hat. Die Abschusszahlen haben sich seit Beginn der Protokollierung der Jagdstreckenmeldungen in den fünfziger Jahren etwa um den Faktor 25 vervielfacht (siehe Abbildung 1). Mit demnach zunehmender Bestandsdichte steigt auch die Bedeutung des Wildschweins als potentiell Erregerreservoir für Nutztierbestände und als Überträger von Zoonosen.

2.4.1 Sozialstruktur, Populationsdichte und Lebensweise als wichtige Einflussfaktoren für die Verbreitung von Krankheitserregern

Das Wildschwein ist ein geselliges Tier, welches in Gruppen verschiedener Größen, sogenannter Rotten, organisiert ist. Rotten mit intakter Sozialstruktur bestehen in der Regel aus einem adulten weiblichen Schwein (=Leitbache), mehreren untergeordneten Bachen, den Überläufern (=1-2 Jährige Tiere) und den Frischlingen (=Tiere < 1 Jahr). Die männlichen Tiere werden im Überläuferalter aus der Rotte verstoßen. Sie ziehen dann entweder als Einzelgänger umher oder gruppieren sich zu kleinen männlichen Überläuferrotten zusammen. Die adulten männlichen Tiere (=Tiere > 2 Jahre), sogenannte Keiler, sind Einzelgänger und finden sich nur in der Hauptpaarungszeit im Winter (November bis Ende Januar) bei den weiblichen Tieren ein. Nach einer durchschnittlichen Tragezeit von 115 Tagen (HENRY, 1968) werden vor allem in den Monaten März bis Mai die Frischlinge geboren. Lange Zeit galt das Wildschwein als saisonal polyöstrisch (BRIEDERMANN, 1986). Diese These wird mittlerweile als nicht mehr haltbar eingestuft (NEEF, 2009). Anhand von Untersuchungen zur Reproduktionsdynamik beim mitteleuropäischen Wildschwein konnte belegt werden, dass heute das ganze Jahr über Wildschweine vornehmlich zwar in dem zuvor beschriebenen Zeitraum, zusätzlich aber mit zwei weiteren Peaks in den Monaten August und Dezember und grundsätzlich über das gesamte Jahr geboren werden (NEEF, 2009). Etwa 35% der Frischlingsbachen, 60,9% der Überläuferbachen und 71,4% der adulten Bachen tragen zum Fortpflanzungsgeschehen bei (BRIEDERMANN, 1971; NEEF, 2009; MEYNHARDT, 1988). Wildschweinbachen können unter günstigen Umständen zwei Würfe pro Jahr

groß ziehen (NEEF, 2009). Deren durchschnittliche Nachkommenzahl beträgt 5,45 Frischlinge pro Wurf, wobei aus der Literaturstelle nicht ersichtlich ist ob es sich um geborene oder aufgezogene Frischlinge handelt (MEYNHARDT, 1988). Unter günstigen Umweltbedingungen können somit ohne Weiteres Zuwachsraten von 200 bis 300% pro Bache erreicht werden (APPELIUS, 1995; POHLMAYER und SODEIKAT, 2004). Die derartige Populationsdynamik trägt maßgeblich zu den enormen Zuwächsen in den Abschusszahlen des Schwarzwildes der letzten 50 Jahre bei (Abbildung 1).

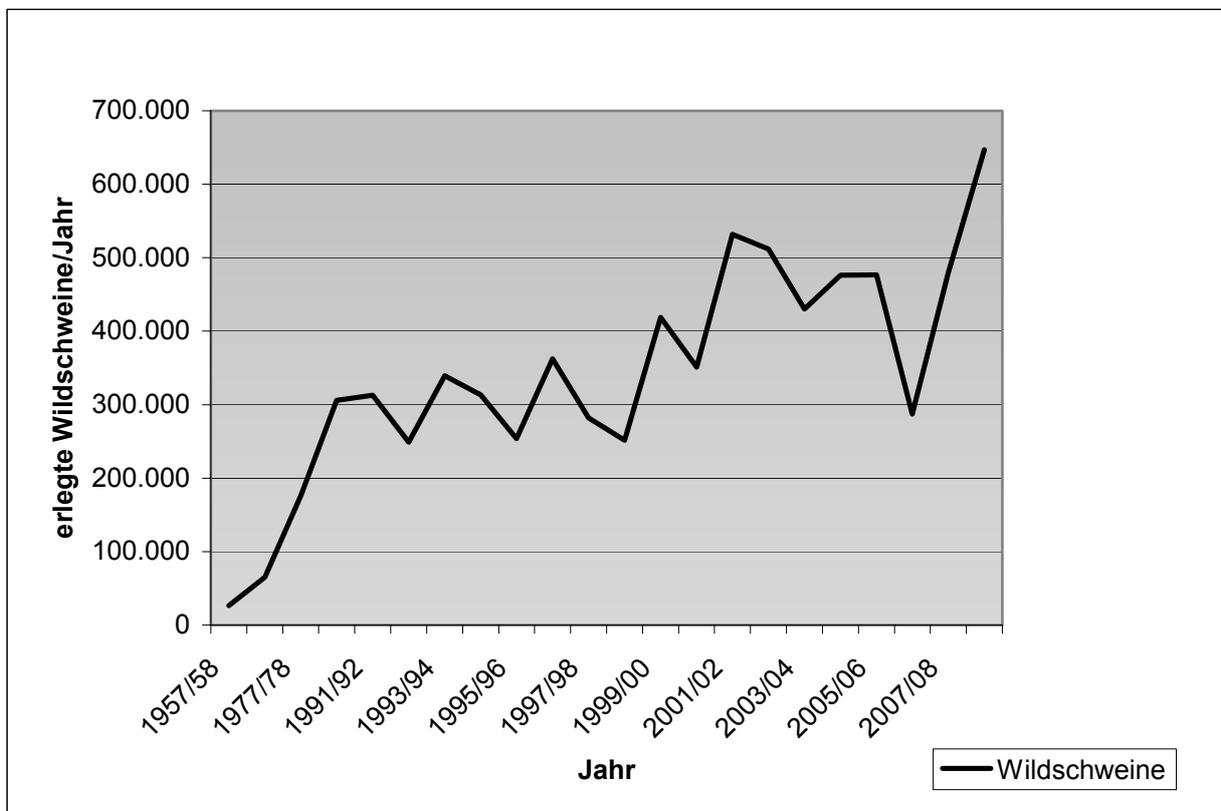


Abbildung 1: Jahresstrecken des Schwarzwildes in Deutschland (DJV-Handbuch 2010; BRIEDERMANN, 1990)

Neben der Wirkung auf die Reproduktionsdynamik werden die unterschiedlichen Ursachen auch direkt für die Populationsentwicklung der Wildschweinbestände, die vornehmlich die Verbesserung der Ernährungs- und Lebensbedingungen betreffen, verantwortlich gemacht. Milde Winter begünstigen beispielsweise das Überleben von zu „Unzeiten“ geworfenen Frischlingen. Die kürzer werdenden Intervalle von auftretenden Mastjahren (RHEINLAND PFALZ: MINISTERIUM FÜR UMWELT,

FORSTEN UND VERBRAUCHERSCHUTZ, 2009), bedingt durch die globale Klimaerwärmung, sorgen zusätzlich für ein vermehrtes Fraßangebot. Unter Mastjahren werden dabei Jahre verstanden in denen hiesige Laubbäume (Eichen, Buchen) verstärkt Früchte tragen. Die Umstrukturierung in der Landwirtschaft, vornehmlich die Intensivierung im Ackerbau mit dem in den letzten Jahrzehnten deutlich gestiegenen Maisanbau (1960: 56.000 ha, 2009: 2.111.000 ha; Quelle: Deutsches Maiskomitee e. V.) und der Zusammenlegung kleiner Flächen zu großen Parzellen sorgen für weitere Nahrungsquellen und erschweren zusehends die Bejagung durch die Jägerschaft.

In zahlreichen Untersuchungen wurde das Wanderverhalten des Schwarzwildes studiert. Die Größenordnung der Streifgebiete beträgt zwischen rund 500 und 1200 ha (KEULING et al., 2008; HAHN und EISFELD, 1998). Sie ist abhängig von der Jahreszeit, der Nahrungsverfügbarkeit und zumindest kurzfristig auch von anthropogenen Störungen (CALENGE et al., 2002; POHLMAYER und SODEIKAT, 2004). Die Streifgebiete von einzelnen Frischlingen, Überläufern und Keilern sind in der Regel etwas größer (KEULING et al., 2008; POHLMAYER und SODEIKAT, 2004). Generell sind Wildschweine in der Lage Strecken von über 50 km pro Tag zurückzulegen (SERRAINO et al., 1999). Natürliche Barrieren wie z.B. große Flüsse können ohne weiteres überwunden werden (MACHACKOVA et al., 2003), so dass heute große Teile Deutschlands von Wildschweinen besiedelt sind.

Das Schwarzwild ist eine omnivore Tierart, dessen Nahrungsspektrum breit gefächert ist. In den Mägen von Wildschweinen lassen sich regelmäßig verschiedene Gräser und Getreide, Tannennadeln, Pilze, Wurzeln, Beeren, Früchte, Eicheln, Bucheckern, verschiedene Insekten, Vogeleier, Mäuse- und Hasenkadaver finden (STIELITZ, 2005). Auch Fasanen, Rebhühner und schwache Wildwiederkäuer gehören zu ihrem Beutespektrum (MACHACKOVA et al., 2003). Ebenso nehmen sie Aas oder unsachgemäß entsorgte Küchen- und Schlachtabfälle auf (AHL, 1994; CORNER et al., 1981; NARANJO et al., 2008a). Der besondere anatomische Aufbau des Nasenspiegels macht es dem Wildschwein möglich unterirdische Mäusenester auszuheben oder ganze Rinderweiden umzubrechen, auf denen es in und unter den Kuhfladen tierisches Eiweiß in Form von Käfern und anderen Insekten findet.

Diese zuvor beschriebenen drei Aspekte, bestehend aus der enormen Reproduktionsdynamik mit der damit verbundenen Bestandsentwicklung, der starken Ausbreitungstendenz und der Ernährungsweise, bilden die Voraussetzung für die Bedeutung des Wildschweins als Krankheitsüberträger allgemein und speziell für die Übertragung verschiedener Mykobakterien.

2.4.2 Einschätzung des Infektionsrisikos und wichtige Faktoren, welche die Übertragung beeinflussen

Um die Bedeutung einer infizierten Wildtierspezies als Erregerreservoir abzuschätzen, bedarf es unter anderem der Abklärung der klinischen Ausprägung der Infektion in einzelnen Tieren, der Dynamik der Infektion in einer Population, der geographischen und lokalen Verteilung des Wirtes und dessen Wechselwirkung mit den Haustieren (CORNER, 2006). Die bloße Anwesenheit einer Infektion in einer Wildtierpopulation ist in dieser Hinsicht kein Beweis dafür, dass diese Tierart ein Erregerreservoir für eine bestimmte Infektionskrankheit darstellt (CORNER, 2006).

Um der unterschiedlichen Bedeutung innerhalb der Reservoirwirte gerecht zu werden, unterscheidet man zwischen sogenannten `Maintenance hosts` und `Spillover hosts` (MORRIS et al., 1994; BIET et al., 2005). Dabei betrachtet man Maintenance hosts als Reservoirwirte, die eine Infektion in einem bestimmten Gebiet in Abwesenheit von anderen infizierten Spezies aufrechterhalten können. Unter den Spillover hosts werden Reservoirwirte aufgefasst, die eine ständige Aufnahme eines infizierten Agens benötigen, um die Infektion aufrechtzuerhalten. Nichts desto trotz können beide Formen der Reservoirire als Krankheitsüberträger agieren (CORNER et al., 2006). Die Bedeutung für diese Einteilung liegt in der Überlegung zur Notwendigkeit von Kontrollmaßnahmen gegenüber den betroffenen Wildtierpopulationen.

2.5 Diagnostische Verfahren zum Mykobakteriennachweis

2.5.1 Mikroskopischer Nachweis

Der mikroskopische Erregernachweis stellt ein einfaches, schnelles und kostengünstiges Verfahren dar, um säurefeste Bakterien nachzuweisen (SALFINGER und KAFADER, 1992). Dabei ist die Färbung nach Ziehl-Neelsen als Methode der Wahl anzusehen. Säure-feste Bakterien erscheinen rot auf blauem Hintergrund. Der Nachteil ist jedoch, dass andere Erreger in dieser Färbung wie z.B. Rhodokokken, Nocardien, Corynebakterien oder Cryptosporidien ebenso rot erscheinen und deshalb zu falsch positiven Ergebnissen führen können (BOHRßEN, 2003). Des Weiteren ist keine sichere Differenzierung zwischen einzelnen Mykobakterienspezies möglich. Der mikroskopische Erregernachweis weist sowohl eine niedrige Spezifität als auch Sensitivität im Gegensatz zu anderen Nachweismethoden auf (THORNTON et al., 1998).

2.5.2 Kultureller Nachweis

Der kulturelle Erregernachweis von Mykobakterien gilt nach wie vor als Goldstandard (TAYLOR et al., 2001). Aufgrund der langen Inkubationsdauer im Vergleich zu anderen Bakterien werden vor der kulturellen Anzucht Dekontaminationsverfahren und anschließend Nährböden mit Antibiotikagemischen eingesetzt, um ein Überwachsen der Mykobakterienkulturen durch die Begleitflora zu verhindern. Dekontaminationsverfahren können dabei Wachstumsergebnisse negativ beeinflussen (THORNTON et al., 1998). Die gebräuchlichsten Dekontaminationsverfahren beruhen auf dem Einsatz von Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC) und N-Acetyl-L-Cystein (NALC) (MERKAL, 1984; SCHNEIDER, 2003; BULL et al., 2003; DONAGHY et al., 2003; JOHANSEN et al., 2006). Mykobakterien sind bezüglich ihres Wachstums unter Laborbedingungen sehr anspruchsvoll. Sie benötigen Spezialnährböden und werden in der Regel bei 37°C angezüchtet (LACHNIK, 2002). Zur Anzucht werden Fest- und Flüssignährmedien eingesetzt, wobei die Eigelbnährböden Löwenstein-Jensen und Herrold's Egg Yolk-Medium (HEYM) die Gebräuchlichsten sind. Der Vorteil der Eigelbnährböden ist die durch ihren hohen Eigelbgehalt bedingte Aufhebung der bakteriostatischen Wirkung

der oben beschriebenen Dekontaminationsmittel (STACHELSCHIED, 1989). Die Vorteile fester Kulturmedien gegenüber Flüssigmedien liegen allgemein in deren Möglichkeit zur makroskopischen Beurteilung der Koloniemorphologie, einer höheren Selektivität und einer geringeren Kontaminationsrate. Nachteile bestehen in deren geringeren Sensitivität und in einer um ein bis zwei Wochen längeren Inkubationszeit verglichen mit den Flüssigmedien (LACHNIK, 2002). Die derzeit eingesetzten Flüssigmedien beruhen auf automatisierten Kultursystemen wie zum Beispiel dem fluorimetrischen MGIT-Verfahren (Mycobacteria Growth Indicator Tube) oder dem radiometrischen Bactec-Verfahren. Das letztgenannte Verfahren nutzt die Fähigkeit der Mykobakterien, aus radioaktiv markierter Palmitinsäure Kohlendioxid freizusetzen, welches sich radiometrisch messen lässt. Das MGIT-System basiert auf in Kulturröhrchen befindlichen fluoreszierenden sauerstoffsensitiven Indikatorsubstanzen, deren Fluoreszenz bei zunehmendem Verbrauch des im Nährmedium befindlichen Sauerstoffs durch Mykobakterien proportional zunimmt und mit UV-Lampen gemessen werden kann. Flüssigkulturen sind recht kontaminationsanfällig und wenig spezifisch (SALFINGER und KAFADER, 1992; PFYFFER, 2001) so dass auf die Verwendung von festen Nährmedien nicht verzichtet werden sollte (AKINEDEN, 2010). Für die Speziesbestimmung können nach der positiven kulturellen Anzucht biochemische oder molekularbiologische Methoden angeschlossen werden.

2.5.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wird in der heutigen Mykobakterien-Diagnostik eingesetzt, um einerseits kulturell positive Ergebnisse zu bestätigen und zwischen verschiedenen Spezies zu unterscheiden und andererseits um Erreger direkt aus Untersuchungsmaterial nachzuweisen.

a) Extraktion

Der Direktnachweis aus Patientenmaterial kann gerade im Bezug auf die langwierige kulturelle Anzucht der Mykobakterien die Diagnose erheblich verkürzen. Die meist sehr sensitiven und spezifischen PCR-Systeme können aber nur dann optimale Ergebnisse erzielen, wenn vorgeschaltete Extraktionsmethoden zuverlässig die Ziel-

DNA aus den Bakterien freisetzen. Die Isolation der Nukleinsäuren stellt sich bei Mykobakterien deutlich schwieriger dar als bei anderen Bakterien. Deren dicke, charakteristische Peptidoglykan-Schicht, macht diese relativ resistent gegenüber Lysis-Puffern (HOSEK, 2006). Der Aufschluss der Ziel-DNA wird durch mechanische, thermische, chemische oder einer Kombination aus diesen erreicht (HOSEK, 2006). Durch den Einsatz sog. „Bead beater“, kombiniert mit Glas- oder Zirkoniumbeads, wird eine Homogenisierung des Probenmaterials, der Aufschluss der Bakterienzellwände und zum Teil die Freisetzung der Ziel-DNA erzielt (ODUMERU et al., 2001). Thermische Verfahren wie die Inkubation bei >95°C über 15-20 Minuten ermöglichen die Zerstörung ihrer widerstandsfähigen Zellwand (HURLEY et al., 1987). Enzyme wie Lysozym und Proteinase K fördern zum Einen die Auflösung des Probenmaterials und zum Anderen auch den Zellwandaufschluss (WARDS et al., 1995; BOSE et al., 1993). Bei der Extraktion von Bakterien-DNA aus Patientenmaterial (meist Kotproben) muss verstärkt mit dem Auftreten von Inhibitoren gerechnet werden, die die Sensitivität der PCR negativ beeinflussen oder die PCR sogar komplett hemmen können. Viele kommerziell erhältliche Extraktionssysteme wurden speziell für solche Proben entwickelt. Dabei wird sich die Bindungsfähigkeit von Nukleinsäuren an Silikagelmembranen zu Nutze gemacht, um über verschiedene Waschstschritte schließlich die unerwünschten PCR-Inhibitoren zu entfernen.

b) Grundlagen der PCR

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) wurde in den achtziger Jahren von Kary Mullis (USA) entwickelt. Die PCR ist ein DNA-Syntheseverfahren, welches mit Hilfe eines speziellen Enzyms und zweier bekannter, flankierender, kurzer DNA-Sequenzen DNA in mehreren Zyklen in vitro vervielfältigt. Die kurzen, einzelsträngigen DNA-Sequenzen nennt man Primer. Diese sind komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der Ursprungs-DNA (=template). Die DNA-Polymerase verlängert die Primer unter den nachfolgend aufgeführten Bedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) entlang der zuvor denaturierten, einzelsträngigen DNA-Matrize zu neuer doppelsträngiger DNA (MULLIS und FALOONA, 1987). Die PCR ist durch sich wiederholende Reaktionsschritte gekennzeichnet. Zuerst werden die DNA-

Doppelstränge durch Erhitzen auf etwa 95°C voneinander getrennt (=Denaturierung). Im zweiten Schritt lagern sich die Primer bei Temperaturen zwischen 50 und 72°C an die zu amplifizierenden DNA-Abschnitte an (=Annealing). Im dritten Schritt erfolgt die Neusynthese des Komplementärstranges durch die Polymerase bei 72°C (=Extension). Die neusynthetisierten DNA-Stränge dienen in den folgenden Zyklen wieder als Matrize, sodass eine exponentielle Vermehrung der Zielsequenz stattfindet. Gewöhnlich werden 35 Zyklen durchlaufen.

Die nested-PCR stellt eine besondere Form der konventionellen PCR dar. Hier wird das Amplifikat der ersten PCR mit einem zweiten Primerpaar reamplifiziert, welches, innerhalb des amplifizierten DNA-Fragments der ersten PCR liegt (MÜHLHARDT, 2009). So können auch noch geringste Mengen an DNA bei gleichzeitig erhöhter Spezifität nachgewiesen werden.

c) Das Prinzip der Real Time PCR

Die Real Time PCR (quantitative Echtzeit PCR) ist als Weiterentwicklung der konventionellen PCR anzusehen. Mit Hilfe dieses Verfahrens ist es möglich die Menge der Bakterien-DNA im Probenansatz zu messen. Der Ansatz bis hin zur Auswertung erfolgt in einem Reaktionsgefäß. Somit werden sowohl das Kontaminationsrisiko als auch der Arbeits- und Zeitaufwand durch den Wegfall der Agarose-Gelelektrophorese reduziert. Grundsätzlich unterscheidet man zwei Detektionssysteme zur Visualisierung der Amplifikate, die beide auf Messungen der Fluoreszenz beruhen. Zum Einen existieren Real Time Verfahren mit unspezifisch an DNA-Doppelstränge bindenden Fluoreszenzfarbstoffen kombiniert mit Schmelztemperaturanalysen (HIGUCHI et al., 1992, 1993; RIRIE et al., 1997) und zum Anderen Verfahren, die auf der Verwendung von sequenzspezifischen Fluoreszenz-markierten DNA-Sonden beruhen (SAMBROOK et al., 1989). Die Fluoreszenz tritt nur in Verbindung mit der Anwesenheit des Amplifikates auf. Als Voraussetzung für die Quantifizierung wird Computer-gestützt zunächst ein Fluoreszenzschwellenwert meist durch Mittelwertbildung der Fluoreszenzwerte der Zyklen drei bis 15 ermittelt. Da die Fluoreszenzwerte in diesen Zyklen nahe Null sind entspricht damit der Fluoreszenzschwellenwert dem Mittelwert des Fluoreszenzrauschens. Der Fluoreszenzschwellenwert kann im Bedarfsfall aber auch

manuell eingestellt werden. Man bezeichnet den Zyklus, in dem die zu untersuchende Probe den Fluoreszenzschwellenwert überschreitet, als Schwellenwertzyklus (*threshold cycle*; C_t -Wert). Die Überschreitung des Schwellenwertes wird um so schneller erreicht je mehr Zielsequenzen sich in der zu untersuchenden Probe befinden. Zur Quantifizierung wird der in der Probe erhaltene Schwellenwert mit den Schwellenwerten von DNA-Standards bekannter DNA-Menge verglichen.

Die in der PCR-Technologie am häufigsten verwendeten unspezifischen DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffe, SYBR® Green und Ethidiumbromid, binden an doppelsträngige DNA (HIGUCHI et al., 1992, 1993). Inzwischen wird fast ausschließlich SYBR® Green in der Real Time PCR eingesetzt, da es im Vergleich zu Ethidiumbromid ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis zeigt und eine wesentlich geringere Gesundheitgefährdung darstellt (O'MAHONY und HILL, 2002; RAVVA und STANKER, 2005). Beide Farbstoffe lagern sich allerdings auch an unspezifische PCR-Produkte oder Primerdimere an, was die Spezifität verringert (BANGSOW et al., 2002; FENOLLAR und RAOULT, 2004). Daher ist es unerlässlich bei Verwendung dieser Farbstoffe in Real Time PCR Systemen eine Schmelztemperaturanalyse durchzuführen, die es ermöglicht zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten zu unterscheiden (WITTEWERT et al., 2001). Dabei wird als Indikator für die Bildung von Einzelsträngen aus DNA-Doppelsträngen die Fluoreszenzabnahme bei einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung gemessen (NEUSSER, 2001). Die Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten erfolgt anhand der ersten Ableitung der Schmelztemperaturkurven, deren Maximum die Temperatur angibt, bei der 50% der Amplifikate als Doppelstrang und 50% der Amplifikate als Einzelstrang vorliegen. Diese Temperatur ist abhängig von der Amplifikatgröße, dem G/C-Gehalt und der Sequenz des Doppelstranges (NEUSSER, 2001; WITTEWERT et al., 2001).

Die zweite Möglichkeit besteht in der Verwendung von sequenzspezifischen Fluoreszenz-markierten DNA-Sonden, von denen die sog. FRET-Sonden (Förster Resonanz Energie Transfer-Sonden) und TaqMan®-Sonden am häufigsten verwendet werden. FRET-Sonden sind Hybridisierungssonden, die aus zwei Oligonukleotiden bestehen (DIDENKO, 2001). Ein Oligonukleotid ist am 3'-Ende (Donor) und das andere Oligonukleotid am 5'-Ende (Akzeptor) mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Binden beide Oligonukleotide an die Zielsequenz, ist

das 3'-Ende des Donors in unmittelbarer Nachbarschaft des 5'-Endes des Akzeptors, so dass die Fluoreszenzenergie des Donors auf den Akzeptor übertragen werden kann. Die emittierte Akzeptorfluoreszenz wird dann aufgenommen und in den Rechner übertragen. TaqMan®-Sonden sind Hydrolysesonden und bestehen aus einem Oligonukleotid, welches am 5'-Ende mit einem Donor-Fluorochrom (Reporter) und am 3'-Ende mit einem Akzeptorfluorochrom (Quencher) markiert sind (LANDT, 2006). Reporter und Quencher befinden sich so nahe beieinander, dass die abgegebene Energie des Reporters vom Quencher absorbiert wird. Trifft die Taq-Polymerase während der Synthese auf die Sonde, wird diese abgebaut (hydrolysiert). Damit entfernen sich Reporter und Quencher so weit voneinander, dass die emittierte Reporter-Fluoreszenz gemessen werden kann.

d) Zielsequenzen im *Mycobacterium avium* complex

In der Literatur beschriebene Zielsequenzen für den Nachweis des *Mycobacterium avium* Komplexes (MAC) umfassen überwiegend das hsp65-Gen und die 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region (ITS) (PARK et al., 2000; TURENNE et al., 2006; TELENTI et al., 1993). Zur Speziesdifferenzierung innerhalb des Komplexes werden oft die für die Mykobakterien charakteristischen Insertionssequenzen (IS) verwendet (JOHANSEN et al., 2005; ICHIKAWA et al., 2009; BULL et al., 2003). Der Vorteil der IS gegenüber anderen Zielsequenzen auch im Bezug auf den Direktnachweis in Gewebe ist, dass sie mehrfach im Genom der Mykobakterien zu finden sind. Dies ist die elementare Voraussetzung einer sensitiven PCR.

Die IS901 ist spezifisch für *M. avium* ssp. *avium* und *M. avium* ssp. *silvaticum* und tritt mit sieben bis elf Kopien im Genom auf (MJIS et al., 2002; TURENNE et al., 2006). Die IS1245 liegt im Genom von *M. avium*, *M. hominissuis* und *M. silvaticum* in mindestens drei Kopien vor (RITACCO et al., 1998). Einer der bekanntesten Insertions-Sequenzen aus dem *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)-Genom, die IS900, wiederholt sich in dem K10-Stamm 17 mal (LI et al., 2005). Neben der IS900, konnten 18 weitere IS aus dem beschriebenen Stamm (LI et al., 2005) identifiziert werden. Einige weitere charakteristische DNA-Sequenzen von MAP, wie z.B. ISMav2 (STROMMENGER et al., 2001), HspX (ELLINGSON et al., 1998), F57 (POUPART et al., 1993), ISMap02 und ISMap04 (LI et al., 2005)

werden in der Diagnostik eingesetzt. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über das Vorkommen einzelner Insertionssequenzen im MAC-Komplex.

Tabelle 7: Vorkommen einzelner Insertionssequenzen bei verschiedenen Spezies aus dem MAC-Komplex

Mykobakterien-Spezies	Insertionselement*		
	IS 901	IS 900	IS 1245
MAP	-	+	-
<i>M. hominissuis</i>	-	-	+
<i>M. silvaticum</i>	+	-	+
<i>M. avium</i>	+	-	+

* + Insertionselement vorhanden, - Insertionselement nicht vorhanden

e) Zielsequenzen im *Mycobacterium tuberculosis complex*

Es gibt zahlreiche Zielsequenzen, die es erlauben den *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) zu detektieren, von denen hier nur die wichtigsten genannt werden sollen. Dazu gehören IS6110, Rv2875 (MPB70), IS1081 (DZIADEK et al., 2001; WARDS et al., 1995; HUARD et al., 2003). Rv2875 kommt einmal im Genom vor und kodiert für MPB70, ein sekretorisches Protein (RADFORD et al., 1988). Die IS6110 wird oft in der Tuberkulosedagnostik verwendet, in seltenen Fällen kann diese aber fehlen oder zu falsch positiven Ergebnissen führen, da gewisse Sequenzhomologien zu den MOTT's bestehen (VAN SOOLINGEN et al., 1993; DZIADEK et al., 2001; BROSCHE et al., 2002). Das Auftreten der Insertionssequenz ist sehr variabel, sie kann im Genom in Mehrfach-Kopien (zwei bis 14) bis hin zu Einfachkopien vorkommen (FOMUKONG et al., 1994; BROSCHE et al., 2002). Die IS1081 hingegen ist im Genom mit fünf bis sieben Kopien vertreten und wird als sehr spezifisch für den MTC angesehen (DZIADEK et al., 2001; TAYLOR et al., 2007). In der humanen Tuberkulose-Diagnostik wird in den aktuellen PCR-Verfahren hauptsächlich auf die Unterscheidung tuberkulöse Mykobakterien – nicht-tuberkulöse Mykobakterien Wert gelegt. Die Spezies des MTC sind zu 99,9% homolog auf Nukleotidebene und identisch in ihrer 16S rRNA Sequenz (SREEVATSAN et al., 1997b; BODDINGHAUS et al., 1990). Es existieren wenige PCR-Verfahren, die eine Spezies-Differenzierung ermöglichen. Die derzeitigen Verfahren, die sich für den Direktnachweis aus Gewebe

eignen, basieren auf der unterschiedlichen Ausprägung der *Regions of Difference* (RD) (TAYLOR et al., 2007; WARREN et al., 2006; HUARD et al., 2003; PINSKY und BANAEI, 2008). Die 14 momentan bekannten RDs treten als Einfach-Kopien im Genom auf (BROSCH et al., 2002). In Tabelle 8 ist das Vorkommen der RDs in den Spezies des MTC aufgeführt (BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002; HUARD et al., 2003).

Tabelle 8: Vorkommen der *Regions of Difference* bei den einzelnen MTC-Spezies

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. canetti</i>	<i>M. africanum</i> I/II	<i>M. microti</i>	<i>M. bovis/BCG</i>	<i>M. pinnipedii</i>
RD14	+	+	₃	₃	+ ¹	₃
RD13	+	+	+	+	-	+
RD12	+	-	+	+	-	+
RD11	+/-	keine Angabe				
RD10	+	+	-/+	-	-	-
RD9	+	+	-/+	-	-	-
RD8	+	+	-/+	-	-	-
RD7	+	+	-/+	-	-	-
RD6	+/-	keine Angabe				
RD5	+/-	keine Angabe				
RD4	+	+	+	+	₂	+
RD3	+/-	keine Angabe				
RD2	+	+	₃	₃	+ ¹	₃
RD1	+	+	+	+	+/-	+

1: bei BCG Tokyo anwesend, fehlt bei BCG Pasteur 2: anwesend bei *M. bovis ssp. caprae* 3: wird aus Literatur nicht ersichtlich

3 Arbeitsthese

Die kulturelle Anzucht ist eine langwierige und kostenaufwendige Form der Mykobakteriendiagnostik. Aufgrund dieser bestehenden Problematik war das Ziel dieser Dissertation ein Verfahren einzusetzen, das mit deutlich geringerem Zeitaufwand aber mit einer ähnlichen Sicherheit und analytischen Sensitivität aussagekräftige Ergebnisse zum Infektionsstatus deutscher Wildschweine mit bedeutenden Mykobakterienspezies liefern konnte. Hierzu wurden die Lymphknoten des Ileozäkalsbereichs mittels verschiedener PCR-Verfahren untersucht.

Dabei galt es:

- spezifische und sensitive PCR-Systeme aus der Literatur und aus eigener Entwicklung einzusetzen
- die Ergebnisse der eingesetzten PCR-Systeme exemplarisch mit den Ergebnissen kultureller Anzuchtversuche zu vergleichen
- geographische Prävalenzunterschiede darzustellen
- festzustellen, in wieweit sich bei den infizierten Tieren grobsinnliche pathologisch-anatomische Veränderungen zeigen
- die Möglichkeit zu erörtern, in wieweit das Wildschwein ein Erregerreservoir für Mykobakterien darstellt

4 Material und Methoden

4.1 Probenmaterial

Das im Rahmen dieser Dissertation ausgewertete Probenmaterial wurde stichprobenartig im Zeitraum vom 10.10.08 bis zum 02.08.09 auf Drückjagden in den Bundesländern Rheinland-Pfalz, Nordrhein-Westfalen, Hessen, Baden-Württemberg, Saarland, Bayern, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Niedersachsen und Schleswig-Holstein gezogen. In 33 Revieren wurden insgesamt 428 Wildschweine beprobt. Den erlegten Wildschweinen wurden Mesenteriallymphknoten aus dem Ileozäkalbereich entnommen. Die beprobten Reviere der jeweiligen Bundesländer, die Anzahl der in den Revieren untersuchten Wildschweine sowie das Datum der Probenentnahme sind in der Tabelle 9 aufgeführt. Die Abbildung 2 gibt die geographische Lage der in die Untersuchung einbezogenen Reviere wieder.

Tabelle 9: Daten zum Probenumfang und zum Entnahmedatum

Bundesland	Reviernummer	Anzahl Tiere je Revier	Gesamtzahl je Bundesland	Datum der Probenentnahme
Baden-Württemberg	3	1	8	17.12.2008
	8	7		06.12.2008
Bayern	4	8	32	12.12.2008
	30	17		12.12.2008
	31	7		13.12.2008
Brandenburg	1	7	36	10./11.10.2008
	13	13		22.11.2008
	14	16		21.11.2008
Hessen	10	12	43	12.11.2008
	17	30		13.11.2008
	33	1		28.11.2008
Mecklenburg-Vorpommern	21	18	33	08.11.2008
	23	6		07.11.2008
	24	9		08.11.2008
Niedersachsen	15	30	40	20.11.2008
	22	7		06.11.2008
	32	3		01./02.08.2009
Nordrhein-Westfalen	12	36	42	17.11.2008
	16	6		18.11.2008
Rheinland-Pfalz	25	12	41	31.10.2008
	26	15		24.10.2008
	27	4		25.10.2008
	29	10		15.10.2008
Saarland	2	22	29	16.12.2008
	28	7		17.10.2008
Sachsen	9	27	34	29.11.2008
	11	7		02.12.2008
Sachsen-Anhalt	5	26	36	05.12.2008
	7	10		04.12.2008
Schleswig-Holstein	18	13	23	15.11.2008
	20	10		14.11.2008
Thüringen	6	7	31	26.11.2008
	34	24		10.12.2008
Deutschland	Anzahl Reviere 33		Anzahl Tiere 428	Zeitraum 10./11.10.2008- 02.08.2009

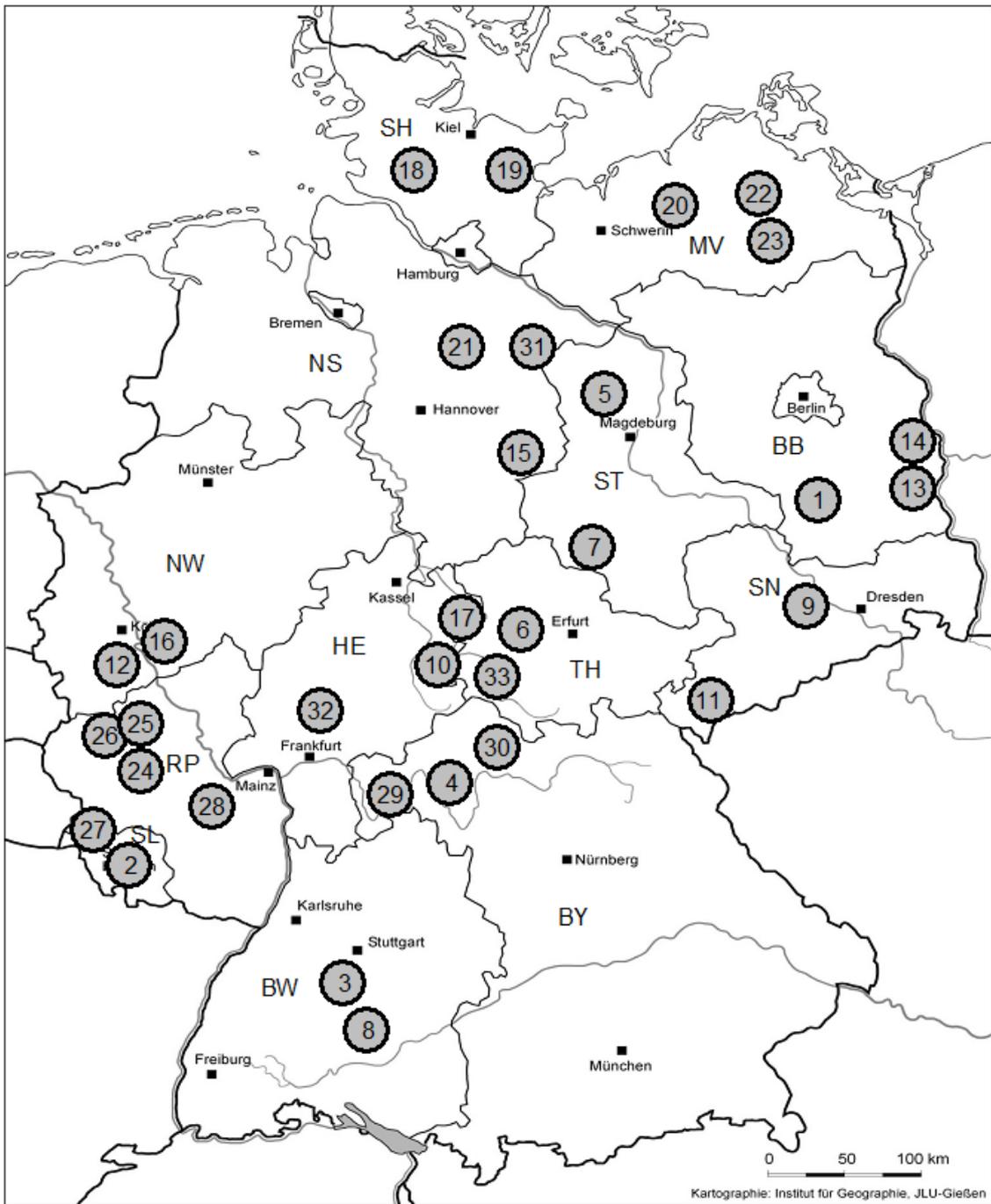


Abbildung 2: Geographische Verteilung der untersuchten Reviere.

Die grau hinterlegten Kreise mit den darin enthaltenen Nummern geben die Reviere wieder, aus denen die einzelnen Proben stammen (s. auch Tabelle 9).

4.1.1 Entnahme und Konservierung der Proben

Die erlegten Wildschweine wurden entweder zentral, d.h. sämtliche Tiere wurden an bestimmten Sammelpunkten oder dezentral, d.h. in der Regel in unmittelbarer Umgebung der Schützenstände aufgebrochen. Anschließend erfolgte die Kennzeichnung der Tiere, die Zahnaltersschätzung, die Gewichtsschätzung/-bestimmung, die Bestimmung des Geschlechts, die Ermittlung des Ernährungszustandes und sonstiger Besonderheiten. Die Proben wurden in elektrisch betriebenen Kühleinrichtungen auf 4°C gekühlt und so maximal 2 Tage transportiert, ehe sie weiterverarbeitet oder bei –20°C eingefroren wurden.

4.1.2 Zahnaltersschätzung

Die Schätzung des Alters der erlegten Tiere erfolgte am Streckenplatz mit Hilfe des Unterkiefergebisses der erlegten Wildschweine. Anhand des Zahnwechsels lässt sich eine relativ genaue Einordnung der Wildschweine bis zu einem Alter von 2 Jahren, sprich bis zum Erreichen des Adultstadiums, erzielen (HABERMEHL, 1985; BRIEDERMANN, 1986). Um eine schnelle aber trotzdem möglichst genaue Altersseinschätzung am Jagdstreckenplatz zu gewährleisten wurde entsprechend Tabelle 10 besonderer Wert auf markante Veränderungen während des Zahnwechsels gelegt. Aufgrund ihres Alters wurden die Wildschweine in neun Altersgruppen zusammengefasst (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Altersschätzung bei Wildschweinen (modifiziert nach HABERMEHL, 1985; BRIEDERMANN, 1986)

Altersgruppe	Alter in Monaten	Merkmal
1	< 3	nicht alle i* sind durchgebrochen
2	3-4	alle i sind vollständig
3	6-8	M1 ⁺ ist vorhanden, i3 ist ausgefallen
4	10-12	I3 [°] voll entwickelt
5	15	i1 wird gewechselt, i2 noch vorhanden
6	17-18	I1 und i2 stehen in einer Linie
7	19-20	i2 wird gewechselt
8	22-24	I2 ist voll entwickelt
9	>24	M3 ist voll entwickelt

*i = Milchschnidezahn; ⁺M = Molar; [°]I = Dauerschnidezahn

4.1.3 Gewichtsschätzung/-bestimmung

Die Gewichtsschätzung/-bestimmung erfolgte stets als Nettogewicht, das heißt dass die Brust-, Bauch- und Beckenorgane bereits entfernt und die Tiere weitestgehend entblutet waren. Die Gewichte der Wildschweine wurden entweder geschätzt oder unter Zuhilfenahme einer Federwaage ermittelt.

Zur Einschätzung des körperlichen Entwicklungszustandes wurde für jedes Tier dessen theoretisches Soll-Gewicht aus der über alle Tiere bestimmten Regression zwischen Alter und Körpergewicht errechnet.

4.1.4 Geschlechtsbestimmung

Die Geschlechter wurden durch das Aufsuchen der primären Geschlechtsmerkmale bestimmt.

4.1.5 Ernährungszustand

Zur Einschätzung des Ernährungszustandes wurden das subkutane Fettgewebe und das Körperhöhlenfettgewebe herangezogen. Die Einteilung erfolgte in gut, mäßig und kachecktisch.

4.1.6 Sonstige Beobachtungen am Einzeltier

Besonderes Augenmerk wurde auf Veränderungen der Lymphknoten des Kopfes, der Lunge und Lungenlymphknoten und des Digestionstraktes gerichtet. Zudem wurden unter den sonstigen Beobachtungen Tiere mit verdickten Gelenken, Laufverletzungen, Räude oder führende Tiere und hochgravide Tiere vermerkt.

4.2 Bearbeitung des Probenmaterials

4.2.1 DNA-Isolierung aus Mesenteriallymphknoten

Die DNA aus den Mesenteriallymphknoten wurde entsprechend einem im Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Gießen etablierten und validierten Arbeitsprotokoll isoliert (noch nicht publiziert). Das Protokoll zur DNA-Isolierung beinhaltet eine Kombination aus mechanischem und biochemischem Aufschluss. Die Isolierung erfolgte mit dem DNeasy® Blood&Tissue Kit (Fa. QIAGEN, Hilden) modifiziert für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Gewebe.

Die bei -20°C gelagerten Lymphknoten wurden zunächst für ca. 20 min getaut, ehe die Lymphknotenkapsel entfernt und aus dem Kern des Lymphknotens etwa 25 mg auf einer sterilen Petrischale mit Einmalklingen so klein wie möglich geschnitten wurde. Anschließend wurde das zerkleinerte Material in ein 2 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäß (Twist Top® Vials, Roth), das zum Einen mit etwa 10 mg Zirconia/Silicabeads (0,1 mm, Roth, Karlsruhe) und zum Anderen mit etwa 1,5 g SiLibeads® (Typ ZY 1,4-1,6 mm, Fa. Sigmund Lindner) befüllt war, gegeben. Nach Zugabe von 360 μl Lysispuffer wurde das Schraubdeckel-Reaktionsgefäß in einem Ribolyser (Fast Prep FP 120, Bio 101 Savant) bei 5000 U/min für 20 s zentrifugiert. Aufgrund der starken Schaumbildung wurden die Reaktionsgefäße bei 10000 x g (Biofuge fresco, Fa. Heraeus) für 1 min zentrifugiert und dann kurz gevortext. Die beiden Zentrifugationsschritte im Ribolyser und der Biofuge fresco wurden noch zweimal wiederholt.

Es folgte eine Inkubation der lysierten Proben in einem Thermomixer (HLC Kühl Thermomixer MKR 13, HLC Biotech, Bovenden) bei 37°C über Nacht und einer Schüttelfrequenz von 1000/s. Danach wurde den Proben 50 μl Proteinase K und 400 μl AL Puffer hinzugesetzt. Anschließend wurde gründlich gevortext und kurz

anzentrifugiert. Daraufhin erfolgte eine erneute Inkubation im Thermomixer bei 56°C für 2 h. Um eventuell nicht lysierte Mykobakterien vollends zu inaktivieren, wurden die Proben für weitere 15 min bei 96°C im Thermomixer inkubiert. Es wurde gründlich gevortext und kurz anzentrifugiert. Nach Zugabe von 400 µl absolutem Ethanol (99%) wurde erneut gevortext und anzentrifugiert und anschließend die Hälfte der Flüssigkeit (600 µl) in eine QIAamp Zentrifugationssäule überführt und bei 6000 x g für 1 min zentrifugiert (Heraeus Biofuge fresco, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau). Der Durchfluss wurde verworfen und die Zentrifugationssäule in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Dieser Schritt wurde mit dem Rest der lysierten Probe wiederholt. Die Säule wurde in ein neues Sammelgefäß gesetzt und es folgten zwei Waschschriffe um Reste der an der Silicagelmembran haftenden Kontaminanten (Inhibitoren, Proteine, Nukleasen) zu entfernen. Im ersten Schritt wurden 500 µl AW1-Puffer auf die Säule gegeben, bei 6000 x g 1 min zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Im zweiten Schritt wurden 500 µl AW2-Puffer auf die Säule gegeben und bei 16000 x g für 3 min zentrifugiert. Um Reste des Alkohol-haltigen Waschpuffers vollständig zu entfernen wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt und eine weitere Minute bei 16000 x g zentrifugiert. Abschließend wurde die Säule in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 100 µl AE-Puffer, der durch eine pH-Wertänderung die DNA aus der Silicagelmembran löst, mittig auf den Filter pipettiert. Es folgte eine Inkubation von 1 min bei Raumtemperatur und dann eine Zentrifugation bei 6000 x g für 1 min. Die DNA-Konzentration des Eluats wurde photometrisch bestimmt und das Eluat schließlich bei -20 °C eingefroren.

4.2.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der aus den 428 Wildschweinproben isolierten DNA wurde photometrisch (Nano Drop 1000, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) gemessen und mit 1x TE auf 100 ng/µl eingestellt.

4.2.3 Probenbearbeitung für die kulturelle Anzucht

Pro Probe wurden etwa 1 Gramm Mesenteriallymphknoten in sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben und bei -20°C tiefgefroren. Für die kulturelle Anzucht wurden die mittels PCR positiv getesteten MAC Proben dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde in Gießen übergeben.

4.3 PCR

Nachfolgend (Tabelle 11, Tabelle 12 und Tabelle 17) sind eine Reihe von Primern aufgeführt, die als spezifisch für Mykobakterienkomplexe und die einzelnen Spezies gelten. Die Abbildung 3 stellt eine Übersicht über die zur Differenzierung der verschiedenen Mykobakterien verwendeten Zielsequenzen dar.

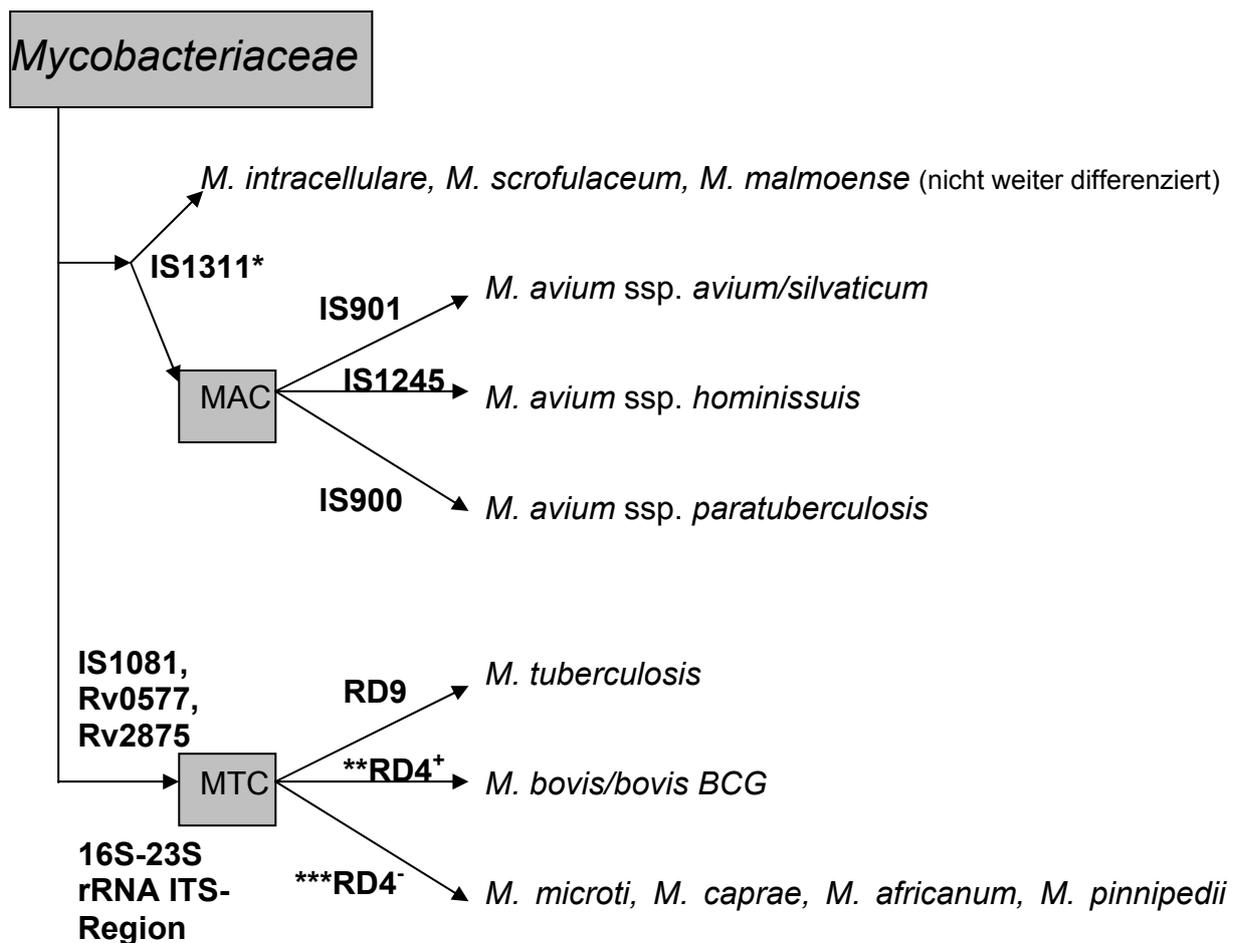


Abbildung 3: Bestimmungsschlüssel ausgewählter Mykobakterienspezies.* **Fett** markiert sind die Zielsequenzen der getesteten Primerpaare; ** RD4 vorhanden; *** RD4 nicht vorhanden

4.3.1 Konventionelle PCR

Für den Direktnachweis von Mykobakterien aus Gewebe wurden verschiedene bereits in der Literatur beschriebene Primer und selbst entwickelte Primer von den Firmen Metabion (München) und Biomers (Ulm) bezogen (Tabelle 11 und Tabelle 12) und die Lyophilisate laut Herstellerangaben auf 100 pmol/µl mit 1x TE eingestellt. Aus der Ursprungslösung wurden 20 µM Stamm- und 4 µM Gebrauchslösung mit 1x TE hergestellt und anschließend, wie die Ursprungslösung, bei -20°C gelagert. Alle Primer wurden auf Spezifität und Sensitivität getestet. Bei jedem PCR-Ansatz wurde sowohl eine Positivkontrolle als auch eine Negativkontrolle mitgeführt. In regelmäßigen Abständen wurde auch der Leerwert des Mastermixes (Mastermix ohne Zugabe von Proben-DNA) und der bei der DNA-Extraktion eingesetzte AE-Elutionspuffer auf Abwesenheit von Mykobakterien-DNA getestet.

a) Primerdesign

Um ein für MAC spezifisches Primerpaar zu entwickeln, wurden die Sequenzen des hsp65-Gens von *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *hominissuis* und *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus der Nukleotid-Datenbank (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) extrahiert und mit Hilfe von ClustalX 2.0 (Conway Institute UCD, Dublin, www.clustal.org) miteinander verglichen. Mit dem Programm Oligo 4.0 (Primer Analysis Software, Copyright 1989-91 by Wojciech Rychlik) wurden die Primer anhand der homologen Sequenzbereiche der hsp65-Gene entwickelt und hinsichtlich Dimer- und Schleifenbildung optimiert und sowohl die zu erwartende Amplifikatgröße als auch die optimale Annealingtemperatur ermittelt.

Ein ähnliches Vorgehen wurde für die Entwicklung spezifischer Primer (IS901 und IS901-R₂) für *M. avium* ssp. *avium* gewählt, die gegen das IS901-Element gerichtet waren. Zur Differenzierung von *M. avium* ssp. *hominissuis* wurde das für diese Mykobakterien spezifische Insertionselement Ismav6 mit der IS901-Sequenz verglichen. Die Primer zum Nachweis von *M. avium* ssp. *avium* wurden in einen möglichst heterologen Sequenzbereich gelegt.

Tabelle 11: Primer für den Nachweis von Mykobakterien

Literatur/Primerbezeichnung	Zielgen/ Amplifikat- größe (Bp)	Primersequenz	Spezifisch für
(eigene Entwicklung)/ IS901	IS 901/ 302 Bp	*F:5-GGC AGC AGG CCA GAT AAT CAC C-3 **R:5-CGG TGA TAC GGC CGG AAT CG	<i>M. avium</i>
(eigene Entwicklung)/ IS901-R ₂	IS 901/ 103 Bp	F: 5-GGC AGC AGG CCA GAT AAT CAC C-3 R:5-GTC CTT GAT CTG CCG ATC CAA GT-3	<i>M. avium</i>
Taylor et al., 2007 / F ₂ -R ₂	IS1081/ 135 Bp	F:5-CTG CTC TCG ACG TTC ATC GCC G-3 R:5-GGC ACG GGT GTC GAA ATC ACG-3	MTC ¹
(eigene Entwicklung)/ MAC I	Hsp65/ 233 Bp	F:5-GCA AGG TCG TCG TCA CCA AG-3 R:5-GTC CTC GAT GCG GTG CTT G-3	MAC ²
Huard et al., 2003/ 1081	IS1081/ 238 Bp	F:5-TCG CGT GAT CCT TCG AAA CG-3 R:5- GCC GTT GCG CTG ATT GGA CC-3	MTC
Park et al., 2000/ TB	16S-23S rRNA ITS Region/ 121 Bp	F :5-TGG TGG GGC GTA GGC CGT GA-3 R:5-CAC TCG GAC TTG TTC CAG GT-3	MTC
Huard et al., 2003/ Rv0577	Rv0577/ 786 Bp	F:5- ATG CCC AAG AGA AGC GAA TAC AGG CAA-3 R:5- CTA TTG CTG CGG TGC GGG CTT CAA-3	MTC

¹MTC = *Mycobacterium tuberculosis complex*; ²MAC = *Mycobacterium avium complex*; * F = Forward;

** R = Reverse

Tabelle 12: Primer für den Nachweis von Mykobakterien

Literatur/Primerbezeichnung	Zielgen/ Amplifikat- größe (Bp)	Primersequenz	Spezifisch für
Huard et al., 2003/ MB	MPB70 (Rv2875)/ 489 Bp	F: 5-GGC GAT CTG GTG GGC CCG-3 R: 5-CGC CGG AGG CAT TAG CAC GCT-3	MTC
Park et al., 2000/ MAC II	16S-23S rRNA ITS Region/ 144 Bp	F: 5-CCC TGA GAC AAC ACT CGG TC-3 R: 5-GTT CAT CGA AAT GTG TAA TT-3	MAC
Johansen et al., 2005/ IS1245 long	IS1245/ 427 Bp	F: 5-GCC GCC GAA ACG ATC TAC-3 R: 5-AGG TGG CGT CGA GGA AGA-3	<i>M. avium</i> , <i>M.hominissuis</i>
Johansen et al., 2005/ IS1245 short	IS1245/ 175 Bp	F : 5-GGT GAG CGG ATC ACT CAA G R: 5-GAA TCC GCA GTT CCA GGT C	<i>M. avium</i> , <i>M.hominissuis</i>
Johansen et al., 2005/ IS 1311	IS1311/ 198 Bp	F : 5-GCT GGA CGC ATT ACG CAA TG-3 R : 5-CGC AAC TCC AAA TCG CCA G-3	<i>M. avium</i> , <i>M.hominissuis</i> , MAP ³
Eigene Entwicklung / MA	IS1311/ 198 Bp	F: 5-AGG TGC TGG ACG CAT TAC GCA AT-3 R: 5-ACT CCA AAT CGC CAG CGA TCG T-3	<i>M. avium</i> , <i>M.hominissuis</i> , MAP
Bull et al., 2003/ TJ 1-TJ4	IS900/ 355 bzw. 294 Bp	TJ1-F: 5-GCT GAT CGC CTT GCT CAT-3 TJ2-R: 5-CGG GAG TTT GGT AGC CAG TA-3 TJ3-F: 5-CAG CGG CTG CTT TAT ATT CC-3 TJ4-R: 5-GGC ACG GCT CTT GTT GTA GT-3	MAP

³MAP = *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

b) Kontrollstämme

Als Positivkontrollen dienten die in Tabelle 13 aufgeführten Mykobakterien-Stämme.

Tabelle 13: Kontrollstämme

Stamm	Typ	Quelle/Bezug
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	Subkultur eines Referenzstammes M128	Friedrich-Löffler-Institut, Institut für molekulare Pathogenese (Jena)
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> AV56	Desinfektionsmittelversuchstamm AV56	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (Gießen)
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	Feldisolat 877/09	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (Gießen)
<i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i>	Feldisolat 09/MA0834	Friedrich-Löffler-Institut, Institut für molekulare Pathogenese (Jena)
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> K10	Feldisolat	Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde (Gießen)
<i>Brachyspira</i> <i>hyodysenteriae</i>	Feldisolat	Professur für Schweinekrankheiten (Gießen)
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	Feldisolat	Professur für Schweinekrankheiten (Gießen)
<i>Lawsonia intracellularis</i>	Feldisolat	Professur für Schweinekrankheiten (Gießen)
<i>M. tuberculosis</i>	Feldisolat 3213/08	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (Gießen)
<i>M. bovis</i>	Feldisolat 09/MA0822	Friedrich-Löffler-Institut, Institut für molekulare Pathogenese (Jena)
<i>M. microti</i>	Feldisolat 3405/06	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten Tiere (Gießen)

c) Pipettierprotokoll

Die Herstellung der PCR-Mastermixe erfolgte in einem separaten PCR-Vorbereitungsraum, in dem auch die Primergebrauchslösungen angesetzt wurden. Die verwendeten Reagenzien wurden nach dem Auftauen auf Eis gelagert. Die Primer und der Mastermix wurden in 0,2 ml PCR-Gefäße pipettiert und anschließend in einen anderen Raum gebracht, in dem unter einer Werkbank die zu untersuchende DNA und die Negativkontrolle hinzu pipettiert wurden. Die Positivkontrolle wurde wiederum in einem separaten Raum dazugegeben. In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Reagenzien für einen 20 µl Ansatz aufgelistet.

Tabelle 14: Pipettierprotokoll für die konventionelle PCR (20 µl Ansatz)

Reagenzien	Eingesetzte Menge [µl]
RNase freies Wasser	4,0
2x Multiplex PCR Mastermix	10,0
Loading Dye (Auftragspuffer)	2,0
Primermix (4µM)	2,0
DNA	2,0
Volumen pro PCR-Gefäß	20

d) Thermocyclerprogramm

Alle PCR-Reaktionen wurden in Thermocyclern der Firma Biometra, Göttingen durchgeführt. Die PCR-Bedingungen waren für alle PCR-Systeme gleich, lediglich die Annealingtemperatur differierte (Tabelle 15).

Tabelle 15: Thermocyclerprogramm

Schritt	Temperatur(°C)	Zeit	Funktion	Anzahl
1	95	15 min	Denaturierung und Aktivierung der Taq-Polymerase	1 x
2	94	30 s	Denaturierung	35 x
3	variabel	90 s	Annealing	
4	72	60 s	Extension	
5	72	10 min	Final Extension	1 x
6	4	∞	Kühlung	

e) Darstellung der PCR-Produkte mittels Agargelelektrophorese

Die Auswertung der PCR erfolgte unter Verwendung von 2%igen Agarosegelen (Agarose NEEO, Roth, Karlsruhe). Zunächst wurde die Ethidiumbromid-haltige (0,4 µg/ml) Agaroselösung erhitzt und dann in den Gelträger gegossen, der an beiden Enden mit einem Keil abgedichtet war. Im noch flüssigen Gel eventuell vorhandene Blasen wurden entfernt und die Kämme eingesetzt. Anschließend musste das Gel 20

min aushärten, ehe die Kämme wieder entfernt werden konnten. Dann wurde so viel Laufpuffer (1 x TAE) hinzugegeben, dass das Gel gleichmäßig bedeckt war. Von den PCR-Produkten wurden jeweils 4 µl in die Geltaschen pipettiert. Eine 100 bp-Leiter (Roth, Karlsruhe) diente als Größenstandard. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 V für 20 min.

f) Fotodokumentation

Die DNA-Banden wurden in den mit Ehtidiumbromid angefärbten Gelen in einer Geldokumentationskammer (Bio Doc Analyze, Whatman Biometra, Göttingen) unter UV-Licht (365nm) angeregt, digital aufgenommen (Canon G2 Power-Shot, Canon Inc., Tokio, Japan), analysiert und archiviert.

g) Auswertung der PCR- Ergebnisse

Eine Probe galt als positiv für den nachzuweisenden Erreger, wenn Banden in Höhe der zu erwartenden Amplifikatgröße sichtbar waren. Anhand der 100 bp-Leiter konnte die ungefähre Größe des PCR-Produktes abgeschätzt werden und mit der Positivkontrolle verglichen werden. Sofern keine Banden zu erkennen waren, wurden die Proben als negativ gewertet, traten undeutliche Banden auf, wurden diese als fraglich positiv gewertet und wiederholt. Die Negativkontrolle, der Leerwert des Mastermixes und der AE-Elutionspuffer mussten stets ein negatives Ergebnis aufweisen.

4.3.1.1 Spezifität

Alle der in den Tabelle 11 und Tabelle 12 aufgeführten Primerpaare wurden im Hinblick auf ihre Spezifität mit den in der Tabelle 13 gelisteten Kontrollstämmen getestet.

4.3.1.2 Analytische Sensitivität

a) Herstellung der Verdünnungsreihen

Um die Empfindlichkeit der entwickelten PCR-Systeme zu testen, wurden Verdünnungsreihen der einzelnen Mykobakterienspezies angesetzt. Dazu wurden auf der Homepage des `National Center for Biotechnology Information` (NCBI) die Genomgrößen der Mykobakterien in Erfahrung gebracht. Mit der photomerisch bestimmten Konzentration der nach der Extraktion aus den kulturell angezüchteten Mykobakterienspezies gewonnenen DNA wurde die Anzahl der Ziel-DNA-Moleküle pro μl wie folgt berechnet (gezeigt am Beispiel von *M. tuberculosis*):

DNA-Konzentration	Genomgröße <i>M. tuberculosis</i> H37Rv
62,7 ng/ μl	4.411.532 Bp

1 Bp = 660 g/mol

1 mol = $6,023 \times 10^{23}$ Moleküle (Avogadro'sche Zahl)

$4.411.532 \text{ Bp} \times 660 \text{ g/mol} = 2.911.611.120 \text{ g/mol}$

$2.911.611.120 \text{ g} = 6,023 \times 10^{23} \text{ Moleküle}$

$2.911.611.120 \text{ ng} = 6,023 \times 10^{14} \text{ Moleküle}$

$291.161,112 \text{ ng} = 6,023 \times 10^{10} \text{ Moleküle}$

$1 \text{ ng} = 6,86 \times 10^5 \text{ Moleküle}$

$62,7 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 6,86 \times 10^5 \text{ Moleküle/ng} = 4,3 \times 10^6 \text{ Moleküle}/\mu\text{l}$

Schließlich wurde 1 μl der extrahierten DNA mit 3,3 μl 1 x TE zusammengegeben, um 1 x 10^6 Moleküle/ μl zu erhalten. Nun wurde in 10er-Potenzen die Mykobakterien-DNA bis auf 1×10^{-1} Moleküle/ μl verdünnt.

b) Bestimmung der Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze für die einzelnen PCR-Systeme wurden jeweils 10-fach PCR-Ansätze für die Verdünnungsstufen 10, 1 und 0,1 Moleküle Mykobakterien-DNA/ μ l durchgeführt. Aus den hieraus erhaltenen Ergebnissen wurde mit Hilfe der Probit-Analyse die Nachweisgrenze errechnet.

Für die Umrechnung auf ein Gramm Gewebe mussten nachfolgende Faktoren eingerechnet werden. Die Erreger-DNA wurde aus 25 mg Gewebe isoliert und von dem Eluat (100 μ l) wurden 2 μ l in die PCR eingesetzt. Desweiteren wurde der Median (1016,5 ng/ μ l) aus den photometrisch gemessenen DNA-Konzentrationen der 428 Probenelutionen errechnet und mit dem Faktor 10,2 in die Umrechnung mit einbezogen. Demzufolge ergab sich ein Gesamtfaktor von 2×10^4 der mit den Ergebnissen der Probit-Analyse multipliziert werden musste. Um die Genomkopienäquivalente auf Bakterienäquivalente umzurechnen, war es zu dem nötig, die Anzahl der Insertionssequenzen im Bakteriengenom zu berücksichtigen.

4.3.1.3 Optimierung der Annealingtemperaturen

Die Annealingtemperaturen für die einzelnen PCR-Systeme wurden in einem Gradienten-Cycler (T-Gradient, Fa. Whatman Biometra, Göttingen) optimiert, der es erlaubt pro Reihe (insgesamt 12 Reihen) eine unterschiedliche Temperatur einzustellen. Dadurch war es möglich die Optimierung der Annealingtemperatur in einem Durchgang zu bewerkstelligen.

4.3.1.4 Auswahl der Primer

Für den Direktnachweis von Mykobakterien aus Lymphknoten mussten die eingesetzten Primer spezifisch und die PCR hoch-sensitiv sein. Aus diesem Grund wurden Primer ausgewählt, die mindestens 10-100 Moleküle Mykobakterien-DNA pro PCR-Ansatz detektieren konnten.

a) *Nachweis des Mykobakterium tuberculosis Komplexes (MTC) mittels konventioneller PCR*

Für den Nachweis von Erregern aus dem MTC wurde das F₂-R₂-Primerpaar (Tabelle 11) eingesetzt, das gegen die Insertionssequenz IS1081 gerichtet ist.

b) *Nachweis von M. avium ssp. avium, M. avium spp. hominissuis und M. avium spp. paratuberculosis*

Für den Nachweis ausgewählter Mykobakterien aus dem MAC-Komplex wurden Primer ausgewählt, die gegen die Insertionssequenzen IS900, IS1245 und IS901 gerichtet sind (Tabelle 16). Aufgrund des Auftretens der IS901 und der IS1245 bei *M. avium ssp. avium* und *M. avium ssp. silvaticum* war es nicht möglich diese mit Hilfe der PCR voneinander zu differenzieren.

Tabelle 16: Vorkommen einzelner Insertionssequenzen bei verschiedenen Mykobakterien-Spezies aus dem MAC-Komplex

Mykobakterien-Spezies	Insertionselement*		
	IS 901	IS 900	IS 1245
MAP	-	+	-
<i>M. hominissuis</i>	-	-	+
<i>M. silvaticum</i>	+	-	+
<i>M. avium</i>	+	-	+

* + Insertionselement vorhanden, - Insertionselement nicht vorhanden

4.3.2 Real-time PCR

Zur Speziesdifferenzierung der Mykobakterien aus dem MTC-Komplex wurden Primer verwendet, die bereits in der Literatur beschrieben wurden (PINSKY und BANAEI, 2008). Die Primerpaare (Tabelle 17) waren gegen die sogenannten `Regions of Difference` (RD) gerichtet. Die Bezeichnung RD9- und RD4-present bedeutet, dass die RD-Sequenz in der zu untersuchenden Spezies vorhanden ist. RD4-deleted bedeutet hingegen, dass das Primerpaar in eine Region der RD4 gelegt

ist die nur bei *M. bovis* und *M. bovis BCG* zu finden ist. Die Auswertung der Real-time-PCR-Ergebnisse erfolgte anhand von Schmelztemperaturkurven.

Tabelle 17: Primer für den Nachweis von Mykobakterien aus dem MTC-Komplex (aus PINSKY und BANAEI, 2008)

Primerbezeichnung	Zielsequenz/ Amplifikat- größe (Bp)	Primersequenzen
RD9_present*	RD9/ 51 Bp	F: 5-TTT CGA GCC GTA AAT TAC TGT G-3 R: 5- GAG CAT TCT CGC TCC GAA T-3
RD4_deleted	RD4/ 94 Bp	F :5- AGA AGC GCA ACA CTC TTG GA-3 R: 5- TTG CTG AAA AAT GGC TAT TGA-3
RD4_present	RD4/ 55 Bp	F : 5- AGA AGC GCA ACA CTC TTG GA-3 R: 5- CAT GCG CCC TAT TTG ATC TC-3

* für die Pyrosequenzierung war der Forward-Primer biotinyliert

a) Pipettierprotokoll

Der Mastermix (Absolute SYBR Green ROX Mix, Thermo Fisher Scientific, UK) und die Primer wurden in einem separaten PCR-Vorbereitungsraum, in dem ebenso die Primergebrauchslösungen hergestellt wurden, zunächst aufgetaut und anschließend auf Eis gelagert. Die Primer und der Mastermix wurden in eine 96 Well-Platte pipettiert und anschließend in einen anderen Raum gebracht, in dem unter einer Werkbank die zu untersuchende DNA und die Negativkontrolle hinzu pipettiert wurde. Die Positivkontrolle wurde wiederum in einem separaten Raum dazugegeben. In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Reagenzien für einen 25 µl Ansatz aufgelistet.

Tabelle 18: Pipettierprotokoll für eine Real-time PCR (25 µl Ansatz)

Reagenzien	Eingesetzte Menge
RNAse freies Wasser	8,0 µl (RD4); 4,25 µl (RD9)
Absolute SYBR Green ROX Mix	12,5 µl
Primermix (0,2 µM [RD4], 0,5 µM [RD9])	2,5 µl (RD4); 6,25 µl (RD9)
DNA (100 ng/µl)	2,0 µl
Gesamtvolumen	25 µl

b) Thermocyclerprogramm

Die PCR-Bedingungen für die einzelnen Primerpaare waren identisch (Tabelle 19).

Tabelle 19: PCR-Bedingungen für die Real-time PCR

Schritt	Temperatur(°C)	Zeit	Funktion	Anzahl
1	95	15 min	Aktivierung der Taq-Polymerase	1 x
2	95	15 s	Denaturierung	40 x
3	62	30 s	Annealing	
4	72	30 s	Extension	
5	95	15 s		1 x Dissoziation
6	60	1 min		
7	95	15 s		
8	60	15 s		

c) Optimierung der Primerkonzentrationen

Um die optimalen Primerkonzentrationen für den Nachweis von Spezies des MTC-Komplexes mittels Real Time PCR zu finden, wurden Primerkonzentrationen von 0,1 bis 0,6 µM (Endkonzentration im PCR-Ansatz) getestet.

d) *Auswertung der Real-time PCR*

Proben mit Fluoreszenzwerten unterhalb des Schwellenwertes (*threshold*) wurden als negativ bewertet. Ebenfalls als negativ gewertet wurden Proben, deren Fluoreszenzwerte zwar den *threshold* überschritten nicht aber die erwartete Schmelztemperatur aufwiesen. Der *threshold* wurde wie in Kap. 2.5.3 beschrieben Computer gestützt ermittelt. Nur Proben deren Fluoreszenzsignale den *threshold* überschritten und deren Amplifikate die erwartete Schmelztemperatur hatten, wurden als positiv beurteilt. Die Negativkontrollen mussten stets negativ sein.

4.3.2.1 Spezifität

Die Spezifität aller in der Tabelle 17 aufgeführten Primerpaare wurde mit den in der Tabelle 13 gelisteten Kontrollstämmen getestet.

4.3.2.2 Analytische Sensitivität

Die Ermittlung der analytischen Nachweisgrenze der PCR-Systeme wurde mittels Verdünnungsreihen der einzelnen Mykobakterienspezies durchgeführt.

Alle Ansätze wurden mit 10, 1 und 0,1 Molekülen Mykobakterien-DNA/ μ l 10mal wiederholt und mit den Ergebnissen eine Probit-Analyse durchgeführt.

4.3.2.3 Optimierung der Annealingtemperaturen

Um Unspezifitäten während der PCR aufgrund zu niedriger Annealingtemperaturen oder Sensitivitätsverluste durch zu hohe Annealingtemperaturen zu vermeiden wurden für alle PCR-Systeme die Annealingtemperaturen optimiert. Dies erfolgte in einem Gradienten-Cycler (T-Gradient, Fa. Whatman Biometra, Göttingen), der es ermöglicht unterschiedliche Temperaturen innerhalb des Thermoblockes einzustellen. Dadurch kann die optimale Annealingtemperatur eines Primerpaares in einem Durchgang ermittelt werden.

4.3.2.4 Bestimmung der mittleren Schmelztemperatur der PCR-Amplifikate

Zur Bestimmung der mittleren Schmelztemperatur wurden zwischen 18 und 27 Positivkontrollen der jeweiligen PCR-Systeme in einer 96-well-Platte amplifiziert und anhand der Dissoziationskurven die Schmelztemperatur bestimmt. Alle Werte, die innerhalb einer Abweichung von drei Standardabweichungen von der mittleren Schmelztemperatur lagen, wurden als positiv bewertet. Werte außerhalb dieses Intervalls wurden als unspezifische Amplifikate interpretiert.

4.3.2.5 Ermittlung der Quantifizierungsgrenze

Um eine Aussage über die in der PCR nachgewiesene DNA-Menge treffen zu können, wurden in Dreifach-Ansätzen für die einzelnen Primerpaare Mykobakterien-DNA in Konzentrationen von 1×10^5 bis 1×10^2 Molekülen in die PCR eingesetzt. Anschließend wurde der Mittelwert aus den Zyklen ermittelt, bei denen der *threshold* überschritten wurde.

Die Effektivität der Real-time PCR wurde anhand der Formel $E (= \text{Effektivität in } \%) = (-1 + 10^{-1/m}) \cdot 100$ bestimmt, wobei m die Steigung darstellt. Bei einer Effektivität von 100% ist eine Verdopplung der Genomkopien pro PCR-Zyklus zu erwarten.

Aus den in Tabelle 24 (Kapitel 5.3.4) ermittelten Daten (Achsenabschnitt und Steigung) und aus den von der Real-time PCR resultierenden Ergebnissen der Einzelproben wurden mit Hilfe der Standardgeraden ($y = m \cdot x + b$) die Zahl der Genomkopien pro PCR-Ansatz ermittelt. Für die Umrechnung auf ein Gramm Gewebe mussten zudem nachfolgende Faktoren eingerechnet werden. Die Erreger-DNA wurde aus 25 mg Gewebe isoliert und von dem Eluat (100 μ l) wurden 2,5 μ l in die PCR eingesetzt. Desweiteren wurde der individuelle Verdünnungsfaktor der photometrisch gemessenen DNA-Konzentrationen mit in die Umrechnung einbezogen.

4.3.2.6 Optimierung der eingesetzten DNA-Menge

Um eine Steigerung der Nachweiswahrscheinlichkeit zu erhalten, wurde die eingesetzte DNA-Menge pro PCR-Ansatz optimiert. Dazu wurden Probenelutionslösungen, die mit 100 ng/µl eingesetzter DNA positiv getestet wurden, auf 500-150 ng/µl DNA in 50 ng Schritten eingestellt. Die PCR wurde bei den entsprechend eingestellten DNA-Konzentrationen wiederholt.

4.3.3 Nachweis von *M. bovis*, *M. tuberculosis* und von *M. africanum*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. microti* mittels Real-time PCR

Für den Nachweis ausgewählter Mykobakterien aus dem MTC wurden Primer ausgewählt, die gegen die `Regions of difference` RD9 und RD4 (PINSKY und BANAEL, 2008) gerichtet waren. Die PCR wurde auf folgender Grundlage beurteilt (Abbildung 4).

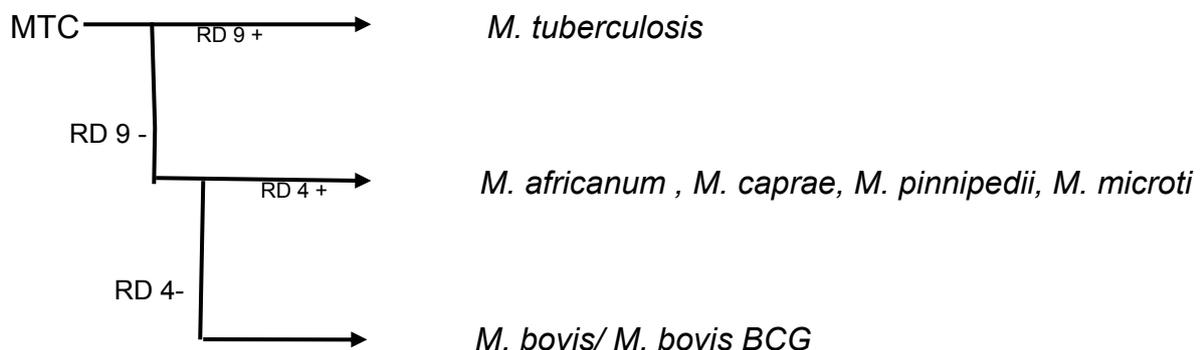


Abbildung 4: Schema zur Differenzierung von Spezies aus dem MTC-Komplex anhand der RD4- und RD9-Sequenzen (+ RD vorhanden; - RD nicht vorhanden); modifiziert nach PINSKY und BANAEL, 2008

4.4 Kulturelle Anzucht

An das Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde in Gießen wurden 18 Lymphknotenproben, die zuvor mittels PCR positiv auf die IS1311 getestet wurden, zur Anzucht von Mykobakterien übergeben. Zur kulturellen Anzucht wurden vornehmlich Proben ausgewählt, die in der vorherigen PCR starke Banden aufwiesen. Die Probenaufbereitung für die kulturelle Anzucht erfolgte nach einem im Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Gießen etablierten und validierten Arbeitsprotokoll und wurde von dem dortigen Personal durchgeführt.

Es wurden je 50 mg von zerkleinerten Lymphknoten für die kulturelle Anzucht (HEYM- und MGIT- Nährmedium) in sterile 15 ml Falcon-Gefäße eingewogen. Die Probe wurde nun im Falcon-Röhrchen mit 0,5 ml steriler NaCl suspendiert und 0,5 ml NALC-NaOH hinzu gegeben. Es wurde gründlich gevortext. Im nächsten Schritt wurde 20 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml steriler Phosphatpufferlösung. Nicht zerkleinerte Gewebeteile wurden mit einer Pasteurpipette in einen mit etwas sterilem Sand befüllten Mörser überführt. Die Gewebeteile wurden mit einem sterilen Pistel zerkleinert, ehe der Mörserinhalt mit einer Pasteurpipette wieder in die Falcon-Röhrchen zurück gegeben wurde. Es folgte eine Zentrifugation der Röhrchen bei 10.000 x g für 10 min. Der Überstand wurde nun verworfen. Das Sediment wurde für MGIT-Medien mit 500 µl, für HEYM-Medien mit 300 µl NaCl resuspendiert. Die beimpften Nährmedien wurden 12 Wochen lang bei 37°C bebrütet. Die MGIT-Nährmedien wurden mehrere Male in der Woche auf Fluoreszenz überprüft. Bei positivem Befund wurde auf einem HEYM-Nährmedium subkultiviert und weitere 12 Wochen bebrütet. Die Bestätigung der kulturellen Ergebnisse erfolgte abschließend durch den Einsatz der in dieser Dissertation verwendeten speziesspezifischen Primer.

4.5 Sequenzierungsarbeiten

Für Amplifikate mit einer Größe über 60 Bp wurde die Sequenzierung nach Sanger und für Amplifikate unter 60 Bp das Pyrosequencing™ eingesetzt.

4.5.1 DNA-Sequenzierung (nach Sanger)

Um die Nukleinsäuresequenz verschiedener Amplifikate zu erhalten, wurden diese zu GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) geschickt. Dazu mussten die PCR-Produkte zunächst reamplifiziert werden. Anschließend wurden diese aufgereinigt, indem zu 26 µl PCR-Produkt 4 µl ExoSAP-IT® (USB Corporation, Cleveland, USA) gegeben wurde. ExoSAP-IT® beinhaltet die zwei hydrolytischen Enzyme Exonuklease 1 und Alkalische Phosphatase, die überschüssige Primer abbauen und Nukleotide dephosphorylieren. Anschließend erfolgte die Inkubation in einem vorgeheizten Thermocycler (Whatman Biometra, Göttingen) für 15 min bei 37 °C,

ehe die Enzyme letztendlich bei 80°C 15 min lang inaktiviert wurden. Die derart präparierten Amplifikate wurden anschließend mit 30 µl der jeweiligen 10 µM Primer-Gebrauchslösungen zu GATC Biotech AG geschickt.

4.5.2 Pyrosequencing™

Diese DNA-Sequenzierungstechnik wurde am Royal Institute of Technology (Stockholm) entwickelt, um kurze DNA-Abschnitte zu sequenzieren (GLÄSER, 2001). Bei diesem Verfahren wird während des Strangaufbaus Pyrophosphat freigesetzt, welches in einer Kaskade enzymatischer Reaktionen in Licht umgewandelt und in einem Pyrogramm™ als Peak erkennbar wird. Die Höhe der Peaks ist proportional zu der Menge der eingebauten Nukleotide. Anhand der Peaks des Pyrogramms™ lässt sich somit die Sequenz des DNA-Abschnittes ableiten.

Zunächst wird das PCR-Produkt in ein einzelsträngiges Template überführt, an dem ein Sequenzierungsprimer gebunden wird (GLÄSER, 2001). Unter Zugabe eines Substrat-Enzymgemischs, bestehend aus der DNA-Polymerase, Apyrase, Sulfurylase und Luciferase, wird das an den Sequenzierungsprimer gebundene Template im PyroMark™ ID (QIAGEN, Hilden) sequenziert. Nacheinander werden die vier verschiedenen Nukleotide zu dem Template dispensiert. Ist ein Nukleotid komplementär zu dem Nukleotid der Matrize, wird dieses von der DNA-Polymerase eingebaut. Der Einbau des Nukleotids setzt Pyrophosphat (PPi) frei. Dieses wird mit Hilfe von ADP und der ATP-Sulfurylase zu ATP umgebaut. Die Luciferase katalysiert in Anwesenheit von ATP die Reaktion von Luciferin zu Oxiluciferin. Das dabei emittierte Licht wird aufgezeichnet und in dem Pyrogramm als Peak erfasst. Unverbrauchte Nukleotide werden von der Apyrase abgebaut. Diese Schritte werden solange wiederholt, bis die vorgegebene *dispensation order* abgearbeitet wurde.

4.5.2.1 Aufbereitung der PCR-Amplifikate für die Pyrosequenzierung

Zunächst wurden die zu sequenzierenden PCR-Produkte um den Faktor 100 verdünnt und in einem 30 µl Ansatz mit dem jeweiligen biotinylierten Primer bei den entsprechenden Thermocyclereinstellungen reamplifiziert. Die Stärke der Bande wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

Für die Pyrosequenzierung wurde der Rest des PCR-Ansatzes (etwa 26 µl) mit RNase-freiem Wasser auf 40 µl aufgefüllt und in eine 96-*well*-PCR-Platte pipettiert. Nun wurden 40 µl einer Streptavidin-Sepharose™-Suspension (Amersham, Biosciences, Sweden) hinzugegeben und anschließend die PCR-Platte für 5 min bei Raumtemperatur auf einem magnetischen Schüttler (Variomag® Monoshaker, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) inkubiert. Dadurch wurden die doppelsträngigen, biotinylierten PCR-Amplifikate an die Streptavidinbeads gebunden. Die Streptavidin-Beads mit den an sie gebundenen PCR-Amplifikaten wurden mittels Vakuum Prep tool (PyroMark™ Q96 Vacuum Prep Workstation, QIAGEN, Hilden) aufgenommen, in Ethanol (70%) für 5 s gewaschen, in 0,2 M NaOH denaturiert (5 s) und im letzten Schritt mit 10 mM Tris-Acetat-Puffer (5 sec) gewaschen. Die Beads mit den gebundenen DNA-Einzelsträngen wurden danach in eine mit 40 µl Sequenzierungsprimer befüllte PSQ™ 96-Platte entlassen. Die PSQ™ 96-Platte wurde im Anschluss für 2 min bei 80°C in einem Brutschrank (Memmert, Schwabach) inkubiert. Dies führte zur Bindung des Sequenzierungsprimers an die einzelsträngige, biotinylierte DNA-Matrize. Nach dem Abkühlen wurde die PSQ™96-Platte in das Pyromark ID-Gerät eingesetzt.

Die PSQ™ 96 Reagenzien-Kartusche wurde mit den Nukleotiden (dATPαS, dCTP, dGTP, dTTP), dem Enzym-Mix und dem Substrat befüllt. Nach dem Einsetzen der Kartusche in den Pyromark ID wurde die Sequenzierung über den Rechner gestartet. Im ersten Schritt werden durch Luftdruck automatisch 5,5 µl Enzym- und Substratlösung aus der Kartusche in die definierten *wells* der PSQ™96-Platte überführt. Anschließend werden nach der vorgegebenen *dispensation order* 0,22 µl der einzelnen Nukleotide in die *wells* eingespritzt. Der Fortschritt der Sequenzierung konnte anhand des Pyrogramms am Bildschirm verfolgt werden.

4.5.3 Überprüfung der Nukleinsäuresequenzen

Die ermittelten Sequenzen wurden mit allen in der DNA-Datenbank eingestellten Sequenzen mit Hilfe des `Basic Local Alignment Search Tools` (BLAST) verglichen.

4.6 Verwendete Internetdatenbanken

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Biological Abstracts*

BIOSIS Previews*

CAB Abstracts*

Medline*

National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Web of Science*

Zoological Record*

* Zugang über:

<http://rzblx10.uni->

regensburg.de/dbinfo/dbliste.php?bib_id=ubgie&colors=31&ocolors=40&lett=c&collid=VM

4.7 Statistische Auswertung

Alle ermittelten Daten wurden mit dem Programmpaket SPSS® Version 15 (IBM Company, Chicago) berechnet. Median, Mittelwert, Korrelation, Standardabweichung und Prävalenz sowie das theoretische Soll-Gewicht wurde mit „Descriptives“ und „Frequencies“ bestimmt. Die analytische Sensitivität und Nachweisgrenzen der einzelnen Primer wurden mit Hilfe der Probit-Analyse berechnet. Häufigkeitsunterschiede, auch unter Berücksichtigung von Geschlechts- und Altersgruppen sowie anderer, nominal oder ordinal verteilter Effekte, wurden mittels Chiquadrat-Test auf Signifikanz untersucht. Eine Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Tierkollektiv

Insgesamt gingen 428 Wildschweine aus 13 Bundesländern und 33 Revieren in die Untersuchung ein.

Nach den Ergebnissen der Zahnaltersschätzungen, die für insgesamt 425 Wildschweine vorliegen, waren die erlegten Tiere zwischen weniger als 3 und über 24 Monate alt. Zirka 68% der untersuchten Wildschweine waren unter einem Jahr alt. Der Anteil an Überläufern belief sich auf 22%, der der adulten Tiere (ab 24 Monate) auf 10%.

Die geschätzten beziehungsweise bestimmten Körpergewichte schwankten absolut zwischen 4,5 und 105 kg. Das Durchschnittsgewicht betrug 33,4 kg. Die untersuchten Tiere wichen um $0 \pm 18,5$ kg vom theoretischen Soll-Gewicht ab.

Das Geschlecht wurde bei 421 Tieren ermittelt. 55,2 % (n=234) der Wildschweine waren weiblichen Geschlechts, 44,8% (n=187) waren männlich.

Im Rahmen der Felduntersuchungen wurden die Wildschweine und deren Organe an den Jagdstreckenplätzen auf für Mykobakterien charakteristische granulomatöse Entzündungen untersucht. Bei vier Tieren wurden vergrößerte Mandibularlymphknoten vorgefunden. Bei diesen lag eine eitrig-abszedierende Entzündung vor. Bei der Präparation der Ileoazakallymphknoten für die DNA-Extraktion wurden in zehn Lymphknoten etwa 1 mm große, weiß-gelbliche Veränderungen von fester bis krümeliger Konsistenz vorgefunden. Dabei handelte es sich um kalzifizierte Granulome.

5.2 Auswahl der Primer für die konventionelle PCR

Von allen in Tabelle 11 und Tabelle 12 (Kap. 4.3.1, Material und Methoden) aufgeführten Primerpaaren wurde nach Optimierung der PCR-Bedingungen die Spezifität und Sensitivität überprüft (Tabelle 20).

Alle optimierten Annealingtemperaturen für die Primerpaare lagen über 62°C. Für das Primerpaar MA konnte eine Zweistufen-PCR durch Zusammenlegen des Annealing- und Extensionschrittes durchgeführt werden.

Mit den Primerpaaren TB und MAC II konnte keine Amplifikation der Ziel-DNA erreicht werden. Ansonsten lag die Sensitivität der etablierten PCR-Systeme zwischen 1×10^{-1} und 1×10^3 DNA-Kopien/PCR-Ansatz (Abbildung 5).

Einige Primerpaare waren nicht spezifisch für die angegebene Spezies. So reagierte das vermeintlich MTC-spezifische Primerpaar Rv0577 unspezifisch mit *M. avium* und MAP und die Primerpaare IS1311 und MA unspezifisch mit Erreger-DNA des MTC-Komplexes. Der MAC I Primer war sehr sensitiv, reagierte aber vermutlich mit Schweine-DNA, da nahezu 100% der Proben positiv getestet wurden.

Tabelle 20: Optimale Annealingtemperatur, Spezifität und Sensitivität der eingesetzten Primerpaare

Bezeichnung Primerpaar	Spezifisch für	Optimale Annealingtemperatur (°C)	Kommentar	Sensitivität (Anzahl DNA-Kopien/PCR-Ansatz)
MAC I	MAC	65	reagiert vermutlich mit WildschweindNA (nahezu 100% positiv)	1×10^{-1}
MAC II	MAC	60	Kein Amplifikat sichtbar	
IS1311	MAC, M.i. ¹ , M.s. ² , M.m. ³	57-59 ⁴	Erkennt MTC	1×10^2
MA	MAC, M.i., M.s., M.m.	68	Annealing und Extension bei 68°C, erkennt MTC	1×10^1
IS901	<i>M. avium</i>	65		1×10^0
IS901-R ₂	<i>M. avium</i>	65		1×10^0
IS1245(long)	<i>M. avium</i> <i>M. silvaticum</i> <i>M. hominissuis</i>	61-65 ⁴		1×10^2
IS1245(short)	<i>M. avium</i> <i>M. silvaticum</i> <i>M. hominissuis</i>	64		1×10^0
TJ1-TJ4	MAP	62		1×10^0
F ₂ -R ₂	MTC	65		1×10^0
1081	MTC	62-65 ⁴		1×10^0
TB	MTC	60	Kein Amplifikat sichtbar	
Rv0577	MTC	65	Reagiert unspezifisch mit MAP und <i>M. avium</i>	-
MB	MTC	65		1×10^3

¹M.i. = *M. intracellulare*; ²M.s. = *M. scrofulaceum*; ³M.m. = *M. malmoense*

⁴in diesem Temperaturbereich war kein Unterschied in der Sensitivität zu erkennen

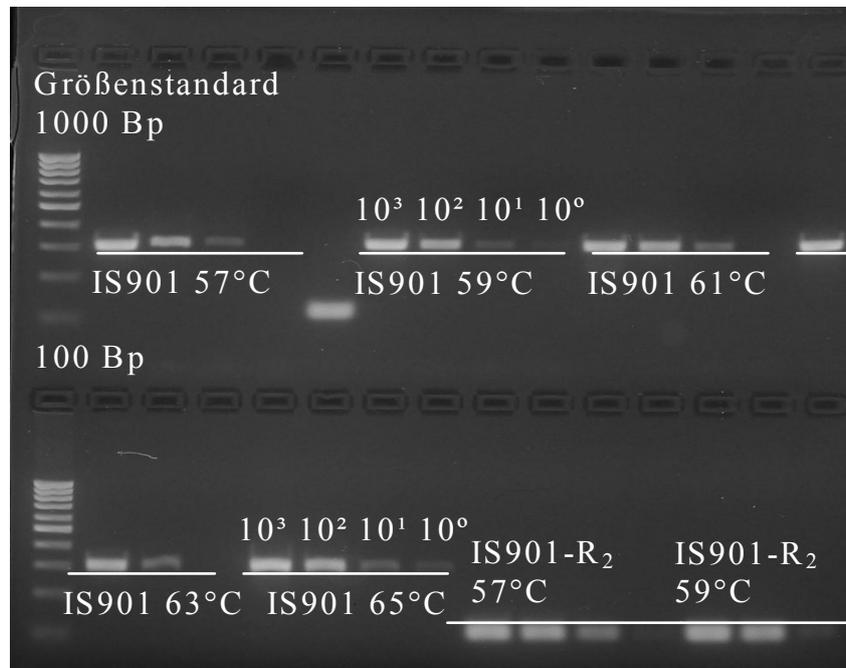


Abbildung 5: Sensitivitätsbestimmung der Primerpaare IS901 und IS901-R₂ bei verschiedenen Annealingtemperaturen

Um das Vorkommen von Erregern des MAC-Komplexes in den Lymphknoten der Wildschweine zu untersuchen, wurden die Primerpaare MA, IS901, TJ 1 bis 4 und IS1245 (short) eingesetzt. Die Nachweisgrenze dieser Primerpaare wurde wie in Kapitel 4.3.1.2 beschrieben, bestimmt. In der Tabelle 21 sind die mittels Probit-Analyse errechneten Primersensitivitäten und die damit verbundenen Nachweisraten der verschiedenen Mykobakterien pro Gramm Lymphknotengewebe dargestellt.

Für den Nachweis des MTC-Komplexes wurde das Primerpaar F₂-R₂ eingesetzt (Tabelle 21).

Tabelle 21: Analytische Nachweisgrenze der einzelnen Primer für konventionelle PCR

Primerbezeichnung	Anzahl der Genomkopien/ PCR-Ansatz (95%*)	Anzahl der Insertionssequenzen im Bakteriengenom	Anzahl der Bakteriengenom-äquivalente/ pro Gramm Gewebe
MA	1,56	2-10	$1,5 \times 10^4 - 3,1 \times 10^3$
IS901	2,76	7-11	$7,9 \times 10^4 - 5 \times 10^3$
TJ 1-4	2,3	17	$2,7 \times 10^3$
IS1245 (short)	18,65	mindestens 20	$1,9 \times 10^4$
F ₂ -R ₂	0,62	5-7	$2,5 \times 10^3 - 1,8 \times 10^3$

* bei einer Nachweiswahrscheinlichkeit von 95%

5.3 Speziesdifferenzierung innerhalb des MTC-Komplexes mit der Real-Time PCR

5.3.1 Optimierung der Primerkonzentrationen

Das RD9-present Primerpaar erzielte bei einer Endkonzentration von 0,5 µM die höchsten Fluoreszenzsignale. Für die Primerpaare RD4-present und RD4-deleted lag die optimale Konzentration im PCR-Ansatz bei 0,2 µM.

5.3.2 Spezifität und analytische Sensitivität

Die Primer RD9 present, RD4 present und RD4 deleted zeigten sich als spezifisch für Mykobakterien des MTC-Komplexes. Die größte Sensitivität wurde bei einer Annealingtemperatur von 62 °C erreicht. Die analytische Nachweisgrenze ist in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Analytische Nachweisgrenze der einzelnen Primer für die Real-Time PCR

Primerbezeichnung	Anzahl der Genomkopien/ PCR-Ansatz (95%*)	Anzahl der RD's im Bakteriengenom	Anzahl der Bakteriengenom-äquivalente/ pro Gramm Gewebe
RD9-present	24,6	1	4,9x10 ⁵
RD4-present	11,06	1	2,2x10 ⁵
RD4-deleted	11,67	1	2,3x10 ⁵

* bei einer Nachweiswahrscheinlichkeit von 95%

5.3.3 Bestimmung der mittleren Schmelztemperatur der Amplifikate

Die Real Time PCR-Amplifikate wurden anhand ihrer Schmelztemperatur identifiziert. Dabei erwiesen sich Amplifikate als spezifisch, die im Bereich von drei Standardabweichungen von der mittleren Schmelztemperatur lagen (Tabelle 23).

Tabelle 23: Schmelztemperaturen der RD-Primer

	RD9 present n = 18	RD4 present n = 26	RD4 deleted n = 27
T_m Mittelwert	79,7 °C	79,9 °C	85,5 °C
Standardabweichung	± 0,42	± 0,5	± 0,5
3fache Standardabweichung	± 1,26	± 1,5	± 1,5
Ergebnis positiv im Temperaturbereich	78,4-81 °C	78,4-81,4 °C	84-87 °C

5.3.4 Bestimmung der Quantifizierungsgrenze

Zur Quantifizierung der Erreger wurde eine dekadische Verdünnungsreihe (10² bis 10⁵ Erreger pro PCR-Ansatz) mit genomischer DNA der Referenzstämme *M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. microti* durchgeführt (Abbildung 6 bis Abbildung 8) und anhand der daraus erstellten Standardkurven die Erregerkonzentration in den Proben ermittelt.

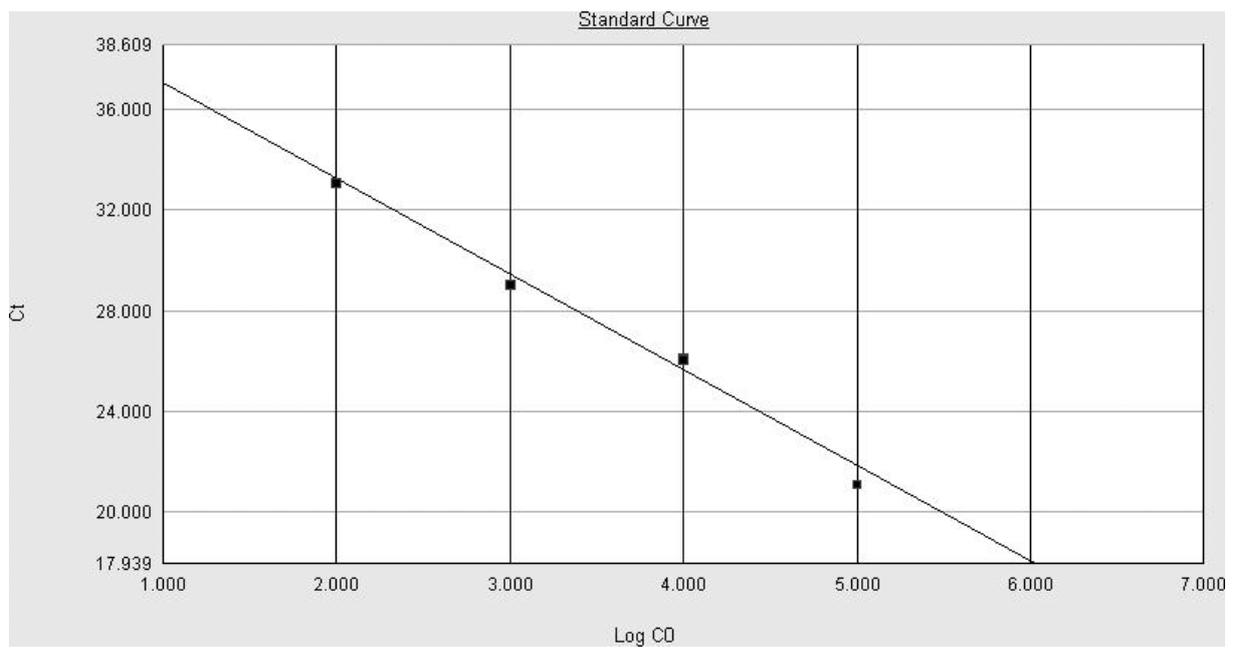


Abbildung 6: Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des *M. tuberculosis* Stammes

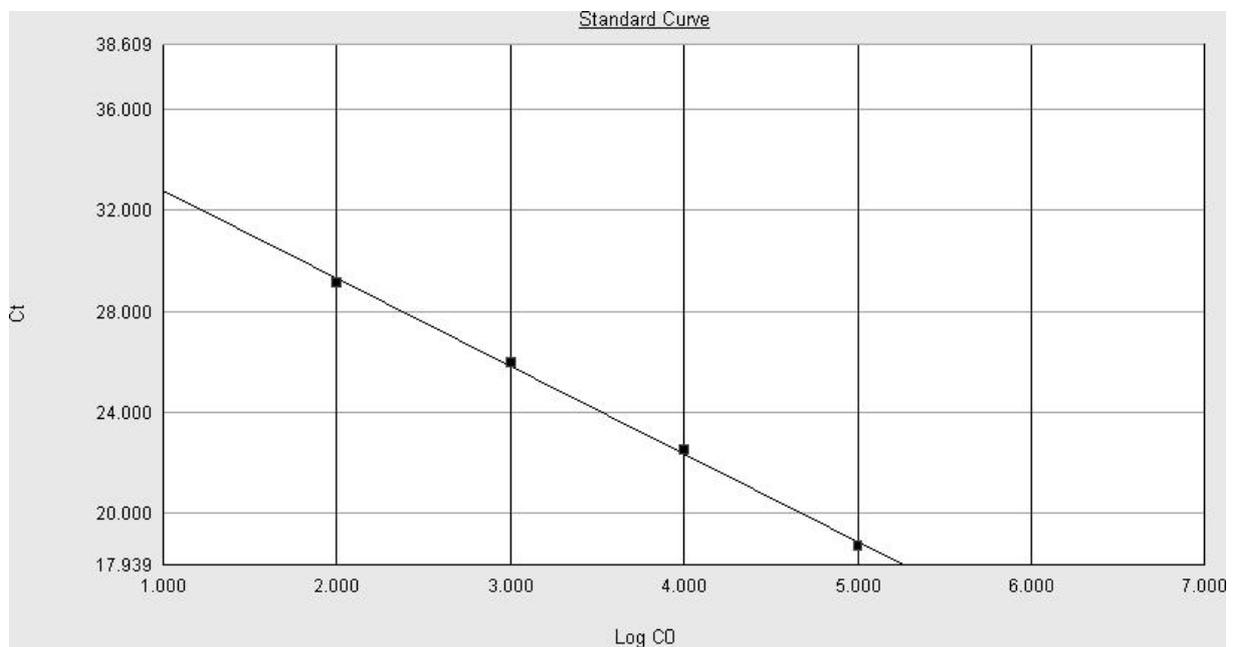


Abbildung 7: Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des *M. microti* Stammes

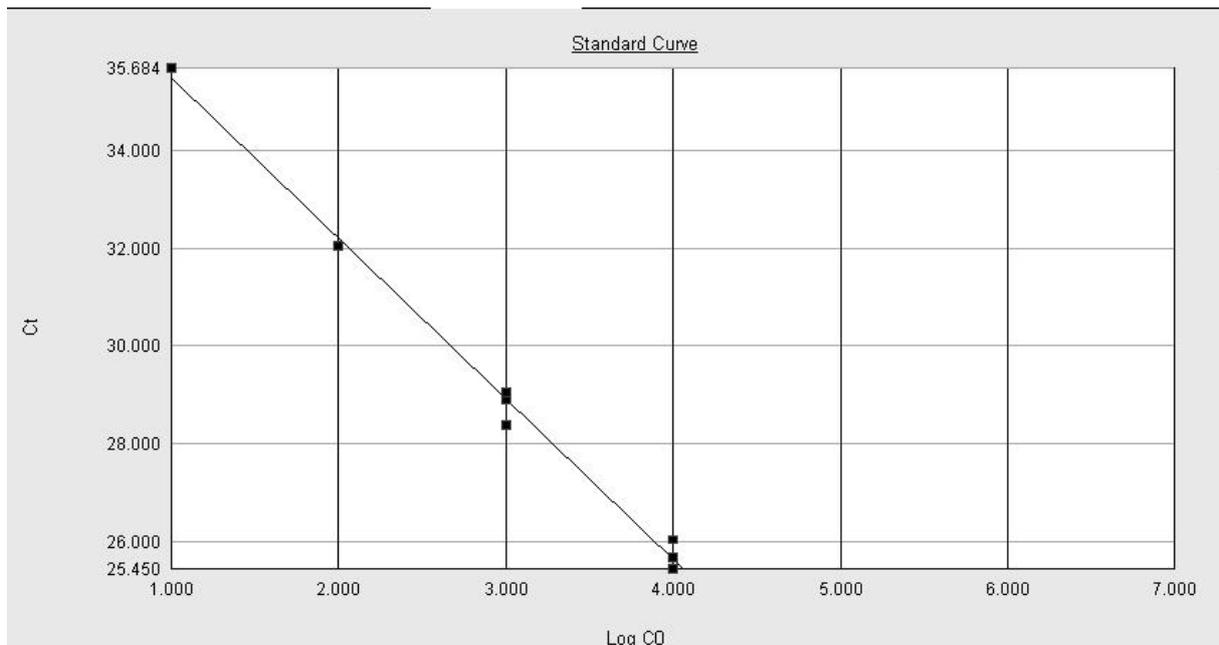


Abbildung 8: Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des *M. bovis* Stammes

Das Bestimmtheitsmaß lag bei allen Regressionsgeraden über 0,98 und die Steigung der Geraden bei Werten von -3,8 bis -3,23 (Tabelle 24). Dies entspricht eine PCR-Effizienz von 83% bis 104%.

Tabelle 24: Angaben zu den bei der Bestimmung der Quantifizierungsgrenze erhaltenen Ergebnissen

Parameter	RD9 present	RD4 present	RD4 deleted
Bestimmtheitsmaß	> 0,98	> 0,99	> 0,99
Steigung/Effizienz	- 3,8/83%	- 3,48/94%	- 3,23/104%
Achsenabschnitt	40,85	36,25	38,74

5.3.5 Optimierung der eingesetzten DNA-Menge

Zur Ermittlung der maximal pro PCR-Ansatz einsetzbaren DNA-Menge wurden *M. tuberculosis*-positive Mesenteriallymphknoten von Wildschweinen mit der Real-Time PCR untersucht. Dazu wurden in Dreifachansätzen verschiedene DNA-Mengen in die Real-Time PCR eingesetzt (Tabelle 25) mit dem Ergebnis, dass die maximal in die PCR einsetzbare DNA-Menge bei 200 ng lag.

Tabelle 25: Einsatz verschiedener DNA-Mengen in die Real Time PCR

<i>M. tuberculosis</i> positive Lymphknoten	RD9 present Primer					
	1. Ansatz		2. Ansatz		3. Ansatz	
Eingesetzte DNA in ng	Ct	Tm ¹ (°C)	Ct	Tm (°C)	Ct	Tm (°C)
200	35,18	79,3	34,77	79,3	34,76	79,6
300	n.n. ²	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
500	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
600	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
700	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
800	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
1000	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

¹Tm = Schmelztemperatur; ²n.n. = nicht nachweisbar

5.4 Prävalenzen von MTC

Insgesamt wurden 428 Proben mittels PCR untersucht. Durch die Amplifikation der für MTC charakteristischen IS1081-Nukleotidsequenz entstand eine Bande von 135 Bp (Abbildung 9).

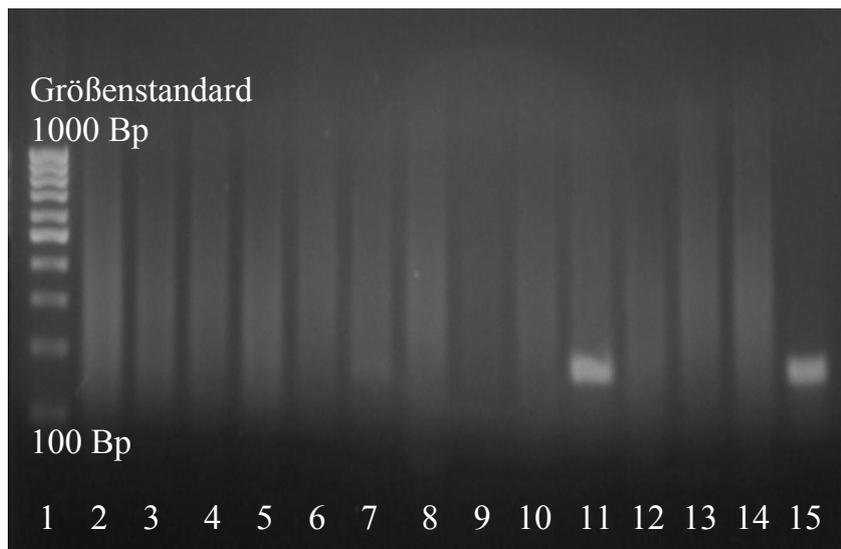


Abbildung 9: Typisches Bandenmuster der MTC-PCR. Spur 1: Größenstandard (100 Basenpaar-Leiter), Spur 2-10 und 12-14: negative Proben, Spur 11: positive Probe (# 129), Spur 15: Positivkontrolle

Bei den durchgeführten Untersuchungen waren 351 von 428 untersuchten Tieren (82%) MTC-negativ, 77 Tiere (18%) waren MTC-positiv. Bezogen auf die in den Bundesländern beprobten Reviere wurden 57,6% respektive 57,1% der untersuchten Wildschweine in Mecklenburg-Vorpommern (MV) und Nordrhein-Westfalen (NW) als MTC-positiv eingestuft. Im Vergleich dazu waren die Prävalenzen in den anderen elf untersuchten Bundesländern kleiner 20% (Abbildung 10). Miteinander vergleichbare Prävalenzen (12,5 bis 19,5%) wurden in den Bundesländern Baden-Württemberg (BW), Schleswig-Holstein (SH), Sachsen (SN), Brandenburg (BB), Niedersachsen (NS) und Rheinland-Pfalz (RP) vorgefunden. In Hessen (HE), Saarland (SL) und Thüringen (TH) wurden vergleichsweise wenig (2,3 bis 6,5%) MTC-positive Tiere nachgewiesen. Allein in Bayern (BY) und in Sachsen-Anhalt (ST) trat kein Fall einer MTC-Infektion auf. Die Prävalenzen waren in den einzelnen Bundesländern signifikant ($p=0,000$) verschieden.

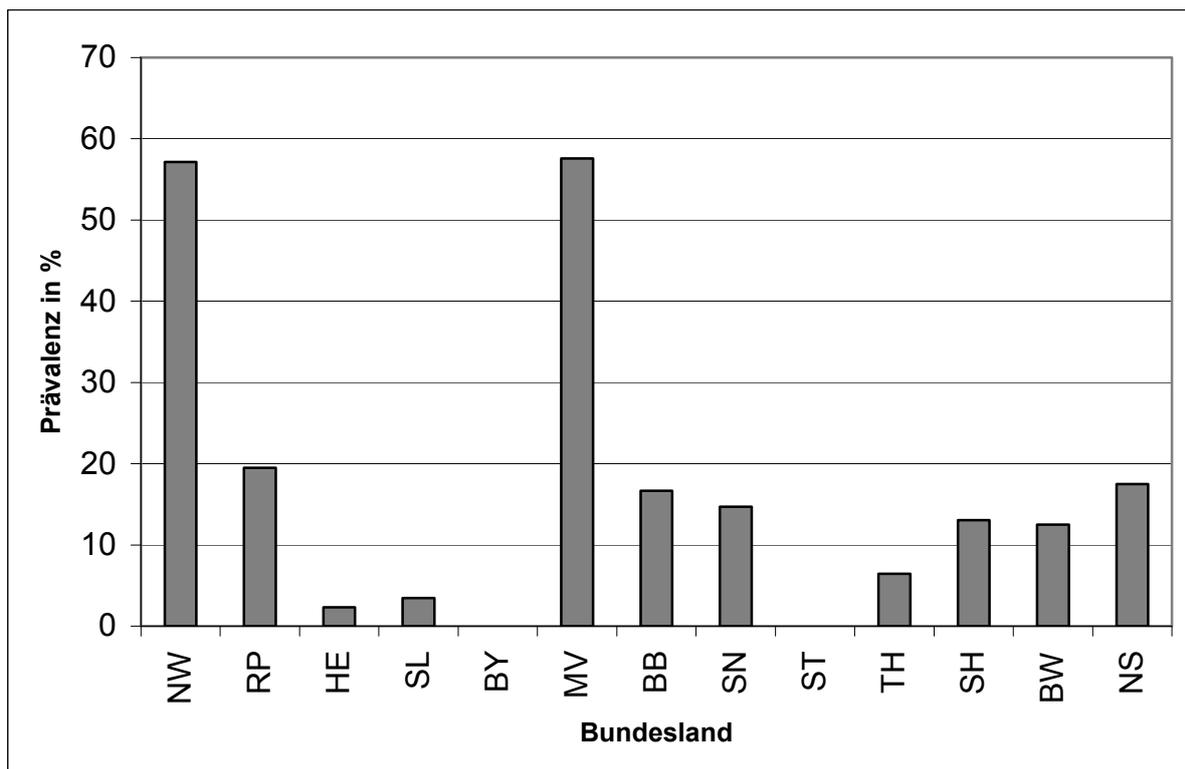


Abbildung 10: Bundesweit ermittelte Prävalenzen für MTC in der Jagdsaison 2008/2009

Abbildung 11 gibt die Prävalenzen der MTC-positiven Wildschweine in den untersuchten Revieren an. Das prozentuale Auftreten von MTC in den Revieren war signifikant ($p=0,000$) verschieden. Auffällig ist, dass in allen untersuchten Revieren Mecklenburg-Vorpommerns MTC-Prävalenzen von über 50% gefunden wurden.

Ähnlich hohe Prävalenzen wurden nur noch in Revier 12 in Nordrhein-Westfalen (57,1%), in Revier 21 in Niedersachsen (63,9%) und in Revier 11 in Sachsen (57,1%) festgestellt. In den Revieren 25 in Rheinland-Pfalz und 13 in Brandenburg betragen die Prävalenzen 40 beziehungsweise 38,5%. In den restlichen Revieren trat MTC bei 0 bis 15,4% der beprobten Wildschweine auf. In einer größeren Region entlang der hessisch/bayrisch/thüringischen Grenze waren die meisten Reviere MTC-negativ, nur zwei Reviere zeigten eine geringe Belastung mit Erregern aus dem MTC-Komplex.

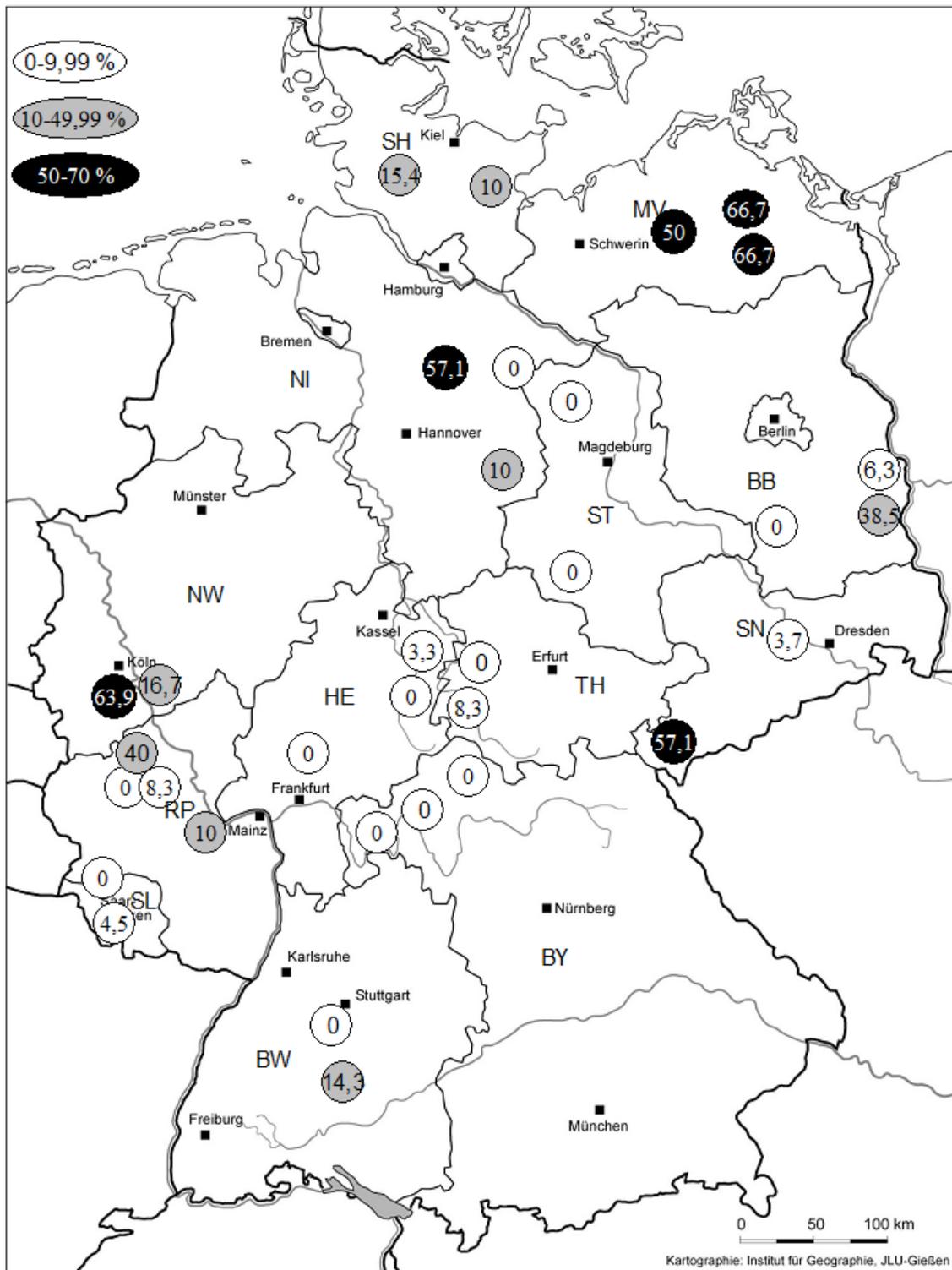


Abbildung 11: Prozentuales Vorkommen von MTC in den untersuchten Revieren

5.4.1 Zusammenhang zwischen MTC-Prävalenz und Alter

Der Anteil MTC-positiver Wildschweine verteilt sich gleichmäßig auf die verschiedenen Altersgruppen. Die MTC-Prävalenzen schwankten zwischen 10,3% bei den 22-24 Monate alten Tieren und 25% bei den 3-4 und den 15 Monate alten Tieren. Davon ausgenommen waren die Tiere unter drei Monaten, bei den kein MTC-positives Tier detektiert wurde (Tabelle 26). Der Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere und der MTC-Prävalenz war nicht signifikant.

Tabelle 26: Zusammenhang zwischen Zahnalter und MTC-Prävalenzen

Alter (in Monaten)	Tierzahl (n)	MTC-positiv (in %)	MTC-negativ (in %)
< 3	3	0	100
3-4	36	25	75
6-8	223	18,4	82,6
10-12	26	19,2	80,8
15	4	25	75
17-18	7	14,3	85,7
19-20	45	13,3	86,7
22-24	39	10,3	90,7
> 24	42	23,3	76,7

5.4.2 Zusammenhang zwischen Geschlecht und MTC- Prävalenzen

Der Unterschied in der geschlechtsabhängigen MTC-Prävalenz war statistisch nicht signifikant.

5.4.3 Zusammenhang zwischen Körpergewicht und MTC-Prävalenzen

Die Abweichung vom errechneten Soll-Gewicht zwischen den MTC-positiven und -negativen Tieren war nicht signifikant.

5.4.4 Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Granulomen und MTC-Prävalenzen

In allen zehn Fällen wurden die unter Kapitel 5.1 aufgeführten als kalzifizierte Granulome angesprochenen Veränderungen ausschließlich bei MTC-positiven Wildschweinen ($p= 0,000$) gefunden. Bezogen auf alle MTC-positiven Tiere (77 Tiere) wurden in 13% (10 Tiere) der Fälle Granulome nachgewiesen.

5.5 Prävalenzen von *M. tuberculosis*, *M. bovis/BCG* und *M. microti/africanum/pinnipedii/caprae*

Von den 77 MTC-positiven Wildschweinen konnten 22 Tiere (28,5%) Mykobakterienspezies des MTC-Komplexes zugeordnet werden. Auf Deutschland übertragen wurden insgesamt zwölf Tiere (2,8%) positiv auf *M. tuberculosis*, fünf Tiere (1,2%) positiv auf *M. bovis/BCG* und fünf Tiere (1,2%) positiv auf *M. microti/africanum/pinnipedii/caprae* getestet.

In Mecklenburg-Vorpommern und Baden-Württemberg waren 18,2 respektive 12,5% aller untersuchten Schweine PCR-positiv auf *M. tuberculosis*. Der prozentuale Anteil lag in den Bundesländern Sachsen, Schleswig-Holstein und Nordrhein-Westfalen zwischen 2,9 und 7,3%. In den übrigen Bundesländern wurde *M. tuberculosis* nicht nachgewiesen (Abbildung 12 und Abbildung 13).

M. bovis/BCG wurde in Thüringen, Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern in 3,2 bis 6,1% der untersuchten Wildschweine gefunden. In den restlichen Bundesländern wurde *M. bovis/BCG* nicht nachgewiesen. Bei einem einzigen Wildschwein konnte eine Simultaninfektion mit *M. bovis/BCG* und *M. tuberculosis* nachgewiesen werden (Abbildung 12 und Abbildung 13).

M. microti/africanum/pinnipedii/caprae konnte in 2,5 bis 5,3% der untersuchten Wildschweine in Niedersachsen, Sachsen, Saarland und Nordrhein-Westfalen detektiert werden. In den anderen Bundesländern gelang kein Nachweis (Abbildung 12 und Abbildung 13).

Die Korrelation zwischen dem Auftreten von Granulomen und der anschließenden Speziesdifferenzierung war nicht signifikant.

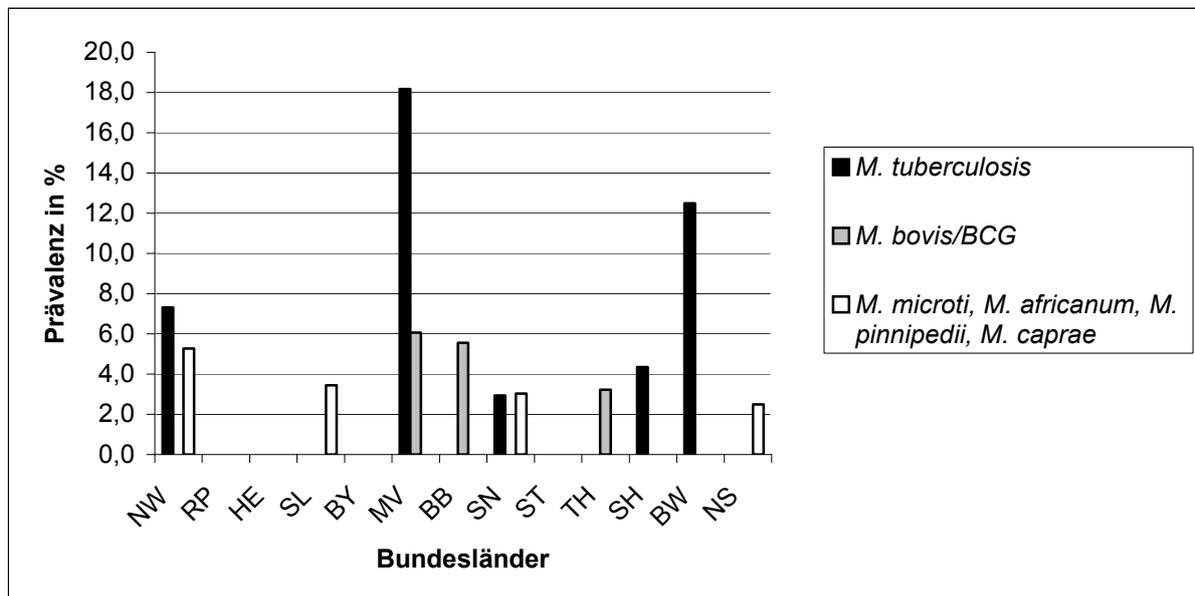


Abbildung 12: Nachweishäufigkeit von Mykobakterien des MTC in den einzelnen Bundesländern

Die Verteilung der verschiedenen Spezies des MTC-Komplexes auf die beprobten Reviere ist in Abbildung 13 dargestellt.

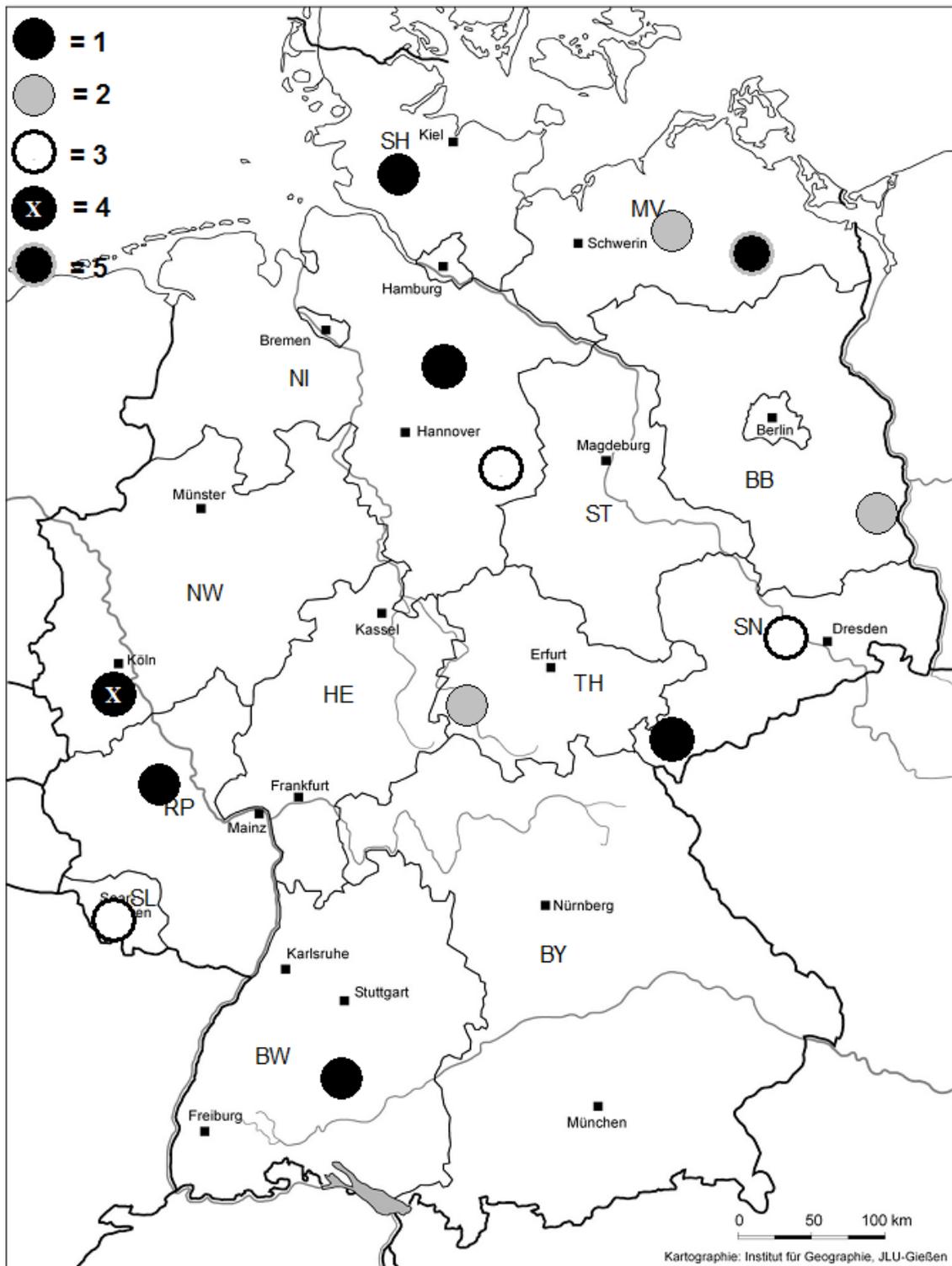


Abbildung 13: graphische Darstellung zum Auftreten von Mykobakterien des MTC in den entsprechenden Revieren. 1 = *M. tuberculosis*; 2 = *M. bovis/BCG*; 3 = *M. microti/africanum/pinnipedii/caprae*; 4 = simultaner Nachweis von 1 und 2 im jeweiligen Revier; 5 = simultaner Nachweis von 1 und 3 im jeweiligen Revier

5.5.1 Quantifizierung der Erregermengen

M. tuberculosis

Im Median wurden $3,6 \times 10^6$ Genomäquivalente pro Gramm Lymphknoten nachgewiesen. Minimal wurden $3,3 \times 10^5$ maximal $3,4 \times 10^7$ Genomkopien pro Gramm Gewebe gefunden.

M. bovis/BCG

Im Median wurden $3,6 \times 10^5$ Genomäquivalente pro Gramm Lymphknoten vorgefunden. Minimal wurden $1,2 \times 10^5$ maximal $7,2 \times 10^5$ Genomkopien pro Gramm Lymphknotengewebe detektiert.

M. microti/ africanum/ pinnipedii/ caprae

Im Median wurden $3,8 \times 10^4$ Genomäquivalente pro Gramm Lymphknoten nachgewiesen. Minimal wurden $5,4 \times 10^3$ maximal $1,5 \times 10^5$ Genomkopien pro Gramm Gewebe gefunden.

In Tabelle 27 ist die auf ein Gramm Lymphknoten umgerechnete Erregermenge angegeben.

Tabelle 27: Anzahl der nachgewiesenen Genomäquivalente der jeweiligen Mykobakterien-Spezies pro Gramm Gewebe

Spezies	Tiernummer	Genomkopien pro PCR-Ansatz	Verdünnungsfaktor	Bakteriengenom-äquivalente pro Gramm Gewebe
<i>M. tuberculosis</i>	72	199,5	11	$3,7 \times 10^6$
	74	199,5	11,5	$3,5 \times 10^6$
	78	1313,5	12	$2,5 \times 10^7$
	85	2132,8	10	$3,4 \times 10^7$
	86	226,6	7,5	$2,7 \times 10^6$
	97	22,7	9	$3,3 \times 10^5$
	129	167,4	7	$1,9 \times 10^6$
	162	199,5	12	$3,8 \times 10^6$
	177	139,6	13,5	$3,0 \times 10^6$
	188	91,3	8	$1,2 \times 10^6$
	262	148,3	17,5	$4,2 \times 10^6$
	341	56,2	7,5	$6,7 \times 10^6$
Median				$3,6 \times 10^6$
<i>M. bovis/BCG</i>	74	7,1	11	$1,2 \times 10^5$
	89	9,4	13	$2,0 \times 10^5$
	243	15,4	25	$6,2 \times 10^5$
	245	20,5	22	$7,2 \times 10^5$
	352	23,7	9,5	$3,6 \times 10^5$
Median				$3,6 \times 10^5$
<i>M. microti/africanum/pinnipedii/ca prae</i>	140	1,2	20	$3,8 \times 10^4$
	169	1,3	8	$1,7 \times 10^4$
	199	4,4	22	$1,5 \times 10^5$
	270	23,2	9,5	$3,5 \times 10^5$
	425	0,4	8,5	$5,4 \times 10^3$
Median				$3,8 \times 10^4$

5.5.2 Sequenzierung

Zur Bestätigung der Richtigkeit der Amplifikate aus der F₂-R₂-, RD9 present- und RD4 deleted-PCR wurden diese sequenziert. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit allen in der Genbank eingetragenen Sequenzdaten mit Hilfe des `Basic Local Alignment Search Tool` (BLAST) verglichen.

Dabei zeigte das RD9 present-Amplifikat eine Übereinstimmung von 100% mit *M. tuberculosis* und auch das RD4 deleted-Amplifikat erwies sich als spezifisch für *M. bovis*/*M. bovis* BCG (Tabelle 28). Die Spezifität der Primer F₂-R₂ für Spezies aus dem MTC-Komplex wurde ebenfalls anhand der Sequenzierung bestätigt.

Tabelle 28: Ergebnis des Vergleichs der Sequenzdaten MTC-spezifischer Amplifikate mit Einträgen in der Datenbank

Sequenz des MTC-Amplifikats (F₂-R₂)	
CTG CTC TCG ACG TTC ATC GCC GCC TTG ATG GGG GCT GAA GCC GAC GCC CTG TGC GGG GCG GGC TAC CGC GAA CGC AGC GAT GAG CGG TCC AAT CAG CGC AAC GGC TAC CGC CAC CGT GAT TTC GAC ACC CGT GCC	
Grad der Übereinstimmung mit den aufgeführten Spezies	
100 %	<i>M. tuberculosis</i> KZN 1435 (Acc.-Nr. CP001658)
	<i>M. bovis</i> BCG Tokyo (Acc.-Nr. AP010918)
	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra (Acc.-Nr. CP000611)
	<i>M. tuberculosis</i> F11 (Acc.-Nr. CP000717)
	<i>M. bovis</i> BCG Pasteur 1173P2 (Acc.-Nr. AM408590)
	<i>M. tuberculosis</i> CDC1551 (Acc.-Nr. AE000516)
	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i> AF2122/97 (Acc.-Nr. BX248333)
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (Acc.-Nr. AL123456)
Sequenz des <i>M. tuberculosis</i>-Amplifikats (RD9 present)	
GCC CTG CGC AAT TCG GAG CGA GAA TG	
Grad der Übereinstimmung mit den aufgeführten Spezies	
100 %	<i>M. tuberculosis</i> KZN 1435 (Acc.-Nr. CP001658)
	<i>M. tuberculosis</i> F11 (Acc.-Nr. CP000717)
	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra (Acc.-Nr. CP000611)
	<i>M. tuberculosis</i> CDC1551 (Acc.-Nr. AE000516)
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (Acc.-Nr. AL123456)
Sequenz des <i>M. bovis</i>/BCG-Amplifikats (RD4 deleted)	
AGC GCA ACA CTC TTG GAG TGG CCT ACA ACG GCG CTC TCC GCG GCG CGG GCG TAC CGG ATA TCT TAG CTG GTC AAT AGC CAT TTT TCA GCA A	
Grad der Übereinstimmung mit den aufgeführten Spezies	
100 %	<i>M. bovis</i> BCG Tokyo (Acc.-Nr. AP010918)
	<i>M. bovis</i> BCG Pasteur 1173P2 (Acc.-Nr. AM408590)
	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i> AF2122/97 (Acc.-Nr. BX248333)

5.6 Prävalenzen von MAC

Der zum Nachweis von MAC eingesetzte MA-Primer war nicht rein spezifisch für den MAC. Dies ist bei den insgesamt 35 (8,2 %) positiv getesteten Wildschweinproben zu berücksichtigen. Die 35 positiven MAC Lymphknotenproben wurden mit den in Kap. 4.3.1 aufgeführten Primern auf ihre Spezieszugehörigkeit überprüft. Die falsch positiven PCR-Ergebnisse wurden nicht weiter verfolgt.

5.7 Prävalenzen von *M. avium* ssp. *avium/silvaticum*, *M. avium* ssp. *hominissuis* und MAP

Bei keinem der 428 untersuchten Wildschweine konnte eine Infektion mit *M. avium* ssp. *avium/silvaticum* oder *M. avium* ssp. *hominissuis* bestätigt werden.

Ein einziges Wildschwein aus einem Revier in Nordrhein-Westfalen wurde PCR-positiv auf MAP getestet. In diesem Tier wurde zusätzlich MTC nachgewiesen. Damit waren nur 0,2% der Wildschweine positiv für MAP.

5.8 Kulturelle Anzucht

Makroskopisch stellten sich nach einer insgesamt 12 Wochen andauernden Inkubation auf zwei HEYM-Medien und nach weiteren 6 Wochen auf einem weiteren HEYM-Medium Bakterienkolonien dar. Bei der Speziesdifferenzierung mittels PCR wurden die beiden erstgenannten als MAP-Kolonien bestätigt. Gleichzeitig war eine der Proben PCR-positiv für *M. avium* ssp. *hominissuis*. Die nach 18 Wochen gewachsenen Kolonien stellten sich als *M. avium* ssp. *avium/silvaticum* heraus. Das betroffene Tier stammte aus Thüringen. Auch alle anderen Nährmedien, auf denen makroskopisch nichts zu sehen war, wurden mit Hilfe der PCR überprüft, es konnten aber keine weiteren Spezies des Avium- und Tuberkulose-Komplexes bestätigt werden. Eines der mit MAP infizierten Wildschweine stammte aus einem Revier in Mecklenburg-Vorpommern. Das andere sowohl mit MAP als auch mit *M. avium* ssp. *hominissuis* infizierte Tier stammte aus dem Saarland. In Abbildung 13 sind die einzelnen Reviere, in denen die positiven Nachweise gelangen, aufgeführt.

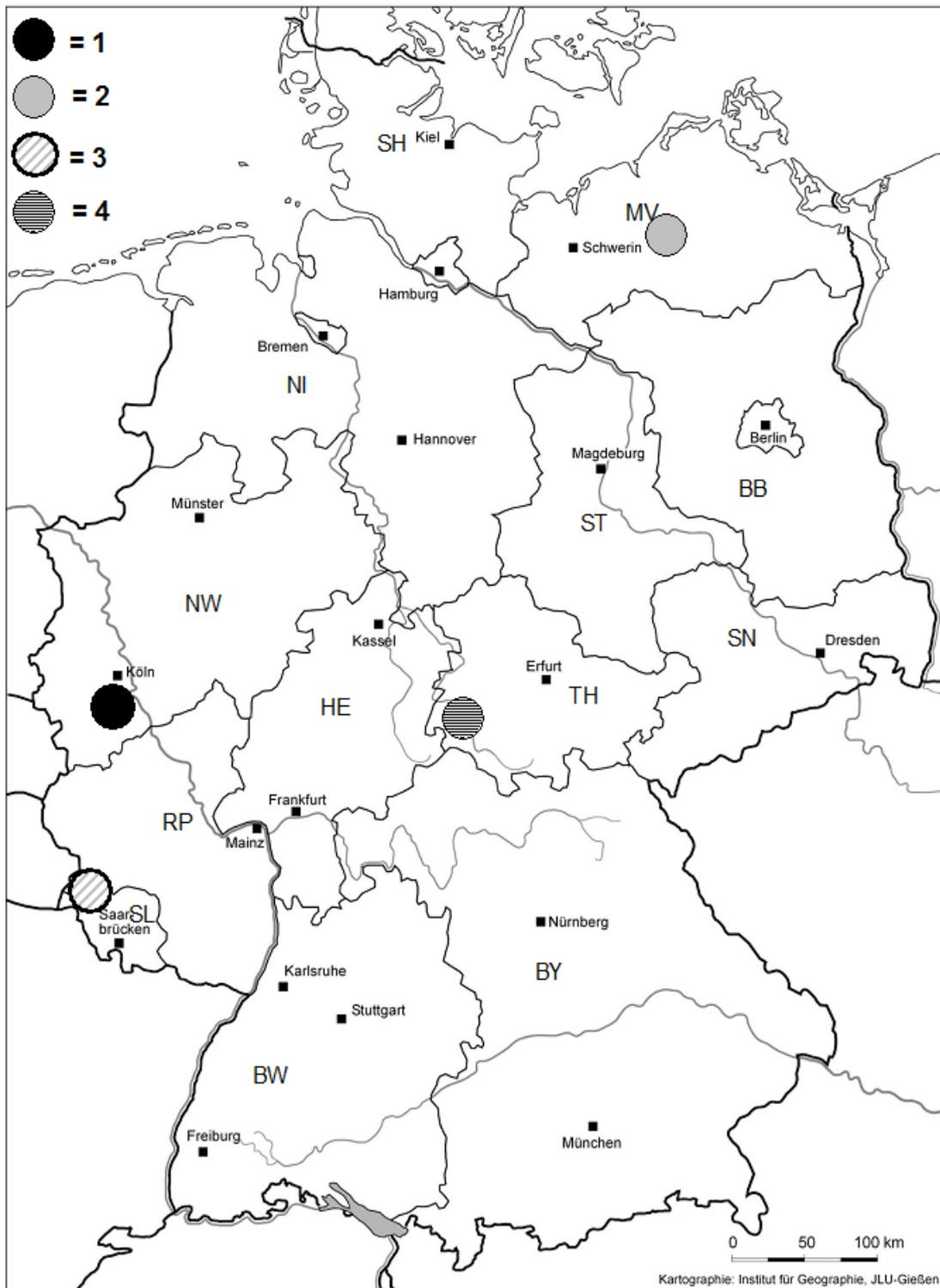


Abbildung 14: graphische Darstellung zum Nachweis einzelner Mykobakterienspezies des MAC-Komplexes: 1 = MAP (PCR-Nachweis); 2 = MAP (kultureller Nachweis); 3 = MAP + *M. avium* ssp. *hominissuis* (kultureller Nachweis); 4 = *M. avium* ssp. *avium/silvaticum* (kultureller Nachweis)

6 Diskussion

Mykobakterien sind Auslöser der sogenannten Mykobakteriosen und der Tuberkulose bei Schweinen. Sie gelten als Zoonoseerreger. Insbesondere Kinder und immunsupprimierte Personen werden als prädestiniert für durch Mykobakterieninfektionen hervorgerufene Erkrankungen angesehen (COMAS und GAGNEUX, 2009). Krankheitsausbrüche bei Nutztierbeständen haben große ökonomische Auswirkungen auf den internationalen Handel und damit verbunden auf die hiesige Landwirtschaft.

Wildtierpopulationen nehmen eine besondere Stellung als Reservoir für die Infektion von Nutztierbeständen ein (BIET et al., 2005; GAVIER-WIDEN et al., 2009). Als getilgt geltende Infektionskrankheiten wie die Tuberkulose treten sporadisch auch in Deutschland (2008: 230 neue Erkrankungsfälle bei Rindern in 23 Betrieben; Quelle: Bundestierärztekammer) immer wieder auf. In benachbarten Ländern wie Frankreich (ZANELLA et al., 2008a), Österreich (GLAWISCHNIG et al., 2003), Tschechien, Polen (MACHACKOVA et al., 2003) und Spanien (NARANJO et al., 2008a) wurden bereits Untersuchungen zum Vorkommen von Mykobakteriosen und der Tuberkulose bei wildlebenden Tieren durchgeführt. In Deutschland hingegen fehlen solche Untersuchungen weitestgehend.

Ziel dieser Arbeit war es, stichprobenartig das Vorkommen und die Verbreitung ausgewählter Mykobakterienspezies in deutschen Wildschweinpopulationen zu untersuchen. Hierzu wurde die DNA aus Lymphknoten des Ileozäkalsbereichs isoliert und versucht, Mykobakterien-spezifische Nukleotidabschnitte mit Hilfe der PCR zu amplifizieren. Eine Auswahl von Lymphknoten positiver Reagenten wurden zudem einem kulturellen Anzuchtversuch auf Mykobakterien unterzogen, um die PCR-Ergebnisse zu bestätigen.

6.1 Methodenkritik

Die vorliegende epidemiologische Studie war als Feldstudie ausgelegt. Das Tiermaterial wurde im Rahmen der Jagdausübung gesammelt. Dies stellte einen nicht zu unterschätzenden Unsicherheitsfaktor da, denn die zu erwartende

Jagdstrecke der erlegten Wildschweine konnte vor dem jeweiligen Jagdtermin schwer abgeschätzt werden. Das Untersuchungsgebiet wurde weit gefasst, um einen Bundesländer-übergreifenden Überblick über das Auftreten von Mykobakterieninfektionen zu ermöglichen. Um ein möglichst aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen, wurde die Probensammlung in einer größeren Anzahl von Revieren (n=33) durchgeführt. In den untersuchten Revieren konnte eine verhältnismäßig große Probandenzahl (n=428) gewonnen werden. Sie reicht aus, um erste aussagekräftige Ergebnisse über den Infektionsstatus deutscher Wildschweine mit ausgewählten Mykobakterienspezies zu erhalten. Bei der Einschätzung der Erregerprävalenzen auf Bundeslandebene muss jedoch beachtet werden, dass sich Prävalenzen bereits auf Revierebene, abhängig von Populationsdichte und sonstigen Umweltbedingungen, erheblich unterscheiden können. Die Übertragung regionaler Erregerprävalenzen auf die Ebene des entsprechenden Bundeslandes muss daher sehr vorsichtig interpretiert werden.

An der Jagdstrecke wurden die Organe der erlegten Wildschweine auf das Vorhandensein der für die Mykobakterien charakteristischen granulomatösen Entzündungsherde untersucht. Die im Rahmen einer Feldstudie stattgefundenene Suche nach pathologisch-anatomischen Veränderungen kann daher nicht mit den üblichen Sektionen von veterinär-pathologischen Instituten verglichen werden. Tuberkulöse Läsionen können derart klein sein, dass sie selbst während routinemäßiger Autopsien nicht nachgewiesen werden können (GAVIER-WIDEN et al., 2009). Daher können auftretende pathologische Veränderungen vereinzelt übersehen worden sein.

Die Wildschweine wurden auf sogenannten Treib- oder Drückjagden erlegt. Mit Hilfe dieser Jagdform konnten in den Herbst- beziehungsweise Wintermonaten sehr große Stückzahlen in einem begrenzten Zeitraum beprobt und ausgewertet werden. Eine ähnlich große Stückzahl in den Frühlings- und Sommermonaten zu erreichen ist aufgrund des in der Regel praktizierten Einzelabschusses nicht realisierbar. Dieser Umstand muss bei der Bewertung der Ergebnisse beachtet werden. Eine über das Jahr gleichmäßig verteilte Untersuchung der Probanden hätte zusätzlich jahreszeitlich bedingte Unterschiede aufdecken können. Dies war aber aus

wildbiologischen, jagdrechtlichen und organisatorischen Gesichtspunkten schwer möglich.

Die nördlichen Teile Nordrhein-Westfalens und die westlichen Teile Niedersachsens konnten nicht beprobt werden, da es sich dort um hauptsächlich landwirtschaftlich geprägte Gebiete handelt in denen zu dieser Jahreszeit keine Drückjagden mit entsprechender Streckenerwartung durchgeführt wurden. Aus organisatorischen Gründen und wegen der mitunter geringen Jagdstreckenerwartung wurde auf die Probennahme in Revieren Mittel- und Südbayerns verzichtet.

Die Alterseinschätzung bei den erlegten Tieren erfolgte anhand der Beurteilung ihres individuellen Zahnstatus. Bis zu einem Alter von zwei Jahren lässt sich das Lebensalter relativ genau schätzen. Die Beurteilung des Alters bei älteren Wildschweinen anhand des Gebisses hätte nur sehr ungenau erfolgen können und wäre mit einem deutlich größeren Aufwand verbunden gewesen. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Fragestellung dieser Arbeit hauptsächlich mit dem generellen Nachweis der Mykobakterienspezies beschäftigte, wurden diese Tiere zu der Gruppe der adulten Wildschweine (älter als 2 Jahren) zusammengefasst.

Der direkte Erregernachweis mittels PCR ist eine seit Jahren gebräuchliche, spezifische und sensitive Methode mit der auch noch geringe Genommengen detektiert werden können. Im Vergleich zum Goldstandard in der Mykobakteriendiagnostik, der kulturellen Anzucht (TAYLOR et al., 2001) kann die PCR schon innerhalb von kurzer Zeit Ergebnisse zum Infektionsstatus der einzelnen Tiere liefern. Spezifische und sensitive PCR-Systeme können für epidemiologische Studien die kulturelle Anzucht ersetzen (CARDOSO et al., 2009; CLARK et al., 2008). Voraussetzung dafür ist, dass Sensitivitäten erreicht werden, die mit Sensitivitäten der kulturellen Anzucht vergleichbar sind. Der positive PCR-Nachweis kann aber nicht zwangsläufig, im Gegensatz zur kulturellen Anzucht, mit dem Vorliegen eines vermehrungsfähigen Erregers gleichgesetzt werden. In Bezug auf die geringen Mengen an Gewebe, die üblicherweise in die PCR eingesetzt werden, können in wenigen Fällen Erreger nicht erfasst und als falsch negativ eingestuft werden. Dies galt es zu berücksichtigen.

6.2 PCR

Die verwendeten PCR-Systeme waren geeignet, 0,1 DNA-Kopien pro PCR-Ansatz zu detektieren. Dies war nur möglich, da die Primer auf die im Genom mehrfach vorkommenden Insertionssequenzen gerichtet waren. Demzufolge waren die in die konventionelle PCR eingesetzten Primern in der Lage mit einer Nachweiswahrscheinlichkeit von 95 % zwischen $1,8 \times 10^3$ und $1,9 \times 10^4$ Mykobakterien-Genomäquivalente nachzuweisen. Verschiedenen Publikationen zu folge sind für einen sicheren MAP-Nachweis mittels kultureller Anzucht mindestens 100 CFU/g Kot nötig (HALLDORSOTTIR et al., 2002; VANSNICK et al., 2007). Vergleichbare Mengenangaben für Lymphknotengewebe werden in der aktuellen Literatur nicht beschrieben. Zur Reduzierung der PCR-Ansätze und der Kosten wurden zuerst Primer auf den MAC und MTC eingesetzt, um anschließend an den MAC- und MTC-positiven Proben eine Speziesdifferenzierung über die speziesspezifischen Primer zu versuchen. Das auf den MAC gerichtete Primerpaar erwies sich als nicht rein MAC-spezifisch. Einerseits wird die IS1311 auch von anderen Mykobakterien wie *M. scrofulaceum*, *M. malmoense* und *M. intracellulare* exprimiert (JOHANSEN et al., 2005), andererseits detektierte der Primer auch Spezies des MTC. Dennoch konnten mit Hilfe seiner Verwendung die Anzahl der PCR-Ansätze deutlich reduziert werden. Der MTC-Primer zeigte sich hingegen als hochspezifisch und gleichzeitig äußerst sensitiv.

Zur Differenzierung der MAC-Spezies wurden die Primer auf deren Insertionssequenzen gerichtet. In einer Vielzahl von Publikationen wurde deren Verwendung für die Speziesdifferenzierung bereits beschrieben (MOSER, 2009; JOHANSEN et al., 2005; TRCKA et al., 2006; CVETNIC et al., 2007; PAVLIK et al., 2003b; ICHIKAWA et al., 2009; TURENNE et al., 2006; DOMINGOS et al., 2009). In verschiedenen Veröffentlichungen wurde bereits das Auftreten von IS900-like Sequenzen in anderen Mykobakterien beschrieben (TADDEI et al., 2008; COUSINS et al., 1999; ENGLUND et al., 2002). Aus diesem Grund wurde der positive MAP-Nachweis aus den Kulturen nochmals mit anderen äußerst spezifischen aber nicht sehr analytisch sensitiven MAP-Primern, zielgerichtet auf die Sequenzen ISMav2 und F57, durch das Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde Gießen überprüft und bestätigt.

Von 77 PCR-positiven MTC-Proben konnten nur 22 Proben einer MTC-Spezies zugeordnet werden. Die für den Nachweis ausgewählte IS1081 gilt als spezifisch für MTC (DZIADEK et al., 2001). Dem gegenüber gelang bei den übrigen 55 Proben keine Speziesdifferenzierung. Dies ist durch die unterschiedliche analytische Sensitivität zu erklären. Der auf den MTC-Komplex gerichtete F₂-R₂-Primer war in der Lage, mit einer 95 %igen Nachweiswahrscheinlichkeit 1,8 bis 2,5 x 10³ Genomäquivalente pro Gramm Lymphknotengewebe zu erkennen. Die auf die einzelnen Spezies gerichteten RD-Primer schafften es lediglich zwischen 2,2 x 10⁵ und 4,9 x 10⁵ Genomäquivalente zu detektieren. Damit erwiesen sie sich als nicht geeignet für einen zuverlässigen Mykobakterien-Direktnachweis aus einem Körpergewebe. Der Nachweis von Genabschnitten, deren Sequenzen im Genom nur in Einfachkopien vorkommen, ist für den Direktnachweis deshalb nur bedingt einsetzbar. Zu demselben Schluss kommt auch TAYLOR et al. (2007). Andererseits erlaubt die Verwendung der RD-Primer, überhaupt eine Aussage darüber zu treffen, welche MTC-Spezies in der deutschen Wildschweinpopulation tatsächlich vorkommen.

In der Publikation von PINSKY und BANAEI (2008) wird der RD9 Primer als spezifisch für *M. tuberculosis* beschrieben. Es ist aber auch bekannt, dass die RD9-Region in *M. canetti* und *M. africanum II* vorkommt (BROSCH et al., 2002; HUARD et al. 2003). Aufgrund fehlender Referenzstämme konnte die Spezifität des Primers für *M. tuberculosis* deshalb nicht überprüft werden.

6.3 Kulturelle Anzucht

Exemplarisch wurden 18 mittels PCR auf MAC positiv getestete Lymphknotenproben einem kulturellen Anzuchtversuch durch das Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde Gießen unterzogen. In drei Ansätzen gelang die Anzucht von Mykobakterien. Die geringe Übereinstimmung zwischen PCR und kultureller Anzucht wurden auch von anderen Autoren beschrieben (MÜLLER et al., 2007). Für die geringen Anzuchtergebnisse kommen verschiedene Ursachen in Frage. Einerseits können methodisch bedingt nicht mehr lebensfähige Mykobakterien nur in der PCR nachgewiesen werden, andererseits kann auch das vor der kulturellen Anzucht

notwendige Dekontaminationsverfahren negative Auswirkungen auf die Anzuchtergebnisse haben (REDDACLIFF et al., 2003). Denn vor dem Hintergrund, dass die Wildschweine erlegt worden sind und aufgrund der Schussverletzung keine „sterilen“ Bedingungen in der Bauchhöhle herrschen und die Magen-Darm-Barriere etwa 45 min nach dem Tod der Tiere zusammenbricht, muss auch von einer erhöhten Kontamination der Lymphknoten mit Begleitkeimen ausgegangen werden (AKINEDEN, 2010). Elementar für ein zufriedenstellendes Anzuchtergebnis ist deshalb der Einsatz eines geeigneten Dekontaminationsverfahrens, das jedoch eine Beeinträchtigung der Mykobakterien im Probenmaterial nach sich ziehen kann (AKINEDEN, 2010; FISCHER, 2010).

Die aber wohl bedeutendste Ursache für die gegensätzlichen Ergebnisse ist in dem möglichen Auftreten von Spheroplastenstadien (=zellwanddefekte Mykobakterien) zu suchen. Generell ist zum Auftreten zellwanddefekter Mykobakterien beim Menschen wenig und zur Isolation zellwanddefekter Mykobakterien beim Tier noch weniger bekannt (BERAN et al., 2006). Derzeit wird davon ausgegangen, dass Mykobakterien vielfach als Spheroplasten-Stadien in granulomatös veränderten Geweben überleben (BOBCHENOK et al., 2002). Eine Umwandlung dieser Stadien in normale, zellwandkompetente Formen ist nur langsam möglich (BERAN et al., 2006). Die kulturelle Anzucht kann Monate bis Jahre dauern, ehe Kolonien auf Nährmedien wachsen (CHIODINI et al., 1986; GRAHAM et al., 1987). Auch HINES und STYER (2003) berichten davon, dass es extrem schwierig ist zellwanddefekte Formen von MAP zu isolieren. Genetisch unterscheiden sich zellwanddefekte und zellwandkompetente Formen nicht voneinander (CHIODINI et al., 1986; HINES und STYER, 2003), so dass mit der PCR auch Spheroplasten erfasst werden können.

6.4 Prävalenzen

Bisher liegen nur wenige Ergebnisse über das Vorkommen verschiedener Mykobakterienspezies in deutschen Wildschweinbeständen vor. Ein Fallbericht stammt aus Mecklenburg-Vorpommern, ein anderer aus Bayern (SCHULZ et al., 1992; MÜLLER et al., 2007). Die vorliegende Studie ist unter den oben Aufgeführten die Erste, in der auch Wildschweine ohne makroskopisch erkennbare Granulome in Lymphknoten auf das Vorhandensein von Mykobakterien untersucht wurden.

6.4.1 Prävalenzen von MTC beim Wildschwein

Anhand der Studie konnte aufgezeigt werden, dass im betreffenden Zeitraum 18% der 428 untersuchten Wildschweine mit MTC infiziert waren. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen benachbarter Länder der Europäischen Union, so waren die in dieser Arbeit ermittelten Prävalenzen für MTC deutlich niedriger. Der Großteil der verfügbaren Studien basierte auf Ergebnissen der kulturellen Anzucht von *M. bovis*. Im Süd-Westen Spaniens wurden Prävalenzen von 42,5% beschrieben (VICENTE et al., 2005). In Teilen Italiens wurden Prävalenzen zwischen 25,4% und 43,6% ermittelt (SERRAINO et al., 1999; BOLLO et al., 2000). In der Normandie wurden Prävalenzen von 31% in den dortigen Wildschweinpopulationen vorgefunden (MAEDER et al., 2008). In einer größeren Studie in Tschechien (842 untersuchte Wildschweine) hingegen konnten in keinem einzigen Fall Spezies des MTC nachgewiesen werden (TRCKA et al., 2006). Über das Vorkommen von MTC bei Wildschweinen in Osteuropa ist derzeit ähnlich wenig bekannt wie bis zur vorliegenden Arbeit in Deutschland. Fasst man die Länder Bosnien-Herzegowina, Polen, Slowakei, Kroatien, Slowenien, Ungarn und Tschechien zusammen, so wurden insgesamt zwischen 1983 und 2001 nur 431 Wildschweine untersucht. Bei diesen gelang nur in 5,1% der Fälle ein kultureller Nachweis von *M. bovis* (MACHACKOVA et al., 2003).

Die Bundesländer Mecklenburg-Vorpommern und Nordrhein-Westfalen wiesen mit 57,6% beziehungsweise 57,1% bundesweit die mit Abstand höchsten Prävalenzen auf. Ähnliche Ergebnisse (55,6%) wurden bereits von SCHULZ et al. (1992) für Mecklenburg-Vorpommern beschrieben. Allerdings beruhen die Ergebnisse ausschließlich auf der Basis der kulturellen Anzucht von *M. bovis*. In den Revieren Bayerns und Sachsen-Anhalts trat kein Fall von MTC auf. Vergleicht man die vorliegende Arbeit mit der von MÜLLER et al. (2007) durchgeführten Studie so wurden dort deutlich höhere Prävalenzen von MTC (20,7%) mit ebenfalls gebietsweise starken Schwankungen nachgewiesen. Ferner ist zu beachten, dass diese Ergebnisse in deutlich südlicher gelegeneren Teilen Bayerns (Neu-Ulm, Landkreis Hassfurt, Landkreis Schweinfurt, Landkreis Weißenburg) ermittelt wurden. Fasst man die Erhebungen dieser Studie zusammen, so kommt man zu dem Ergebnis, dass im überwiegenden Teil der untersuchten Reviere (57,6%) MTC-

Prävalenzen zwischen 0 und 10% ermittelt wurden. 18,2% der Reviere wiesen Prävalenzen von 50 bis 66,7% auf. In Mitteldeutschland wurden die niedrigsten Prävalenzen (0 bis 10%) ermittelt. Im Rahmen der Untersuchung der einzelnen Organe erlegter Wildschweine wurden bei vier Tieren eitrig abszondierende Entzündungen in den Mandibularlymphknoten vorgefunden. Bei nur einem Tier konnte daraufhin eine Infektion mit Spezies des MTC festgestellt werden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass auch andere Erreger wie *Rhodococcus equi*, Corynebakterien, Aktinobazillen, Arkanobakterien, verschiedene Pilze und natürlich auch Mykobakterien, die nicht in die Untersuchung mit einbezogen wurden, derartige Veränderungen nach sich ziehen können (DVORSKA et al., 1999; MATLOVA et al., 2005; DE LISLE et al., 2002). Alle im Zuge der DNA-Extraktion aufgefundenen 1 mm großen Granulome wurden in Probenmaterial nachgewiesen, die daraufhin positiv auf MTC getestet wurden. In den statistischen Untersuchungen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem Nachweis von MTC, dem Lebensalter sowie insbesondere dem Körpergewicht festgestellt werden. Die Tatsache, dass klinisch kranke Tiere überwiegend eine starke Abmagerung zeigen (DE LISLE et al., 2002), führt zu dem Schluss, dass die infizierten Tiere in Deutschland eher als Träger von MTC anzusehen sind. Klinisch manifeste Erkrankungen an Tuberkulose scheinen hingegen in Wildschweinpopulationen deutlich seltener aufzutreten. Diese Aussage geht konform mit einer Reihe von Ergebnissen anderer Autoren (MÜLLER et al., 2007; VICENTE et al., 2005; ZANELLA et al., 2008; NUGENT et al., 2002; CORNER et al., 1981). Im südlichen Teil Spaniens allerdings wurde bei Wildschweinen mehrfach generalisierte Tuberkulose festgestellt. Diese ging häufig mit Läsionen in der Lunge und den Lungenlymphknoten einher (MARTIN-HERNANDO et al., 2007; PARRA et al., 2003; GORTAZAR et al., 2003). Die Erkenntnisse aus diesen Gebieten Spaniens müssen allerdings differenziert betrachtet werden. Die dort vorgefundenen tuberkulösen Veränderungen wurden in Gebieten von herausragender jagdtouristischer Bedeutung ermittelt. Viele Flächen dort sind eingezäunt, Überpopulationen werden angestrebt und die Wildschweine werden über das ganze Jahr zugefüttert (VICENTE et al., 2007). Durch diese Maßnahmen werden Wildschweindichten von bis zu 90,9 Individuen pro km² erreicht (ACEVEDO et al., 2007). Aktuelle Schätzungen zu Wildschweindichten in Deutschland sind derzeit nicht verfügbar. Schätzungen aus den 90ziger Jahren

gehen von einer Populationsdichte von rund 5,6 Wildschweinen pro km² in Deutschland aus (HOWELLS und EDWARD-JONES, 1997).

Ursachen für unterschiedliche Epidemieverläufe sind in erster Linie in hohen Bestandsdichten, Resistenzen gegenüber Erkrankungen und Virulenzunterschieden einzelner Krankheitserreger zu suchen. Verschieden stark ausgeprägte Populationsdichten können als Ursache für unterschiedliche Epidemieverläufe angesehen werden. Infektionen verlaufen selbstlimitierend, sofern Wildschweindichten so gering sind, dass der Kontakt von empfänglichen zu infizierten Tieren auf ein Mindestmaß reduziert ist (BRUNNER et al., 2004). In Bezug auf die Tuberkulose treten in der Regel nur dann Erkrankungsfälle auf, wenn eine kontinuierliche Superinfektion stattfindet (BALASUBRAMANIAN et al., 1994) und der Infektionsdruck hoch ist. Die Erkenntnisse aus den Infektionsgeschehen in spanischen Jagdgattern lassen sich somit nicht direkt auf Krankheitsverläufe bei freilebenden Wildschweinen übertragen. Ein weiterer Gesichtspunkt zur unterschiedlichen Manifestation von klinischen Symptomen bei Wildschweinen sind beschriebene Resistenzen gegenüber MTC. Generell gelten Wildschweine gegenüber einer Infektion mit MTC als sehr empfänglich (VICENTE et al., 2005; GORTAZAR et al., 2008; ZANELLA et al., 2008b; BACHVAROVA et al., 1996). Ergebnissen von ACEVEDO-WHITEHOUSE et al. (2005) zu Folge schützt eine größere Heterozygotität der Tiere diese zwar nicht vor einer Infektion mit *M. bovis*, minimiert dafür aber das Fortschreiten der Erkrankung. Große Bedeutung werden dabei dem Auftreten von Polymorphismen im Methylmalonyl-CoA-mutase-Gen zugesprochen (NARANJO et al., 2008b). Neben einer übermäßigen Population und vermeintlichen Resistenzen sind immer auch Virulenzunterschiede bei Mykobakterien anzuführen, die das Ausmaß einer Erkrankung beeinflussen können. Virulenzunterschiede für *M. bovis*- und *M. tuberculosis*-Stämme sind bekannt (LOPEZ et al., 2003; MEDINA et al., 2006). AGUILAR LEON et al. (2009) infizierte BALB/c Mäuse mit *M. bovis* unterschiedlichen Spoligotyps, isoliert aus Wildschweinen. Durch unterschiedlich stark auftretende Krankheitsbilder konnte er beweisen, dass in Wildschweinpopulationen unterschiedlich virulente *M. bovis*-Stämme existieren.

6.4.2 Prävalenzen von *M. tuberculosis*, *M. bovis/bovis* BCG, *M. africanum/pinnipedii/microti/caprae*

2,8 % der deutschen Wildschweinpopulation war zum Zeitpunkt der Untersuchung mit *M. tuberculosis* infiziert. Jeweils zu 1,2 % wurde *M. bovis/BCG* und *M. africanum/microti/pinnipedii/caprae* in Wildschweinen detektiert. In 18,2 % der untersuchten Wildschweinproben aus Mecklenburg-Vorpommern gelang ein positiver Nachweis auf *M. tuberculosis*. In Baden-Württemberg wurden 12,5 % der Wildschweine positiv auf *M. tuberculosis* getestet. In den übrigen Bundesländern wurden Prävalenzen von nur 0 bis 7,3 % nachgewiesen. Im Median war ein Gramm Lymphknoten mit $3,6 \times 10^6$ Genomäquivalenten von *M. tuberculosis* belastet. *M. africanum/microti/pinnipedii/caprae* wurde in 2,5 bis 5,3 % der Wildschweinpopulation in Niedersachsen, Sachsen, Saarland und Nordrhein-Westfalen vorgefunden. In allen übrigen beprobten Bundesländern wurde *M. africanum/microti/pinnipedii/caprae* nicht detektiert. Im Durchschnitt wurden $3,8 \times 10^4$ Genomäquivalente pro Gramm Gewebe nachgewiesen. *M. bovis/BCG* wurde am häufigsten in den Revieren Mecklenburg-Vorpommerns (6,1 %) vorgefunden. Danach folgten Brandenburg (5,6 %) und Thüringen (3,2 %). In den Revieren der restlichen Bundesländer wurde kein Fall von *M. bovis/BCG* festgestellt. Im Mittel waren $3,6 \times 10^5$ Genomäquivalente pro Gramm Lymphknotengewebe errechnet worden. Vergleicht man verschiedene internationale Literaturangaben so wurde in den überwiegenden Studien *M. bovis* bei den untersuchten Wildschweinen beschrieben (PAVLIK et al., 2006; ZANELLA et al., 2008a; GAVIER-WIDEN et al., 2009; PARRA et al., 2006; MACHACKOVA et al., 2003). Nur wenige Male ist das Vorkommen von *M. tuberculosis* in Wildschweinpopulationen oder bei Schlachtschweinen aufgeführt (MOHAMED et al., 2009; SERRAINO et al., 1999). Bei der Auswertung der *M. tuberculosis*-Prävalenzen muss folgendes berücksichtigt werden. Der in dieser Arbeit verwendete RD9-Primer wies von allen Primern die schlechteste analytische Sensitivität auf, gleichzeitig aber wurde *M. tuberculosis* am häufigsten nachgewiesen. Man muss also davon ausgehen, dass die *M. tuberculosis*-Prävalenzen in deutschen Wildschweinen tatsächlich deutlich höher ausfallen dürften. *M. tuberculosis* galt bis dato als sehr spezifisch für den Menschen. Das derart häufige Auftreten bei Wildschweinen war so nicht zu erwarten. Dies zeigt aber, dass *M. tuberculosis* ein größeres Wirtsspektrum hat als bisher angenommen.

6.4.3 Prävalenzen von *M. a. ssp. avium/silvaticum*, *M. a. ssp. hominissuis*, *M. a. ssp. paratuberculosis*

Der PCR-Nachweis von *M. avium* ssp. *avium/silvaticum* und *M. avium* ssp. *hominissuis* konnte in keinem einzigen Fall bestätigt werden. Lediglich *M. avium* ssp. *paratuberculosis* wurde ein einziges Mal in einem Revier in Nordrhein-Westfalen nachgewiesen. Im Rahmen der kulturellen Anzucht mit anschließender Bestätigung mittels PCR wurde in zwei Proben MAP nachgewiesen. Eine Probe stammte aus Mecklenburg-Vorpommern, die Andere aus dem Saarland. Das im Saarland erlegte Wildschwein war simultan mit *M. avium* ssp. *hominissuis* infiziert. Zudem wurde aus dem Lymphknoten eines thüringischen Tieres *M. avium* ssp. *avium/silvaticum* isoliert. Basierend auf den molekularbiologischen Ergebnissen waren in Deutschland 0,2 % der untersuchten Wildschweine mit MAP infiziert. Ähnliche Ergebnisse wurden für Wildschweinpopulationen in Tschechien (0,1 %), Spanien (1,5 %) und für weitere osteuropäische Länder wie Polen, Bosnien-Herzegowina, die Slowakei, Kroatien und Ungarn (0,2 %) beschrieben (TRCKA et al., 2006 ; KOPECNA et al., 2008; ALVAREZ et al., 2005; MACHACKOVA et al., 2003). Lediglich auf Sardinien wurde MAP bei 11,1 % der Wildschweine nachgewiesen (ZANETTI et al., 2008). Dies ist die erste Studie in Deutschland, bei der MAP in Wildschweinen festgestellt wurde. Der verhältnismäßig seltene Nachweis von *M. avium* ssp. *avium* und *M. avium* ssp. *hominissuis* in Wildschweinpopulationen wurde auch bereits in anderen Studien beschrieben (DE LISLE et al., 1994; MÜLLER et al., 2007; MACHACKOVA et al., 2003). Die Ursachen für die geringen Nachweishäufigkeiten von Spezies des MAC im Vergleich zu den relativ hohen Nachweishäufigkeiten von MTC bei Wildschweinen sind ungeklärt.

6.4.4 Prävalenzen von sonstigen Mykobakterien

Aufgrund der unspezifischen Reaktionen mit Spezies des MTC und dem in der Literatur beschriebenen Auftreten der IS1311 in anderen Mykobakterienspezies, blieben die ermittelten Prävalenzen von MAC unberücksichtigt.

6.5 Interaktionen zwischen Wildschweinen und Nutztieren

Die hohe Reproduktionsdynamik und die starke Ausbreitungstendenz der Wildschweine führen dazu, dass Wildschweine heute nahezu flächendeckend in Europa vertreten sind (BIEBER und RUF, 2005). Große Populationen tragen maßgeblich zur Aufrechterhaltung und Verbreitung von Tierseuchen bei (HUDSON et al., 2002). Wildtiere nehmen eine bedeutende Stellung als Reservoirwirte für Infektionskrankheiten ein (DASZAK et al., 2000; MACHACKOVA et al., 2003). Die Übertragung der Krankheitserreger von Wildtieren auf Nutztierbestände kann enorme wirtschaftliche Folgen nach sich ziehen (PAVLIK et al., 2003b). Direkte Kontakte zwischen Wildschweinen und Hauschweinen beziehungsweise Rindern sind als sehr selten einzustufen. Ein Großteil der Hausschweine, abgesehen von Freilandhaltungen, wird in geschlossenen Systemen gehalten. Auch die Wahrscheinlichkeit eines direkten Kontaktes zwischen Wildschweinen und Rindern darf als gering eingestuft werden, liegen die Hauptaktivitätsphasen der Wildschweine doch in den späten Abend- bis frühen Morgenstunden (SERRAINO et al., 1999). Das zusätzlich geringe Auftreten von generalisierten Erkrankungen und das überwiegende Fehlen von pulmonalen Läsionen, führen zu der Annahme, dass der bedeutendste Infektionsweg zur Übertragung von Tuberkulose, die direkte (oronasale) Infektion über Aerosole (NEILL et al., 1994), als unwahrscheinlich einzustufen ist (SERRAINO et al., 1999; CORNER et al., 1981; ZANELLA et al., 2008a). Generell ist aber auch eine Übertragung über unbelebte Vektoren möglich (BIET et al., 2005). Aufgrund des Nachweises von MTC in Mesenteriallymphknoten ist eine mögliche Ausscheidung der Bakterien über die Faeces in Betracht zu ziehen. Eine solche Vermutung ist allerdings noch nicht wissenschaftlich belegt (NARANJO et al., 2008a). Zudem ist nicht bekannt, in welchen Mengen die betreffenden Mykobakterien ausgeschieden werden und inwieweit die Ausscheidungen von Wildschweinen Weiden, Wiesen und Gewässer kontaminieren (MARTIN-HERNANDO et al., 2007). Für die Infektion von Rindern über den oralen Weg bedarf es großer Mengen an MTC (MORRIS und PFEIFFER, 1994). Es wird von einer minimalen Infektionsdosis von 10^7 Mykobakterien ausgegangen (O'REILLY und DABORN, 1995).

Es ist bekannt, dass die Häufigkeit des Auftretens von Spezies des MAC und MTC in Hausschweinen und Wildschweinen in der Regel konträr zueinander verläuft (DE LISLE et al., 1994). In Wildschweinen werden tuberkulöse Veränderungen vornehmlich durch Infektionen mit Mykobakterien des MTC hervorgerufen. Werden hingegen tuberkulöse Läsionen bei Hausschweinen festgestellt so sind diese in der Regel auf Infektionen mit *M. avium* subspezies zurückzuführen. Legt man zu Grunde, dass in einigen Bundesgebieten bei Rinderherden MAP-Prävalenzen von 80 % erreicht werden (BÜLTE et al., 2005) und dass Wildschweine generell als empfänglich für Mykobakterieninfektionen gelten (NUGENT et al., 2002) so sind die geringen MAP-Prävalenzen in der deutschen Wildschweinpopulation verwunderlich. Einerseits können klinisch kranke Rinder große Mengen MAP mit ihrem Kot ausscheiden (CROSSLEY et al., 2005), andererseits ist die hohe Tenazität von MAP in Rinderkot, auf Weiden und in verschiedenen Dipteren erwiesen (LOVELL et al., 1944; WHITTINGTON et al., 2004; FISCHER et al., 2001, 2005, 2006). Wildschweine suchen bedingt durch ihr Nahrungsverhalten oftmals Weiden auf und durchwühlen Kuhfladen in der Hoffnung tierisches Eiweiß in Form von verschiedenen Insekten zu finden. Die Gefahr MAP aufzunehmen ist somit als relativ groß zu bewerten. Die Ursachen für die geringe Infektionshäufigkeit der Wildschweine mit MAP und *M. avium* ssp. *avium/silvaticum/hominissuis* können anhand dieser Studie nicht direkt erklärt werden. Möglich Ansatzpunkte sind, dass zum einen das Wildschwein nicht primärer Wirt für MAP ist und zum anderen, dass die Infektionsdosen derart hoch sein müssen, dass eine Infektion in Natura nur in wenigen Fällen zu erwarten ist.

6.6 Zoonotische Aspekte

Jährlich sterben etwa zwei Millionen Menschen an Tuberkulose, asymptomatisch ist etwa ein Drittel der Weltbevölkerung mit *M. tuberculosis* infiziert (BUTLER et al., 2000). In den vergangenen Jahren wurde zudem eine erhöhte Inzidenz von MAC-Infektionen bei HIV-infizierten Patienten verzeichnet (STEINBROOK, 2007). Wildtiere, insbesondere die in Deutschland flächendeckend vorkommenden und in ihrer Anzahl zunehmenden Wildschweine, stellen ein potentiell Infektionsrisiko für den Menschen dar. Im Zuge dessen sind vor allem solche Personen als vermehrt gefährdet zu bezeichnen, die einen engen Kontakt zu infizierten Nutz- und Wildtieren

haben. Dazu zählen in erster Linie Landwirte, Tierärzte, Schlachthofpersonal und Jäger (ROBINSON et al., 1988; SMITH et al., 2004; BIET et al., 2005). Derweil muss auch ein anthroponotisches Infektionsgeschehen in Betracht gezogen werden. Berücksichtigt man den in dieser Arbeit verhältnismäßig häufigen Nachweis von *M. tuberculosis* und nimmt zur Kenntnis, dass etwa 97,7 % der humanen Tuberkulosefälle auf *M. tuberculosis* zurückzuführen sind (Quelle: Robert Koch Institut, Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2008), so besteht der Verdacht einer möglichen Infektion der Wildschweine bedingt durch den Menschen. Dabei ist die mögliche Infektionsquelle nicht im direkten Tier zu Mensch Kontakt, sondern vielmehr im Verzehr toten organischen Materials (=Nekrophagie) zu suchen. Dieser Schluss wird bestätigt durch den positiven Nachweis der Mykobakterien in den Mesenteriallymphknoten. Anhand dieses Nachweises muss von einer Infektion, hervorgerufen durch Ingestion, ausgegangen werden. Mögliche Infektionsquellen stellen Küchenabfälle, Schlachtabfälle, Aas oder jedwede Art menschlicher Ausscheidungen dar (STIELITZ, 2005; MACHACKOVA et al., 2003; AHL, 1994; CORNER et al., 1981; ARANAZ et al., 2004; NARANJO et al., 2008a). Andererseits muss darauf verwiesen werden, dass die Infektion genauso gut durch die Aufnahme von anderem infiziertem organischen Material, beispielsweise bisher nicht identifizierten Wildtieren/-kadavern und Ausscheidungen, ausgelöst werden kann. Die Gefahr eines Menschen mit normal funktionierendem Immunsystem an Tuberkulose zu erkranken ist relativ gering. Ein Drittel der Weltbevölkerung ist mit *M. tuberculosis* infiziert, die Meisten entwickeln weder eine klinische Erkrankung noch werden sie trotz der Persistenz des Pathogens infektiös (KAUFMANN, 2001). Die Gefahr an Tuberkulose oder einer Mykobakteriose zu erkranken steigt hingegen bei neugeborenen Kindern sowie alten und immundefizienten (z.B. HIV-Patienten) Menschen (BIET et al., 2005; KAUFMANN, 2001). Derzeit liegen aber in der aktuellen Literatur keine gesicherten Erkenntnisse über Infektionen mit Erregern des MTC oder MAC bei Menschen vor, die zweifelsfrei auf Kontakt zu Wildbeziehungsweise Hausschweinen oder auf den Verzehr von deren Fleisch zurückzuführen sind. Im Fall von MAP wird gegenwärtig davon ausgegangen, dass es an dem Ausbruch von Morbus Crohn beim Menschen beteiligt sein kann (BÜLTE et al., 2005).

7 Fazit

Die Tuberkulose ist eine bei Mensch und Tier auftretende und in vielen Industrieländern als getilgt geltende Infektionskrankheit. Jährlich erkranken in Deutschland rund 4.500 Menschen an Tuberkulose. Immer wieder treten vereinzelt Tuberkulosefälle in Nutztierbeständen auf. MOTT's werden zunehmend aus HIV-Patienten isoliert. Deswegen stellen sich Fragen zu den Infektionsquellen von Mensch und Tier. Wildtieren kommt hierbei eine nicht unerhebliche Bedeutung zu. Sie sind nur eingeschränkt kontrollierbar und stellen deshalb in besonderem Maße eine potentielle Gefahr dar, Reservoir für die unterschiedlichsten Krankheitserreger zu sein. Das Wildschwein, dessen Population in den letzten Jahrzehnten fast explosionsartig angewachsen ist, wurde ausgewählt, um Informationen über den Infektionsstatus von Mykobakterien des Tuberkulose- und Aviumkomplexes zu sammeln. Diese Studie liefert durch ihren Versuchsaufbau erstmals flächendeckende Ergebnisse zum Auftreten einzelner Mykobakterienspezies bei Wildschweinen in Deutschland. Durch den Direktnachweis der Mykobakterien mittels PCR konnten die Ergebnisse im Vergleich zu kulturellen Anzucht in kurzer Zeit ermittelt werden. Die eingesetzten Primer erzielten annähernd die Nachweisgrenzen, die beim kulturellen Nachweis erreicht werden können. Die eingesetzten PCR-Systeme zeigten sich als sinnvolle Alternative für epidemiologische Studien. Für eine sichere Speziesdifferenzierung innerhalb des MTC erwiesen sich die verwendeten Primer auf Basis der *Regions of Difference* für den Direktnachweis jedoch als nicht zuverlässig. Dennoch kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Wildschweine viel öfter als bisher angenommen mit *M. tuberculosis* infiziert sind. Eine Einordnung der Wildschweine als echtes Erregerreservoir für MTC und MAC gestaltet sich jedoch als sehr schwierig. Die potentiellen Infektionsquellen sind so mannigfaltig, dass es derzeit unmöglich erscheint, eine Aussage darüber zu treffen, welche epidemiologische Rolle das Wildschwein einnimmt.

Zu weiteren Einschätzungen bedarf es der Beantwortung folgender Fragen. Zum einen, in wieweit die klinisch nicht kranken Wildschweine Erreger des MTC ausscheiden und auf welchem Übertragungsweg und durch wen deren Infektion überwiegend stattfindet. Zum anderen gilt es zu klären in welchem Maße der Mensch in Bezug auf *M. tuberculosis* für das Wildschwein ein Infektionsreservoir darstellt.

Nach wie vor ist ebenfalls nicht erklärt, welche Ursachen den niedrigen Infektionsraten des Wildschweins mit Keimen des MAC zu Grunde liegen.

8 Zusammenfassung

Mykobakterien (M.) sind die Verursacher der Mykobakteriosen und Tuberkulosen bei Mensch und Tier. Ausbrüche der Paratuberkulose und Tuberkulose können große wirtschaftliche Verluste verursachen. Mykobakterien haben ein breites Wirtsspektrum und sind auch auf den Menschen übertragbar. In den letzten Jahren sind zusehends Mykobakterien bei immundefizienten Patienten nachgewiesen worden. In den Industrieländern gilt die Rindertuberkulose überwiegend als getilgt. Dennoch tritt die Rindertuberkulose immer wieder sporadisch auf. Oftmals werden damit Wildtiere in Verbindung gebracht. Das Wildschwein ist eine Wildart, in deren Population in den letzten Jahrzehnten ein enormer Populationszuwachs stattgefunden hat. Diese Arbeit verfolgt das Ziel Wildschweine in Deutschland auf das Vorkommen ausgewählter Mykobakterienspezies zu untersuchen.

Die Mesenteriallymphknoten von 428 Wildschweinen aus den verschiedensten Regionen Deutschlands wurden auf Spezies des *Mycobacterium avium complex* (MAC) und des *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) mittels PCR untersucht. Dazu wurden verschiedenste Primerpaare, die entweder bereits in der Literatur beschrieben waren oder selbst konstruiert wurden, auf Spezifität und auf deren analytische Sensitivität getestet.

18% der untersuchten Tiere waren zum Zeitpunkt der Untersuchung mit dem MTC infiziert. 2,8% konnten als Träger von *M. tuberculosis* identifiziert werden. Jeweils bei 1,2% der erlegten Wildschweine wurde *M. bovis/BCG* und *M. africanum/microti/pinnipedii/caprae* nachgewiesen. 0,2% der Probanden wurden PCR-positiv auf *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* getestet. Hinsichtlich der Prävalenzen konnten signifikante Unterschiede zwischen den in den verschiedenen Bundesländern gelegenen Revieren aufgezeigt werden. Anhand der statistischen Auswertung konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen MTC-Nachweis und Lebensalter oder Körpergewicht festgestellt werden. Die Wildschweine zeigten keine klinische Erkrankung. Sie wurden vielmehr als reine Träger von MTC identifiziert. Erstmals wurde in der deutschen Wildschweinepopulation *M. tuberculosis* nachgewiesen. Dagegen wurden Spezies des MAC molekularbiologisch deutlich seltener, nämlich *M. avium ssp.*

paratuberculosis in nur 0,2% der Fälle und *M. avium* ssp. *avium/hominissuis* gar nicht detektiert.

Diese Studie liefert erstmals flächendeckende Ergebnisse zum Auftreten einzelner Mykobakterienspezies bei Wildschweinen in Deutschland. Die eingesetzten PCR-Systeme zeigten sich für epidemiologische Studien als zeitsparende und sinnvolle Alternative zur kulturellen Anzucht. So kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Wildschweine viel öfter als bisher angenommen mit *M. tuberculosis* infiziert sind, während die Prävalenz von MAP auf einem sehr niedrigen Niveau liegt. Allerdings erlaubt die Untersuchung anhand der einbezogenen Tierzahlen noch keine Aussage darüber, welche epidemiologische Rolle das Wildschwein hinsichtlich der Verbreitung von Mykobakterien insgesamt einnimmt.

9 Summary

Mycobacteria (M.) are the initiators of mycobacterial infections and tubers in humans and animals. Outbreaks of paratuberculosis and tuberculosis may cause major economic losses. Mycobacteria have a broad host range and may also occasionally infect humans. Within the last few years, the number of mycobacteria in patients with immunodeficiency is becoming noticeable. In industrialized countries the bovine tuberculosis shall be deemed to be deleted. Nevertheless the bovine tuberculosis occurs sporadically. Often wild animals are associated in this case. The wild boar is a species, of which there was a population explosion during the last decades. This thesis is dedicated to investigate wild boars on the occurrence of selected species of mycobacteria in Germany.

The mesenteric lymphnodes of 428 wild boars from the most diverse regions of Germany have been screened on species of the *Mycobacterium avium complex* (MAC) and the *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) by using the method of PCR. For this purpose, various primer pairs, either already described in the literature or custom-designed, were tested for specificity and analytical sensitivity.

At the time of the investigation in 18% of the sampled animals DNA of the MTC was detected. 2.8% of these wild boars were identified as carriers for *M. tuberculosis*. 1.2% as carriers with each *M. bovis/BCG* and *M. africanum/microti/pinnipedii/caprae*. 0.2% of the individuals were tested PCR-positive for *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*. Results differed significantly between the prevalences in the districts of the different provinces. The results of the statistical evaluation did not show any significant correlation between the presence of MTC-DNA and the age or body weight. None of the wild boars showed any clinically disease. They were however identified as carriers of MTC. *M. tuberculosis* in German wild boar populations has been proven for the first time. However, using the method of molecular biology, species of the MAC were detected at low frequencies. In particular, *M. avium ssp. paratuberculosis* was detected in 0.2% of the cases and *M. avium ssp. avium/hominissuis* was not detected at all.

This study provides the first nation-wide results regarding the occurrence of single mycobacteria species among wild boars in Germany. The PCR-systems used for the present epidemiological study, appeared to be a time-saving and reasonable alternative for cultivation. It can be concluded that *M. tuberculosis* infected wild boars occur more often than previously assumed, while the prevalence of MAP is on a very low level. Because of the relatively low numbers of individuals included in the present study, a clear conclusion towards the overall epidemiological role of wild boars as a reservoir for mycobacteria can not terminatory be concluded.

10 Literaturverzeichnis

ACEVEDO P., VICENTE J., HOFLE U., CASSINELLO J., RUIZ-FONS F., GORTAZAR C. (2007): Estimation of European wild boar relative abundance and aggregation: a novel method in epidemiological risk assessment. *Epidemiology and Infection*. 135: 519-527.

ACEVEDO-WHITEHOUSE K., VICENTE J., GORTAZAR C., HOFLE U. FERNANDEZ-DE-MERA I. G., AMOS W. (2005): Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Molecular Ecology*. 14: 3209-3217.

ADAMS W. (2001): Paratuberkulose bei Schaf und Ziege in Westfalen-Lippe.
<http://www.landwirtschaftskammer.de/landwirtschaft/tiergesundheit/hgd/paratuberkulose.htm>

AGUILAR LEON D., ZUMARRAGA M. J., JIMENEZ OROPEZA R., GIOFFRE A. K., BERNARDELLI A., OROZCO ESTEVEZ H., CATALDI A. A., HERNANDEZ PANDO R. (2009): *Mycobacterium bovis* with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*. 157: 139-147.

AHL A. (1994): The swine fever situation in Germany in 1992 and 1993. *Deutsches Tierärzteblatt*. 42: 314-316.

AKINEDEN Ö. (2010): persönliche Kommunikation

ALFREDSEN S., SKJERVE E. (1993): An abattoir-based case-control study of risk-factors for mycobacteriosis in Norwegian swine. *Preventive Veterinary Medicine*. 15: 253-259.

ALVAREZ J., JUAN L., DE BRIONES V., ROMERO B., ARANAZ A., FERNANDEZ-GARAYZABAL J. F., MATEOS A. (2005): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in fallow deer and wild boar in Spain. *Veterinary Record*. 156: 212-213.

ANON (1981): Bovine tuberculosis in badgers. *Tubercle*. 62: 145-146.

APPELIUS M. (1995): Einflüsse auf die Populationsdynamik von weiblichen Schwarzwildfrischlingen aus dem nördlichen Regierungsbezirk Braunschweig und dem Forstamt Saupark. *Diss. TiHo Hannover*. Inst. für Wildtierforschung

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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 1785-1789.

ARANAZ A., JUAN L., DE 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 2602-2608.

ARMSTRONG J. A., HART P. D. (1975): Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *Journal of Experimental Medicine*. 142: 1-16.

BACHVAROVA Y., LIKOV B., TZVETKOV Y., KAROV R. (1996): Tuberculosis in wild boars. *Proceedings of the International Union of Game Biologists 22. Congress*. 492-494.

BAESS I. (1983): Deoxyribonucleic acid relationships between different serovars of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect.* 91: 201-203.

BALASUBRAMANIAN V., WIEGESHAUS E. H., TAYLOR B. T., SMITH D. W. (1994): Pathogenesis of tuberculosis: pathway to apical localization. *Tubercle & Lung Disease*. 75: 168-78.

BALIAN S. C., RIBEIRO P., VASCONCELLOS S. A., PINHEIRO S. R., NETO J. S. F., GUERRA J. L., XAVIER J. G., MORAIS Z. M., TELLES M. A. S. (1997): Tuberculous lymphadenitis in slaughtered pigs from Sao Paulo State (Brazil): gross lesions, histopathology and demonstration of mycobacteria. *Revista de Saude Publica*. 31: 391-397.

BANG B. (1906): Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rinde. *Berl. Tierärztl. Wochenschrift*. 50: 759-763.

BANGSOW T., HUCH R., MALE S., MÜLLER (2002): Polymerase-Kettenreaktion. In: SCHIMPF: Gentechnische Methoden. *Spektrum Akadem. Verlag Berlin Heidelberg*. 147-167.

BANNANTINE J.P., ZHANG Q. LI LL., KAPUR V. (2003): Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* belies their divergent growth rates. *BMC Microbiology*. 3: 10.

BAUMGARTNER W., DAMOSER J., KHOL J. L. (2005): Comparison of two studies concerning the prevalence of bovine paratuberculosis (Johne's disease) in Austrian cattle in the years 1995-97 and 2002/03. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*. 92: 274-277.

BEARD P. M., DANIELS M. J., HENDERSON D., PIRIE A., RUDGE K., BUXTON D., RHIND S., GREIG A., HUTCHINGS M. R., MCKENDRICK I., STEVENSON K., SHARP J. M. (2001a): Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J Clin Microbiol*. 39: 1517-1521.

BEARD P. M., RHIND S. M., BUXTON D., DANIELS M. J., HENDERSON D., PIRIE A., RUDGE K., GREIG A., HUTCHINGS M. R., STEVENSON K., SHARP J. M. (2001b): Natural paratuberculosis infection in rabbits in Scotland. *J Comp Pathol*. 124: 290-299.

BERAN V., HAVELKOVA M., KAUSTOVA, J., DVORSKA L., PAVLIK, I. (2006): Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Veterinarni Medicina*. 51: 365-389.

BIEBER C., RUF T. (2005): Population dynamics in wild boar *Sus scrofa*: ecology, elasticity of growth rate and implications for the management of pulsed resource consumers. *Journal of Applied Ecology*. 42: 1203-1213.

BIET F., BOSCHIROLI M. L., THOREL M. F., GUILLOTEAU L. A. (2005): Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Research*. 36: 411-436.

BLOBEL H., SCHLIEßER (1985): Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. *VEB Gustav Fischer Verlag*, Jena. 5: 155-313.

BOBCHENOK A.P., STEKLOVA L.N., VISHNEVSKAIA E.B., MELNIKOVA N.N., VISHNEVSKII B.I. (2002): The detection rate and clinical and diagnostic values of L forms of the pathogen in patients with pulmonary or extrapulmonary tuberculosis. *Problemy Tuberkuleza*. 4, 19-21. IN: BRENNAN P.J., NIKAIIDO H. (1995): The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 64: 29-63.

BODDINGHAUS B., ROGALL T., FLOHR T., BLOCKER H., BOTTGER E. C. (1990): Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 1751-1759.

BOELAERT F., WALRAVENS K., BIRONT P., VERMEERSCH J. P., BERKVENNS D., GODFROID J. (2000): Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Veterinary Microbiology*. 77: 269-281.

BÖTTCHER M. (1997): Kulturelle und serologische Untersuchungen zur Prävalenz der Paratuberkulose im Regierungsbezirk Arnberg. *Vet. Med. Diss. Hannover*

BÖTTCHER J., GANGL A. (2004): *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* – combined serological testing and classification of individual animals and herds. *J. Vet. Med. B*. 51: 443-448.

BOHRßEN A. (2003): Diagnostik von Mykobakterien mittels Polymerase-Kettenreaktion: Nachweis aus Patientenmaterial und Erweiterung der Speziesdiagnostik. *Diss. Tierärztliche Hochschule Hannover*

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. *Journal of Veterinary Medicine*. 47: 337-342.

BOSE M., CHANDER A., DAS R. H. (1993): A rapid and gentle method for the isolation of genomic DNA from mycobacteria. *Nucleic Acids Research*. 21: 2529-30.

BRENNAN P. J., NIKAIIDO H. (1995): The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 64: 29-63.

BRENTROP H., HEIMBERG P. (2005): Paratuberkulose. <http://www.landwirtschaftskammer.de/landwirtschaft/tiergesundheit/rgd/paratuberkulose.htm>

BRIEDERMANN L. (1971): Zur Reproduktion des Schwarzwildes in der Deutschen Demokratischen Republik. *Beitr. Jagt- und Wildforsch*. 7: 169-186.

BRIEDERMANN L. (1986): Schwarzwild. *Verlag Neumann-Neudamm, Melsungen*

BRIEDERMANN L. (1990): Schwarzwild. 2. Auflage, *Verlag Neumann-Neudamm, Melsungen*

BROSCH R., GORDON S. V., MARMIESSE M., BRODIN 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:3684-3689.

BRUNNER J. L., SCHOCK D. M., DAVIDSON E., COLLINS, JAMES P. (2004): Intraspecific reservoirs: Complex life history and the persistence of a lethal ranavirus. *Ecology* (Washington D C). 85:560-566.

BÜLTE M., SCHÖNENBRÜCHER H., ABDULMAWJOOD A. (2005): From farm to fork- *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) as zoonotic agent? *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 118: 377-385.

BULL T. J., MCMINN E. J., SIDI-BOUMEDINE K., SKULL A., DURKIN D., NEILD P., RHODES G., PICKUP R., HERMON-TAYLOR J. (2003): Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology.* 41: 2915-2923.

BUTLER D. (2000): New fronts in an old war. *Nature.* 406: 670-672.

CALENGE C., MAILLARD D., VASSANT J., BRANDT S. (2002): Summer and hunting season home ranges of wild boar (*Sus scrofa*) in two habitats in France. *Game & Wildlife Science.* 19: 281-301.

CARDOSO M. A., CARDOSO R. F., HIRATA R. D. C., HIRATA M. H., LEITE C. Q. F., SANTOS A. C. B., SIQUEIRA V. L. D., OKANO W., ROCHA N. S., LONARDONI M. V. C. (2009): Direct detection of *Mycobacterium bovis* in bovine lymph nodes by PCR. *Zoonoses and Public Health.* 56: 465-470.

CETINKAYA B., ERDOGAN H. M., MORGAN K. L. (1998): Prevalence, incidence and geographical distribution of Johne's disease in cattle in England and the Welsh borders. *Veterinary Record.* 143: 265-9.

CHAPMAN J. S., BERNARD J. S. (1962): The tolerances of unclassified mycobacteria. I. Limits of pH tolerance. *American Review of Respiratory Disease.* 86: 582-583.

CHIODINI R. J., VAN KRUININGEN H. J., THAYER W. R. JR., COUTU J. A. (1986): Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Chron's disease. *J. Clin. Microbiol.* 24: 357-363.

CLARK D. L., KOZICZKOWSKI J. J. R. P. R., CARLSON R. A., ELLINGSON J. L. E. (2008): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science.* 91: 2620-2627.

CLEMENS D.L., HORWITZ M.A. (1995): Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *Journal of Experimental Medicine.* 181: 257-70.

CIRILLO J.D., FALKOW S., TOMPKINS L.S., BERMUDEZ L.E. (1997): Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infection & Immunity.* 65: 3759-67.

COCITO C., GILOT P., COENE M., DE KESEL M., POUPART P., VANNUFFEL P. (1994): Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 7: 328-345.

COLLINS M. T. (1997): *Mycobacterium paratuberculosis*: a potential food-borne pathogen?. *Journal of Dairy Science.* 80: 3445-3448.

COLLINS M. T., SPAHR U., MURPHY P. M. (2001): Ecological characteristics of *M. paratuberculosis*. *Bulletin of the International Dairy Federation.* 362, 32-40.

COMAS I., GAGNEUX S. (2009): The past and future of tuberculosis research. *PLoS Pathogens.* 5.

CORN J. L., MANNING E. J. B. SREEVATSAN S., FISCHER J. R. (2005): Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Applied and Environmental Microbiology.* 71: 6963-6967.

CORNER L. A., BARRETT R. H., LEPPER A. W., LEWIS V., PEARSON C. W. (1981): A survey of mycobacteriosis of feral pigs in the Northern Territory. *Australian Veterinary Journal*. 57: 537-542.

CORNER L. A. L. (2006): The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Veterinary Microbiology*. 112: 303-312.

COTTER P.D., HILL C. (2003): Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*. 67: 429-453.

COUSINS D. V., WHITTINGTON R., MARSH I., MASTERS A., EVANS R. J., KLUVER P. (1999): Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Molecular & Cellular Probes*. 13: 431-442.

COUSINS D. V., WILLIAMS S. N., HOPE A., EAMENS G. J. (2000): DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Australian Veterinary Journal*. 78: 184-190.

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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 1305-1314.

CROSSLEY B. M., ZAGMUTT-VERGARA F. J., FYOCK T. L., WHITLOCK R. H., GARDNER I. A. (2005): Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows. *Veterinary Microbiology*. 107: 257-263.

CVETNIC Z., KOVACIC H., OCEPEK M. (1998): Mycobacteria in the environment and feed of pigs in Croatia. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*. 85: 18-21.

CVETNIC Z., SPICIC S., BENIC M., KATALINIC-JANKOVIC V., PATE M., KRT B. OCEPEK M. (2007): Mycobacterial infection of pigs in Croatia. *Acta Veterinaria Hungarica*. 55: 1-9.

DALCHOW W. (1988): Mycobacteriosis in swine fed on cereal waste water. *Tierärztliche Umschau*. 43: 62-74.

DANIELS M. J., HENDERSON D., GREIG A., STEVENSON K., SHARP J. M., HUTCHINGS M. R. (2003): The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. *Epidemiology & Infection*. 130: 553-559.

DASZAK P., CUNNINGHAM A. A., HYATT A. D. (2000): Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science (Washington)*. 287: 443-449.

DAVID H. L., JAHAN M. T., JUMIN A., GRANDRY J., LEHMAN E. H. (1978): Numerical taxonomy analysis of *Mycobacterium africanum*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 28: 464-472.

DAWSON D.J. (1990): Infection with *Mycobacterium avium complex* in Australian patients with AIDS. *Medical Journal of Australia*. 153(8):466-8

DIDENKO V. (2001): DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *BioTechniques*. 31: 1106-16.

DELAHAY R. J., CHEESEMAN C. L., CLIFTON-HADLEY R. S. (2001): Wildlife disease reservoirs: the epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in the European badger (*Meles meles*) and other British mammals. *Tuberculosis*. 81: 43-49.

DE LISLE G. W. (1994): Mycobacterial infections in pigs. *Surveillance (Wellington)*. 21: 23-25.

DE LISLE G. W., DE BENGIS R. G., SCHMITT S. M., O'BRIEN, D. J. (2002): Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. *Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties*. 21: 317-334.

DE LISLE G. W., MACKINTOSH C. G., BENGIS R. G. (2001): *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Revue Scientifique et Technique*. 20: 86-111.

DEUTSCHES MAISKOMITEE e. V:

www.maiskomitee.de/web/intranetHomepages.aspx?hp=30a01c5a-cb8c-9314-9398-742c9d12a03e

DEUTZ A., SPERGSER J., WAGNER P., ROSENGARTEN R., KOFER J. (2005): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in wild animal species and cattle in Styria/Austria. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*. 118: 314-320.

DOMINGOS M., AMADO A., BOTELHO A. (2009): IS1245 RFLP analysis of strains of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* isolated from pigs with tuberculosis lymphadenitis in Portugal. *Vet Rec*.164: 116-120.

DONAGHY J. A., TOTTON N. L., ROWE M. T. (2003): Evaluation of culture media for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Cheddar cheese. *Letters in Applied Microbiology*. 37: 285-291.

DONAT K., EULENBERGER K., KAEMPFER P. (2005): Seroprevalence of paratuberculosis in cattle in Saxony. *Tierärztliche Umschau*. 60: 497-501.

DONSEL D. J., VAN LARKIN E. P. (1977): Persistence of *Mycobacterium bovis* BCG in soil and on vegetables spray-irrigated with sewage effluent and sludge. *Journal of Food Protection*. 40: 160-163.

DREIER S., KHOL J. L., STEIN B., FUCHS K., GUTLER S., BAUMGARTNER W. (2006): Serological, bacteriological and molecularbiological survey of paratuberculosis (Johne's disease) in Austrian cattle. *Journal of Veterinary Medicine Series B*. 53: 477-81.

DVORSKA L., PARMOVA I., LAVICKOVA M., BARTL J., VRBAS V., PAVLIK I., (1999): Isolation of *Rhodococcus equi* and atypical mycobacteria from lymph nodes of pigs and cattle in herds with the occurrence of tuberculoid gross changes in the Czech Republic over the period of 1996-1998. *Veterinarni Medicina*. 44: 321-330.

DVORSKA L., BARTOS M., OSTADAL O., KAUSTOVA J., MATLOVA L., PAVLIK I. (2002): IS1311 and IS1245 restriction fragment length polymorphism analyses, serotypes, and drug susceptibilities of *Mycobacterium avium complex* isolates obtained from a human immunodeficiency virus-negative patient. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 3712-3719.

DZIADEK J., SAJDUDA A., BORUN M. (2001): Specificity of insertion sequence-based PCR assays for *Mycobacterium tuberculosis complex*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 5: 569-574.

ELLINGSON J. L., BOLIN C. A., STABEL J. R. (1998): Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Molecular & Cellular Probes*. 12:133-42.

ELLSWORTH S., KIRKBRIDE C. A., JOHNSON D. D. (1980): Excretion of *mycobacterium-avium* from lesions in the intestines and tonsils of infected swine. Source: *American journal of veterinary research*. 41: 1526-1530.

ELSCHNER M., HORNER S. (2003): Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen Thüringens sowie Erfahrungen. http://innlab-dvg.de/fileadmin/Bilder/PDF_AVID_Alt/mycobact/elschner.pdf

ENGLUND S., BOLSKE G., JOHANSSON K. E. (2002): An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letter*. 209: 267-271.

EVERITT J., ACKLAND H.M., WHITLOCK R.H. (1982): Mycobacterial infections in swine. *Cal. Vet.* 3: 16-18.

EVES J. A. (1999): Impact of badger removal on bovine tuberculosis in east County Offaly. *Irish Veterinary Journal*. 52: 199-203.

FEIZABADI M. M., ROBERTSON I. D., COUSINS D. V., HAMPSON D. J. (1996): Genomic analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the *Mycobacterium tuberculosis complex* by isoenzyme analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 34:1136-42.

FENOLLAR F., RAOULT D. (2004): Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *APMIS, Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 112: 785-807.

FISCHER O. A., MATLOVA L., DVORSKA L., SVASTOVA P., BARTL J., MELICHAREK I., WESTON R. T., PAVLIK I. (2001): Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. *Medical and Veterinary Entomology*. 15: 208-211.

FISCHER O. A., MATLOVA L., DVORSKA L., SVASTOVA P., PAVLIK I. (2003): Nymphs of the Oriental cockroach (*Blatta orientalis*) as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis. *Medical & Veterinary Entomology*. 17: 145-150.

FISCHER O. A., MATLOVA L., DVORSKA L., SVASTOVA P., BARTL J., WESTON R.T., PAVLIK I. (2004): Blowflies *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata* as passive vectors of *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *M. a. paratuberculosis* and *M. a. hominissuis*. *Medical & Veterinary Entomology*. 18:116-122.

FISCHER O. A., MATLOVA L., DVORSKA L., SVASTOVA P., BARTOS M., WESTON R. T., KOPECNA M., TRCKA I., PAVLIK I. (2005): Potential risk of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* spread by syrphid flies in infected cattle farms. *Medical and Veterinary Entomology*. 19: 360-366.

FISCHER O. A., MATLOVA L., DVORSKA L., SVASTOVA P., BARTOS M., WESTON R. T., PAVLIK I. (2006): Various stages in the life cycle of syrphid flies (*Eristalis tenax*; Diptera: Syrphidae) as potential mechanical vectors of pathogens causing mycobacterial infections in pig herds. *Folia Microbiologica*. 51: 147-153.

FISCHER M. (2010): persönliches Gespräch

FLYNN O., EGAN J., O'GRADY D., GOOD M. (2005): Inactivation of *Mycobacterium* ssp. *Paratuberculosis* (MAP) in bovine slurry. 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Kopenhagen, Dänemark.

FOMUKONG N. G., TANG T. H., AL-MAAMARY S., IBRAHIM W. A., RAMAYAH S., YATES M., ZAINUDDIN Z. F., DALE J. W. (1994): Insertion sequence typing of *Mycobacterium tuberculosis*: characterization of a widespread subtype with a single copy of IS6110. *Tubercle & Lung Disease*. 75: 435-440.

FROTHINGHAM R., HILLS H. G., WILSON K. H. (1994): Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 32:1639-43.

FRY K. L., MEISSNER P. S., FALKINHAM J. O. 3RD. (1986): Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. VI. Identification and use of epidemiologic markers for studies of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum*. *Am Rev Respir Dis*. 134: 39-43.

FÜLLGRABE R. A. R. (2008): Untersuchungen zum kulturellen und molekularbiologischen Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) aus humanen Darmbiotaten. *Vet. Med. Diss. Gießen*.

FUJIMURA Y., OWEN R. L. (1996): M cells as portals of infection: clinical and pathophysiological aspects. *Infectious Agents & Disease*. 5:144-56.

GARDNER I. A., HIRD D. W. (1989): Environmental source of mycobacteriosis in a california swine herd. Source: *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*. 53: 33-37.

GAUDIER B., GERNEZ-RIEUX C. (1962) : Experimental study of the vitality of BCG in the gastrointestinal tract of non-allergic children vaccinated orally. *Archive Ann Inst Pasteur Lille*. 13: 77-87.

GAVIER-WIDEN D., COOKE M. M., GALLAGHER J., CHAMBERS M. A., GORTAZAR C. (2009): A review of infection of wildlife hosts with *Mycobacterium bovis* and the diagnostic difficulties of the 'no visible lesion' presentation. *New Zealand Veterinary Journal*. 57: 122-131.

GENOV I. (1965): The effect of certain physical and chemical agents on *Mycobacterium tuberculosis*. *Veterinärmedizin*. 2: 97-107.

GLAWISCHNIG W., ALLERBERGER F., MESSNER C., SCHONBAUER M., PRODINGER W. M. (2003): Tuberculosis in free-living red deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) in the northern Alps. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*. 90: 38-44.

GLÄSER S. (2001): Pyrosequencing™ als Plattform für die angewandte Genanalyse. *Biospektrum* 3.01. 7: 275-276.

GONZALEZ-Y-MERCHAND J. A., GARCIA M. J., GONZALEZ-RICO S., COLSTON M. J., COX R. A. (1997): Strategies used by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria to synthesize rRNA. *Journal of Bacteriology*. 179: 6949-6958.

GOOD R. C.(1985): Opportunistic pathogens in the genus *Mycobacterium*. *Annu Rev Microbiol*. 39: 347-369.

GORDEJO F. J. R., VERMEERSCH J. P. (2006): Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Veterinary Microbiology*. 112: 101-109.

GORTAZAR C., VICENTE J., GAVIER-WIDEN D. (2003): Pathology of bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Veterinary Record*. 152: 779-780.

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: 2776.

GOWTAGE-SEQUEIRA S., PATERSON A., LYASHCHENKO K. P., LESELLIER S., CHAMBERS M. A. (2009): Evaluation of the CervidTB STAT-PAK for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in wild deer in Great Britain. *Clinical and Vaccine Immunology*. 16: 1449-1452.

GRAHAM D. Y., MARKESICH D. C., YOSHIMURA H. H. (1987): Mycobacteria and inflammatory bowel disease results of culture. *Gastroenterology*. 92: 436-442.

GREIG A., STEVENSON K., HENDERSON D., PEREZ V., HUGHES V., PAVLIK I., HINES M. E., MCKENDRICK I., SHARP J. M. (1999): Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 1746-51.

GREWAL S. K., RAJEEV S., SREEVATSAN S., MICHEL F. C. JR. (2006): Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing, and liquid storage of dairy manure. *Applied & Environmental Microbiology*. 72: 565-74.

HABERMEHL K. H. (1985): Altersbestimmung bei Wild- und Pelztieren. 2. Auflage, *Verlag Paul Parey*

HACKER U., HUTTNER K., KONOW M. (2004): Investigation of serological prevalence and risk factors of paratuberculosis in dairy farms in the state of Mecklenburg-Westpommern, Germany. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*. 117: 140-144.

HAHN N., EISFELD D. (1998): Diet and habitat use of wild boar (*Sus scrofa*) in SW-Germany. *Gibier Faune Sauvage*. 15: 595-606.

HAGAN W., ZEISSIG A. (1933): Six years experience with a herd experimentally infected with Johne's disease. *Cornell Vet*. 23: 1-15.

HALLDORSOTTIR S., ENGLUND S., NILSEN S. F., OLSAKER I., (2002): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by buoyant density centrifugation, sequence capture PCR and dot blot hybridization. *Veterinary Microbiology*. 87: 327-340.

HARRIS N. B., BARLETTA R. G. (2001): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clinical Microbiology Reviews*. 14: 489-512.

HENRY G.V. (1968): Length of oestrus cycle and Gestation in European Wild Hogs. *J. Wildl. Manage*. 32: 966-970.

HIGUCHI R., DOLLINGER G., WALSH P. S., GRIFFITH R. (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y.)* 10: 413-417.

HIGUCHI R., C. FOCKLER, DOLLINGER G., WATSON R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification directions. *Biotechnology (N.Y.)* 11: 1026-1030.

HINES S. A., BUERGELT C. D., WILSON J. H., BLISS E. L. (1987): Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 190: 681-683.

HINGER M., BRANDT H., ERHARDT G. (2008): Heritability estimates for antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in German Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*. 91: 3237-3244.

HORSBURGH C. R. JR. (1991): *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*. 324: 1332-1338.

HOSEK J., SVASTOVA P., MORAVKOVA M., PAVLIK I., BARTOS M. (2006): Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. *Veterinarni Medicina*. 51: 180-192.

HOWELLS O., EDWARDS-JONES G. (1997): A feasibility study of reintroducing wild boar *Sus scrofa* to Scotland: are existing woodlands large enough to support minimum viable populations. *Biological Conservation*. 81: 77-89.

HUARD R. C., LAZZARINI L. C., BUTLER W. R., VAN SOOLINGEN D., HO J. L. (2003): PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 1637-50.

HURLEY S. S., SPLITTER G. A., WELCH R. A. (1987): Rapid lysis technique for mycobacterial species. *Journal of Clinical Microbiology*. 25: 2227-2229.

HUDSON P. J., RIZZOLI A., GRENFELL B. T., HEESTERBEEK H., DOBSON A. P. (2002): The ecology of wildlife diseases. *Oxford University Press, New York*

HURLEY S. S., SPLITTER G. A., WELCH R. A. (1988): Deoxyribonucleic acid relatedness of *Mycobacterium paratuberculosis* to other members of the family Mycobacteriaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 38: 143-146.

ICHIKAWA K., YAGI T., MORIYAMA M., INAGAKI T., NAKAGAWA T., UCHIYA K., NIKAI T., OGAWA K. (2009): Characterization of *Mycobacterium avium* clinical isolates in Japan using subspecies-specific insertion sequences, and identification of a new insertion sequence, ISMav6. *Journal of Medical Microbiology*. 58: 945-950.

ICHIYAMA S., SHIMOKATA K., TSUKAMURA M. (1988): The isolation of *Mycobacterium avium complex* from soil, water, and dusts. *Microbiol Immunol.* 32: 733-739.

JOHANSEN T. B., DJONNE B., JENSEN M. R., OLSEN I. (2005): Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited. *Journal of Clinical Microbiology.* 43: 2500-2502.

JOHANSEN K. A., HUGEN E. E., PAYEUR J. B. (2006): Growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the presence of hexadecylpyridinium chloride, natamycin, and vancomycin. *Journal of Food Protection.* 69: 878-883.

JOHNE A., FROTINGHAM L. (1895): Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. *Deutsche Zeitschrift für Thiermedizin und vergleichende Pathologie.* 21: 438-455.

JORGENSEN J.B. (1977): Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nordisk Veterinaermedicin.* 29: 267-270.

KALENSKY P. (1992): Isolation of mycobacteria from wild boars. *Veterinarstvi.* 42: 346-347.

KAUFMANN S. H. (2001): How can immunology contribute to the control of tuberculosis?. *Nature Reviews.* 1: 20-30.

KELLY W. R., COLLINS J. D. (1978): The health significance of some infectious agents present in animal effluents. *Veterinary Science Communications.* 2: 95-103.

KEULING O., STIER N., ROTH M. (2008): Annual and seasonal space use of different age classes of female wild boar *Sus scrofa L.* *European Journal of Wildlife Research.* 54: 403-412.

KINDINGER (1934): Tuberkulose in freier Wildbahn. *Vet .Med. Diss. Gießen*

KNELL S., WILLEMS H., HERTRAMPF B., REINER G. (2005): Prevalences of porcine circoviruses in selected populations of feral pigs in Germany. *Tierärztliche Praxis*. 33: 247-253.

KÖHLER H., GEUE L., CONRATHS F. (2003): Zur Paratuberkulose-Situation in Deutschland. *Amtstierärztl. Dienst Lebensmittelkontr.* 1:40-44.

KOMIJJN R. E., DE HAAS P. E., SCHNEIDER M. M., EGER T., NIEUWENHUIJS J. H., VAN DEN HOEK R. J., BAKKER D., VAN ZIJD ERVELD F. G., VAN SOOLINGEN D. (1999): Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs in The Netherlands and comparison of IS1245 restriction fragment length polymorphism patterns of porcine and human isolates. *J Clin Microbiol.* 37: 1254-1259.

KOPECKY K. E., LARSEN A. B., MERKAL R. S. (1967): Uterine infection in bovine paratuberculosis. *American Journal of Veterinary Research*. 28: 1043-1045.

KOPECNA M., ONDRUS S., LITERAK I., KLIMES J., HORVATHOVA A., MORAVKOVA M., BARTOS M., TRCKA I., PAVLIK I. (2006): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in two brown bears in the central European Carpathians. *Journal of Wildlife Diseases*. 42: 691-695.

KOPECNA M., TRCKA I., LAMKA J., MORAVKOVA M., KOUBEK P., HEROLDOVA M., MRLIK V., KRALOVA A., PAVLIK I. (2008): The wildlife hosts of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Czech Republic during the years 2002-2007. *Veterinarni Medicina*. 53: 420-426.

LACHNIK J. (2002): Parallele Identifizierung des Genus *Mycobacterium* und des *M. tuberculosis*-Komplexes bzw. *M. avium* am Lightcycler. *Vet. med. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover*

LAMBRECHT R. S., CARRIERE J. F., COLLINS M. T. (1988): A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. *Applied & Environmental Microbiology*. 54: 910-916.

LANDT O. (2006): Genotypisierung-sondenbasierte Methoden im Vergleich. *BIOspektrum*. 1: 101-102.

LARSEN A. B., MERKAL R. S., VARDAMAN T. H. (1956): Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*. 17: 549-551.

LARSEN A. B., KOPECKY K. E. (1970): *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *American Journal of Veterinary Research*. 31: 255-258.

LI L., BANNANTINE J. P., ZHANG Q., AMONSIN A., MAY B. J., ALT D., BANERJI N., KANJILAL S., KAPUR V. (2005): The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 12344-12349.

LITTLE T. W. A., NAYLOR P. F., WILESMITH J. W. (1982): Laboratory study of *Mycobacterium bovis* infection in badgers and calves. *Veterinary Record*. 111: 550-557.

LOPEZ B., AGUILAR D., OROZCO H., BURGER M., ESPITIA C., RITACCO V., BARRERA L., KREMER K., HERNANDEZ-PANDO R., HUYGEN K., VAN SOOLINGEN D. (2003): A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clinical & Experimental Immunology*. 133: 30-37.

LOVELL R., LEVI M., FRANCIS J. (1944): Studies on the survival of Johne's bacilli. *Journal of Comparative Pathology*. 54: 120-129.

LUGTON I. (1999): Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. *Immunology & Cell Biology*. 77: 364-72.

MACHACKOVA M., MATLOVA L., LAMKA J., SMOLIK J., MELICHAREK I., HANZLIKOVA M., DOCEKAL J., CVETNIC Z., NAGY G., LIPIEC M., OCEPEK M., PAVLIK J. (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. *Veterinarni Medicina*. 48: 51-65.

MADDOCK E. C. G. (1933): Studies on the Survival Time of the Bovine Tubercle Bacillus in Soil, Soil and Dung, in Dung and on Grass, with Experiments on the Preliminary Treatment of Infected Organic Matter and the Cultivation of the Organism. *Journal of Hygiene*. 33: 103-117.

MAEDER S., HARS J., RAMBAUD T., GAME Y., BOSCHIROLI M. L. (2008): Role of wild boar (*Sus scrofa*) in the epidemiology of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in the Brotonne forest (Normandy, France) - results of the 2006-2007 epidemiological survey. *Epidemiologie et Sante Animale*. 53 : 129-144.

MARTIN-ATANCE P., PALOMARES F., GONZALEZ-CANDELA M., REVILLA E., CUBERO M. J., CALZADA J., LEON-VIZCAINO L. (2005): Bovine tuberculosis in a free ranging red fox (*Vulpes vulpes*) from Donana National Park (Spain). *Journal of Wildlife Diseases*. 41: 435-436.

MARTIN-HERNANDO M. P., HOFLE U., VICENTE J., RUIZ-FONS F., VIDAL D., BARRAL M., GARRIDO J. M., FUENTE J., DE LA GORTAZAR C. (2007): Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis complex* infection in the European wild boar. *Tuberculosis*. 87: 360-367.

MATLOVA L, DVORSKA L, AYELE WY, BARTOS M, AMEMORI T, PAVLIK I. (2005): Distribution of *Mycobacterium avium complex* isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement. *J Clin Microbiol*. 43: 1261-1268.

MATLOVA L., DVORSKA L., PALECEK K., MAURENC L., BARTOS M., PAVLIK I., (2004): Impact of sawdust and wood shavings in bedding on pig tuberculous lesions in lymph nodes, and IS1245 RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* of serotypes 6 and 8 isolated from pigs and environment. *Veterinary Microbiology*. 102: 227-236.

MCINERNEY J., SMALL K. J., CALEY, P. (1995): Prevalence of *Mycobacterium bovis* infection in feral pigs in the Northern Territory. *Australian Veterinary Journal*. 72: 448-451.

MEDINA E., RYAN L., LACOURSE R., NORTH R. J. (2006): Superior virulence of *Mycobacterium bovis* over *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) for Mtb-resistant and Mtb-susceptible mice is manifest as an ability to cause extrapulmonary disease. *Tuberculosis*. 86: 20-27.

MERKAL R. S. (1984): Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 184: 939-943.

MEURER D. G., WOLF S. (2007): Allgemeine Pathologie. *Schattauer Verlag*, 2. Auflage. 215.

METCHOCK B.G., NOLTE F.S., WALLACE R.J. (1999): *Mycobacterium*. In: MURRAY P.R., BARON E.J., PFALLER M.A., TENOVER F. C., YOLKEN R.H. *Manual of Microbiology*. 7. Aufl., ASM Press, Washington DC. 399-437.

MEYER S., GROßPIETSCH R., OETJEN M., BORGMANN-FUCHS D., FRIES, R. (2007): Prävalenz und Prädilektionsstellen von Mykobakterien des MAIC beim Schlachtschwein.

http://www.bfr.bund.de/cm/208/vorkommen_von_pathogenen_mykobakterien_bei_mastschweinen.pdf

MEYNHARDT H. (1988): Schwarzwild-Report- Mein Leben unter Wildschweinen. 7. Auflage, *Neumann-Neudamm-Verlag*, Melsungen

MIJS W., DE HAAS P., ROSSAU R., VAN DER LAAN T., RIGOUTS L., PORTAELS F., VAN SOOLINGEN D. (2002): Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52: 1505–1518.

MILIAN SUAZO F., ANAYA E. A. M., GALLEGOS T. R. M. (2003): A review of *M. bovis* BCG protection against TB in cattle and other animals species. *Preventive Veterinary Medicine.* 58: 1-13.

MILLER J. M., JENNY A. L., PAYEUR J. B. (2002) : Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis complex* and *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants. *Veterinary Microbiology.* 87: 15-23.

MILTGEN J., MORILLON M., KOECK J. L., VARNEROT A., BRIANT J. F., NGUYEN G., VERRROT D., BONNET D., VINCENT V. (2002): Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *Canetti*. *Emerg Infect Dis.* 8: 1350-1352.

MÖBIUS P., LENTZSCH P., MOSER I., NAUMANN L., MARTIN G., KOHLER H. (2006): Comparative macrorestriction and RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from man, pig, and cattle. *Veterinary Microbiology.* 117: 284-291.

MOHAMED A. M., EL-ELLA G. A. A., NASR E. A. (2009): Phenotypic and molecular typing of tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species from slaughtered pigs in Egypt. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 21: 48-52.

MOMOTANI E., WHIPPLE D. L., THIERMANN A. B., CHEVILLE N. F. (1988): Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Veterinary Pathology.* 25, 131-137.

MORRIS R. S., PFEIFFER, D. U., JACKSON R. (1994): The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary Microbiology*. 40: 153-177.

MOSER I. (2009): persönliche Kommunikation

MOSTOWY S., COUSINS D., BRINKMAN J., ARANAZ A., BEHR M. A. (2002): Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Infectious Diseases*. 186: 74-80.

MÜHLHARDT C. (2009): Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. *Spektrum Akademie Verlag*. 99.

MÜLLER M., NAUMANN LUDMILA, WEBER A., EHRLEIN J., EWRINGMANN T., KRISCH ADRIANE, KAHLAU DAGMAR. (2007): Detection of *Mycobacterium tuberculosis complex* in wild boars by PCR. Nuchweis des Mycobacterium tuberculosis-Komplexes bei Wildschweinen mittels PCR. *Tierärztliche Umschau*. 62: 140-143.

MULLIS K. B., FALOONA F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 155: 335-350.

MURTY M. V., VENKITASUBRAMANIAN T. A. (1983): Growth and macromolecular synthesis of spheroplasts of *Mycobacterium smegmatis* ATCC 14468. *Annales de Microbiologie*. 134: 359-365.

MUSKENS J., ELBERS A. R., VAN WEERING H. J., NOORDHUIZEN J. P. (2003): Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds. *Journal of Veterinary Medicine Series B*. 50: 372-377.

NARANJO V., GORTAZAR C., VICENTE J., FUENTE J. DE LA (2008a): Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis complex*. *Veterinary Microbiology*. 127.

NARANJO V., ACEVEDO-WHITEHOUSE K., VICENTE J., GORTAZAR C., FUENTE J. DE LA (2008b): Influence of *methylmalonyl-CoA mutase* alleles on resistance to bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Animal Genetics*. 39: 316-320.

NEEF J. (2009): Untersuchungen zur Reproduktionsdynamik beim mitteleuropäischen Wildschwein. *Vet. med. Dissertation Gießen*

NEILL S. D., POLLOCK J. M., BRYSON D. B., HANNA J. (1994): Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*. 40: 41-52.

NEPAL R. M., MAMPE S., SHAFFER B., ERICKSON A. H., BRYANT P. (2006): Cathepsin L maturation and activity is impaired in macrophages harboring *M. avium* and *M. tuberculosis*. *International Immunology*. 18: 931-939.

NEUSSER M. (2001): Schnelles Verfahren der PCR-Optimierung mit „Real-Time“-PCR. *BIOspektrum*. 7: 539-541.

NIEMANN S., RICHTER E., RÜSCH-GERDES S. (2002a): 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: 433-436.

NIEMANN S., RICHTER E., DALUGGE-TAMM H., SCHLESINGER H., GRAUPNER D., KONIGSTEIN B., GURATH G., GREINERT U., RUSCH-GERDES S. (2000): Two cases of *Mycobacterium microti* derived tuberculosis in HIV-negative immunocompetent patients. *Emerging Infectious Diseases*. 6: 539-542.

NIGHTINGALE S. D., BYRD L. T., SOUTHERN P. M., JOCKUSCH J. D., CAL S. X., WYNNE B. A. (1992): Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *Journal of Infectious Diseases*. 165:1082-1085.

NOLAN A., WILESMITH J. W. (1994): Tuberculosis in badgers (*Meles meles*). *Veterinary Microbiology*. 40: 179-191.

NUGENT G., WHITFORD J., YOUNG N. (2002): Use of released pigs as sentinels for *Mycobacterium bovis*. *Journal of Wildlife Diseases*. 38: 665-677.

OFFERMANN U., BODMER T., AUDIGE L., JEMMI T. (1999): Prevalence of *Salmonella*, *Yersinia* and *Mycobacteria* in Swiss slaughter pigs. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. 141: 509-515.

ODUMERU J., GAO A. C. S, RAYMOND M., MUTHARIA L. (2001): Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis* template DNA in milk. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 65: 201-205.

OH Y. K., STRAUBINGER R. M. (1996): Intracellular fate of *Mycobacterium avium*: use of dual-label spectrofluorometry to investigate the influence of bacterial viability and opsonization on phagosomal pH and phagosome-lysosome interaction. *Infection & Immunity*. 64: 319-325.

O'MAHONY J., HILL C. (2002): A real time PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler. *Journal of Microbiological Methods*. 51: 283-293.

O'REILLY L. M., DABORN C. J. (1995): The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle & Lung Disease*. 76: 1-46.

OTT S. L., WELLS S. J., WAGNER, B. A. (1999): Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Preventive Veterinary Medicine*. 40: 179-192.

PALMER M., V. STOFFREGEN W., CARPENTER C., STABEL J. G., JUDITH R. (2005): Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Map) from feral cats on a dairy farm with map-infected cattle. *Journal of Wildlife Diseases*. 41: 629-635.

PARK H., JANG H., KIM C., CHUNG B., CHANG C. L., PARK S. K., SONG S. (2000): Detection and identification of mycobacteria by amplification of the internal transcribed spacer regions with genus- and species-specific PCR primers. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 4080-4085.

PARRA A., FERNANDEZ-LLARIO P., TATO A., LARRASA J., GARCIA A., ALONSO J. M., HERMOSO DE MENDOZA M., HERMOSO DE MENDOZA J. (2003): Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Veterinary Microbiology*. 97: 123-133.

PAVLAS M. (1998): Occurrence, diagnosis and pathogenic significance of mycobacterial infections in pigs. *Veterinarstvi*. 48: 482-487.

PAVLIK I., MATLOVA L., DVORSKA L., BARTL J., OKTABCOVA L., DOCEKAL J., PARMOVA I. (2003a): Tuberculous lesions in pigs in the Czech Republic during 1990-1999: occurrence, causal factors and economic losses. *Veterinarni Medicina*. 48: 113-125.

PAVLIK I., AYELE W. Y., PARMOVA I., MELICHAREK I., HANZLIKOVA M., SVEJNOCHOVA M., KORMENDY B., NAGY G., CVETNIC Z., KATALINIC-JANKOVIC V., OCEPEK M., ZOLNIR-DOVC M., LIPIEC M., HAVELKOVA M., (2003b): *Mycobacterium tuberculosis* in animal and human populations in six Central European countries during 1990-1999. *Veterinarni Medicina*. 48: 83-89.

PAVLIK I. (2006): The experience of new European Union Member States concerning the control of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*. 112: 221-230.

PEARSON J. K. L., MCCLELLAND T. G. (1955): Uterine infection and congenital Johne's disease in cattle. *Veterinary Record*. 67: 615-616.

PFYFFER G. E. (2001): BACTEC MGIT 960-neues Verfahren für Kultur und Resistenzprüfung von *M. tuberculosis*. *News, Universitäres Zentrum für Labormedizin und Pathologie*, Zürich. 4: 9-11.

PINSKY B. A., BANAEI N. (2008): Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis complex* members to the species level. *Journal of Clinical Microbiology*. 46: 2241-2246.

POHLMAYER K., SODEIKAT G. (2004): Populationsdynamik und Raumnutzung des Schwarzwildes. http://www.jagd-bayern.eu/fileadmin/_BJV/Akademie/Schwarzwild/BJV-SW-01_Pohlmeier-ber-2_viv.pdf

POLLOCK J. M., NEILL S. D. (2002): *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Veterinary Journal*. 163: 115-127.

POUPART P., COENE M., VAN HEUVERSWYN H., COCITO C. (1993): Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 1601-1605.

PORTAELS F. (1995): Epidemiology of mycobacterial diseases. *Clin Dermatology*. 13: 207-222.

RADFORD A. J., DUFFIELD B. J., PLACKETT P. (1988): Cloning of a species-specific antigen of *Mycobacterium bovis*. *Infection and Immunity*. 56: 921-925.

RAVVA S. V., STANKER L. H. (2005): Real-time quantitative PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and differentiation from other mycobacteria using SYBR Green and TaqMan assays. *Journal of Microbiological Methods*. 63: 305-317.

RAY J. A., MALLMANN V. H., MALLMANN W. L., MORRILL C. C. (1972): Pathologic and bacteriologic features and hypersensitivity of pigs given *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, or group III mycobacteria. *American Journal of Veterinary Research*. 33: 1333-1345.

REDDACLIFF L. A., VADALI A., WHITTINGTON L. A. (2003): The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium aviu* ssp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Veterinary Microbiology*, 95: 271-282.

REINER G., FRESEN C., BRONNERT S., WILLEMS H. (2009): Porcine Reproductive and *Respiratory Syndrome Virus* (PRRSV) infection in wild boars. *Veterinary Microbiology*. 136: 250-258.

RHEINLAND PFALZ : MINISTERIUM FÜR UMWELT, FORSTEN UND VERBRAUCHERSCHUTZ, 2009: Waldzustandsbericht 2009. <http://www.mufv.rlp.de/index.php?id=6239>

RICHTER E., WEIZENEGGER M., RÜSCH-GERDES S., NIEMANN S. (2003): Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis complex* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2672-5.

RIRIE K. M., RASMUSSEN R. P., WITTEWER C. T. (1997) : Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 245: 154-160.

RITACCO V., KREMER K., VAN DER LAAN T., PIJNENBURG J.E.M., DE HAAS P.E.W, VAN SOOLINGEN D. (1998): Use of IS 901 and IS 1245 in RFLP using of *Mycobacterium avium complex*: relatedness of serovar reference strains, human and animal isolates. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2: 242-251.

ROBINSON P., MORRIS D., ANTIC R. (1988): *Mycobacterium bovis* as an occupational hazard in abattoir workers. *Australian and New Zealand Journal of Medicine.* 18: 701-703.

ROLLE M., MAYR A. (1993): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. *Enke Verlag.* 6: 780.

ROWE M. T., GRANT I. R. (2006): *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. *Letters in Applied Microbiology*. 42: 305-11.

RUIZ-FONS F., SEGALES J., GORTAZAR C. (2008): A review of viral diseases of the European wild boar: effects of population dynamics and reservoir role. *Veterinary Journal*. 176: 158-169.

RUNYON E.H. (1974): Ten mycobacterial pathogens. *Tubercle*. 55: 235-240.

SAITO H., TOMIOKA H., SATO K., TASAKA H., TSUKAMURA M. F., ASANO K., KUZE (1989): Identification and partial characterization of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* by using DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 27: 994-997.

SALFINGER M., KAFADER F. M. (1992): *Mycobacteriaceae*. In BURKHARDT F. (Hrsg.) : Mikrobiologische Diagnostik. *Thieme Verlag*. 269-290.

SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T. (1989): Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*. 2.

SCHMIDBAUER S. M., WOHLSEIN P., KIRPAL G., BEINEKE A., MULLER G., MULLER H., MOSER I., BAUMGARTNER W. (2007): Outbreak of *Mycobacterium bovis* infection in a wild animal park. *Veterinary Record*. 161: 304-307.

SCHNEIDER F. (2003): Entwicklung einer "seminested" PCR und einer „Real-Time-PCR“ zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei Rindern. *Vet. med. Diss. München*

SCHULZ G., DEUTER H., DEDEK J. (1992): Zum Vorkommen von *Mycobacterium bovis*-Infektionen bei freilebendem Schwarzwild. *Verh.-ber. Erkr. Zootiere*. 34: 51-53.

SERRAINO A., MARCHETTI G., SANGUINETTI V., ROSSI M. C., ZANONI R. G., CATOZZI L., BANDERA A., DINI W., MIGNONE W., FRANZETTI F., GORI A. (1999): Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 2766-2771.

SIRIMALAISUWAN A. (2004): Molecular biological studies on *Mycobacterium avium-intracellulare complex* isolated from slaughtered pigs and wildlife animals in Germany. *Vet. med. Diss. Freie Universität Berlin*

SMITH R. M. M., DROBNIEWSKI F., GIBSON A., MONTAGUE J. D. E., LOGAN M. N., HUNT D., HEWINSON G., SALMON R. L., O'NEILL B. (2004): *Mycobacterium bovis* infection, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*. 10: 539-541.

SONGERJ. G., POST K. W. (2005): Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease. *Elsevier Saunders*. 1: 95-109.

SREEVATSAN S., PAN X., ZHANG Y., KREISWIRTH B. N., MUSSER J. M. (1997a): Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis complex* organisms. *Antimicrob Agents Chemother*. 41: 636-640.

SREEVATSAN S., PAN X., STOCKBAUER K. E., CONNELL N. D., KREISWIRTH B. N., WHITTAM T. S., MUSSER J. M. (1997b): Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis complex* indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 9869-9874.

STACHELSCHIED H. L. (1989): Zum kulturellen Nachweis von *Mycobacterium paratuberculosis* in Rinderkotproben. Vergleich zweier Dekontaminierungs- und Kulturverfahren. *Vet. med. Diss. Gießen*

STÄRK K., FREI-STÄHELI C., FREI P. P., PFEIFFER D. U., STRASSER N. M., GOTTSTEIN B., KIHM U. (1997): Häufigkeiten und Kosten von Gesundheitsproblemen bei Schweizer Milchkühen und deren Kälbern (1993-1994). *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 139: 343-353.

STAHL D. A., URBANCE J. W. (1990): The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J. Bacteriol.* 172: 116-124.

STEINBROOK R. (2007): Tuberculosis and HIV in India. *New England Journal of Medicine.* 356: 1198-1199.

STEPHAN R. (2007): Diagnostische Systeme zum Nachweis von *Mycobacterium* subsp. *Paratuberculosis*. *J. Verbr. Lebensm.* 2: 222-227.

STIELITZ U. (2005): Untersuchungen zum Verhalten von Radiocäsium in Wildschweinen und anderen Biomedien des Waldes. http://www.environmental-studies.de/Download/FV_4324-Abschlussbericht-2005.pdf

STROMMINGER B., STEVENSON K., GERLACH G. F. (2001): Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters.* 196: 31-37.

SZABO I., TUBOLY S., SZEKY (1975): Swine lymphadenitis due to *Mycobacterium avium* and atypical mycobacteria. I. Pathological studies. *Acta Vet. Hung.* 25: 67-76.

TADDEI R., BARBIERI I., PACCIARINI M. L., FALLACARA F., BELLETTI G. L., ARRIGONI N. (2008): *Mycobacterium porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: implications for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection by PCR and culture. *Veterinary Microbiology.* 130: 338-347.

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*.

THOEN C. O. (1988): Tuberculosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 193: 1045-1048.

THOREL M. F., KRICHEVSKY M., LEVY-FREBAULT V. V. (1990): Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 254-260.

THORNTON C. G., MACLELLAN K. M., BRINK T. L JR., PASSEN S. (1998): In vitro comparison of NALC-NaOH, tween 80, and C18-carboxypropylbetaine for processing of specimens for recovery of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 3558-3566.

TIMPE A., RUNYON E. H. (1954): The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 202-209.

TIRKKONEN T., PAKARINEN J., MOISANDER A. -M., MAEKINEN J., SOINI H., ALI-VEHMAS T. (2007): High genetic relatedness among *Mycobacterium avium* strains isolated from pigs and humans revealed by comparative IS1245 RFLP analysis. *Veterinary Microbiology*. 125: 175-181.

TORTOLI E. (2006): The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 48: 159-178.

TRCKA I., LAMKA J., SUCHY R., KOPECNA M., BERAN V., MORAVKOVA, M., HORVATHOVA A., BARTOS M., PARMOVA I., PAVLIK I. (2006): Mycobacterial infections in European wild boar (*Sus scrofa*) in the Czech Republic during the years 2002 to 2005. *Veterinarni Medicina*. 51: 320-332.

TURENNE C. Y., SEMRET M., COUSINS D. V., COLLINS D. M., BEHR M. A., (2006): Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *Journal of Clinical Microbiology*. 44: 433-440.

TWORT F. W., INGRAM G. L. Y. (1912): A method for isolating and cultivations the *Mycobacterium enteridis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculosis enteritis of bovines. *Proc. Roy. Soc. London*. 99: 1323-1329.

ULRICHS T., KAUFMANN S. H. (2002): Mycobacterial persistence and immunity. *Frontiers in Bioscience*. 7: 458-469.

VAN SCHAİK G., ROSSITER C. R., STEHMAN S. M., SHIN S. J., SCHUKKEN Y. H., (2003): Longitudinal study to investigate variation in results of repeated ELISA and culture of fecal samples for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in commercial dairy herds. *American Journal of Veterinary Research*. 64: 479-484.

VANSNICK E., RIJK P., DE VERCAMMEN F., RIGOUTS L., PORTAELS F., GEYSEN D. (2007): A DNA sequence capture extraction method for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in feces and tissue samples. *Veterinary Microbiology*. 122: 166-171.

VAN SOOLINGEN D., DE HAAS P. E., HERMANS P. W., GROENEN P. M., VAN EMBDEN J. D. (1993): Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 1987-1995.

VAN SOOLINGEN D., HOOGENBOEZEM T., DE HAAS P. E., HERMANS P. W., KOEDAM M. A., TEPPEMA K. S., BRENNAN P. J., BESRA G. S., PORTAELS F., TOP J., SCHOULS L. M., VAN EMBDEN J. D. (1997): A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 47:1236-1245.

VAN SOOLINGEN D., VAN DER ZANDEN A. G., DE HAAS P. E., NOORDHOEK G. T., KIERS A., FOUORAINE N. A., PORTAELS F., KOLK A. H., KREMER K., VAN EMBDEN J. D. (1998): Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1840-1845.

VICENTE J., HOFLE U., GARRIDO J. M., FERNANDEZ-DE-MERA I. G., JUSTE R., BARRAL M., GORTAZAR C. (2005): Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Veterinary Research.* 37: 107-119.

VICENTE J., HOFLE U., GARRIDO J. M., FERNANDEZ-DE-MERA I. G., ACEVEDO P., JUSTE R., BARRAL M., GORTAZAR C. (2007): Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Veterinary Research.* 38: 451-464.

WAKELIN C. A., CHURCHMAN O. T. (1991): Prevalence of bovine tuberculosis in feral pigs in Central Otago. *Surveillance (Wellington).* 18: 19-20.

WALLACE R. J. JR. (1987): Nontuberculous mycobacteria and water: a love affair with increasing clinical importance. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 1: 677-686.

WARDS B. J., COLLINS D. M., LISLE G. W. DE (1995): Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology.* 43: 227-240.

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. *International Journal of Tuberculosis & Lung Disease.* 10: 818-822.

WAYNE L.G., KUBICA G.P. (1986): The mycobacteria. 1435-1457. In: SNEATH P.H.A. und HOLT J.G. *Bergey's Manual of systematic bacteriology.* 2.

WHITTINGTON R. J., LLOYD J. B., REDDACLIFF L. A. (2001): Recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from nematode larvae cultured from the faeces of sheep with Johne's disease. *Veterinary Microbiology*. 81: 273-279.

WHITTINGTON R. J., MARSHALL D. J., NICHOLLS P. J., MARSH I. B., REDDACLIFF L. A. (2004): Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied & Environmental Microbiology*. 70: 2989-3004.

WHITTINGTON R. J., MARSH I. B., REDDACLIFF L. A. (2005): Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Applied & Environmental Microbiology*. 71: 5304-5308.

WILLIAMS R., STENHOUSE, HOY W. A. (1930): The viability of *B. tuberculosis* (bovinus) on pasture land, in stored faeces and in liquid manure. *Archive Jour Hyg*. 30: 413-419.

WINDSOR R. S., DURRANT D. S., BURN K. J. (1984): Avian tuberculosis in pigs: *Mycobacterium intracellulare* infection in a breeding herd. *Vet Rec*. 114: 497-500.

WITTWER C. T., HERRMANN M. G., GUNDRY C. N., ELENITOBA-JOHNSON K. S. (2001): Real-time multiplex PCR assays. *Methods (Duluth)*. 25: 430-442.

ZANELLA G., DUVAUCHELLE A., HARS J., MOUTOU F., BOSCHIROLI M. L., DURAND B. (2008a) : Patterns of lesions of bovine tuberculosis in wild red deer and wild boar. *Veterinary Record*. 163: 43-47.

ZANELLA G., DURAND B., HARS J., MOUTOU F., GARIN-BASTUJI B., DUVAUCHELLE A., FERME M., KAROUÏ C., BOSCHIROLI M. L. (2008b) : *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. *Journal of Wildlife Diseases*. 44: 99-108.

ZANETTI S., BUA A., MOLICOTTI 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: 145-152.

ZHANG Y. (2004): Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis. *Frontiers in Bioscience*. 9: 1136-1156.

ZORAWSKI C., KARPINSKI T., SKWAREK P., LODA M. (1983): Mycobacterium intracellulare, serotype 8 (Davies), existing in sawdust as a cause of mass infection of pigs. *Bulletin of the Veterinary Institute in Puawy*. 26: 1-5.

11 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acc.-Nr.	Accession Number
BALB-Mäuse	B steht für Bagg (Züchter); ALB steht für Albino
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
d.h.	das heisst
DNA	Deoxyribonucleic acid
et al.	und andere (lat.: et alii)
F	Forward
Fa.	Firma
g	Gramm; bei der Zentrifuge: Gravitationskonstante
h	Stunde
Hrsg.	Herausgeber
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
mM	milliMolar
mm	Millimeter
M	Molar
MAC	<i>Mycobacterium avium complex</i>
MAP	<i>Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MOTT	Mycobacteria other than tubercle bacilli
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
n	Anzahl
ng	Nanogramm
n.n.	nicht nachweisbar
Nr.	Nummer
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCV	Porcines Circo Virus
p	Wahrscheinlichkeit
pmol	pikomolar
R	Reverse
RD	Region of Difference
s	Sekunde
ssp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
+	positiv, plus
-	negativ, minus
>	größer als
<	kleiner als

%

®

™

μl

μM

Prozent

geschütztes Warenzeichen

unregistrierte Warenmarke

Mikroliter

mikroMolar

12 Anhang

12.1 Ansätze für Lösungen

TBE- Puffer für Elektrophorese (10fach)

Verwendete Chemikalien

1000 mM Tris-Base (Roth, Karlsruhe)	60,55 g
1000 mM Borsäure (Roth, Karlsruhe)	30,9 g
20 mM EDTA (Roth, Karlsruhe)	3,7 g

Zugabe von 500 ml Aqua Bidest

Einstellen mit 5N NaOH/1N HCl auf pH 8,3

Autoklavieren und anschließende Lagerung bei +4°C

Zum Gebrauch auf 1:10 verdünnen

Enzymatischer Lysispuffer

Stammlösung (steril filtriert und autoklaviert):

1 M Tris-HCl pH 8,0	2 ml
0,5 M EDTA III (Roth, Karlsruhe)	400 µl
Triton X-100 (Roth, Karlsruhe)	1,2 g

Auffüllen auf 100 ml mit Aqua Bidest

Zugabe des Lysozyms (100000 U/mg Fa. Merck) erfolgt unmittelbar vor Einsatz des Puffers

Ansatz: 20 mg Lysozym/ml Lysispuffer

NALC: N-acetyl-L-Cystein/NaOH-Lösung

Herstellung: 5 ml sterile, wässrige 2,9%ige Lösung von NA_3 -Citrat x 2 H_2O mit 5 ml steriler 4%iger NaOH-Lösung mischen und 50 mg N-acetyl-L-Cystein dazugeben.

Phosphatpufferlösung

Herstellung: Phosphatpuffer pH= 6,8 (nach Sørensen) 1/15 molar (4,84 g KH_2PO_4 + 5,53 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, mit sterilem, destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen).

13 Danksagung

Ich möchte mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein Dank gilt insbesondere folgenden Personen:

Meinem Doktorvater Herrn Dr. Dr. Prof. habil. Reiner für das Überlassen dieses Themas sowie für die gute Betreuung bei dieser Arbeit.

Herrn Dr. Willems, der mich für mich als Ansprechpartner unersetzlich war.

Den Mitarbeiterinnen aus dem Labor der Klinik für Schweine und vor allem den Doktorandinnen Anna Müller und Natalie Bertsch.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde insbesondere Claudia Walter, Marta Fischer und Herrn Dr. Akineden.

Herrn Dr. Weiss aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere für das zur Verfügung stellen verschiedener Mykobakterien-Stämme.

Susanne Lück, für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Allen Jägern, Förstern und Mitarbeitern, die es erst ermöglicht haben diese Dissertation zu verwirklichen.

Herrn Thomas von Stein, der mich nicht nur bei der Suche nach geeigneten Jagdmöglichkeiten unterstützt hat, sondern dem ich auch sonst Vieles zu verdanken habe.

Herrn Till Schlag, für die schöne Zeit, die wir während der Drückjagdsaison 08/09 zusammen verbracht haben.

Herrn Henning Ahlers für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Meinen guten Freunden Henning Ahlers, Henrik Möhle, Matthias Bangen, Till Schlag und Jonas Kulpe für die unvergesslichen schönen Studienjahre.

Herrn Thomas Weiss einem Menschen, der mir seit Beginn des Studiums ein wahrer Freund ist.

Katerina Kämper, die mich bei meiner Dissertation unterstützt hat und immer an meiner Seite stand.

Meinen Eltern Birgit und Peter Capellmann und meinem Bruder Georg, die mich in allen Lebenslagen unterstützt haben und ohne die das Studium und die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN: 978-3-8359-5754-1

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



9 783835 193754

© Sergey YAKovlev - Fotolia.com