

Amtliche Methodensammlung

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Mycobacterium (M.) bovis / *M. caprae* sind die Erreger der Tuberkulose des Rindes. Daneben sind sie auch für eine Vielzahl anderer Säugetierarten (Haus- Zoo- und Wildtiere; Karnivoren, Herbivoren und Omnivoren) und den Menschen pathogen. *M. bovis* / *M. caprae* gehören zum *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (MTC), dem als weitere Spezies *M. tuberculosis*, *M. africanum* und *M. microti* zugerechnet werden. Die Erhebung von *M. caprae* in den Rang einer eigenen Spezies wird kontrovers diskutiert, während *M. pinipedii* (Robbentuberkulose; früher *M. type seal*), heute als eigene Spezies innerhalb des MTC gilt. In jüngerer Zeit wurden *M. mungi* (Mungo), *M. orygis* (Antilope), *M. suricattae* (Erdmännchen), Dassie *Bacillus* (Klippschliefer) als weitere Spezies des MTC beschrieben. Die taxonomische Unterteilung des MTC aufgrund molekularer Unterschiede der Erreger ist derzeit im Fluss.

1.2 Klinische Symptomatik

Tuberkulose ist eine chronisch verlaufende zyklische Infektionskrankheit. Sie ist gekennzeichnet durch granulomatöse Veränderungen, zunächst an den Lymphknoten und Organen an der Eintrittspforte des Erregers. Dieser kann aerogen, durch Verfütterung erregerhaltiger Milch, über den noch nicht abgeheilten Nabel oder über Hautwunden aufgenommen werden. Anfangs präsentieren sich die granulomatösen Herde als kleine (miliare) weiße Knötchen, die sich vergrößern, später verkäsen und verkalken. Über den Blutkreislauf oder kanalikulär kann der Erreger in andere Organe (Euter, Uterus) verbreitet werden.

Die Tuberkulose des erwachsenen Rindes verläuft überwiegend in Form einer Lungentuberkulose. Beim Kalb ist häufiger der Intestinaltrakt betroffen. Besonders problematisch unter dem Aspekt der Weiterverbreitung ist die Euter- und die Uterustuberkulose der erwachsenen weiblichen Tiere. Die Krankheit kann über Jahre subklinisch verlaufen. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium können Husten, Atembeschwerden, Abmagern und Leistungsabfall Zeichen der Erkrankung sein. Bei der Eutertuberkulose treten im Verlauf der Erkrankung knotige, schmerzlose Verhärtungen in einem oder mehreren Eutervierteln auf, zunächst ohne dass die Milch sinnfälliger verändert ist. Bei der Uterustuberkulose treten im Verlauf der Erkrankung knotige, schmerzlose Verhärtungen in einem oder mehreren Uteruvierteln auf, zunächst ohne dass die Milch sinnfälliger verändert ist. Bei der Gebärmuttertuberkulose werden Umrindern und Ausfluss, bei der Tuberkulose des Darmes, die selten äußerlich festzustellen ist, vor allem Veränderungen in den Lymphknoten beobachtet. Die Erkrankung führt schließlich unter starker Abmagerung (Schwindsucht) zum Tode. In Deutschland verläuft die Infektion heutzutage verläuft die Infektion meist ohne nennenswerte Symptomatik und manifestiert sich lediglich durch Organveränderungen, die im Rahmen der tierärztlichen Fleischschau auffallen oder wird durch positiven Ausfall einer Tuberkulinprobe, z. B. im Rahmen einer Exportuntersuchung, festgestellt.

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

Bei der Tuberkulinprobe wird durch intrakutane Applikation von Tuberkulin beim lebenden Tier eine messbare lokale Immunreaktion (Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ) in der Haut hervorgerufen. Durch die Tuberkulinisierung wird eine Treffsicherheit von 96 bis 98 % erreicht, in tuberkulosefreien Populationen von 99,5 %, so dass andere in Frage kommende, mit vergleichbaren Organveränderungen einhergehende Krankheiten mit hoher Sicherheit am lebenden Rind ausgeschlossen werden können. Die Tuberkulinisierung wurde aufgrund des Status der Tuberkulosefreiheit in Deutschland über viele Jahre nicht mehr routinemäßig flächendeckend durchgeführt. Auf Grund der Zunahme entdeckter Fälle von Rindertuberkulose in den vergangenen Jahren hat der Tuberkulintest erneut an Bedeutung gewonnen. Alternativ kann der Gamma-Interferon-Freisetzungstest durchgeführt werden (s. TbVO vom 12.07.2013). Dabei werden Immunzellen des Blutes (Vollblut) durch Inkubation mit Tuberkulin spezifisch zur Produktion von Gamma-Interferon angeregt. Nur Zellen infizierter Tiere (sensibilisierte Zellen) reagieren auf diesen Stimulus und geben Gamma-Interferon ins Plasma ab, welches dann im ELISA detektiert wird. Dieser Test wurde durch den Einsatz eines Cocktails ausgewählter Antigene anstelle von Tuberkulin weiterentwickelt, um bei der Immunantwort ein höheres Maß an Spezifität zu ermöglichen. Erste Erfahrungen in internationalen Studien liegen bereits vor.

1.3 Differentialdiagnose

- Lungenseuche (*Mycoplasma mycoides*),
- Pneumonien anderer Genese (Pasteurellen, *Arcanobacterium pyogenes*),
- traumatische Perikarditis,
- chronischer Leberegelbefall

1.4 Diagnostische Indikation

Gemäß Tuberkulose-Verordnung

Klinischer Verdacht

Pathologisch-anatomischer Verdacht

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Staatliche Veterinäruntersuchungsämter
- Nationales veterinärmedizinisches Referenzlabor für Tuberkulose am FLI, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Naumburger Str. 96 a, 07743 Jena

1.6 Rechtsgrundlagen

- Richtlinie 97/12/EC des Rates vom 17. März 1997 zur Änderung und Aktualisierung der Richtlinie 64/432/EEC vom 26. Juni 1964 zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen (ABl. EG Nr. L 109 S. 1)

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

- Entscheidung 1999/467/EG der Kommission vom 15. Juli 1999 über die amtliche Anerkennung der Tuberkulosefreiheit von Rinderbeständen in bestimmten Mitgliedstaaten und Regionen der Mitgliedstaaten und zur Aufhebung der Entscheidung 97/76/EG (ABl. EG Nr. L 181 S. 36)
- Tuberkulose-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Juli 2013 (BGBl. I S. 2445).
- Ausführungshinweise zur Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes vom 11. Juni 2014

2. Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung sollte nach Möglichkeit frisch entnommenes Material (Organproben, Lymphknoten, Ausscheidungen) verwendet werden. Es sollte nach Möglichkeit nicht mit Formalin oder anderen Reagenzien fixiert sein, da dies die bakteriologische Bearbeitung unmöglich macht und die molekularbiologische Bearbeitung erschwert.

Das Untersuchungsmaterial soll in einem sterilen und verschlossenen Versandbehälter transportiert werden, der den Anforderungen zur Versendung von potenziell infektiösem Material entspricht. Dieser muss eindeutig beschriftet sein, so dass die Herkunft und Identität der Proben erkennbar ist. Die Anforderungen an und Vorschriften für den Transport von Proben sind nachzulesen nachzulesen im Kapitel „Versand“ der Methodensammlung. In Sonderfällen sollten sich Einsender und Laboratorien über den geeigneten Versand verständigen. Die Proben sollten telefonisch im Untersuchungslabor angekündigt werden. Die Transportdauer, d. h. die Zeit von der Gewinnung des Untersuchungsmaterials bis zum Eingang im mikrobiologischen Laboratorium, soll so kurz wie möglich gehalten werden.

Dem Untersuchungsmaterial ist ein schriftlicher, vom Einsender unterschriebener, gegen Durchfeuchtung und Verschmutzung geschützter Untersuchungsauftrag sowie ein Vorbericht beizufügen.

3. Untersuchungsgang

3.1 Mikroskopische Untersuchung

Mikroskopische Untersuchungen - Nachweis von säurefesten Stäbchen / Fluoreszenzmikroskopie - sind für eine erste Beurteilung hilfreich. Der mikroskopische Nachweis weist die geringste Sensitivität unter den Laboruntersuchungsmethoden auf (Nachweisgrenze ca. 5000 Bakterien/ml). Ein negativer mikroskopischer Befund ist daher kein sicheres Indiz gegen das Vorliegen einer Tuberkulose.

Ein direkter Nachweis in Gewebeproben ist möglich mittels Gewebe-Abklatschpräparat oder im Sediment von dünnflüssigem Material (mindestens 2 ml) nach hochtourigem Zentrifugieren (etwa 20 Minuten bei mindestens 3000 x g). Zähflüssiges Material kann durch Zusatz von Aqua dest. (kein Leitungswasser; Gefahr der Kontamination durch nicht tuberkulöse Mykobakterien) verflüssigt werden.

Der Ausstrich ist nach dem Lufttrocknen für 20 min bei 110°C in einem Trockenschrank zu fixieren (DIN 58943-32), da beim „durch die Flamme Ziehen“ des Objektträgers die Erreger nicht mit Sicherheit abgetötet werden.

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

3.1.1 Färbung nach Ziehl-Neelsen (nach DIN 58943-32)

Objektträger mit Karbolfuchsin (siehe Anhang 1.1.) überschichten, bis dreimal bis zur Dampfbildung erhitzen, 5 min abkühlen lassen, Färbelösung mit H₂O abspülen. Entfärben in Salzsäure (3 %)-Äthanol-Gemisch (siehe Anhang 1.2.), bis das Präparat keine Farbschlieren mehr abgibt.

Spülen mit H₂O, 1 Minute mit verdünnter Methylenblaulösung (siehe Anhang 1.3.) gegenfärben, spülen und trocknen.

Mykobakterien erscheinen als **rot** gefärbte Stäbchen auf blauem Untergrund.

3.1.2 Kaltfärbung

Wenn eine Hitzefixierung des Objektträgers vor Beginn der Färbung nicht möglich ist, ist eine „Kaltfärbung“ empfehlenswert, z. B. „TB Quick Stain“ der Fa. Becton Dickinson, da beim Erhitzen des Karbolfuchsin infektiose Aerosole entstehen könnten.

3.1.3 Färbung mit Acridinorange (nach DIN 58943-32)

Objektträger 15 min mit Acridinorange-Gebrauchslösung überschichten (siehe Anhang 1.7.), 2 min entfärben mit Salzsäure-Äthanol (siehe Anhang 1.2.) entfärben, bei sehr „dicken“ Präparaten Entfärbung wiederholen, mit Aqua dest. spülen. Lufttrocknen.

3.2 Real-Time-PCR zum Nachweis von DNA von Erregern des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes und der Identifizierung von *M. bovis* und *M. caprae* in Gewebe

3.2.1 Einleitung

Die Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (real time PCR) dient dem Nachweis von bakterieller DNA in Blut- oder Gewebeproben. Da sich mittels PCR nur eine DNA-Sequenz nachweisen lässt, kann die PCR auch ein positives Ergebnis erbringen, wenn keine lebensfähigen Infektionserreger mehr vorhanden sind (z. B. in autolytischem Gewebe).

Die beschriebene Methode zum Nachweis von Erregern des MTC, eine Eigenentwicklung des FLI, nutzt als Zielsequenzen das Gen für eine hypothetische Helicase und das Insertionselement (IS) 1081. Die Helicase wurde von Rodriguez et al. [1] für die Identifizierung von MTC-Isolaten vorgeschlagen und wird mit modifizierten Primern [2] auch vom NRL für die Identifizierung von MTC-Isolaten genutzt. Die Wahl des zweiten Zielgens (IS 1081) basiert auf einer Publikation von Taylor et al. [3]. Es werden jedoch modifizierte Primer und eine zusätzliche Sonde verwendet. In den beschriebenen PCRs wird ein 91 bp-Fragment des hypothetischen Helicase-Gens (HELI) und ein 85 bp-Fragment des IS 1081 amplifiziert. Als internes Kontrollsystem für eine gelungene DNA-Extraktion ist bei beiden PCRs die Amplifizierung der genomischen DNA des Beta-Aktin-Gens (Gewebe) integriert.

Die Differenzierung in *M. bovis* und *M. caprae* sollte nur bei MTC-positiven Proben durchgeführt werden. Zum Nachweis von *M. bovis*-DNA wird die region of difference 4 (RD4) genutzt (modifiziert nach Taylor et al [3]), die *M. bovis* von anderen Erregern des MTC mit Einschränkung unterscheidet. Diese Einschränkung

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

bezieht sich nach bisheriger Kenntnis auf einen bestimmten Genotyp von *M. caprae*, der in Bayern nachgewiesen wurde (Domogalla et al., [4]). Dieser *M. caprae* Genotyp lässt sich durch die RD4-PCR von *M. bovis* nicht unterscheiden.

Zur Identifizierung von *M. caprae* kann die Verwendung einer Real Time PCR, im Folgenden kurz MCAP genannt, modifiziert nach Reddington et al. durchgeführt werden [5]. Bei Tieren, die aus Regionen mit endemischem Vorkommen von *M. caprae* stammen, z. B. Bayern, Österreich oder Italien, ist daher nach der MTC-PCR mit positivem Ergebnis an zweiter Stelle oder gleichzeitig mit der RD4-PCR die MCAP-PCR durchzuführen. Bei positivem MCAP-Ergebnis ist davon auszugehen, dass es sich um *M. caprae* handelt, selbst wenn mit der RD4-PCR ebenfalls ein positives Ergebnis erzielt wird.

Auf Grund der hohen Sensitivität der Real Time PCR sind die Festsetzung eines sicheren Nachweisbereiches sowie das Mitführen von Puffer/Wasser als Negativkontrolle bei der Extraktion (Extraktionskontrolle) und von positiver und negativer Kontroll-DNA bei der PCR in ausreichender Zahl und Qualität (DNA von *M. bovis*, Extraktionskontrolle, Wasser, nicht infiziertes Gewebe) außerordentlich wichtig für die Interpretation der Ergebnisse. Außerdem sollte die PCR als Doppelbestimmung pipettiert werden, so dass sich die Bewertung des Ergebnisses bei jeder PCR auf zwei PCR-Signale stützen kann. Nach bisherigen Untersuchungen werden mit den oben beschriebenen PCRs nur MTC-Isolate detektiert. Kreuzreaktivität mit dem *M. avium*-Komplex wurde bisher nicht festgestellt. Die Differenzierung von *M. bovis* und *M. caprae* ist nach bisherigen Erfahrungen mit großer Sicherheit möglich.

In Zweifelsfällen sollte die Spezifität des molekularbiologisch generierten Produktes durch eine weitere Methode (z. B. DNA-Sequenzanalyse) bestätigt werden. Das Referenzlabor ist an der Zusendung von derartigen Proben/Isolaten interessiert.

3.2.2 DNA-Extraktion

In Abhängigkeit von der zu untersuchenden Probe, erfolgt die DNA-Extraktion mit geeigneten Verfahren, z. B.:

- DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)

Um einen Hinweis auf vorkommende DNA-Verschleppung während der DNA-Isolierung zu erhalten, sollte bei jeder Extraktion eine DNA-Extraktionskontrolle (EK) mitgeführt werden. Hierbei wird negatives Probenmaterial gleicher Art und/oder Wasser bzw. Puffer zusammen mit den Feldproben aufgearbeitet. Dabei darf kein MTC-spezifisches Signal generiert werden. Bei der negativen Gewebeprobe muss jedoch ein Signal für Beta-Aktin, als Kontrolle für eine erfolgreiche DNA-Extraktion aus Gewebe, generiert werden. Gegebenenfalls sollten Proben verschiedener Tiere nicht gemeinsam extrahiert werden.

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

3.2.3 Probenvorbereitung für die DNA-Extraktion

Je nach verwendetem Extraktionskit werden Gewebemengen zwischen 20 und 40 mg aufgearbeitet. Eine Überladung des Kits sollte vermieden werden. Um mit möglichst großer Wahrscheinlichkeit erregerehaltiges Gewebe in die Extraktion einzuführen, sollte eine Menge von ca. 1 g Gewebe in 10 ml PBS homogenisiert werden. Von der Gewebesuspension werden je nach der vom Kit-Hersteller empfohlenen Gewebemenge 200 - 400 µL entnommen, 10 min bei ca. 10.000 x g zentrifugiert und das Sediment mit dem initialen Puffer aus dem Extraktionskit resuspendiert. Danach wird die Extraktion nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Alternativen:

An Stelle eines Aliquots eines Gewebehomogenates kann die entsprechende Gewebemenge auch mit steriler Schere aus einem veränderten Gewebeteil herausgeschnitten und in die Extraktion eingeführt werden. Bei fehlenden Veränderungen („non visible lesions“) ist zu empfehlen, dass aus drei Lokalisationen der entsprechenden Gewebeprobe jeweils etwa 20 - 40mg Gewebe (je nach Angaben des Kit-Herstellers) für die Untersuchung entnommen und als Poolprobe in die DNA-Extraktionsprozedur eingeführt werden.

Wenn parallel eine Kultivierung durchgeführt wird (siehe unten), kann die Entnahme des Gewebes für die DNA-Extraktion vor oder nach der Dekontamination (z. B. mit N-Acetyl-L-Cystein-NaOH [NALC-NaOH]; s. Anhang 3.6.4.) und anschließender Neutralisation erfolgen. Die Entnahme nach der Dekontamination hat den Vorteil, dass das Material für die Kultivierung und für die DNA-Extraktion aus dem gleichen Gewebesuspensionspool entnommen wird und daher die Ergebnisse besser vergleichbar sind (Sensitivität der Methoden). Allerdings geht durch die Dekontamination mit anschließender Zentrifugation Gewebesubstanz verloren (Lyse). Daher kann für 20 mg Gewebe-Einsatz etwa ein Volumen von 500 µL in die Extraktion eingeführt werden.

3.2.4 Real-Time-PCR (Reagenzien und Protokollblätter s. Anhang)

3.2.4.1 Allgemeines

- a) Die Amplifizierung erfolgt auf Basis des QuantiTect Multiplex PCR Kit no ROX (oder vergleichbarer Reagenzien) in 25 µl Gesamtvolumen.
- b) Als Kontrollen werden neben der/den DNA-Extraktionskontrolle/n (EK) eine „No Template“ Kontrolle (NTC) und mindestens eine positive Kontrolle (PC) mitgeführt. Als positive Kontrolle sollte eine gering konzentrierte MTC-DNA eingesetzt werden (Ct-Wert ca. 30), um die Gefahr der DNA-Verschleppung auf die Feldproben durch positive Kontroll-DNA zu reduzieren. Die Gefahr der DNA-Verschleppung beim Pipettieren der PCR kann außerdem reduziert werden, indem an Stelle von PCR-Mikrotiterplatten PCR-Tubes (Strips) verwendet werden.

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

3.2.4.2 Herstellung des Mastermix

- a) Die Menge des herzustellenden Mastermix richtet sich nach der Anzahl der extrahierten Proben plus der Kontrollansätze (PC; NTC, EK).
- b) Nachdem der Mastermix durch kurzes Vortexen und Zentrifugieren gut gemischt wurde, erfolgt die Verteilung von 20 µl in die Reaktionsgefäße.

3.2.4.3 Zugabe der Template-DNA

- a) Zu den vorgelegten 20 µl Mastermix werden 5 µl DNA-Template pipettiert.
- b) Neben den extrahierten Feldproben und der/den EK werden eine positive Kontroll-DNA (PC, z. B. isolierte DNA von *M. bovis* BCG) und eine „no template control“ (NTC) amplifiziert.
- c) Nach Zugabe der Template-DNA und Verschluss der Reaktionsgefäße folgt ein vorsichtiges Vortexen und kurze Zentrifugation der PCR-Ansätze.

3.2.4.4 Cycler-Programm für die MTC-PCR, RD4-PCR, MCAP-PCR

Inaktivierung RT /Aktivierung Taq	95°C	15 min	} 45 Zyklen
Denaturierung	95°C	60 sec	
Annealing	60°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	

Die Fluoreszenzdaten werden in der Annealing-Phase gesammelt. Die Aufnahme der Fluoreszenzdaten erfolgt über den FAM- und den HEX-Kanal.

3.2.4.5 Auswertung der generierten Fluoreszenzdaten

HEX-Kanal

- a) Für alle Gewebeproben (Lymphknoten, Lunge) und die negative Gewebe-DNA sollte Beta-Aktin mit einem Treshold-Cycle (Ct) von ca. 25 (\pm 4 Ct) nachweisbar sein. Sind die Ct-Werte für die genannten Proben vorhanden, ist von einer erfolgreichen DNA-Isolierung und PCR auszugehen. Ist kein Ct-Wert für die Gewebe-DNA feststellbar und gleichzeitig auch keine MTC-spezifische Amplifizierung erfolgt, ist die Real-Time-PCR nicht auswertbar und somit ist die DNA-Isolierung und/oder die PCR zu wiederholen.
- b) Für die NTC, EK und die PC sollte kein Ct- Wert angezeigt werden, da diese Extrakte keine Gewebe-DNA enthalten.

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

FAM-Kanal

- a) Die für die PC angezeigten Ct-Werte sind abhängig der eingesetzten DNA-Menge der PC, dem verwendeten Real-Time-Gerät, vom gewählten Threshold und der Güte des Tests. Ein Ct-Wert um 30 ist optimal für eine stabile Amplifizierung. Eine zu hohe Konzentration erhöht die Gefahr der DNA-Verschleppung, insbesondere wenn für die PCR Mikrotiterplatten (und nicht PCR-Strips) verwendet werden.
- b) Mit der PC wird die Funktion des MTC-HELI/IS1081-, bzw. des RD4- oder des MCAP-Detektionssystems nachgewiesen. Wird für die PC ein unerwarteter bzw. kein Ct-Wert angezeigt, ist die PCR mit einem neuen Primer-Sonden-Mix und/oder einer neuen PC zu wiederholen. Im Falle der MTC- und der RD4-PCR ist DNA von *M. bovis* BCG (zu erwerben bei der DSMZ, Braunschweig; www.dmsz.de) eine geeignete PC. Im Falle der MCAP-PCR muss DNA eines *M. caprae*-Stammes als PC eingesetzt werden. Da es für *M. caprae* keinen Referenzstamm gibt, muss DNA von einem Feldstamm verwendet werden. Diese DNA kann beim NRL für Tuberkulose angefordert werden.

Für das negative Gewebe, die NTC und die EK sollte kein Ct-Wert angezeigt werden, da sie keine DNA von Erregern des MTC enthalten.

Gesamtbeurteilung

Wenn alle eingesetzten Kontrollen in richtiger Weise reagieren ist eine Auswertung der Feldproben-Ansätze möglich.

Eine MTC-Verdachtsprobe wird in der PCR dann als positiv gewertet, wenn ein Ct-FAM-Wert mit einem signifikanten Anstieg der FAM-Fluoreszenz über das Basis-Niveau für sie angezeigt wird.

Dies bedeutet im Einzelnen:

HELI / IS1081:

Ein Ct-Wert < 39,00 (berechnet als Mittelwert einer Doppelbestimmung für jede der beiden Zielsequenzen, HELI bzw. IS1081) ist für die jeweilige Zielsequenz als positiv zu bewerten.

Ein Ct-Wert > 39,00 (berechnet als Mittelwert einer Doppelbestimmung für jede der beiden Zielsequenzen, HELI bzw. IS1081) ist für die jeweilige Zielsequenz als negativ zu bewerten.

Ein zweifelhafter Bereich zwischen positiven und negativen Ct-Wert-Bereichen ist nicht vorgesehen.

Die Differenz der Ct-Werte einer Doppelbestimmung sollte einen Wert von 2 nicht überschreiten.

Die Differenz der Ct- Werte (Mittelwerte) zwischen beiden Targets sollte einen Wert von 2,25 nicht überschreiten.

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

RD4

Es sind die gleichen Bewertungskriterien wie bei der HELI / IS1081 PCR anzulegen.

Die zulässige Differenz der Ct-Werte zwischen den Targets RD4 und HELI/IS1081 ist derzeit nicht festgelegt.

MCAP

Die MCAP-PCR erbringt bei Gewebeproben im Durchschnitt deutlich höhere Ct-Werte als HELI /IS1081. Daher ist jeder Ct-Wert <45,00 als positives Ergebnis zu bewerten.

Negativkontrollen:

Bei negativen Kontrollproben (z. B. Wasser) sollte bei jeder Probe der Doppelbestimmung ein Ct-Wert von > 41,00 erreicht werden.

Beta-Aktin:

Bei DNA-Extrakten aus Gewebe sollte bei jeder Probe der Doppelbestimmung ein Ct-Wert von 25,00 (\pm 4,0) erreicht werden.

Bei DNA-Extrakten aus bakterieller Reinkultur oder Puffer / Wasser sollte bei jeder Probe der Doppelbestimmung ein Ct-Wert von > 41 erreicht werden.

Vorgehen und Bewertung bei zweifelhaften Befunden

HELI / IS 1081

Ein PCR-Ergebnis ist als zweifelhaft zu bewerten, wenn der Mittelwert der Ct-Werte der Doppelbestimmung für eine der beiden Zielsequenzen ein positives Ergebnis (Ct-Wert < 39,00), für die andere der beiden Zielsequenzen ein negatives Ergebnis (Ct-Wert > 39,00) erbracht hat, sofern die Differenz der Ct-Werte (Mittelwerte) zwischen beiden Targets einen Wert von 2,25 überschreitet.

Erbringt eine PCR bei Fehlen pathologisch-anatomischer Veränderungen zunächst ein zweifelhaftes und bei der Wiederholung ein negatives oder wiederum zweifelhaftes Ergebnis, so ist im Prüfbericht ein zweifelhaftes Gesamtergebnis mitzuteilen und von der Probe eine Kultur anzusetzen.

Die Zusammensetzung der Primer-Sonden-Gemische, PCR-Ansätze sowie die Ergebnisse werden auf Protokollblättern dokumentiert (s. Anhang)

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

3.3 Kulturelle Untersuchung

Die Kultur gilt nach wie vor als sensitivste und verlässlichste Nachweismethode in der Tuberkulose-Diagnostik. Sie ist aber mit den Nachteilen der langen Untersuchungsdauer bis zur Befund-Erhebung und der Gefahr nicht auswertbarer Kulturen durch Kontamination mit Begleitkeimen aus dem Probenmaterial behaftet.

3.3.1 Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials (Reagenzien s. Anhang)

Untersuchungsmaterial kann schonend mit N-Acetyl-L-Cystein-NaOH (NALC-NaOH) nach DIN 58943 Teil 3 vorbehandelt werden (hoher pH!). Dazu werden gleiche Volumina Organsuspension (z. B. 1 g Gewebe in 10 ml Phosphat-Puffer [PBS]) oder flüssiges Untersuchungsmaterial (10 ml) und NALC-NaOH (10 ml) in einem verschlossenen Zentrifugenglas (30 - 50 ml) gut gemischt und 25 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 20 ml PBS zugegeben (Neutralisierung) und die Suspension für 20 min bei 4000 x rpm (mind. 3300 x g) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Da einmaliges Neutralisieren mit PBS nach der NALC-NaOH-Behandlung häufig nicht ausreicht, wird empfohlen, routinemäßig ein zweites Mal mit 10 ml PBS zu waschen. Danach wird das Sediment mit 0,5 - 1,5 ml PBS resuspendiert, wobei bei stark kontaminierten Proben die Zugabe von Antibiotika (100µL PANTA) zu empfehlen ist.

3.3.2 Anlegen des Untersuchungsmaterials

Das vorbehandelte Untersuchungsmaterial wird mit einer Einweg-Pasteurpipette (100 - 150 µL) auf mindestens 2 feste und ein flüssiges Kulturmedium überimpft. Durch die Nutzung dieser (am oberen Ende geschlossenen) Pipetten kann die Gefahr der Verschleppung von infektiösem Material auf ein Minimum reduziert werden. Allerdings ist eine Einstellung der Pipette auf ein exaktes Volumen nicht möglich. Ein Verimpfen mit Impföse ist aus Gründen des Infektionsschutzes weniger zu empfehlen. Außerdem ist das verimpfbare Volumen bei der Impföse zu gering.

Zur Anwendung werden empfohlen (s. Anhang)

Feste Nährmedien	Flüssige Medien
Löwenstein-Jensen-Nährboden mit PACT (Antibiotika-Zusatz)	Kirchner-Medium mit PACT oder PANTA
Stonebrink-Medium mit Na-Pyruvat-Zusatz mit PACT (Antibiotika-Zusatz)	Middlebrook-Medium mit PACT oder PANTA

Die Medien werden bei + 37 °C für mindestens 6 - 8 Wochen aerob bebrütet und einmal pro Woche abgelesen. Festmedien sollten während der ersten 7 Tage der in Schräglage inkubiert werden, so dass die Schrägfläche des Nährbodens waagrecht ausgerichtet ist. Da vor allem bei anderen Wirten als beim Rind (Schwein, Wildschwein, Zootieren) auch mit *Mycobacterium microti* zu rechnen ist, sollte die Bebrütungsdauer dort auf 12 Wochen ausgedehnt werden.

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

3.3.3 Identifizierung und Differenzierung

Gewachsene Kolonien sind mittels Ziehl-Neelsen-Färbung auf das Vorhandensein von säurefesten Stäbchen zu überprüfen.

Langsames Wachstum (6 - 8 Wochen) rauher Kolonien von grau-weißlicher Farbe mit erhabenem Zentrum und unregelmäßig begrenzter peripherer Zone sind verdächtig für *M. bovis*. In flüssigem Medium (in Röhrchen) bilden Mykobakterien ein teppichartiges Sediment, das sich beim Aufschütteln in schneeflockenartige Aggregate auflöst. Eine gleichmäßige Trübung des Mediums deutet auf Kontamination hin. Eine Typisierung der Erreger sollte molekularbiologisch erfolgen. Hierzu ist eine konventionelle PCR ausreichend, da spezifische DNA im Übermaß vorhanden ist. Folgende DNA-Sequenzen eignen sich für die Differenzierung:

16S rDNA	Gattung Mykobakterien	Cousins et al., 1999 [6] Kirschner et al., 1998 [7]
IS 6110	<i>M. tuberculosis</i> -Komplex (MTC)	Liebana et al. 1997 [8]
Hypothetische Helicase	<i>M. tuberculosis</i> -Komplex (MTC)	Rodriguez et al., 1995 [1]; Moser et al., 2008 [2]
IS 1245 + IS 901	<i>M. avium</i>	
IS1245 pos. / IS 901 pos.	<i>M. a. ssp. avium</i>	Kunze et al., 1992 [9]
IS 1245 pos. / IS 901 neg.	<i>M. a. ssp. hominissuis</i>	Guerrero et al., 1995 [10]
IS 900	<i>M. a. ssp. paratuberculosis</i>	Englund et al., 1999 [11]

Mitglieder des MTC können durch Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens oder durch den Nachweis von Insertionselementen nicht weiter differenziert werden. Dazu müssen andere Methoden angewandt werden, z. B. Spoligotyping (direct repeat Region), DNA-Sequenzanalyse des *gyr B*-Gens oder partiell die Analyse der Ausgestaltung des RD1-, des RD4- oder des RD9-Locus oder anderer Loci im MTC-Genom.

Nicht tuberkulöse Mykobakterien können durch DNA-Sequenzanalyse, z. B. der 16S rRNA-Gens, des hsp 65-Gens oder des rpoB-Gens, identifiziert werden.

Auch die Methode des MALDI-TOF wird in zunehmendem Maße angewandt. Hierfür existieren noch keine Empfehlungen des NRL für Tuberkulose.

Für die Differenzierung von *M. a. ssp. paratuberculosis* (Map) siehe auch Methoden zum Nachweis von Map.

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

3.4 Eignungsprüfungen

Die empfohlenen Methoden gelten als akzeptierte Verfahren. Die Eignungsprüfung sollte durch Mitführen von DNA von Referenzstämmen vorgenommen werden. Referenzstämme für Spezies der Risikogruppe 2 (z. B. *M. bovis* BCG) können bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig) erworben werden.

3.5 Serologische Untersuchung

Für die Labordiagnose der Tuberkulose des Rindes sind serologische Methoden bislang ohne Bedeutung.

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

Anhang

Reagenzien für die Färbung (nach DIN 58943-32)

Ziehl-Neelsen-Färbung

Karbolfuchsin-Lösung	
Fuchsin basisch	1 g
Äthanol (96±1%)	10 ml
Phenolum liquefactum, 5% wässrige Lösung	100 ml
Die Lösung ist vor Licht geschützt (braune Flasche) ein Jahr haltbar	

Salzsäure-Äthanol-Gemisch	
Salzsäure (34±2%)	3,0 ml
Äthanol (96±1%)	ad 100,0 ml

Methylenblaulösung nach Löffler	
Methylenblau basisch	0,5 g
Äthanol (96±1%)	30 ml
Kalilauge(0,01% in A. dest.)	100 ml

oder: Gebrauchsfertige Methylenblaulösung, z. B. Fa. Hollborn, Leipzig

Acridinorange-Färbung

Acridinorange-Gebrauchslösung	
farbloses Phenol	0,1 g
Glycerin	5 ml
Äthanol (96±1%)	25 ml
Aqua dest.	ad 50 ml
Die Acridinorange-Gebrauchslösung ist vor Licht geschützt (braune Flasche) 14 Tage haltbar	

Geeignet zum Nachweis von Mykobakterien in Gewebe-Abklatschpräparaten

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

Reagenzien und Protokollblätter für die Realtime-PCR

Herstellung der Primer-Sonden-Mischungen

MTC-HELI-Mix4-FAM (10 pmol Primer/ μ l + 1,25 pmol Sonde/ μ l)

Lösung (Konzentration)	Volumen	Sequenz
MTC-HELI-4F (100 pmol/ μ l)	200 μ l	TTG ATC AGG TCG ACG ATG TAG
MTC-HELI-4R (100 pmol/ μ l)	200 μ l	TCA CCA CCG ACA AAG CGT C
MTC-HELI-4FAM (100 pmol/ μ l)	25 μ l	FAM-TCA ACG ACC CCA ACG ACT GGT GC-BHQ1
0,1 x TE (pH 8,0)	1575 μ l	
Totalvolumen	2000 μ l	

MTC-IS1081-Mix5-FAM (10 pmol Primer/ μ l + 1,25 pmol Sonde/ μ l)

Lösung (Konzentration)	Volumen	Sequenz
MTC-IS1081-5F (100 pmol/ μ l)	200 μ l	CTC TCG ACG TTC ATC GCC G
MTC-IS1081-5Rn (100 pmol/ μ l)	200 μ l	TGG CGG TAG CCG TTG CGC
MTC-IS1081-5FAM (100 pmol/ μ l)	25 μ l	FAM-ATT GGA CCG CTC ATC GCT GCG TTC-BHQ1
0,1 x TE (pH 8,0)	1575 μ l	
Totalvolumen	2000 μ l	

MTC-RD4-Mix6-FAM (10 pmol Primer/ μ l + 1,25 pmol Sonde/ μ l)

Lösung (Konzentration)	Volumen	Sequenz
MTC-RD4-6F (100pmol/ μ l)	200 μ l	AAT GGT TTG GTC ATG ACG CCT TC
MTC-RD4-6R (100pmol/ μ l)	200 μ l	CGC CGT TGT AGG CCA CTC
MTC-RD4-FAM (100pmol/ μ l)	25 μ l	FAM-CAT ACA AGC CGT AGT CGT GCA GAA GC-BHQ1
0,1 x TE (pH 8,0)	1575 μ l	
Totalvolumen	2000 μ l	

MTC-MCAP-Mix-FAM (10 pmol Primer/ μ l + 1,25 pmol Sonde/ μ l)

Lösung (Konzentration)	Volumen	Sequenz
MTC-MCAP f (100pmol/ μ l)	200 μ l	AGA CCG TGC GGA TCT TG
MTC-MCAP r (100pmol/ μ l)	200 μ l	CAT GGA GAT CAC CCG TGA
MTC-CAP-FAM (100pmol/ μ l)	25 μ l	FAM-TAT CGG GTA CAC AAA GAC GA-BHQ1
0,1 x TE (pH 8,0)	1575 μ l	
Totalvolumen	2000 μ l	

modifiziert nach Reddington et al. [5]

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

Actin-DNA-Mix-YAK (2,5 pmol Primer/ μ l + 1,25 pmol Sonde/ μ l)

Lösung (Konzentration)	Volumen	Sequenz
ACT2-1030-F_DNA (100 pmol/ μ l)	50 μ l	TTG ATC AGG TCG ACG ATG TAG
ACT-1135-R (100 pmol/ μ l)	50 μ l	TCA CCA CCG ACA AAG CGT C
ACT-1081-1105-YAK (100 pmol/ μ l)	25 μ l	FAM-TCA ACG ACC CCA ACG ACT GGT GC-BHQ1
0,1 x TE (pH 8,0)	1875 μ l	
Totalvolumen	2000 μ l	

modifiziert nach Toussiant *et al.* [12]

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

Medien für die kulturelle Untersuchung

Feste Nährmedien

Fertige Festmedien	Bezugsquellen (Beispiele)
Löwenstein-Jensen-Nährboden mit Glycerin mit oder ohne Antibiotika (PACT)	Fa. Artelt Enclit Fa. Heipha, jetzt Merck Chemicals
Stonebrink-Nährboden mit oder ohne Antibiotika (PACT)	Fa. Mibius
Zusatz von Antibiotika bei Primärisolierung erforderlich	

Flüssige Nährmedien

Fertige Flüssignährmedien	Bezugsquellen (Beispiele)
Kirchner Bouillon mit PACT	Fa. BD Diagnostic Systems
Kirchner Bouillon mit PANTA oder PACT	Fa. Artelt-Enclit Fa. Heipha, jetzt Merck Chemicals
Middlebrook Bouillon 7H9 mit OADC (ohne Antibiotika)	Fa. Heipha, jetzt Merck Chemicals
Middlebrook Bouillon 7H9 mit ADC (ohne Antibiotika)	Fa. BD Diagnostics

Bei eigener Herstellung von festen oder flüssigen Nährmedien kann auch der Antibiotika-Mix PANTA verwendet werden.

Bei Eigenherstellung sind die Empfehlungen des Herstellers der Substanzen zu beachten.

Das FLI verwendet für die Flüssigkultur sterile Zellkultur-Röhrchen mit Schraubverschluss. Die Kultur erfolgt ohne Schütteln in einem Volumen von 3 ml.

Für Festnährmedien können Glasröhrchen mit Schraubverschluss, z. B. Fa. Wiegand-Glas GmbH verwendet werden.

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

Fertige Supplemente	Zusammensetzung (ggf. pro Liter Medium)	Bezugsquellen (Beispiele)
Middlebrook 7H9 Broth - DIFCO®		Fa. BD Diagnostic Systems
OADC (Wachstumssupplement)	Oleinsäure, Albumin, Dextrose, Katalase	Fa. Sigma-Aldrich Fa. BD Diagnostic Systems
Kirchner Bouillon Grundsubstanz		Fa. Mast Diagnostica
PACT	Polymyxin B 200 000 Einheiten Amphotericin B 10 mg Carbenicillin 100 mg Trimethoprim 10 mg	Fa. Sigma-Aldrich
PANTA	Polymyxin B 60000 Einheiten Amphotericin B 600 µg Nalidixinsäure 2.400 µg Trimethoprim 600 µg Azlocillin 600 µg	

Weitere Reagenzien (DIN58943-3)

N-Acetyl-L-Cystein-NaOH-Lösung (NALC)

Na ₃ -Citrat x 2 H ₂ O, 2,9%ige Lösung, steril	50 ml
NaOH, 4%ige Lösung, steril	50 ml
N-Acetyl-L-Cystein (Fa. Sigma-Aldrich)	500 mg
Natriumcitratlösung und NaOH mischen und N-Acetyl-L-Cystein dazugeben. Die frisch angesetzte Lösung 24 Stunden verwendbar.	

Natriumchloridlösung

NaCl	9 g
A. dest., steril	1000 ml

Phosphatpuffer (nach Sørensen)

NaCl	9 g
A. dest., steril	1000 ml
KH ₂ PO ₄	4,84 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	5,53 g
A. dest.	Ad 1000 ml
pH = 6,8, 1/15 molar	

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

Literatur

1. Rodriguez, J.G., et al., *Species-specific identification of Mycobacterium bovis by PCR*. Microbiology, 1995. **141** (Pt 9): p. 2131-8.
2. Moser, I., et al., *Mycobacterium pinnipedii: transmission from South American sea lion (Otaria byronia) to Bactrian camel (Camelus bactrianus bactrianus) and Malayan tapirs (Tapirus indicus)*. Vet Microbiol, 2008. **127**(3-4): p. 399-406.
3. Taylor, G.M., et al., *Rapid detection of Mycobacterium bovis DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR*. BMC Vet Res, 2007. **3**: p. 12.
4. Domogalla, J., et al., *Region of difference 4 in alpine Mycobacterium caprae isolates indicates three variants*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(5): p. 1381-8.
5. Reddington, K., et al., *A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23481.
6. Cousins, D.V., et al., *Mycobacteria distinct from Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis*. Mol Cell Probes, 1999. **13**(6): p. 431-42.
7. Kirschner, P. and E.C. Bottger, *Species identification of mycobacteria using rDNA sequencing*. Methods Mol Biol, 1998. **101**: p. 349-61.
8. Liebana, E., et al., *The insertion element IS 6110 is a useful tool for DNA fingerprinting of Mycobacterium bovis isolates from cattle and goats in Spain*. Vet Microbiol, 1997. **54**(3-4): p. 223-33.
9. Kunze, Z.M., F. Portaels, and J.J. McFadden, *Biologically distinct subtypes of Mycobacterium avium differ in possession of insertion sequence IS901*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(9): p. 2366-72.
10. Guerrero, C., et al., *A novel insertion element from Mycobacterium avium, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(2): p. 304-7.
11. Englund, S., et al., *Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Diagn Microbiol Infect Dis, 1999. **33**(3): p. 163-71.
12. Toussaint, J.F., et al., *Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments*. J Virol Methods, 2007. **140**(1-2): p. 115-23.

Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*)

- DIN 58943 Teil 3 (1996) Medizinische Mikrobiologie; Tuberkulosedagnostik; Kulturelle Methoden zum Nachweis von Mykobakterien
- DIN 58943 Teil 7 (1995) Medizinische Mikrobiologie; Tuberkulosedagnostik; Modifiziertes Löwenstein-Jensen-Kulturmedium zur Anzucht von Mykobakterien
- DIN 58943 Teil 32 (1995) Medizinische Mikrobiologie; Tuberkulosedagnostik; Mikroskopische Methoden zum Nachweis von Mykobakterien
- OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Kapitel "Bovine Tuberculosis", in der jeweils aktuellen Fassung

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald – Insel Riems, www.fli.bund.de