

25. Tuberkulose der Rinder - Bovine Tuberculosis

Moser, I.

Summary

Tuberculosis (TB) in cattle caused by *Mycobacterium (M.) bovis* / *M. caprae* is a notifiable disease. Both pathogens are members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) which additionally consists of *M. tuberculosis* and *M. africanum* (tuberculosis in humans), *M. microti* (tuberculosis in mice) and *M. pinnipedii* (tuberculosis in pinnipeds). Recently, even more exotic members of the MTC have been described: *M. orygis* (antelope), *M. suricattae* (meerkat), *M. mungi* (mongoose), Dassie bacillus (rock hyrax). Based on the shared sequence of their 16S rDNA, all members of the MTC are taxonomically very closely related. Due to differences in host specificity and biochemical characteristics, *M. bovis* was the first to be separated from *M. tuberculosis* and recognized as an independent species (Zopf 1883, Lehmann and Neumann 1896, Karlson und Jessel 1970). Meanwhile, it has been recommended to elevate most of the other members of the MTC to species rank, as well. Due to their close relationship, complex molecular methods are applied to differentiate members of the MTC (RD [region of difference]-typing, spoligotyping). RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis based on IS6110, the formerly most frequently used method to differentiate *M. tuberculosis*, has its limitation for differentiation of *M. bovis* due to the fact that normally less than five IS6110 copies are present in *M. bovis*. Spoligotyping and MIRU/VNTR (mycobacterial interspersed repetitive unit / variable number of tandem repeat) typing are nowadays the most frequently used methods for molecular epidemiology of MTC members. All members of the MTC possess zoonotic potential, since they may cause tuberculosis not only in their primary hosts, but also in other mammalian

species, occasionally even in pet birds (psittacids). The most crucial feature for disease transmission is the chronic, long lasting (weeks, months, years) subclinical course of the disease still with possible excretion of the pathogen during this stage. Therefore, pasteurization of milk, regular meat inspection, immunological monitoring, culling of positive cattle as well as attention to clinical symptoms compatible with tuberculosis in cattle and other animal species (companion animals, zoo animals, captive and free-ranging wild animals) are prerequisites for efficient control of zoonotic tuberculosis.

During the first half of the 20th century up to 63% of cattle farms harbored tuberculosis-positive cattle and approximately 45% of all slaughtered cattle showed lesions compatible with tuberculosis. Due to a consequent eradication campaign between 1952 and 1961 (West) and 1959 and 1978 (East), based on tuberculin skin reaction, Germany became a country practically free from bovine tuberculosis. In 1996, Germany was declared officially free from bovine tuberculosis (Commission decision 97/76/EC), which means that at least 99.9% of the cattle holdings per year are TB-free and since then, this status has been maintained.

At the end of the year 2015, 12 635 456 cattle were kept in 151 175 farms. Similar to 2014 with 13 outbreaks, 12 outbreaks were notified in 2015 in the federal states of Bavaria (8), Baden-Württemberg (near to the Bavarian border; 1), Lower Saxony (2) and in Mecklenburg-Western Pomerania (1). The three cases in northern Germany were epidemiologically linked due to animal contact. Four cases were detected by an inspection of animals intended for slaughter, three by meat inspection, three cases by contact tracing,

one case upon clinical suspect, and another case by compulsory testing (not specified).

Allgemeine Angaben

Die Tuberkulose der Rinder ist eine anzeigepflichtige Tierseuche, hervorgerufen durch *Mycobacterium (M.) bovis* oder *M. caprae*. Beide sind Angehörige des *M. tuberculosis*-Komplexes (MTC) und als Erreger der Rindertuberkulose in Deutschland von vergleichbarer Bedeutung. Allerdings unterscheiden sie sich in ihrer geographischen Prävalenz. Dem MTC gehören außerdem auch *M. tuberculosis* und *M. africanum* (Tuberkulose des Menschen), *M. microti* (Tuberkulose der Maus) und *M. pinnipedii* (Tuberkulose der Robben) an. Mit *M. orygis* (Antilope), *M. suricattae* (Erdmännchen), *M. mungi* (Mungo) und dem Dassie bacillus (Klippeschliefer) wurden in jüngerer Zeit weitere exotische Mitglieder des MTC beschrieben. Die Angehörigen des MTC unterscheiden sich nicht in ihrer 16S rDNA. Aufgrund der Unterschiede in der Wirtsspezifität sowie biochemischer Marker wurde zunächst mit *M. bovis* (Karlson und Jessel 1970) eine eigene Spezies neben *M. tuberculosis* (Zopf 1883; Lehmann and Neumann 1896) geschaffen. Später wurde auch für die meisten anderen MTC-Erreger die Einstufung als eigene Spezies vorgeschlagen. Diese taxonomischen Einteilungen sind im Fluss und werden unterschiedlich gehandhabt. Bis in die zweite Hälfte des 20. Jahrhunderts war in Deutschland ein großer Teil der Rinderbestände, d. h. bis zu 63 % der Betriebe bzw. bis zu 45 % der Schlachtrinder, tuberkulosepositiv. Der Zweite Weltkrieg trug erheblich zur Verschärfung der Lage bei. Durch konsequente Bekämpfung auf Basis der Tuberkulin-Reaktion wurde in Deutschland zwischen den Jahren 1952 und 1961 (West)

bzw. 1959 und 1978 (Ost) der Status der amtlich anerkannten Freiheit von Tuberkulose erreicht. Nach der Vereinigung im Jahr 1990 wurde der Status am 17. Dezember 1996 durch EU-Entscheidung (Entscheidung der Kommission 97/76/EG) bestätigt. Deutschland ist auf Grund dieser Entscheidung seit dem 1. Juli 1996 amtlich anerkannt frei von Rindertuberkulose, da pro Jahr in weniger als 0,1 % der Rinderhaltungsbetriebe Tuberkulose amtlich festgestellt wird.

Statistische Angaben

Zum Stichtag 3. November 2015 wurden in Deutschland 12 635 456 Rinder in 151 175 Betrieben gezählt (Statistisches Bundesamt, Viehbestand, Fachserie 3 Reihe 4.1). Im Vergleich zum Jahr 2014 mit 13 Ausbrüchen ging die Anzahl im Jahr 2015 auf zwölf Ausbrüche in den Bundesländern Bayern (BY; 8), Baden-Württemberg (BW; 1), Niedersachsen (NI; 2) und Mecklenburg-Vorpommern (MV; 1) zurück. Für die drei Ausbrüche in NI und MV wurde ein epidemiologischer Zusammenhang nachgewiesen. Insgesamt wurden vier Ausbrüche im Zuge von Schlachttieruntersuchungen, drei bei der amtlichen Fleischuntersuchung, drei bei Kontaktuntersuchungen, ein Ausbruch auf Grund klinischer Symptome und einer bei einer nicht näher definierten Pflichtuntersuchung entdeckt. Bundesweit lag der Anteil der Betriebe mit positivem Tuberkulose-Nachweis damit bei 0,007 %. Dies liegt weit unterhalb des gegenwärtig gemäß Anhang A Abs. 1 Nr. 4. a der Richtlinie 64/432/EWG, geändert durch die Richtlinie 98/46/EG, festgelegten Grenzwertes von 0,1 %. Tabelle 1 zeigt die Anzahl der Ausbrüche in Deutschland in den Jahren 2005 bis 2015.

Tabelle 1: Tuberkulose-Ausbrüche in den Jahren 2005 bis 2015 (ohne Verdachtsmeldungen)
(TSN-Abfrage 27.Mai 2016)

Bundesland	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Brandenburg					2						
Bayern	3	2	7	8	18	5	2	20	35	9	8
Baden-Württemberg	2	2	2						7		1
Hessen						1					
Mecklenburg-Vorpommern											1
Niedersachsen			3	13	3	4	3	3	4	2	2
Nordrhein-Westfalen				1				1			
Schleswig-Holstein				1		1					
Sachsen										2	
Sachsen-Anhalt											
Thüringen		1									
Gesamt	5	5	12	23	23	11	5	24	46	13	12

Labordiagnostische Untersuchungen

Aufgrund ihrer engen Verwandtschaft können die einzelnen Spezies bzw. Subspezies des MTC nur durch komplexe Typisierungsmethoden voneinander unterschieden werden, z. B. mittels Spoligotypisierung, DNA-Sequenzanalyse des *gyrB*-Gens auf der Basis von definierten Punktmutationen (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) oder auf der Basis hochspezifischer PCR-Reaktionen (RD [region of difference]-Typisierung). Die Unterscheidung aufgrund biochemischer Eigenschaften mittels konventioneller Kultivierungsmethoden hat ihre Bedeutung heute weitgehend verloren. Für die Typisierung von MTC-Erregern unterhalb der Spezies-Ebene zur Beantwortung von Fragen mit molekularepidemiologischem Hintergrund stehen verschiedene

Methoden zur Verfügung. Die Spoligotypisierung (spacer - oligo) basiert auf der Analyse der Direct-Repeat-Region (DR), einer Region im Genom von MTC-Erregern, die durch das Vorkommen von kurzen repetitiven DNA-Sequenzen, unterbrochen durch ebenso kurze nicht repetitive Sequenzen (Spacer), charakterisiert ist. Für diese Untersuchungen steht heute ein Microarray zur Verfügung. Durch Hybridisierung von biotinylierten PCR-Produkten der DR-Region an Spacer-Oligonukleotide mit anschließender Entwicklung einer Farbreaktion werden spezies-spezifische Signalmuster generiert, welche durch das Vorhandensein oder Fehlen von Spacer-Sequenzen charakterisiert sind. In der Regel werden die Spacer 1 bis 43 zur Charakterisierung herangezogen. Das Ergebnis kann als numerischer

Code dargestellt werden. Durch Variationen innerhalb dieser Muster ist eine begrenzte Möglichkeit der Differenzierung unterhalb der Spezies-Ebene gegeben. Insgesamt ist die DR-Region jedoch relativ stabil.

Eine weitere Methode, die Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus, basiert auf der Charakterisierung der Verteilung der Insertionssequenz (IS) *6110* im Genom, die bei allen Mitgliedern des MTC in unterschiedlich großer Kopienzahl vorkommt. Da das *IS6110* bei *M. bovis* meist nur in sehr geringer Kopienzahl vorliegt, eignet sich diese Methode jedoch nicht sehr gut für die Differenzierung dieser Isolate. Darüber hinaus können die Ergebnisse nicht in einen numerischen Code übersetzt werden, so dass die Methode für globale Vergleichsuntersuchungen wenig geeignet ist. Eine weitere, neuere Methode beruht auf der Identifizierung von MIRU / VNTR (mycobacterial interspersed repetitive unit / variable number of tandem repeat) -Sequenzen. Dies sind kurze repetitive Sequenzen, die über das Genom verteilt vorkommen. Jeder Locus ist durch seine spezifische Sequenz charakterisiert. Einzelne Isolate unterscheiden sich durch die Anzahl der Repetitionen an einem definierten Locus. Diese Methode ist ausschließlich PCR-basiert, automatisierbar und generiert einen numerischen Code als Ergebnis. Heute gewinnt jedoch die Sequenzierung ganzer Genome bzw. der SNPs (single nucleotide polymorphisms) auf dem Gesamtgenom zur Beantwortung molekular-epidemiologischer Fragestellungen mehr und mehr an Bedeutung.

Neben der Rindertuberkulose werden auch Tuberkuloseverdachtsfälle bei anderen Tierarten untersucht. Es handelt sich dabei um kleine Haustiere wie Hunde und Katzen, Nutzgeflügel, Ziervögel, um Tiere aus zoologischen Einrichtungen oder privaten Haltungen (Neuweltkameliden, Robbe, Tapir, Känguru, Primaten, Elefanten u. a.)

bzw. Gehegewild (Sika-, Damwild) oder frei lebende Wildtiere, bei welchen immer wieder Erreger des MTC, aber auch andere Mykobakterienspezies nachgewiesen werden.

Die im Nationalen Referenzlabor (NRL) angewandten diagnostischen Methoden umfassen:

1. die Isolierung der Erreger aus tuberkulös verändertem bzw. verdächtigem Gewebe (Lymphknoten, Organe, Schleimhaut) oder Sekreten, deren Kultivierung sowie deren molekulare Identifizierung und Typisierung,
2. die Differenzierung und Typisierung eingesandter Mykobakterien-Isolate,
3. den Nachweis erregerspezifischer DNA in Gewebe,
4. in Ausnahmefällen die Durchführung des Interferon-Gamma-Freisetzungstests (IGRA) mit Blutproben und,
5. in Ausnahmefällen den Nachweis von Antikörpern (nicht beim Rind)

Die Methodik der Isolierung und Kultivierung des Erregers und des direkten molekularen Nachweises ist in der amtlichen Methodensammlung niedergelegt (<https://www.fli.de/de/publikationen/amtliche-methodensammlung/>). Zur Differenzierung der Isolate werden vorwiegend molekularbiologische Verfahren wie PCR, Spoligotypisierung, MIRU-/VNTR-Typisierung, Restriktionsanalysen von PCR-Produkten (z. B. *hsp65* Gen, *gyrB*-Gen) oder DNA-Sequenzanalyse (16S rDNA) eingesetzt. Nicht alle diese Methoden werden routinemäßig angewandt. Vor allem die vier letztgenannten molekularen Methoden kommen nur gezielt bei Fragestellungen zum Einsatz, die auf anderen Wegen nicht zufriedenstellend beantwortet werden können. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Isolierung und Speziesbestimmungen aufgeführt.

Tabelle 2: Ergebnisse der Speziesbestimmung von Mykobakterien-Isolaten im Jahr 2015

Eingesandte Proben	Anzahl (x Proben von n Tieren)	Erreger (Tiere)			
		MTC	<i>M. avium ssp. hominissuis</i>	<i>M. avium ssp. avium</i>	andere
Rind	52/17	20	1	0	2
Schwein	2/2	0	2	0	0
Geflügel / Vögel	27/16	0	4	12	0
Katze, Hund	11/7	1	1	0	1
Zootiere	51/28	1	4	0	4
Wild (Gehege)	62/18	3	0	0	0
Heimtiere	8/2	0	7	0	0
Wechselwarme	6/4	0	0	0	6
Gesamt	219/94	25	19	12	13

Bei Blutproben von zwei Wisenten wurde im Rahmen der Diagnostik ein Gamma-Interferon-Freisetzungstest durchgeführt. Bei beiden Tieren wurde ein negatives Ergebnis erzielt.

Staatliche Bekämpfungsmaßnahmen

Die Zunahme der Tuberkulose-Ausbrüche zwischen 2009 und 2013 hatten zu einer lebhaften Diskussion über die Effizienz der amtlichen Tuberkulose-Diagnostik und zu einer Überarbeitung der Tuberkulose-Verordnung geführt. Die wesentlichste Veränderung, welche die Feststellung der Tuberkulose beim Rind betrifft, ist die Anordnung, dass positive und fragliche Ergebnisse des Tuberkulin-Hauttests und des Gamma-Interferon-Freisetzungstests eine diagnostische Tötung der betroffenen Tiere nach sich ziehen und ein standardisiertes Panel von elf Gewebeproben molekularbiologisch und, bei Bedarf, bakteriologisch untersucht wird. Nur durch direkten Nachweis des Erregers oder seiner DNA wird ein positiver Befund verifiziert. Damit soll ausgeschlossen werden, dass Landwirte durch fragliche oder falsch positive Ergebnisse immunologischer Tests langfristig ungerechtfertigten Restriktionen unterworfen werden und der Status von Deutschland als amtlich anerkannt frei von Rindertuberkulose (OTF) gefährdet wird. Als sensitivste und verlässlichste,

aber auch langwierigste Nachweismethode (Goldstandard) gilt bei der Tuberkulose nach wie vor die Isolierung und Kultivierung des Erregers im bakteriologischen Labor. Durch die neue Tuberkulose-Verordnung hat sie in der amtlichen Diagnostik wieder an Gewicht gewonnen. Das 2013/2014 bundesweit durchgeführte einmalige Monitoring ergab, dass der OTF-Status auch mehr als 15 Jahre nach Beendigung der regelmäßigen und flächendeckenden Tuberkulinisierung der Rinder nicht gefährdet ist. Der seltene, aber dennoch in jüngerer Zeit wiederholt aufgetretene Fall, dass *M. tuberculosis* bei hauttestpositiven Rindern nachgewiesen bzw. vermutet wurde, macht deutlich, dass weitere Festlegungen zum amtlichen Umgang mit derartigen Ausnahmefunden getroffen werden müssen.

Zoonosepotenzial

Als Erreger der klassischen Tuberkulose besitzen alle Mitglieder des MTC zoonotisches Potenzial. Sie sind zwischen Mensch und Tier sowie zwischen einzelnen Säugetierarten, unter bestimmten

Bedingungen sogar auf Vögel (v. a. Psittaziden), übertragbar und können schwere Erkrankungen hervorrufen. Beim individuellen Patienten (Mensch) lässt sich eine durch *M. bovis* oder *M. caprae* verursachte Tuberkulose nicht von einer durch *M. tuberculosis* induzierten Tuberkulose unterscheiden. Allerdings manifestiert sich bovine Tuberkulose beim Menschen häufig als extrapulmonale Tuberkulose. Umgekehrt führt die Infektion mit *M. tuberculosis* beim Rind in der Regel nur zu einer lokalen Ansiedelung des Erregers und zur Ausbildung eines Primärkomplexes ohne Ausbreitung in andere Organsysteme. Zu Hochzeiten der Rindertuberkulose in Deutschland, bis in die zweite Hälfte des 20. Jahrhunderts, waren insgesamt etwa 13 % der humanen Tuberkulosefälle auf eine Infektion mit *M. bovis* bzw. *M. caprae* zurückzuführen, die damals noch nicht differenziert werden konnten. Dieser Wert lag über dem internationalen Durchschnitt von ca. 10 %. Übertragungsweg par excellence war der Verzehr von Rohmilch, so dass bei Kindern je nach Region eine Häufigkeit von boviner Tuberkulose von bis zu 40 % und mehr registriert wurde. Durch die Einführung der Pasteurisierung der Milch und die Tilgung der Tuberkulose in den Rinderbeständen wurde die Anzahl der Fälle boviner Tuberkulose beim Menschen bis heute auf zwischen 1 % und 2 % aller Tuberkulosefälle reduziert. Dabei handelt es sich wohl häufig um Reaktivierungen alter Infektionen bei Menschen in höherem Lebensalter oder Menschen mit Migrationshintergrund. Neuinfektionen sind jedoch auch heute, vor allem bei Personen mit engem Bezug zur Landwirtschaft nicht ausgeschlossen.

Weitere Infektionsquellen für den Menschen können andere Nutztierarten als das Rind, kleine Haustiere, wie Hund und Katze oder Zootiere und

Gehegewild, in neuerer Zeit auch Neuweltkameliden darstellen, die unerkannt infiziert in engem dauerhaftem Kontakt mit dem Menschen leben. Unter ungünstigen Bedingungen ist auch eine Übertragung von Mensch zu Mensch möglich. Je nachdem, ob es sich um die klassische Tröpfcheninfektion oder den oralen Infektionsweg handelt, kann es eher zur Lungentuberkulose oder zu einer extrapulmonalen Manifestation kommen.

Ein Wildtierreservoir, das sich durch Vorkommen von *M. caprae* vor allem bei Rotwild manifestiert, besteht im Allgäu und angrenzenden Gebieten der österreichischen Alpen. Die potenzielle wechselseitige Übertragung des Erregers zwischen Rind und Wildtier erschwert hier die nachhaltige Bekämpfung der Tuberkulose beim Rind. In anderen Regionen Deutschlands wurde *M. bovis* / *M. caprae* in der Vergangenheit bei Wildtieren nur sehr sporadisch gefunden, wohingegen Tuberkulose hervorgerufen durch *M. microti* bei karnivoren und omnivoren Wildtieren sowie Haustieren mit Zugang zur freien Natur und Zootieren mit Zugang zu Außengehegen nicht selten nachgewiesen werden kann. Bei Neuweltkameliden wurde der Erreger der Rindertuberkulose in Deutschland bisher nicht nachgewiesen.

Forschung

Die molekulare Epidemiologie der Tuberkulose des Rindes wird mit Hilfe von Multi-Locus-Varianzanalysen der isolierten Erreger untersucht. Hierdurch können Infektionsketten bestätigt und Zusammenhänge zwischen scheinbar unabhängigen Ausbrüchen aufgeklärt werden.

Das Auftreten von Mykobakterieninfektionen bei anderen Tierarten als beim Rind (kleinen Haustieren, Tieren zoologischer Einrichtungen, Gehegewild sowie frei lebenden Wildtieren) wird wegen ihrer Bedeutung als potenzielle Infektions-

Tiergesundheitsjahresbericht 2015

quelle für den Menschen und das Rind ebenfalls untersucht.

Ein weiterer Schwerpunkt der Forschung lag auf Untersuchungen zum Vorkommen und zur molekularen Epidemiologie der Tuberkulose und anderen Mykobakterieninfektionen des Menschen im Nord-

osten Tansanias. Eine große Zahl phylogenetischer Linien von *M. tuberculosis* sowie verschiedene Spezies nicht-tuberkulöser Mykobakterien, isoliert aus Sputumproben von Patienten mit Tuberkuloseverdacht, wurde identifiziert. *M. bovis* war bei diesen Patienten nicht nachzuweisen.