FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Amtliche Methode
und Falldefinition

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

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode **3**

1. Charakterisierung der Infektion **3**

1.1 Erreger 3

1.2 Klinische Symptomatik 3

1.3 Differenzialdiagnose 4

1.4 Diagnostische Indikation 4

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung 4

1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung) 4

2. Untersuchungsmaterial **5**

3. Untersuchungsgang **6**

3.1 Mikroskopische Untersuchung 6

3.2 Real-Time-PCR zum Nachweis von DNS von Erregern des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes und der Identifizierung von *M. bovis* und *M. caprae* in Gewebe 6

3.3 Kulturelle Untersuchung 11

3.4 Eignungsprüfungen 13

3.5 Serologische Untersuchung 13

Anhang **14**

Literatur **23**

Falldefinition – Tuberkulose der Rinder **24**

Falldefinition – Tuberkulose des Geflügels **27**

Falldefinition – Tuberkulose bei *Artiodactyla* (außer Rindern) u. sonstigen landlebenden Mammalia **29**

Amtliche Methode

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 Säugertierarten (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. pinnipedii* (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 sinnfällig verändert ist. Bei der Gebärmuttertuberkulose werden Umrindern und Ausfluss, bei der Tuberkulose des Darmes, die selten äußerlich festzustellen ist, vor allem Veränderungen in den mesenterialen Lymphknoten beobachtet. Die Erkrankung führt schließlich unter starker Abmagerung (Schwindsucht) zum Tode. In Deutschland verläuft die Infektion heutzutage meist ohne nennenswerte Symptomatik und manifestiert sich lediglich durch Organveränderungen, die im Rahmen der tierärztlichen Fleischbeschau auffallen, oder wird durch positiven Ausfall einer Tuberkulinprobe, z. B. im Rahmen einer Exportuntersuchung, festgestellt.
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. 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 Differenzialdiagnose

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

1.4 Diagnostische Indikation

Gemäß Tuberkulose-Verordnung

- Klinischer Verdacht
- Pathologisch-anatomischer Verdacht

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Staatliche Veterinäruntersuchungsämter
- Nationales Referenzlabor für Tuberkulose der Rinder am FLI, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, Tel.: 03641 804 2100

1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Durchführungsverordnung (EU) 2021/620 vom 15. April 2021 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Genehmigung des Status „seuchenfrei“ und des Status der Nichtimpfung für bestimmte Mitgliedstaaten oder Zonen oder Kompartimente dieser Mitgliedstaaten in Bezug auf bestimmte gelistete Seuchen und der Genehmigung von Tilgungsprogrammen für diese gelisteten Seuchen

- ~~2003/467/EG: Entscheidung der Kommission vom 23. Juni 2003 zur Feststellung des amtlich anerkannt tuberkulose-, brucellose- und rinderleukosefreien Status bestimmter Mitgliedstaaten und Regionen von Mitgliedstaaten in Bezug auf die Rinderbestände (bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2003) 1925)~~
- Tuberkulose-Verordnung in der jeweils gültigen Fassung
- Ausführungshinweise zur Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes vom 11. Juni 2014
- VO (EU) 2016/429 Tiergesundheitsrecht, Anhang II „Liste der Seuchen“ (geändert durch VO (EU) 2018/1629): Infektion mit dem *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (*M. bovis, M. caprae, M. tuberculosis*)
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 „Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen“
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/688 „Tiergesundheitsanforderungen an Verbringungen von Landtieren und Bruteiern innerhalb der Union“
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 „Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen“

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 sind. Die Anforderungen an und Vorschriften für den Transport von Proben sind nachzulesen im Kapitel Probenversand der amtlichen Methodensammlung. In Sonderfällen sollten sich Einsender und Laboratorien über den geeigneten Versand verständigen. Die Proben sollten telefonisch oder elektronisch 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.

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

Objektträger mit Karbolfuchsin (siehe Anhang) überschichten, bis dreimal bis zur Dampfbildung erhitzen, 5 min abkühlen lassen, Färbelösung mit H_2O abspülen. Entfärben in Salzsäure (3 %)-Äthanol-Gemisch (siehe Anhang) bis das Präparat keine Farbschlieren mehr abgibt.
Spülen mit H_2O, 1 min mit verdünnter Methylenblaulösung (siehe Anhang) gegenfärben, spülen und trocknen. Mykobakterien erscheinen als rot gefärbte Stäbchen auf blauem Untergrund.

3.1.2 Kaltfärbung

Wenn eine Hitzefixierung (siehe Pkt. 3.1.) 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 Karbolfuchsins (siehe Pkt. 3.1.1) infektiöse Aerosole entstehen könnten.

3.1.3 Färbung mit Acridinorange (nach DIN 58943-32)

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

3.2 Real-Time-PCR zum Nachweis von DNS 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 DNS in Blut- oder Gewebeproben. Da sich mittels PCR nur eine DNS-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 zusätzlich eine Sonde verwendet. In den beschriebenen PCRs wird ein 91 bp-Fragment des hypothetischen Helicase-Gens (HELI) und ein 110 bp-Fragment des IS *1081* amplifiziert. Als internes Kontrollsystem für eine gelungene DNS-Extraktion ist bei beiden PCRs die Amplifizierung eines 96 bp Fragmentes aus der genomischen DNS des Beta-Aktin-Gens (Gewebe) integriert modifiziert nach Toussaint *et al*. [12].
Die Differenzierung in *M. bovis* und *M. caprae* sollte nur bei MTC-positiven Proben durchgeführt werden.
Zum Nachweis von *M. bovis*-DNS 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 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/nicht infiziertes Gewebe als Negativkontrollen bei der Extraktion (Extraktionskontrollen, Reinheitskontrollen) und von positiver und negativer Kontroll-DNS bei der PCR in ausreichender Zahl und Qualität (DNS 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. DNS-Sequenzanalyse) bestätigt werden. Das Referenzlabor ist an der Zusendung von derartigen Proben/Isolaten interessiert.

3.2.2 DNS-Extraktion

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

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

Um einen Hinweis auf vorkommende DNS-Verschleppung während der DNS-Isolierung zu erhalten, sollte bei jeder Extraktion eine DNS-Extraktionskontrolle (EK) mitgeführt werden. Hierbei wird negatives Probenmaterial gleicher Art und 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 DNS-Extraktion aus Gewebe generiert werden. Gegebenenfalls sollten Proben verschiedener Tiere nicht gemeinsam extrahiert werden.

3.2.3 Probenvorbereitung für die DNS-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 erregerhaltiges 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:
Anstelle 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 - 40 mg Gewebe (je nach Angaben des Kit-Herstellers) für die Untersuchung entnommen und als Poolprobe in die DNS-Extraktionsprozedur eingeführt werden.
Wenn parallel eine Kultivierung durchgeführt wird (siehe unten), kann die Entnahme des Gewebes für die DNS-Extraktion vor oder nach der Dekontamination (z. B. mit N-Acetyl-L-Cystein-NaOH [NALC-NaOH]; siehe Anhang) und anschließender Neutralisation erfolgen. Die Entnahme nach der Dekontamination hat den Vorteil, dass das Material für die Kultivierung und für die DNS-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 Gewebeeinsatz etwa ein Volumen von 500 µl in die Extraktion eingeführt werden.

3.2.4 Real-Time-PCR (Reagenzien und Protokollblätter im 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 DNS-Extraktionskontrolle/n (EK) eine „*no template*“ Kontrolle (NTK) und mindestens eine positive Kontrolle (PK) mitgeführt. Als positive Kontrolle sollte eine gering konzentrierte MTC-DNS eingesetzt werden (Ct-Wert ca. 30), um die Gefahr der DNS-Verschlep-

pung auf die Feldproben durch positive Kontroll-DNS zu reduzieren. Die Gefahr der DNS-Verschleppung beim Pipettieren der PCR kann außerdem reduziert werden, indem anstelle von PCR-Mikrotiterplatten PCR-Tubes (Strips) verwendet werden.

3.2.4.2 Herstellung des Mastermix

a) Die Menge des herzustellenden Mastermix richtet sich nach der Anzahl der extrahierten Proben plus der Kontrollansätze (PK, NTK, 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-DNS

a) Zu den vorgelegten 20 µl Mastermix werden 5 µl DNS-Template pipettiert.

b) Neben den extrahierten Feldproben und den EK werden eine positive Kontroll-DNS (PK, z. B. isolierte DNS von *M. bovis* BCG) und eine „*no template*“ Kontrolle (NTK) amplifiziert.

c) Nach Zugabe der Template-DNS 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	
Denaturierung	95 °C	60 sec	45 Zyklen
Annealing	60 °C	30 sec	45 Zyklen
Elongation	72 °C	30 sec	45 Zyklen

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

<u>HEX-Kanal</u>

a) Für alle Gewebeproben (Lymphknoten, Lunge) und die negative Gewebe-DNS sollte Beta-Aktin mit einem Treshold-Cycle (Ct) von ca. 25 (± 4 Ct) nachweisbar sein. Sind die Ct-Werte für die genannten Proben vorhanden, ist von einer erfolgreichen DNS-Isolierung und PCR auszugehen. Ist kein Ct-Wert für die Gewebe-DNS feststellbar und gleichzeitig auch keine MTC-spezifische Amplifizierung erfolgt, ist die Real-Time-PCR nicht auswertbar. Somit ist die DNS-Isolierung und/oder die PCR zu wiederholen.

b) Für die NTK, EK und die PK sollte kein Ct-Wert angezeigt werden, da diese Extrakte keine Gewebe-DNS enthalten.

FAM-Kanal

a) Die für die PK angezeigten Ct-Werte sind abhängig der eingesetzten DNS-Menge der PK, 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 DNS-Verschleppung, insbesondere wenn für die PCR Mikrotiterplatten (und nicht PCR-Strips) verwendet werden.

b) Mit der PK wird die Funktion des MTC-HELI/IS *1081*-, bzw. des RD4- oder des MCAP-Detektionssystems nachgewiesen. Wird für die PK ein unerwarteter bzw. kein Ct-Wert angezeigt, ist die PCR mit einem neuen Primer-Sonden-Mix und/oder einer neuen PK zu wiederholen. Im Falle der MTC- und der RD4-PCR ist DNS von *M. bovis* BCG (zu erwerben bei der DSMZ, Braunschweig; www.dsmz.de) eine geeignete PK. Im Falle der MCAP-PCR muss DNS eines *M. caprae*-Stammes als PK eingesetzt werden. Diese DNS kann beim NRL für Tuberkulose der Rinder angefordert werden.

   Für das negative Gewebe, die NTK und die EK sollte kein Ct-Wert angezeigt werden, da sie keine DNS 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/IS *1081*:

Ein Ct-Wert ≤ 39,0 (berechnet als Mittelwert einer Doppelbestimmung für jede der beiden Zielsequenzen, HELI bzw. IS *1081*) 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. IS *1081*) 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.

RD4

Es sind die gleichen Bewertungskriterien wie bei der HELI/IS *1081*-PCR anzulegen.

- Die zulässige Differenz der Ct-Werte zwischen den Targets RD4 und HELI/IS *1081* ist derzeit nicht festgelegt.

MCAP

Die MCAP-PCR erbringt bei Gewebeproben im Durchschnitt deutlich höhere Ct-Werte als HELI/IS *1081*. Daher ist jeder Ct-Wert < 45,0 als positives Ergebnis zu bewerten.

Negativkontrollen:

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

Beta-Aktin:

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

Bei DNS-Extrakten aus bakterieller Reinkultur oder Puffer/Wasser sollte bei jeder Probe der Doppelbestimmung ein Ct-Wert von ≥ 41,0 erreicht werden.

<u>Vorgehen und Bewertung bei zweifelhaften Befunden</u>

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 ≤ 39,0), für die andere der beiden Zielsequenzen ein negatives Ergebnis (Ct-Wert > 39,0) 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.

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 Befunderhebung und der Gefahr nicht auswertbarer Kulturen durch Kontamination mit Begleitkeimen aus dem Probenmaterial behaftet.

3.3.1 Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials (Reagenzien im 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 Zentrifugengefäß (50 ml) gut gemischt und 25 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 20 ml PBS zugegeben (Neutralisierung) und die Suspension für 20 min bei 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 die Zugabe von Antibiotika (100 µl PANTA) zu empfehlen ist.

3.3.2 Anlegen des Untersuchungsmaterials

Das vorbehandelte Untersuchungsmaterial wird mit einer Einweg-Pasteurpipette (100 – 150 µl) auf mindestens zwei 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 oder offenen Pipettiersystemen ist aus Gründen des Infektionsschutzes weniger zu empfehlen. Außerdem ist das verimpfbare Volumen bei der Impföse zu gering.

Zur Anwendung werden empfohlen (siehe 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
Coletsos-Medium mit PACT (Antibiotika-Zusatz)	

Die Medien werden bei +37 °C ± 2 °C für mindestens sechs bis acht Wochen aerob bebrütet und einmal pro Woche abgelesen. Festmedien sollten während der ersten sieben Tage in Schräglage inkubiert werden, so dass die Schrägfläche des Nährbodens waagerecht ausgerichtet ist. Da vor allem bei anderen Wirten als beim Rind (Schwein, Wildschwein, Zootieren) auch mit *M. microti* zu rechnen ist, sollte die Bebrütungsdauer dort auf zwölf Wochen ausgedehnt werden.

3.3.3 Identifizierung und Differenzierung

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

Langsames Wachstum (sechs bis acht Wochen) rauer 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 DNS im Übermaß vorhanden ist. Folgende DNS-Sequenzen eignen sich für die Differenzierung:

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

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

Nicht tuberkulöse Mykobakterien können durch DNS-Sequenzanalyse, z. B. 16S rRNS-, *hsp65*- oder *rpoB*-Gen, identifiziert werden.

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

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

3.4 Eignungsprüfungen

Die empfohlenen Methoden gelten als akzeptierte Verfahren. Die Eignungsprüfung sollte durch Mitführen von DNS 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.

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
Vor Licht geschützt in brauner Flasche aufbewahren	

Haltbarkeit: 1 Jahr

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 %	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

Reagenzien und Protokollblätter für die Real-Time-PCR

Herstellung der Primer-Sonden-Mischungen

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

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

MTC-IS *1081*-Mix5-FAM (10 pmol Primer/µl + 1,25 pmol Sonde/µl)

Lösung (Konzentration)	Volumen	Sequenz
MTC-IS *1081*-5F (100 pmol/µl)	200 µl	CTC TCG ACG TTC ATC GCC G
MTC-IS *1081*-5Rn (100 pmol/µl)	200 µl	TGG CGG TAG CCG TTG CGC
MTC-IS *1081*-5FAM (100 pmol/µl)	25 µl	FAM-ATT GGA CCG CTC ATC GCT GCG TTC-BHQ1
0,1 x TE (pH 8,0)	1575 µl	
Totalvolumen	2000 µl	

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

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

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

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

modifiziert nach Reddington *et al.* [5]

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

Lösung (Konzentration)	Volumen	Sequenz
ACT2-1030-F_DNA (100 pmol/µl)	50 µl	AGC GCA AGT ACT CCG TGT G
ACT-1135-R (100 pmol/µl)	50 µl	CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T
ACT-1081-1105-YAK (100 pmol/µl)	25 µl	YakimaYellow-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-BHQ1
0,1 x TE (pH 8,0)	1875 µl	
Totalvolumen	2000 µl	

modifiziert nach Toussaint *et al.* [12]

Protokollblatt - MTC-HELI+EK-System

Einsendungs-/Labor-Nr.: ..... Einsendung vom: .....

Real-Time-PCR Lauf-Nr: ..... Datum: .....

Bearbeiter: ..... Uhrzeit: .....

Bemerkungen: .....

Pipettier-folge	**Mastermix-Komponenten** *(QuantiTect Multiplex PCR Kit no ROX(Qiagen))*	**MTC+IC-Nachweis**	
		1 x	**N x**
1.	RNase freies Wasser	3,5 µl	
2.	2x QuantiTect Multiplex Master Mix	12,5 µl	
3.	Primer-Sonden-Mix 1: **Actin-DNA-Mix-YAK**	2,0 µl	
4.	Primer-Sonden-Mix 2: **MTC-HELI-Mix4-FAM**	2,0 µl	
	Total Volumen Mastermix	**20 µl**	
5.	**Zugabe der Template-DNS** (Feldproben, EK, PK, NTK)	je 5 µl	
	Total Volumen Reaktionsansatz	**25 µl**	

Belegungsplan der 96-well-Platte im Cycler:

Temperaturprofil:

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

Messung: FAM+HEX in Annealing-Phase

Ergebnisse:

EK .....

MTC .....

Protokollblatt - MTC-IS *1081*+EK-System

Einsendungs-/Labor-Nr.: ..... Einsendung vom: .....

Real-Time-PCR Lauf-Nr: ..... Datum: .....

Bearbeiter: ..... Uhrzeit: .....

Bemerkungen: .....

Pipettier-folge	**Mastermix-Komponenten** *(QuantiTect Multiplex PCR Kit no ROX(Qiagen))*	**MTC+IC-Nachweis**	
		1 x	**N x**
1.	RNase freies Wasser	3,5 µl	
2.	2x QuantiTect Multiplex Master Mix	12,5 µl	
3.	Primer-Sonden-Mix 1: **Actin-DNA-Mix-YAK**	2,0 µl	
4.	Primer-Sonden-Mix 2: **MTC-IS 1081-Mix5-FAM**	2,0 µl	
	Total Volumen Mastermix	**20 µl**	
5.	**Zugabe der Template-DNS** (Feldproben, EK, PK, NTK)	je 5 µl	
	Total Volumen Reaktionsansatz	**25 µl**	

Belegungsplan der 96-well-Platte im Cycler:

Temperaturprofil:

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

Messung: FAM+HEX in Annealing-Phase

Ergebnisse:

EK .....

MTC .....

Protokollblatt - *M. bovis*-RD4+EK-System

Einsendungs-/Labor-Nr.: ..... Einsendung vom: .....

Real-Time-PCR Lauf-Nr: ..... Datum: .....

Bearbeiter: ..... Uhrzeit: .....

Bemerkungen: .....

Pipettier-folge	**Mastermix-Komponenten** (*QuantiTect Multiplex PCR Kit no ROX(Qiagen)*)	**MTC+IC-Nachweis**	
		1 x	**N x**
1.	RNase freies Wasser	3,5 µl	
2.	2x QuantiTect Multiplex Master Mix	12,5 µl	
3.	Primer-Sonden-Mix 1: **Actin-DNA-Mix-YAK**	2,0 µl	
4.	Primer-Sonden-Mix 2: ***M. bovis* RD4-Mix5-FAM**	2,0 µl	
	Total Volumen Mastermix	**20 µl**	
5.	**Zugabe der Template-DNS** (Feldproben, EK, PK, NTK)	je 5 µl	
	Total Volumen Reaktionsansatz	**25 µl**	

Belegungsplan der 96-well-Platte im Cycler:

Temperaturprofil:

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

Messung: FAM+HEX in Annealing-Phase

Ergebnisse:

EK .....

MTC .....

~~Protokollblatt - *M. caprae*-MCAP+EK-System~~

~~Einsendungs-/Labor-Nr.: ..... Einsendung vom: .....~~

~~Real-Time-PCR Lauf-Nr: ..... Datum: .....~~

~~Bearbeiter: ..... Uhrzeit: .....~~

~~Bemerkungen: .....~~

~~**Pipettier-folge**~~	~~**Mastermix-Komponenten**~~ ~~(*QuantiTect Multiplex PCR Kit no ROX(Qiagen)*)~~	~~**MTC+IC-Nachweis**~~	
		~~**1 x**~~	~~**N x**~~
~~**1.**~~	~~RNase freies Wasser~~	~~3,5 µl~~	
~~**2.**~~	~~2x QuantiTect Multiplex Master Mix~~	~~12,5 µl~~	
~~**3.**~~	~~Primer-Sonden-Mix 1: **Actin-DNA-Mix-YAK**~~	~~2,0 µl~~	
~~**4.**~~	~~Primer-Sonden-Mix 2: ***M. caprae* MCAP-f-r MCAP-FAM**~~	~~2,0 µl~~	
	~~**Total Volumen Mastermix**~~	~~**20 µl**~~	
~~**5.**~~	~~**Zugabe der Template-DNS** (Feldproben, EK, PK, NTK)~~	~~je 5 µl~~	
	~~**Total Volumen Reaktionsansatz**~~	~~**25 µl**~~	

~~Belegungsplan der 96-well-Platte im Cycler:~~

~~Temperaturprofil:~~

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

~~Messung: FAM+HEX in Annealing-Phase~~

~~Ergebnisse:~~

~~EK .....~~
~~MTC .....~~

Medien für die kulturelle Untersuchung

Feste Nährmedien

Fertige Festmedien	Bezugsquellen (Beispiele)
Löwenstein-Jensen-Nährbodenmit Glycerin mit oder ohne Antibiotika (PACT)	Fa. Artelt Enclit Fa. Heipha, jetzt Merck Chemicals Fa. BD Diagnostic Systems
Stonebrink-Nährboden mit oder ohne Antibiotika (PACT)	
Coletsos-Medium mit oder ohne Antibiotika (PACT)	

Zusatz von Antibiotika bei Primärisolierung erforderlich

Flüssige Nährmedien

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

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.

Fertige Supplemente / Grundsubstanzen	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	Fa. Sigma-Aldrich
	Amphotericin B	10 mg	
	Carbenicillin	100 mg	
	Trimethoprim	10 mg	
PANTA	Polymyxin B	60.000 Einheiten	Fa. Sigma-Aldrich
	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_2O, 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 ist 24 Stunden verwendbar.

Natriumchloridlösung

NaCl	9 g
A. dest., steril	1000 ml

Phosphatpuffer (nach Sörensen)

NaCl	9 g
A. dest., steril	1000 ml
KH_2PO_4	4,84 g
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	5,53 g
A. dest.	Ad 1000 ml
	pH = 6,8, 1/15 molar

Literatur

- Rodriguez, J.G., et al., *Species-specific identification of Mycobacterium bovis by PCR*. Microbiology, 1995. **141 (Pt 9)**: p. 2131-8.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Cousins, D.V., et al., *Mycobacteria distenct 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.
- Kirschner, P., E. C. Böttger, *Species identification of mycobacteria using rDNA sequencing*. Methods Mol Biol, 1998. 101: p. 349-61.
- 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.
- 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.
- 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.
- Toussaint, J.F., C. Sailleau, E. Breard, S. Zientara, K. De Clercq. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. J Virol Methods, 2007. 140 (1-2): p. 115-23.

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

Falldefinition – Tuberkulose der Rinder

Klinisches Bild

Die Tuberkulose des Rindes (bTB) ist eine chronisch verlaufende, zyklische Allgemeininfektion, die sich, je nach Eintrittspforte des Erregers und Immunstatus des Wirtes, als granulomatöse Entzündung einzelner Organsysteme äußern oder zur generalisierten Entzündung führen kann. Beim erwachsenen Rind ist meist primär das Respirationssystem und der Rachenraum (aerogener Infektionsweg), beim Kalb eher der Rachenraum und/oder der Digestionstrakt (oraler Infektionsweg) betroffen. Typische pathologisch-anatomische Veränderungen in Organen und zugehörigen Lymphknoten sind Granulome (organisierte Ansammlungen von erregerhaltigen Phagozyten und Immunzellen), deren Zentren sekundär verkäsen und verkalken können. Der klassische Erreger der Rindertuberkulose ist *Mycobacterium bovis*, ein Angehöriger des *M. tuberculosis*-Komplexes (MTC); in Süddeutschland, wie auch in verschiedenen süd- und mitteleuropäischen Ländern, wird jedoch auch *M. caprae* (Synonym: *M. bovis* subspecies *caprae*) häufig oder sogar vorwiegend als Erreger der Tuberkulose beim Rind isoliert.
Inkubationszeit: variabel (Wochen bis Monate)

Zieltierpopulation

Nach EU-VO 2018/1882, Kategorie B, D und E:
Rinder (Gattung *Bison*, *Bos* [inkl. Untergattungen *Bos, Bibos, Novibos, Poephagus*], *Bubalus* [inkl. *Anoa*])

Labordiagnostischer Nachweis

Positiver Befund mit mindestens einer der folgenden Methoden:
Erregernachweis:

- Mikroskopischer Erregernachweis (Nachweis säurefester Stäbchen in Se- oder Exkreten oder im Organabklatschpräparat)
- Erregerisolierung und –identifizierung (Anzüchtung)
- Genomnachweis (PCR)

Indirekter Nachweis:

- Nachweis einer zellvermittelten Immunantwort
  - Tuberkulinprobe mit bovinem Tuberkulin im Mono- oder Simultantest;
  - Interferon-Gamma-Freisetzungstest (IGRA)

Zusatzinformation

Der alleinige Nachweis säurefester Stäbchen weist nur auf das Vorhandensein von Mykobakterien hin. Ein alleiniger indirekter Nachweis begründet nur einen Verdacht.

Epidemiologischer Zusammenhang

Zukauf von oder Kontakt zu Rindern aus Betrieben mit bTB-Ausbruchsgeschehen in der Vergangenheit (auch Jahre), räumliche Nähe zu Betrieben mit bTB-Ausbruchsgeschehen, räumliche Nähe zu Wild mit bekanntem bTB-Reservoir-Status; evtl. Kontakt zu anderen Haus- und Nutztieren (z. B. Neuweltkameliden), die aus Betrieben/Ländern/Regionen mit endemischem bTB-Vorkommen stammen oder Personen, die zu letztgenannten Betrieben bzw. Regionen Kontakt hatten.
Nachweis einer offenen Tuberkulose verursacht durch *M. bovis, M. caprae, M. tuberculosis, M. africanum* oder *M. microti* bei Personen mit Kontakt zur betroffenen Herde.

Voraussetzung für den Verdacht

Sie liegen vor, wenn ein labordiagnostischer Nachweis, eine klinische Untersuchung oder eine pathologisch-anatomische Untersuchung den Ausbruch einer Tuberkulose befürchten lassen.

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzungen für die Feststellung eines Falles:

- Erregernachweis durch Erregerisolierung und -identifizierung oder Genomnachweis
- Nachweis einer zellvermittelten Immunantwort mit Bestätigung durch ein positives Ergebnis des direkten Erregernachweises (Genomnachweis, Kultur)

Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- ~~2003/467/EG: Entscheidung der Kommission vom 23. Juni 2003 zur Feststellung des amtlich anerkannt tuberkulose-, brucellose- und rinderleukosefreien Status bestimmter Mitgliedstaaten und Regionen von Mitgliedstaaten in Bezug auf die Rinderbestände (bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2003) 1925)~~
- Durchführungsverordnung (EU) 2021/620 vom 15. April 2021 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Genehmigung des Status „seuchenfrei“ und des Status der Nichtimpfung für bestimmte Mitgliedstaaten oder Zonen oder Kompartimente dieser Mitgliedstaaten in Bezug auf bestimmte gelistete Seuchen und der Genehmigung von Tilgungsprogrammen für diese gelisteten Seuchen
- Tuberkulose-Verordnung in der jeweils gültigen Fassung
- Ausführungshinweise zur Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes vom 11. Juni 2014
- VO (EU) 2016/429 Tiergesundheitsrecht, Anhang II „Liste der Seuchen“ (geändert durch VO (EU) 2018/1629): Infektion mit dem *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (*M. bovis, M. caprae, M. tuberculosis*)
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 „Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten

und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen“

- Delegierte Verordnung (EU) 2020/688 „Tiergesundheitsanforderungen an Verbringungen von Landtieren und Bruteiern innerhalb der Union“
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 „Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen“

Falldefinition – Tuberkulose des Geflügels

Klinisches Bild

Der Erreger wird meist oral über Futter, Wasser oder kontaminiertes Erdreich aufgenommen und kann die Tiere über längere Zeit ohne klinische Symptome infizieren. Später stehen vor allem unspezifische Symptome (Abmagerung, abnehmende Legeleistung) aber auch Durchfall im Vordergrund. Zudem kann es zu Lähmungserscheinungen kommen. Über den Kot können erhebliche Mengen des Erregers in die Umgebung ausgeschieden werden. Am empfänglichsten sind Hühner und Greifvögel. Aber auch Tauben, Ziervögel, Wassergeflügel oder andere (Wild-)vögel können betroffen sein.

M. avium-Infektionen bei Mammalia werden Mykobakteriosen genannt, die allerdings überwiegend durch *Mycobacterium avium* ssp. *hominissuis* hervorgerufen werden. Beim Schwein können tuberkuloseähnliche Veränderungen in inneren Organen (Lymphknoten) auftreten, die während der Schlachtung nachgewiesen werden.

Inkubationszeit: über ein Jahr

Labordiagnostischer Nachweis

Positiver Befund mit mindestens einer der folgenden Methoden:

Erregernachweis:

- Mikroskopischer Erregernachweis (Nachweis säurefester Stäbchen im Organabklatschpräparat)
- Erregerisolierung und –identifizierung (Anzüchtung)
- Genomnachweis (PCR)

Indirekter Nachweis:

- Nachweis einer zellvermittelten Immunantwort (Tuberkulinprobe mit aviärem Tuberkulin)

Zusatzinformation

Derbknotige Einlagerungen in Leber, Milz, Darm, Knochenmark (Röhrenknochen) im Rahmen einer pathologisch-anatomischen Untersuchung begründen einen Verdacht. Der alleinige Nachweis säurefester Stäbchen weist nur auf das Vorhandensein von Mykobakterien hin.

Epidemiologischer Zusammenhang

Keine Angaben.

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

Voraussetzung für den Verdacht

Entfällt.

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzungen für die Feststellung eines Falles:
Erregernachweis durch Erregerisolierung und -identifizierung oder Genomnachweis

Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der jeweils geltenden Fassung
- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz – TierGesG)

Falldefinition – Tuberkulose bei *Artiodactyla* (außer Rindern) und sonstigen landlebenden Mammalia

Klinisches Bild

Betrifft alle durch Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes (MTC) hervorgerufenen Tuberkulosen bei von Menschen gehaltenen Tieren oder zur Fleischerzeugung gehaltenem Gehegewild, die ein tuberkulöses Erscheinungsbild im klinischen Verlauf aufweisen, außer der Tuberkulose der Rinder, für die eine Anzeigepflicht besteht. Allerdings differiert das klinische Erscheinungsbild je nach Tierart, *Mycobacterium sp.* und Weg der Aufnahme des Erregers sehr stark und kann sogar über Jahre ohne klinische Symptome verlaufen. Es kann zu Granulombildung mit derbknotigen Einlagerungen bis hin zu Verkalkungen kommen, die in inneren oder auch äußeren Organen auftreten können, und so den Verdacht einer Tuberkulose nahelegen.
Inkubationszeit: variabel (Wochen bis Monate)

Tierpopulation

Nach EU-VO 2018/1882
Kategorie D und E: *Artiodactyla* (außer *Bison*, *Bos* und *Bubalus* ssp.)
Kategorie E: Landlebende Mammalia (außer *Artiodactyla*)

Labordiagnostischer Nachweis

Positiver Befund mit mindestens einer der folgenden Methoden:
Erregernachweis:

- Mikroskopischer Erregernachweis (Nachweis säurefester Stäbchen in Se- oder Exkreten oder im Organabklatschpräparat)
- Erregerisolierung und –identifizierung (Anzüchtung)
- Genomnachweis (PCR)

Bei Ziegen (Ungulaten des Genus *Caprae*) positiver Befund mit mindestens einer der folgenden Methoden:

- Nachweis einer zellvermittelten Immunantwort:
- Tuberkulinprobe
- Interferon-Gamma-Freisetzungstest [IGRA]

Zusatzinformation

Der alleinige Nachweis säurefester Stäbchen weist nur auf das Vorhandensein von Mykobakterien hin.
Durch nichttuberkulöse Mykobakterien können ähnliche klinische Bilder wie von Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes hervorgerufen werden. Bei fraglichen Isolaten kann zur Abklärung eine Speziesbestimmung am FLI, Standort Jena, vorgenommen werden.

Epidemiologischer Zusammenhang

Keine Angaben.

Voraussetzung für den Verdacht

Entfällt.

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzungen für die Feststellung eines Falles:
Nachweis eines Erregers des *M. tuberculosis*-Komplexes (MTC, *M. bovis, M. caprae* oder *M. tuberculosis*) durch Isolierung und Identifizierung oder Genomnachweis von MTC bei landlebenden Mammalia außer Rindern.

Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der jeweils geltenden Fassung
- Gesetz zur Vorbeugung vor und Behandlung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz – TierGesG)
- Verordnung (EU) 2016/429 Tiergesundheitsrecht, Anhang II „Liste der Seuchen“ (geändert durch VO (EU) 2018/1629): Infektion mit dem *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (*M. bovis, M. caprae, M. tuberculosis*)
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 „Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen“
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/688 „Tiergesundheitsanforderungen an Verbringungen von Landtieren und Bruteiern innerhalb der Union“
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 „Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen“

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