

Aus dem Leibniz-Institut für Zoo-und Wildtierforschung (IZW), Berlin

eingereicht über

den Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Untersuchung zum Vorkommen und zur Bedeutung
ausgewählter Mykobakterien bei Zootieren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Annike Maja Salchow
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2018
Journal-Nr.: 4023

Aus dem Leibniz-Institut für Zoo-und Wildtierforschung (IZW), Berlin

eingereicht über

den Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Untersuchung zum Vorkommen und zur Bedeutung ausgewählter
Mykobakterien bei Zootieren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Annikе Maja Salchow
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2018
Journal-Nr.: 4023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Alex Greenwood
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ludwig E. Hölzle
Dritter Gutachter: PD Dr. Sebastian Günther

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

zoo animals; zoological gardens; Mycobacterium spp.; sampling; rectum;
throat; polymerase chain reaction; epidemiology; animal health; public health

Tag der Promotion: 01.03.2018

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-887-0

Zugl.: Berlin; Freie Univ.; Diss.; 2018

Dissertation; Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte; auch die der Übersetzung; des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches; oder Teilen daraus; vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet; vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen; Warenbezeichnungen; usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme; dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2018

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Familie, Freunde und alle, die an mich geglaubt haben

„Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Literaturübersicht	5
2.1	Die Gattung <i>Mycobacterium</i>	5
2.1.1	Taxonomie und mikrobielle Eigenschaften	5
2.1.2	Pathogenese	6
2.1.3	Vorkommen und Bedeutung.....	6
2.1.4	Krankheitsbild.....	7
2.2	<i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplex (MTC).....	8
2.2.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
2.2.2	<i>Mycobacterium bovis</i>	9
2.2.3	<i>Mycobacterium caprae</i>	10
2.2.4	<i>Mycobacterium africanum</i>	11
2.2.5	<i>Mycobacterium microti</i>	11
2.2.6	<i>Mycobacterium pinnipedii</i>	11
2.2.7	<i>Mycobacterium canetti</i>	12
2.2.8	<i>Mycobacterium mungi</i>	12
2.2.9	<i>Mycobacterium orygis</i>	12
2.2.10	<i>Mycobacterium suricattae</i>	12
2.3	Nichttuberkulöse Mykobakterien (NTM).....	13
2.3.1	<i>Mycobacterium avium</i> complex (MAC)	13
2.3.2	Weitere Mykobakterien.....	15
2.4	Mykobakterien in zoologischen Einrichtungen	16
2.5	Diagnostik	17
2.5.1	Direkter Erregernachweis	17
2.5.2	Indirekter Erregernachweis (Nachweis einer Immunreaktion).....	24
3.	Material und Methoden	26
3.1	Zoologische Einrichtungen	26
3.2	Probenmaterial und –entnahme	26
3.2.1	Rachentupfer.....	26
3.2.2	Rektaltupfer.....	26
3.2.3	Mehrfache Beprobung.....	27
3.3	Material und Geräte.....	27
3.3.1	Material für die Probenentnahme	27
3.3.2	Referenzstämme	27

3.3.3	Material und Geräte für die Laboruntersuchungen	28
3.4	Untersuchungsmethoden	32
3.4.1	Untersuchungen zur Sensitivität der verwendeten Methode	32
3.4.2	Untersuchung von Feldproben.....	38
4	Ergebnisse	43
4.1	Untersuchungen zur Sensitivität der verwendeten Methode.....	43
4.1.1	DNA-Extraktion aus Mykobakterien	43
4.1.2	Voranreicherung zur Erhöhung der Sensitivität des Nachweisverfahrens	43
4.2	Untersuchung von Feldproben (Rachentupfer, Rektaltupfer).....	47
4.2.1	Rachentupfer	48
4.2.2	Rektaltupfer	52
4.2.3	Mehrfach Beprobung	64
4.3	Ergebnis aller positiven Feldproben nach Entnahmezeitpunkt	67
5	Diskussion	68
6	Zusammenfassung	75
7	Summary	76
8	Literaturverzeichnis	77
9	Anhänge	96
9.1	Tabellen.....	96
9.2	Abkürzungsverzeichnis	103
10	Danksagung	105

1 Einleitung

Mykobakterien gehören zu den mit am längsten bekannten Krankheitserregern. Sie verursachen bis heute große medizinische Probleme sowohl beim Menschen als auch beim Tier. Die klassische Tuberkulose, verursacht durch *Mycobacterium tuberculosis*, ist nach wie vor die weltweit wichtigste Infektionskrankheit beim Mensch. Dies zeigt sich in der hohen Zahl der jährlichen Neuinfektionen und der Todesfälle. Daneben findet man in der Gattung *Mycobacterium* auch einige wichtige Zoonoseerreger. Obwohl Infektionen mit Mykobakterien schon sehr lang erforscht werden, gibt es noch eine große Zahl an offenen Fragen zur Pathogenese. Daraus resultieren Schwierigkeiten sowohl für eine effektive Therapie, als auch für eine Immunprophylaxe. Aufgrund der komplexen Vorgänge während einer Mykobakterien-Infektion bzw. einer Erkrankung durch Mykobakterien (Immunantwort, persistente Infektionen) ist der diagnostische Nachweis des Erregers nicht immer eindeutig möglich.

In zoologischen Einrichtungen werden eine Vielzahl von Tierarten gehalten, die sowohl für die klassische Tuberkulose, als auch für Infektionen mit anderen Mykobakterienspezies, empfänglich sind. Ein sicherer Nachweis einer Infektion mit Mykobakterien ist deshalb aufgrund des erwähnten zoonotischen Potenzials von herausragender Bedeutung, um die Verantwortung der Einrichtungen gegenüber den Besuchern zu gewährleisten. Zur Beurteilung des tatsächlichen Infektionsrisikos für die Besucher, aber auch für das Zoopersonal, sind Daten über die aktuelle Prävalenz von Mykobakterien-Infektionen bei den Zootieren besonders wichtig.

Der Nachweis von Mykobakterien am lebenden Tier ist mit den heute verfügbaren Testverfahren nicht immer zuverlässig. So ist der oft verwendete Tuberkulin-Hauttest bei vielen Tierarten nicht ausreichend sensitiv. Viele infizierte Tiere werden in der Praxis nicht erkannt.

Die Schwierigkeit des Nachweises von Mykobakterien an lebenden Tieren im Zoo wird von den zuständigen Zootierärzten auf Fachtagungen und in wissenschaftlichen Veröffentlichungen immer wieder hervorgehoben.

Häufig wird eine Infektion mit Mykobakterien erst post mortem festgestellt. Die Tiere zeigten in diesen Fällen keine klinische Symptomatik und die nachfolgenden diagnostischen Untersuchungen von Tierpflegern, Tierärzten und anderen Menschen mit direktem Kontakt zum betroffenen Tier sind meist negativ. Eine Übertragung scheint demnach nicht stattgefunden zu haben. Es stellt sich also die Frage, ob davon ausgegangen werden kann, dass bei den meisten in den zoologischen Einrichtungen vorkommenden Mykobakterien-Infektionen keine Ausscheidung von Mykobakterien stattgefunden hat.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist das Vorkommen von nichttuberkulösen Mykobakterien (NTM). Ihre Rolle als potenzielle Infektionserreger bei immunsupprimierten Individuen ist für die meisten Tierarten völlig ungeklärt. Darüber hinaus können sie bei der Untersuchung auf Tuberkulose falsch positive Testergebnisse verursachen. Auch die Frage nach der Existenz von tierartsspezifischen Mykobakterienspezies in der Gruppe der NTM (mit oder ohne klinische Relevanz) ist weitgehend unbeantwortet.

Die wenigen bisher verfügbaren Studien und Fallbeschreibungen über Erkrankungen durch Mykobakterien (insbesondere des Tuberkulosekomplexes) bei einigen in zoologischen Einrichtungen gehaltenen Tierarten, beziehen sich meist nur auf die diagnostischen Möglichkeiten und Probleme. Bis heute fehlt es an grundlegenden, epidemiologischen Forschungsarbeiten, die sich ausführlich mit den folgenden wichtigen Fragen beschäftigen:

1. Welche Mykobakterienspezies kommen bei welchen in deutschen zoologischen Einrichtungen gehaltenen Tierarten vor?
2. Werden diese Mykobakterien durch Sekret des Respirationstraktes und/oder Kot ausgeschieden?
3. Gibt es Tierarten, die im Zusammenhang mit zoonotischen Mykobakterien ein besonderes Infektionspotenzial haben?
4. Auf welchen Wegen könnten die zoonotischen Mykobakterien auf den Menschen im Zusammenhang mit zoologischen Einrichtungen übertragen werden (Vektoren, direkter Kontakt, etc.)?

Ziel der folgenden Arbeit war es, die Bedeutung der zwei wesentlichsten Ausscheidungswege von Mykobakterien (Rachensekret, Kot) bei Zootieren zu untersuchen. Da die Probenentnahme möglichst wenig invasiv stattfinden sollte, wurden Tupferproben entnommen. Außerdem sollte analysiert werden, welche diagnostischen Methoden sich am besten eignen, um klinisch inapparente Mykobakterien-Infektionen, die mit einer Erregerausscheidung verbunden sind, zu detektieren.

Durch diese Ergebnisse soll die Datenlage zur Prävalenz und Epidemiologie von Mykobakterien-Infektionen in zoologischen Einrichtungen in Deutschland sowie deren zoonotische Bedeutung erweitert werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Gattung *Mycobacterium*

2.1.1 Taxonomie und mikrobielle Eigenschaften

Die Gattung *Mycobacterium* (M.) wird innerhalb der Ordnung Actinomycetales als einzige zur Familie der *Mycobacteriaceae* zugeordnet (Lehmann and Neumann 1896).

Seit ihrer Entdeckung durch Robert Koch bereits im Jahre 1882 sind bis heute über 150 Spezies bekannt (Euzéby 1997).

Man unterteilt die Mykobakterien in den Tuberkulosekomplex (TBC), zu dem die obligat pathogenen Erreger der klassischen Säugetiertuberkulose gehören und die Gruppe der nicht tuberkulösen Mykobakterien (NTM) im Englischen auch als MOTT (Mycobacteria other than tuberculosis) bezeichnet. Zu dieser großen Gruppe gehören sowohl obligat als auch fakultativ pathogene Spezies. Die größte Anzahl der MOTT sind allerdings i.d.R. apathogen und deshalb klinisch nicht relevant. Infektionen durch Vertreter der sog. MOTT werden im Unterschied zu den klassischen Tuberkulosen als Mykobakteriose bezeichnet. Eine Sonderstellung nimmt der Erreger *Mycobacterium leprae* ein, welcher keiner dieser Gruppen zugeordnet wird. Er ist ausschließlich humanpathogen und bisher nicht kultivierbar (Valentin-Weigand 2011).

Mykobakterien sind gerade bis leicht gebogene, unbewegliche und nicht sporenbildende stäbchenförmige Bakterien mit einem aeroben bis mikroaerophilen Stoffwechsel, die in pleomorpher Form bei 37°C auf speziellen Nährböden wachsen (Richter 2009).

Auf Grund ihrer unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit und ihres Pigmentationsverhaltens klassifizierte Runyon die Mykobakterien in vier unterschiedliche Klassen (Runyon 1959; Timpe and Runyon 1954). Diese Einteilung gilt heute aber als veraltet. Man unterscheidet innerhalb der Gattung zwischen schnell (Wachstum innerhalb von 7 Tagen) und langsam wachsenden Spezies (Wachstum zwischen einer und bis zu 16 Wochen), wobei zur letzteren sowohl der Tuberkulose- als auch einige Vertreter (z.B. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) des *M. avium*-Komplex gehören (Wayne and Kubica 1986).

Üblicherweise werden Mykobakterien als grampositiv bezeichnet, wobei sie sich in der Gram-Färbung kaum anfärben lassen (Richter 2009). Sie zeichnen sich durch einen hohen GC-Gehalt (61-71 mol %) in der DNA und einem hohen Lipidgehalt (13 bis 23 %) ihrer Zellwand aus. Diese lipidreiche Zellwand ist Ursache für viele wichtige Eigenschaften der Mykobakterien. Sie verleiht ihnen eine stark ausgeprägte Tenazität, indem sie unter anderem für die Resistenz gegen Säuren und Laugen verantwortlich ist. Ein wichtiges diagnostisches Merkmal ist zu dem die Säurefestigkeit. Diese verdanken die Mykobakterien den Mykolsäuren (langkettige gesättigte Fettsäuren, bestehend aus 60-90 Kohlenstoffatomen) an der Oberfläche ihrer Zellen. Der Farbstoff Karbofuchsin bildet mit freien Mykolsäuren einen Komplex, der sich nicht mit HCl-Alkohol entfärben lässt. Diese Eigenschaft nutzt man bei der Färbung nach Ziehl-Neelsen (Valentin-Weigand 2011; Madigan and Martinko 2006; Böttger 2001; Ehrlich 1882b; Ehrlich 1882a). Ein weiteres wichtiges Lipid der Membran von Mykobakterien ist der sogenannte Cord-Faktor (6,6'-Dimykolyltrehalose). Er wird verantwortlich gemacht für das Zusammenlagern der Erreger zu zopfartigen Gebilden und

sorgt für Phagozytosehemmung und Gewebeschädigung (Spargo et al. 1991; Noll et al. 1956). Toxine im eigentlichen Sinne sind bei Mykobakterien nicht bekannt (Böttger 2001; Russell 2001). Die einzige Ausnahme stellt *M. ulcerans* dar mit der Bildung des Toxins Mycolacton (Valentin-Weigand 2011).

2.1.2 Pathogenese

Der wohl wichtigste Pathogenitätsfaktor von Mykobakterien ist ihr Überleben innerhalb von Makrophagen. Dabei spielt die lipidreiche Zellwand eine wichtige Rolle, denn sie verschafft dem Erreger Schutz vor zahlreichen Noxen (z.B. Sauerstoffradikalen). Mykobakterien dringen über Rezeptoren in die Makrophagenzellen ein und bewirken einerseits eine Hemmung der Phagolysosomenfusion und andererseits umgehen sie dadurch die Ausbildung einer kompetenten, lokalen Immunantwort des Wirtes. Werden Mykobakterien über Phagozytose in die Makrophagen aufgenommen, so verweilen sie dort in Vakuolen bis zum Zelltod der Wirtszelle in Form von Nekrose oder Apoptose (Russell 2001). Diese Eigenschaften finden sich allerdings nur bei langsam und nicht bei den schnell wachsenden Spezies (Sharbati-Tehrani et al. 2005).

Die Infektion von *M. tuberculosis* erfolgt meist über sehr kleine Aerosoltröpfchen, die nicht mehr als ein bis drei Erreger enthalten. Diese dringen bis in die tiefen Lungenbereiche vor und erreichen so die Alveolen. Dies dient wohl nach neusten Vermutungen der Umgehung der unspezifischen, lokalen Immunantwort im oberen Respirationstrakt, die durch die dort vorhandene (kommensale) Mikroflora ausgelöst wird. Des Weiteren exprimiert *M. tuberculosis* Oberflächenlipide wie die Phthiocerol-Dimycolate (=PDIMs), welche die Oberflächenstrukturen (pathogen-activated molecular patterns = PAMPs) maskieren. Dadurch können diese nicht mehr durch Toll-like-Rezeptoren erkannt und gebunden werden. Dieser Mechanismus ist aber für eine effektive Induktion einer Immunantwort notwendig. (Cambier et al. 2014).

Bei der klassischen Tuberkulose entsteht je nach Infektionsweg (aerogen oder oral) ein Primärherd im entsprechenden Organ (Lunge/Darm). Durch die weitere Ausbreitung in die regionalen Lymphknoten kommt es zur Ausbildung des Primärkomplexes. Dieser bleibt in den meisten Fällen der Erkrankung über einen längeren Zeitraum in abgekapselter Form bestehen. Es gibt auch die Möglichkeiten der Ausheilung oder der Frühgeneralisation. Die dabei auftretenden Entzündungsprozesse können proliferativ verlaufen und zur Ausbildung der typischen Granulome (sekundäre Verkäsung) führen oder exsudativ mit einer großen Ansammlung von eiweißreichem Exsudat und folgender Koagulationsnekrose, der primären Verkäsung. Die Frühgeneralisation kann als akute Miliartuberkulose oder protrahierte Generalisation verlaufen. In einigen Fällen kann es aber auch zu einer isolierten chronischen Organtuberkulose kommen. Die Verbreitung läuft hämatogen, lymphogen und intrakanalikulär mit Ergüssen in die Hohlräume (offene Tuberkulose). Aus einem abgekapselten Primärherd kann es auch noch nach vielen Jahren (z.B. bei Immunsuppression) zu einer Spätgeneralisation kommen (Valentin-Weigand 2011).

2.1.3 Vorkommen und Bedeutung

Mykobakterien kommen weltweit vor und stehen vor allem durch ihre obligat pathogenen Vertreter, wie die Mitglieder des Tuberkulose-Komplexes, seit über 100 Jahren im Fokus der Medizin und Wissenschaft. Diese Erreger machen aber nur einen sehr kleinen Teil der über 150 Spezies aus. Der weitaus größere Teil der bekannten Mykobakterien-Spezies lebt als

Saprophyten ubiquitär in der Umwelt und auch in Gewässern. Nichtsdestotrotz treten Infektionen mit diesen nichttuberkulösen Mykobakterien bei immunsupprimierten und selten auch bei immunkompetenten Individuen auf (Manghani et al. 2015; May et al. 1997; Falkinham 1996; Nightingale et al. 1992). Durch die globale Zunahme von HIV-Infektionen beim Menschen in den letzten 10 Jahren, spielen diese nicht pathogenen Mykobakterien-Spezies eine zunehmend wichtigere Rolle (Ballesteros et al. 2016; Tsilimparis et al. 2014). Infektionen mit Mykobakterien gehören zu den Haupttodesursachen bei HIV-Patienten (Diedrich and Flynn 2011; Havlir and Barnes 1999; May et al. 1997; Falkinham 1996; Collins 1989). Laut der WHO starben 2014 1,5 Mio. Menschen an Tuberkulose, 0,1 Mio. davon waren HIV-positiv.

In der Veterinärmedizin spielen zudem einige Vertreter des *M. avium*-Komplexes eine wichtige Rolle. Dazu gehören besonders *M. avium* subsp. *avium*, der Erreger der Geflügeltuberkulose und *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, der Erreger der Paratuberkulose. Wirtschaftlich ist besonders die Paratuberkulose von Bedeutung durch hohe finanzielle Verluste in der Rinderhaltung. Diese finanziellen Einbußen entstehen zum einen durch eine reduzierte Milchleistung, die zu Beginn der Infektion um 10-20 % vermindert ist. Zum anderen durch eine erhöhte Krankheitsanfälligkeit (z. B. erhöhte Mastitisinzidenz) und damit verbundene Tierarztkosten, sowie durch Abmagerung und ein dadurch bis zu 48% verringertes Schlachtgewicht. Auch ein verringertes Geburtsgewicht bei Kälbern von infizierten Kühen wird beschrieben (Sorge 2013). Genaue Zahlen zum finanziellen Verlust in Deutschland liegen nicht vor, aber Studien aus Kanada, den USA, Irland oder den Niederlanden berechnen einen Verlust von beispielsweise 100 US\$ bzw. 2000 Niederländische Gulden (ca. 907 €) pro Tier (Anonymus 2016; Sorge 2013; Mee and Richardson 2008; Tiwari et al. 2005).

Die Rindertuberkulose zählt in Deutschland zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen. Rechtlich gesehen zählen hierzu nur Infektionen, die durch *M. bovis* oder *M. caprae* hervorgerufen werden. Alle anderen Tuberkulosen der Haussäugetiere sind meldepflichtig. Ebenso die durch *M. avium* subsp. *paratuberculosis* verursachte Paratuberkulose bei Rindern, Schafen und Ziegen und die Geflügeltuberkulose (*M. avium* subsp. *avium*). Trotz einzelner Ausbrüche von Rindertuberkulose in den letzten Jahren, besitzt Deutschland bis heute den offiziellen Status „Tuberkulosefrei“. Über das Tierseuchennachrichtensystem (TSN) wurden im Jahr 2013 in Deutschland 46 Tuberkuloseausbrüche in Rinderhaltungen angezeigt, das entspricht einer Herdenprävalenz von ungefähr 0,03% (Moser et al. 2014).

2.1.4 Krankheitsbild

Die durch Mykobakterien verursachten Krankheitsbilder sind je nach Spezies sehr unterschiedlich. So gibt es bei den NTM eine große Bandbreite, die von pulmonalen oder disseminierten (oft bei immunsupprimierten Patienten) Erkrankungen über Lymphadenitiden, verschiedenen Hautinfektionen und granulomatöse Enteritiden reicht (Richter 2009).

Klinische Symptome sind meist sehr unspezifisch oder können sogar ganz fehlen. Es treten unspezifische Allgemeinsymptome auf, wie z.B. Abmagerung und schlechtes Allgemeinbefinden, sowie Husten oder Durchfälle. Andere klinische Symptome werden je nach den beteiligten Organsystemen beschrieben.

Andere klinische Erscheinungsformen finden sich bei der Paratuberkulose (*M. avium* subsp. *paratuberculosis*). Sie zeichnet sich durch eine chronisch-progressive Enteritis mit intermittierend, wässrigen Durchfällen und zunehmender Abmagerung aus.

Einige Vertreter der NTM verursachen Mastitis bei Wiederkäuern (z.B. *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. fortuitum*) und Hautveränderungen wie z. B. das durch *M. ulcerans* verursachte Buruli-Ulkus, eine in den Tropen vorkommende, ulzerierende Hautinfektion (Valentin-Weigand 2011).

2.2 *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTC)

Zum *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTC) gehören die klassischen Erreger der Tuberkulose von Säugetieren. Bis heute werden ihm der Impfstamm *M. bovis* BCG und zehn weitere Spezies zugeordnet: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. canetti*, *M. mungi*, *M. orygis* und *M. suricattae*.

Bei allen genannten Spezies handelt es sich um obligat pathogene, intrazellulär lebende Bakterien, die ein langsames Wachstum aufweisen. Die Übertragung erfolgt vorrangig durch direkten Kontakt kann aber auch auf indirektem Weg geschehen, über die mit Ausscheidungen infizierter Tiere oder Menschen kontaminierte Umwelt. Ein weiterer Übertragungsweg findet über die Milch statt und bei Fleischfresser auch oral durch die Aufnahme infizierter Beutetiere. Auch Bissverletzungen scheinen z.B. beim Dachs einen weiteren Übertragungsweg für *M. bovis* darzustellen (Kaneene et al. 2010).

Ausführliche Studien zur DNA-Homologie haben gezeigt, dass eine sehr enge Verwandtschaft zwischen den einzelnen Vertretern dieses Komplexes besteht und das Genom zu 99,9% übereinstimmt (Garnier et al. 2003). Die Sequenz der 16S rRNA ist stark konserviert und zeigt keine Unterschiede bei den Mitgliedern des MTC (Rogall et al. 1990a). Auch die Sequenzen der Housekeeping-Gene *rpoB*, *katG* und *gyrA* gleichen sich sehr stark. Bei einigen Vertretern des Tuberkulose-Komplexes besteht sogar eine 100%ige Übereinstimmung der Sequenzen. Dies ist z. B. zwischen *M. canetti* Stamm So93, *M. bovis* BCG und *M. bovis* Stamm H37Ra der Fall (Cousins et al. 2003; Aranaz et al. 1999; van Soolingen et al. 1997). Diese ausgeprägte Homologie führt bei einigen Autoren zu der Meinung, dass es sich bei Unterscheidung der Vertreter des MTC eigentlich um Subspezies handeln müsse (Frothingham et al. 1994; Rogall et al. 1990a). Durch ihre historische und aktuell große Bedeutung in Human- und Veterinärmedizin und den starken Unterschieden in Epidemiologie, Wirtsspektrum, Pathogenität und Resistenzverhalten erscheint die heutige Klassifizierung dennoch gerechtfertigt und sinnvoll (Aranaz et al. 1999). Trotz der stark ausgeprägten genetischen Homologie können Subtypen aber durch verschiedene andere molekularbiologische Untersuchungen unterschieden werden, so können z.B. durch single nucleotide polymorphism (SNP)-Analysen des *Gyrase B*-Gens (*gyrB*) sechs von neun Vertretern des MTC differenziert werden (Gey van Pittius et al. 2012).

2.2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis wurde als erste Spezies des MTC bereits 1882 von Robert Koch entdeckt.

Obwohl das Wirtsspektrum von *M. tuberculosis* im Gegensatz zu *M. bovis* sehr eng ist, konnten *M. tuberculosis*-Infektionen bei einer Reihe von Tierarten festgestellt werden. Besonders bei Primaten und Elefanten gibt es viele beschriebene Fälle, aber auch bei der Mendesantilope (*Addax nasomaculatus*), dem Schabracken- (*Tapirus indicus*) und Flachlandtapir (*Tapirus terrestris*), beim kleiner Kudu (*Tragelaphus imberbis*), dem Bergriedbock (*Redunca fulvorufula*), dem Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*), der Giraffe (*Giraffa camelopardalis*) und bei Psittaciden (Lyashchenko et al. 2012; Verma-Kumar et al. 2012; Murakami et al. 2012; Lewerin et al. 2005; Michel et al. 2003; Oh et al. 2002; Montali et al. 2001).

Der Hauptwirt ist der Mensch und so hat *M. tuberculosis* besonders in der Humanmedizin eine große Bedeutung. Zwar waren die Zahlen der Neuinfektionen in Deutschland 10 Jahre lang rückläufig, jedoch stagnierten die Zahlen in den vergangenen vier Jahren. Laut dem Robert-Koch-Institut (RKI) wurden im Jahr 2015 in Deutschland 5.865 Fälle von Tuberkulose gemeldet, dies entspricht einem deutlichen Anstieg gegen über den 4.533 gemeldeten Fällen von 2014 (Fiebig 2016). Weltweit schätzt die WHO 10,4 Millionen Neuerkrankungen und davon 1,2 Millionen Co-Infektionen mit HIV und 1,8 Millionen Todesfälle für das Jahr 2015. Im Jahr 2014 waren es noch 9,6 Millionen Neuinfektionen und 1,1 Millionen Todesfälle. Diese Zahlen lassen erkennen, dass Tuberkulose und speziell die Co-Epidemie HIV/TB weltweit ein dramatisches Problem darstellt. Besonders schwerwiegend sind die zunehmenden Fälle von Infektionen mit multiresistenten Stämmen (diese sind laut Definition mindestens gegen die zwei wichtigsten Medikamente Isoniazid und Rifampicin unempfindlich). Neben den multiresistenten (multidrug-resistant, MDR-TB), gibt es eine zunehmende Zahl festgestellter Infektionen mit „extended-drug resistant“ TB (XDR-TB) und auch Fälle von „total-drug resistant“ TB (TDR-TB). Die XDR-Stämme sind nicht nur gegen die „Firstline“-Medikamente Isoniazid und Rifampicin resistent, sondern auch gegen alle Fluorochinolon-Antibiotika und mindestens gegen eines der Aminoglycosid-Antibiotika Capreomycin, Kanamycin und Amikacin, welche wichtige Reservemedikamente („Secondline“) darstellen. TDR-Stämme entsprechen der heute höchsten Resistenzstufe und sind gegen alle bekannten Firstline- und Secondline-Medikamente resistent. Die WHO schätzt für 2015, dass ein Anteil von 3,3 % der Neuinfektionen durch MDR-Stämme und davon 9,5 % durch XDR-Stämme verursacht wurden (Stand:WHO 2016).

2.2.2 *Mycobacterium bovis*

M. bovis ist der Erreger der Rindertuberkulose und hat das bisher breiteste bekannte Wirtsspektrum des MTC. So konnte *M. bovis* bei den verschiedensten domestizierten und wildlebenden oder in Gefangenschaft gehaltenen Tierarten nachgewiesen werden. Dazu gehören neben Rindern und anderen Boviden (Bison, Büffel), unter anderem eine Vielzahl verschiedenster Wiederkäuer (Ziege, Schaf, Antilope, Hirsch, Giraffe), Kameliden (Alpaka, Lama, Kamel), Feliden (Luchs, Löwe, Gepard, Leopard, Puma, Tiger, Hauskatze), Caniden (Kojote, Rotfuchs, Haushund), Elefanten, Nashörner, Equiden (Pferd, Esel), Tapire, Schweine (Wildschwein, Warzenschwein, Hausschwein), Affen (u.a. Pavian, Rhesusaffe, Schwarz-Weißer Stummelaffe, Bartaffe, Husarenaffe, Siamang, Schimpanse), Amerikanische Schwarzbären, Waschbären, Nagetiere (Ratte, Kaninchen), Hasen, Igel, Frettchen, Hermelin, Maulwürfe und Vögel (Broughan et al. 2013; Ryan et al. 2008; Schmidbauer et al. 2007; Biet et al. 2005; Martín-Atance et al. 2005; Pavlik et al. 2002; Bruning-Fann et al. 2001; de Lisle et al. 2001; Briones et al. 2000; Bruning-Fann et al. 1998;

Helman et al. 1998; Thorel et al. 1998; Bengis et al. 1996; Morris et al. 1996; Stetter et al. 1995; Wilson et al. 1984; Little et al. 1982). Eine besondere Bedeutung als bekannte Wildtierreservoir haben der Dachs in Großbritannien und das Australische Possum in Neuseeland (Coleman and Cooke 2001; de Lisle et al. 2001; Clifton-Hadley et al. 1995; Anderson and Trehwella 1985).

Die Bedeutung, die der Erreger weltweit besitzt, beruht zum einen auf wirtschaftlichen Aspekten wie den durch ihn zu verzeichnenden Verlusten in der Rinderhaltung und zum anderen auf seiner Rolle als Zoonoseerreger (Amanfu 2006). So war die Rindertuberkulose vor Zeiten der Pasteurisierung der Milch eine verbreitete Kinderkrankheit. Tierseuchenrechtlich zählen *M. bovis* und *M. caprae* zu den Erregern der Rindertuberkulose, bei der es sich um eine anzeigepflichtige Tierseuche handelt. Seit 1996 trägt Deutschland den offiziellen Status „frei von Tuberkulose“, auch als „officially tuberculosis free“ (OTF-Status) bezeichnet (79/96/EC, Entscheidung der Europäischen Kommission). Dies bedeutet, dass in einem Jahr in weniger als 0,1% der rinderhaltenden Betriebe Tuberkulose festgestellt wird. Dieser Status konnte trotz einzelner Ausbrüche seit 2008, besonders in Bayern und Niedersachsen, aufrechterhalten werden (Stand Dezember 2014). Setzte man früher auf flächendeckende Anwendung des Tuberkulin-Hauttestes und Ausmerzungen positiver Reagenten, wurde seit Erreichen des OTF-Status 1996 das Kontrollmonitoring auf die amtliche Fleischuntersuchung am Schlachthof verlagert. Dabei werden die Schlachtkörper auf makroskopische Veränderungen hin untersucht (Moser et al. 2014). Die Infektion erfolgt hauptsächlich aerogen oder oral. Während sich adulte Tiere meist aerogen infizieren, erfolgt die Infektion des Kalbes oft auf alimentären Weg über die Aufnahme infizierter Milch. Auch die intrauterine Infektion des Foetus ist beschrieben (Neill et al. 1994). Die Infektion des Menschen erfolgte in der Vergangenheit hauptsächlich oral durch die Aufnahme infizierter Milch. Durch die weltweite Verbreitung der Pasteurisierung von Milch, stellt heute aber die aerogene Infektion in der Fleischverarbeitung vor allem auf Schlachthöfen ein Risiko dar (Thoen et al. 2006). Darüber hinaus sind auch kutane Infektionen beschrieben (Neill et al. 1994).

2.2.3 *Mycobacterium caprae*

Obwohl das Wirtsspektrum nicht ganz so breit ist wie bei *M. bovis*, sind bereits bei einer Reihe domestizierter Haustiere und verschiedenen Wildtierspezies Erkrankungen nachgewiesen worden. Dazu gehören neben Ziegen, Rinder, Hausschweine, Wildschweine, Rotwild, Kamele, Fuchs und Bisons auch ein Sibirischer Tiger (Rodriguez et al. 2011; Pate et al. 2006; Gortazar et al. 2005; Erler et al. 2004; Lantos et al. 2003).

Den taxonomischen Rang einer eigenen Spezies erlangte *M. caprae* erst 2003 (Aranaz et al. 2003). Zunächst wurde der Erreger 1999 als Subspezies klassifiziert: *M. tuberculosis* subsp. *caprae*, zwischendurch auch als *M. bovis* subsp. *caprae* (Niemann et al. 2002; Aranaz et al. 1999). Ein für die Diagnostik wichtiger Unterschied zwischen *M. bovis* und *M. caprae* ist die Sensitivität gegenüber Pyrazinamid (PZA). Findet man bei *M. bovis* in der Sequenz für Pyrazinamidase (*pncA*) eine Punktmutation an Position 169, so besitzen die Stämme von *M. caprae* alle das Wildtyp-Gen und sind damit ebenso wie die meisten Stämme von *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. africanum*, von *M. pinnipedii* und *M. orygis* sensitiv gegenüber PZA (van Ingen et al. 2012; Aranaz et al. 2003; Cousins et al. 2003; Aranaz et al. 1999). Das erste Isolat dieser Spezies stammte aus Spanien und wurde aus einer an Tuberkulose erkrankten Ziege isoliert (Aranaz et al. 1999).

Der von Pate et al. beschriebene Ausbruch von Tuberkulose durch *M. caprae* in einem Slowenischen Zoo macht zudem die Relevanz des Erregers für zoologische Einrichtungen deutlich (Pate et al. 2006). Eine große Bedeutung gewinnt *M. caprae* aber nicht nur durch seine Inter-Spezies-Übertragung, sondern auch durch seine Eigenschaft als Zoonoseerreger. In Deutschland gibt es beim Auftreten der „Rindertuberkulose“ eine deutliche Nord-Süd-Differenz. In Süddeutschland wird ein deutlich höherer Anteil der „Rindertuberkulose“ beim Menschen von *M. caprae* verursacht, als im Norden Deutschlands (Kubica et al. 2003). Deutschland erscheint diesbezüglich zweigeteilt: im Norden (bes. Niedersachsen) wird fast ausschließlich *M. bovis* diagnostiziert, im Süden (bes. Bayern/Allgäu) *M. caprae*. Beim Auftreten von *M. caprae* im Allgäu scheint es sich dabei nach heutigem Stand um ein relativ eng begrenztes Endemiegebiet zu handeln, bei dem das Rotwild als Wildtierreservoir eine bedeutende Rolle spielt (Moser et al. 2014).

2.2.4 *Mycobacterium africanum*

Obwohl der Hauptwirt von *M. africanum* der Mensch ist, konnten Isolate bei verschiedenen Affenarten, bei Klippschliefern und auch bei Schweinen und Rindern gefunden werden (Gudan et al. 2008; Weber et al. 1998; Alfredsen and Saxegaard 1992; Wayne and Kubica 1986; Thorel 1980).

M. africanum wurde erstmals 1969 von einem Patienten aus dem Senegal isoliert (Castets et al. 1969). Man unterscheidet den Subtyp I (geographischer Ursprung Westafrika), der in seinen biochemischen Eigenschaften eher *M. bovis* ähnelt und den Subtyp II (geographischer Ursprung Ostafrika), der *M. tuberculosis* phänotypisch ähnlicher ist (David et al. 1978).

2.2.5 *Mycobacterium microti*

Die Hauptwirte von *M. microti* sind Kleinnager, aber auch bei einer Vielzahl anderer Tierarten wurden Infektionen beschrieben: Schweine, Rinder, Katzen, Hunde, Lamas, Klippschliefer, Frettchen, Erdmännchen, Dachs und Totenkopffäffchen (Palgrave et al. 2012; Rüfenacht et al. 2011; Zanolari et al. 2009; Henrich et al. 2007; Lutze-Wallace et al. 2006; Deforges et al. 2004; Cavanagh et al. 2002; Kremer et al. 1998; van Soolingen et al. 1998; Pattyn et al. 1970; Huitema and Jaartsveld 1967; Wells 1953).

Noch in den 40er bis 60er Jahren wurden über 10.000 Menschen mit Stämmen von *M. microti* gegen die humane Tuberkulose geimpft. Heute gilt *M. microti* als humanpathogene Spezies, da sowohl bei immunsupprimierten, als auch immunkompetenten Menschen Infektionen nachgewiesen werden konnten (Emmanuel et al. 2007).

2.2.6 *Mycobacterium pinnipedii*

Der Erreger konnte bereits bei einer Vielzahl wilder und in Gefangenschaft lebender Robbenarten nachgewiesen werden; doch auch bei anderen Säugetierspezies wie Flachland- und Schabrackentapir, Lama, Baktrisches Kamel, Westlicher Flachlandgorilla, Stachelschwein, Schneeopard und Amurleopard wurde *M. pinnipedii* isoliert (Jurczynski et al. 2011; Kriz et al. 2011; Lacave et al. 2009; Moser et al. 2008; Gomis et al. 2008; Kiers et al. 2008; Cousins 2006; Cousins et al. 2003; Moisson et al. 1998).

Seit 2003 hat *M. pinnipedii* den taxonomischen Status einer eigenen Spezies im MTC (Cousins et al. 2003). Der Name stammt von seinen Hauptwirten den Robben (*Pinnipedia*). Bei *M. pinnipedii* handelt es sich außerdem um eine Zoonose, die besonders für Tierpfleger eine Infektionsgefahr darstellt (Kiers et al. 2008). Bereits 1993 wurde die erste Übertragung des Erregers von einem Seelöwen auf einen Tiertrainer berichtet (Thompson et al. 1993). Die Übertragung erfolgt vermutlich über Aerosole, die besonders bei der Reinigung der Gehege mit Hochdruckreinigern entstehen. Der Umgang mit dieser Infektion bereitet bis heute viele Probleme. Zum einen weil die ante mortem Diagnostik aufwendig und die Testverfahren für Wild- bzw. Zootiere nicht validiert sind, zum anderen weil infizierte Tiere oft keine oder nur unspezifische Symptomatik zeigen (Jurczynski et al. 2012).

2.2.7 *Mycobacterium canetti*

Bis heute sind nur humane Fälle beschrieben und das Verbreitungsgebiet scheint in West-Afrika zu liegen (Pfyffer et al. 1998).

Der Name von *M. canetti* stammt von dem französischen Mikrobiologen Georges Canetti, der den Erreger 1969 erstmals beschrieb (Koeck et al. 2011). Auf Grund der genaueren Charakterisierung und Klassifizierung eines Canetti-Stammes von einem somalischen Kind durch van Soolingen et al., gilt *M. canetti* seit 1997 als eigene Spezies (van Soolingen et al. 1997).

2.2.8 *Mycobacterium mungi*

M. mungi wurde in Botswana erstmals aus Zwergmangusten (*Mungos mungo*) isoliert. Diese scheinen für den Erreger sehr empfindlich zu sein und er verursacht hohe Mortalitätsraten. Im Unterschied zu anderen Spezies des MTC scheint der Übertragungsweg nicht aerogen von Tier zu Tier zu verlaufen, sondern durch eine nasale Aufnahme aus der Umwelt über den Nasenspiegel (Alexander et al. 2010).

2.2.9 *Mycobacterium orygis*

Das genaue Wirtsspektrum dieser Spezies ist noch nicht bekannt; doch konnte *M. orygis* aus Oryxantilopen, Gazellen, Wasserbüffeln, Rindern, Resusaffen und Menschen mit Tuberkulose isoliert werden (van Ingen et al. 2012). Eine weitere Isolierung gelang bei einem afrikanischen Büffel (Gey van Pittius et al. 2012).

M. orygis bekam erst im Jahr 2012 seinen Status als eigene Spezies innerhalb des MTC. Seinen Namen verdankt er dem Ursprungstier seiner Erstisolierung der Oryxantilope. Es wird eine Tier-zu-Mensch-Übertragung vermutet (van Ingen et al. 2012).

2.2.10 *Mycobacterium suricattae*

Sein bisher einzig bekannter Wirt sind Erdmännchen (*Suricata suricatta*) aus der Kalahari Wüste in Südafrika (Parsons et al. 2013).

M. suricattae ist nach heutigem Stand der Jüngste Vertreter der MTC und wurde erst 2013 als eigene Spezies deklariert. Der Erreger scheint hauptsächlich über die tiefen Abschnitte des Respirationstraktes in den Wirt einzudringen, denn meistens finden sich Läsionen in der

Lunge. Da auffällig häufig aber auch die Mesenteriallymphknoten betroffen sind, wird zumindest eine Ausscheidung über den Verdauungstrakt vermutet (Drewe et al. 2009).

2.3 Nichttuberkulöse Mykobakterien (NTM)

Zu den nichttuberkulösen Mykobakterien (NTM) oder im englischen auch als *Mycobacteria other than tuberculosis* (MOTT) bezeichnet, gehören prinzipiell alle Spezies die nicht dem MTC zugeordnet werden. Diese Gruppe umfasst damit eine große Anzahl verschiedenster Spezies.

2.3.1 *Mycobacterium avium* complex (MAC)

Der *Mykobacterium avium*-Komplex gehört zu den nichttuberkulösen Mykobakterien (NTM) und stellt, neben dem Tuberkulose-Komplex, in der Veterinärmedizin sowohl aus klinischen Aspekten, als auch durch seine ökonomische Bedeutung die wichtigste Gruppe dar.

Zu diesem Komplex werden seit langem die zwei Spezies *M. intracellulare* und *M. avium* mit den vier Subspezies *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum* gezählt (Kim et al. 2012). Als neuere Vertreter sind in den letzten Jahren *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. arosiense*, *M. vulneris*, sowie *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. bouchodurhonense* dazu gekommen (Ben Salah et al. 2009; van Ingen et al. 2009; Bang et al. 2008; Murcia et al. 2006; Tortoli et al. 2004).

Die Differenzierung der Subspezies von *M. avium* erfolgte 1990 durch Thorel et al. und man unterschied fortan *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* und *M. avium* subsp. *silvaticum*. Seit 2002 gilt *Mykobacterium avium* subsp. *hominissuis* durch die Untersuchungen von Mijs et al. als eigene Subspezies im MAC.

***Mykobacterium avium* subsp. *avium* (MAA)**

MAA ist der Erreger der Geflügeltuberkulose.

Die Empfänglichkeit von Vögeln für die Infektion ist unterschiedlich, bei Hühnervögeln und Tauben ist sie hoch, bei Wassergeflügel gering. Daneben spielen aber MAA-Infektionen auch eine Rolle bei Wildvögeln, besonders bei Greifvögeln. Es gibt weltweit eine Vielzahl beschriebener Infektionen mit Geflügeltuberkulose aus zoologischen Einrichtungen. Hier spielt sie aufgrund der großen Gefahr von Einschleppung und Verbreitung durch Wildvögel heute eine bedeutend größere Rolle als in der modernen Geflügelproduktion (Dhama et al. 2011; Silva Adel et al. 2009; Ledwon et al. 2008; Dvorska et al. 2007; Gümüssoy et al. 2006; Keymer et al. 1982; Montali et al. 1976). Infektionen bei Säugetierarten mit MAA sind zwar selten, aber bei verschiedenen Arten dennoch beschrieben. Dazu zählen der Asiatische Elefant und der Bengalische Tiger (Yong et al. 2011; Cho et al. 2006). Da die Differenzierung der Subspezies erst 1990 bzw. 2002 für *M. avium* subsp. *hominissuis* erfolgte, ist es nicht eindeutig nachzuvollziehen, um welche Subspezies von *M. avium* es sich in den älteren Fallbeschreibungen genau handelt (Möbius et al. 2006; Mijs et al. 2002; Thorel et al. 1990). Dazu gehören zum Beispiel einige Veröffentlichungen von Infektionen mit *M. avium* beim Känguru, Makaken, Hauspferd, Igel und Hirsch (Biet et al. 2005; Maslow et al. 2003; Thorel

et al. 1997; Gunnes et al. 1995; Mann et al. 1982; Matthews and McDiarmid 1977). MAA kann auch Mykobakteriosen beim Menschen hervorrufen (Thorel et al. 1990).

Bei der Geflügeltuberkulose handelt es sich um eine meldepflichtige Tierkrankheit. Die Infektion erfolgt oral durch die Aufnahme von kontaminiertem Futter, Wasser oder Material aus der Umwelt (Einstreu, Erde usw.). Es treten tuberkulöse Granulome im gesamten Körper auf, wobei der Primärherd sich meist im Darm befindet. Die Verbreitung erfolgt dann hämatogen. Während des chronischen Verlaufs werden erhebliche Mengen des Erregers ausgeschieden (Valentin-Weigand 2011). In der chronischen Phase, die symptomatisch von starker Kachexie begleitet wird, kommt es zu einer massiven Bildung von Tuberkeln, die wiederum eine große Menge des Erregers enthalten. So gelangen die Erreger aus ulzerierenden Läsionen des Intestinaltraktes in den Vogelkot. (Dhama et al. 2011).

***Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)**

MAP ist der Erreger der Paratuberkulose.

Neben zahlreichen Haus- und Wildwiederkäuern wie Okapi, Bison, Banteng, Tapir, Markhor, Alpensteinbock, u.v.m. konnte MAP bei einigen anderen Säugetierarten isoliert werden (Probst et al. 2011; Corn et al. 2005; Vansnick 2004; Erume et al. 2001; Weber et al. 1992). Dazu gehören: Resusaffen, Schwarzweiße Vari, Lisztaffen, Dschelada, Hutiacong und Große Maras (Münster et al. 2013; Singh et al. 2011). Zudem wurde MAP auch bei Aras, Schneeeulen und Geierperlhühnern gefunden (Münster et al. 2013). Das zoonotische Potential von MAP wird nach wie vor wissenschaftlich kontrovers diskutiert, da es eine Reihe von Hinweisen auf eine Beteiligung am Morbus Crohn beim Menschen gibt (Feller et al. 2007; Naser et al. 2004; Sanderson et al. 1992).

Die Paratuberkulose gehört zu den meldepflichtigen Tierkrankheiten. Es handelt sich um eine therapieresistente chronisch-progressive Enteritis und Lymphadenitis, die vor allem bei Wiederkäuern auftritt (Valentin-Weigand 2011). Das Krankheitsbild ist lange bekannt und wurde bereits 1895 von Dr. Johne (Johne and Frothingham 1895), einem deutschen Tierarzt und Pathologen beschrieben (Sorge 2013); doch erst einige Jahre später konnte MAP dem Krankheitsbild durch die Erfüllung der Koch'schen Postulate zweifelsfrei zugeordnet werden (Twort and Ingram 1912). Trotz der 99%igen DNA-Homologie der Subspezies von *M. avium* kann MAP phänotypisch durch seine Mycobactin-Abhängigkeit und genotypisch durch das Insertionselement IS900 unterschieden werden (Tiwari et al. 2006). IS900 wird bis heute häufig zum Nachweis von MAP verwendet, doch liegt keine 100%ige Spezifität vor. So belegt eine Studie unter anderem das Vorliegen von IS900 im Genom von *M. cookii* mit einer Übereinstimmung von 94% (Englund et al. 2002). Eine höhere Spezifität weisen Zielregionen wie F57 oder Hsp X auf (Tasara and Stephan 2005). Es kommen drei verschiedenen Stämme vor: der Schaf-Typ (Typ I), der Rinder-Typ (Typ II) und der intermediäre Typ (Typ III; (Münster 2012). Eine Besonderheit stellt das extrem langsame Wachstum dar; so dass die Kultivierung von MAP bis zu 16 Wochen dauern kann (Whipple et al. 1991). Das Krankheitsbild kann in vier Phasen unterteilt werden; die erste Phase tritt bei Jungtieren bis zu einem Alter von 2 Jahren auf. Sie geht ohne klinische Symptome und mit einer nicht nachweisbaren Ausscheidungsrate einher. Gefolgt wird sie von der zweiten Phase (subklinische Phase). Auch hier sind kaum Symptome erkennbar, aber durch eine Veränderung der Immunantwort kann es zu einer Vergrößerung der Lymphknoten und einer Verdickung der Darmmukosa kommen. In Phase drei (klinische Phase) beginnen die typischen Symptome, wie Gewichtsverlust und chronischer bzw. intermittierender Durchfall.

Während dieser Phase werden große Erregermengen mit dem Kot ausgeschieden. Es kommt zu einer weiteren Verdickung der Darmwand mit den für die Paratuberkulose typischen hirnwindungsartigen Veränderungen. In der letzten Phase (fortgeschrittene Phase) zeigen die Tiere Kachexie, Inappetenz und unstillbare Diarrhoe, die zum Tode führt (Münster 2012). Die Infektion erfolgt meist oral über kotkontaminierte Milch oder Kolostrum, kann aber auch durch die Aufnahme von kontaminiertem Futter, Wasser oder Bodensubstrat erfolgen (Clarke 1997).

***Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH)**

Hauptwirte für MAH sind, wie der Name ankündigt, Menschen und Schweine. Infektionen treten besonders bei immungeschwächten Personen, wie z.B. HIV-Infizierten, aber auch bei Kindern in Form von Lymphadenitiden weltweit vor (Despierrez et al. 2012; van Coppenraet et al. 2008). Das Vorkommen von MAH bei Schweinen ist in vielen Ländern Europas beschrieben (Alvarez et al. 2011; Domingos et al. 2009; Johansen et al. 2007; Möbius et al. 2006; Matlova et al. 2004). Aber auch aus den USA, Brasilien oder Japan gibt es Beschreibungen (Iwamoto et al. 2012; Higgins et al. 2011; Romano et al. 2005). Auch bei anderen Spezies wurden Infektionen mit diesem Erreger beschrieben: bei Rindern, Rotwild, Hunden, einer Blaustirnamazone, Wasservögeln und Pferden (Blahutkova et al. 2011; Campora et al. 2011; Higgins et al. 2011; Kriz et al. 2010; Shitaye et al. 2009; Haist et al. 2008; Moravkova et al. 2008; Dvorska et al. 2007; Glawischnig et al. 2006; Möbius et al. 2006). Die Empfänglichkeit scheint bei unterschiedlichen Tierarten aber stark zu variieren (Dvorska et al. 2007; Hejlíček and Tremel 1995).

Die Übertragung der Infektion erfolgt vermutlich auf dem oralen Weg mit Erregern aus der Umwelt oder bei der Wasseraufnahme (Pate et al. 2008; Matlova et al. 2005; Mijs et al. 2002). Infektionen mit MAH werden außerdem in einigen Fällen bei Co-Infektionen mit anderen Mykobakterien-Spezies wie MAP beschrieben (Moravkova et al. 2008; Glawischnig et al. 2006). Das Krankheitsbild zeigt meist Lymphadenitis der mesenterialen bzw. der intestinalen Lymphknoten. Läsionen können auf den Gastrointestinaltrakt beschränkt bleiben oder generalisiert vorkommen (Agdestein et al. 2012; Despierrez et al. 2012; Haist et al. 2008).

2.3.2 Weitere Mykobakterien

Über NTM bei Zoo- und Wildtieren gibt es verschiedene Fallberichte z.B. von *M. intracellulare* bei Zwergpinguinen, *M. peregrinum* bei einem Sumatra-Orang Utan, *M. kansasii* und *M. gastri* bei einer Schneesiege, *M. ulcerans* bei Koalas, Ringelschwanzbeutlern und einem Alpaka, *M. genavense* bei einem Sri-Lanka-Riesenhörnchen und einer Vielzahl verschiedener in zoologischen Einrichtungen gehaltenen Vogelarten, sowie *M. fortuitum* bei Psittaciformes (Theuss et al. 2010; Napier et al. 2009; Ledwon et al. 2008; Rietschel 2004; Portaels et al. 2001; Portaels et al. 1996; Keymer et al. 1982). Auch Infektionen mit *M. gordonae* und *M. chelonae* konnten bei Zoovögeln festgestellt werden (Rodríguez Martínez et al. 2011; Silva Adel et al. 2009).

NTM gelten allgemein als opportunistische Erreger, die ubiquitär in der Umwelt vorkommen und besonders immungeschwächte Patienten befallen. Viele NTM leben als Saprophyten in der Umwelt und konnten in (Trink-)Wasser, Böden, Staub, Einstreu bzw. Nestmaterial und Futter nachgewiesen werden (Biet et al. 2005; Ashford et al. 2001; Falkinham 1996). NTM

verfügen über eine breite Temperaturtoleranz und wachsen in einer große pH-Spanne von 4.0 bis 7.5 (Biet et al. 2005). Sie verursachen Lungenerkrankungen, Lymphadenits und Hauterkrankungen, können aber auch andere Weichteilgewebe, Knochen oder Gelenke befallen. Oft verursachen sie Infektionen bei immungeschwächten Individuen (besonders Kinder, HIV-Infizierte und sehr alte Menschen) oder treten in Folge post-operativer Komplikationen oder Traumata auch bei kompetenter Immunität auf (Falkinham 1996).

2.4 Mykobakterien in zoologischen Einrichtungen

Die meisten Spezies des MTC besitzen die Fähigkeit, Wildtiere und andere in zoologischen Einrichtungen gehaltene Tierarten zu infizieren. Dies spielt besonders eine große Rolle in Bezug auf das vorhandene zoonotische Potential dieser Spezies.

Es gilt somit nicht nur die Übertragung von Zootieren auf den Menschen (Pfleger, Tierärzte, Besucher, usw.), sondern auch eine mögliche Gefährdung sehr seltener, wertvoller Tierbestände durch die Einschleppung dieser Infektionserreger vom Menschen zu verhindern. Letzteres spielt besonders in Ländern mit sehr hohen humanen Tuberkuloseinzidenzen eine Rolle.

Zoologische Einrichtungen beherbergen darüber hinaus oft eine große Anzahl sehr unterschiedlicher Spezies, die z.T. in engen Kontakt gehalten werden, so dass auch eine Inter-Spezies-Übertragung möglich ist. Die Empfänglichkeit, Pathogenität und Immunantwort der verschiedenen Spezies unterscheidet sich zudem z. T. stark voneinander und auch die Krankheitsbilder sind nicht immer einheitlich.

Meistens treten klinische Symptome bei erkrankten Zootieren gar nicht oder nur sehr unspezifisch auf, was ein Erkennen der Erkrankung am lebenden Tier schwierig macht.

Eine große Problematik stellt die Diagnostik von Mykobakterien bei Zootieren dar. Bis heute steht keine validierte Methodik für Screening-Tests zur Identifizierung von Mykobakterien-Infektionen bei anderen Spezies als Rind, Cerviden und dem Menschen zur Verfügung. So hat der heute immer noch häufig angewandte Tuberkulin-Test bei vielen Spezies nur eine sehr geringe Aussagekraft.

Die meisten wissenschaftlich geleiteten zoologischen Einrichtungen in Europa sind Mitglied der European Association of Zoos and Aquaria (EAZA), deren Aufgabe u.a. die Koordination der Europäischen Erhaltungszuchtprogramme (EEP) und Europäischen Zuchtbuchprogramme (ESB) ist. Diese Zuchtprogramme dienen dem Erhalt von (bedrohten) Arten und haben das Ziel einen optimalen Genpool zu gewährleisten. Hierfür ist ein stetiger Austausch von Tieren zwischen den verschiedenen zoologischen Einrichtungen auch über die Ländergrenzen hinaus unabdingbar (EAZA Strategy 2009-2012). Die Richtlinie 92/65/EWG des Rates vom 13. Juli 1992 über die tierseuchenrechtlichen Bedingungen für den Handel mit Tieren, Samen, Eizellen und Embryonen in der Gemeinschaft sowie für ihre Einfuhr in die Gemeinschaft (Balai Directive) regelt zum einen, dass eine Institution mindestens drei Jahre frei von Rindertuberkulose (*M. bovis* und *M. caprae*) sein muss. Zum anderen gibt sie vor, dass Mitgliedstaaten der EU mit entsprechenden Monitoring-Programmen für Primaten, Feliden und Wiederkäuern frei von Tuberkulose (hier sind alle Mykobakterien des MTC eingeschlossen) sein müssen. Derzeit gibt es jedoch in keinem

Mitgliedstaat der EU solch ein anerkanntes Programm. Das bedeutet in der Praxis, dass einzelne Tiere aus offiziell TB-freien Institutionen nicht getestet werden müssen und somit potenziell ein Austausch von unzureichend getesteten Tieren stattfindet.

Was für eine Rolle Mykobakterien in deutschen zoologischen Einrichtungen spielen, ist nicht eindeutig zu beurteilen, da umfassende Studien hierzu fehlen. Eine ausführliche Fallbeschreibung eines Tuberkuloseausbruchs bei verschiedenen Tierarten im Zoo Heidelberg verursacht durch *M. pinnipedii* existiert aus dem Jahr 2011 (Jurczynski et al. 2011). Dabei kam es zur Übertragung der Erkrankung von einem Tapir auf Kamele und ein Stachelschwein. Aus jüngerer Zeit stammt ein Fall von Tuberkulose verursacht durch *M. tuberculosis* bei einem Elefanten im Zoo Karlsruhe stammt aus dem Jahr 2014 (Babara Lang, Karlsruhe, persönliche Mitteilung). Über das Vorkommen von MAP in deutschen Zoos gibt es zwei Studien. Münster et al. zeigt, dass MAP nicht nur bei Wiederkäuern, sondern auch anderen Säugetierarten (u.a. Primaten) und Vögeln vorkommt (Münster et al. 2013). Die Studie fand in einem Zoo in Nordrhein-Westfalen statt. In einer zweiten Studie von Probst et al. wurden zehn deutsche und ein tschechischer Zoos untersucht (Probst et al. 2011). Von 667 getesteten Tieren wiesen dabei 19 Antikörper gegen MAP auf. Die Prävalenz lag in den einzelnen Einrichtungen zwar nur bei 2-8 %, doch war in jedem der getesteten zoologischen Einrichtungen mindestens ein serologisch positives Tier zu finden.

Infektionen mit anderen NTM werden regelmäßig aus vielen zoologischen Einrichtungen Deutschlands berichtet. Eine Fallbeschreibung von *M. avium* bei einer Gruppe Rotschenkliger Kleideraffen (*Pygathrix nemaeus nemaeus*) aus dem Kölner Zoo stammt aus dem Jahr 2010 (Plesker et al. 2010). Einige weitere Ausbrüche wurden im Zoo Osnabrück 2011 bei Blauhalsstraußen (*Struthio camelus australis*) und bei Humboldtpinguinen (*Spheniscus humboldti*) im Tiergarten Nürnberg und Tierpark Hagenbeck festgestellt (Jurczynski et al. 2013; Scheibe et al. 2012). Die Infektion eines Sri-Lanka-Riesenhörnchens (*Ratufa macroura*) mit *M. genavense* aus dem Leipziger Zoo wurde im Jahr 2010 publiziert (Theuss et al. 2010). Rietschel beschreibt im Jahr 2004 zwei Fälle von Mykobakteriose bei einem Sumatra-Orang-Utan (*Pongo abelii*) mit *M. peregrinum* und einer Schneeziege (*Oreamnos americanus*) mit *M. kansanii* und *M. gastri* in der Wilhelma Stuttgart (Rietschel 2004). Auch Fälle von Infektionen mit MAH bei einem Rüsselspringer und Chinesischen Zwergwachteln konnten zwischen 2012 und 2013 festgestellt werden (Tobias Knauf-Witzens, Stuttgart, persönliche Mitteilung). Diese Reihe von „Einzelfallbeschreibungen“ und die wenigen etwas umfassenderen Studien zeigen, dass Mykobakterien in vielen zoologischen Einrichtungen in Deutschland vorkommen.

2.5 Diagnostik

2.5.1 Direkter Erregernachweis

Mikroskopie

Zum Nachweis säurefester Stäbchenbakterien werden die Ziehl-Neelsen-Färbung und die Auramin-Färbung (Fluoreszenzfarbstoff) angewandt.

Bei der Ziehl-Neelsen-Färbung wird eine Mischung aus dem basischen Farbstoff Fuchsin und Phenol eingesetzt. Durch langsames Erwärmen der Probe dringt der Farbstoff in die

Lipidschicht. Dieses wird vom Phenol erleichtert. Anschließend wird die Probe mit einer Säure/Alkohol-Mischung entfärbt. Durch die Säurefestigkeit der Mykobakterien bleibt der Farbstoff bei diesem Schritt in ihrer Lipidschicht erhalten. Abschließend wird mit Methylenblau gegengefärbt. Säurefeste Organismen erscheinen dadurch rot im Mikroskop, während Hintergrund und andere Organismen blau gefärbt sind (Madigan and Martinko 2006).

Der Vorteil dieser Methode ist die relativ schnelle Anwendbarkeit. Bei der Beurteilung ist aber lediglich die Feststellung von säurefesten Stäbchenbakterien und keine weitere Differenzierung von Spezies möglich. Außerdem gibt es neben den Mykobakterien auch andere säurefeste Organismen, die nicht unterschieden werden können: z.B. die Gattungen *Nocardia*, *Rhodococcus* und *Corynebacterium*. Die Sensitivität ist zu dem relativ schlecht und liegt zwischen 25-65%. Die minimale Keimmenge für ein positives Ergebnis beträgt bei der mikroskopischen Untersuchung ca. 5×10^4 Bakterien/ml (Böttger 2001).

Bei der Auramin-Rhodamin Färbung wird ein Gemisch aus den Farbstoffen Auramin O (Diphenylmethanfarbstoff) und Rhodamin B (Xanthenfarbstoff) als Fluoreszenzmarker eingesetzt. Durch das anschließende Entfärben mit einer Säure/Alkohol-Mischung und Gegenfärben mittels Kaliumpermanganat, können die säurefesten Stäbchen, welche sich nicht entfärben, im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Mykobakterien erscheinen hell leuchtend, goldgelb-grünlich und heben sich deutlich vom Hintergrund ab (Silver et al. 1966).

Ein Nachteil der Fluoreszenzmethode gegenüber der ZN-Färbung ist, dass die Morphologie der Erreger oft nur unzureichend beurteilt werden kann und in diesen Fällen noch eine ZN-Färbung hinzugezogen werden müsste (Richter 2009).

Kultureller Erregernachweis

Die meisten Mykobakterien (NTM) sind, was ihr Wachstum betrifft, relativ anspruchslos. Einige wenige NTM sind dagegen kaum kultivierbar wie z.B. *M. haemophilum*, *M. ulcerans* und *M. genavense* (Böttger 2001). Auch die diagnostisch besonders bedeutsamen Mykobakterien des MTC und des MAC sind auf Grund ihres langsamen Wachstums aufwendiger in der Anzucht (Valentin-Weigand 2011). Die üblich verwendeten Nährböden enthalten Eidotter. Dieser dient als fettreicher Stickstofflieferant, welcher das Wachstum der Mykobakterien begünstigt. Für eine notwendige Unterdrückung der Begleitflora wird den Nährböden außerdem Malachitgrün und zum Teil Antibiotikazusätze zugefügt. Die Anzucht erfolgt meist bei 37°C und dauert acht Wochen bei wöchentlicher Kontrolle (erste Kolonien meist nach 2-4 Wochen sichtbar; Böttger 2001). Besonders langwierig mit bis zu 16 Wochen ist die Anzucht von MAP (Whipple et al. 1991). Dieser Erreger benötigt zudem Mycobactin als Wachstumszusatz, eine Eisen-Chelatverbindung (Siderochrom), die von den meisten Mykobakterien selbständig synthetisiert werden kann (Thorel et al. 1990; Raymond et al. 1984). NTM besitzen je nach Spezies ein größeres Temperaturspektrum, das meist zwischen 20 – 40 °C liegt (Ilg 2003). Bei Verdacht auf *M. avium* oder *M. marinum* wird beispielsweise eine Bebrütung von 45 °C bzw. 25 °C empfohlen (AVID IX 1997). Es werden Fest- und Flüssignährmedien zur Anzucht verwendet. Zu den üblich angewendeten Nährmedien gehören Löwenstein-Jensen, Middlebrook, Herrold's-Egg-Yolk und Stonebrink (Valentin-Weigand 2011).

Vorteil der Kultur ist ihre hohe Empfindlichkeit, die ihr bis heute noch die Bezeichnung „Goldstandard“ erhalten hat. Es wird empfohlen für die Diagnostik ein Flüssig- und zwei Festmedien in Kombination zu verwenden (DIN 58943-3), d. h. mindestens drei verschiedene Nährmedien zu beimpfen. Ein Problem der Kultur ist die Kontaminationsgefahr bei nicht sterilem Probenmaterial. Durch das langsame Wachstum der Mykobakterien kann es schnell zu einem Überwachsen mit der Begleitflora kommen. Deshalb ist eine Dekontamination der Proben mit Chemikalien wie N-Acetyl-L-Cystein (NALC) und Natriumhydroxid (NaOH), Schwefelsäure (AVID IX 1997), Natrium-Laurylsulfat (SDS) oder Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC) notwendig (Ambrosio et al. 2008; Buijtsels and Petit 2005; Carricajo et al. 2001; Böttger 2001).

Neben den konventionellen Nährmedien stehen auch eine Reihe automatisierter und schnellerer Verfahren zur Verfügung.

Hierzu zählt das BACTEC 12B Flüssigmedium aus dem BACTEC-460 System, das MGIT (Mycobacterium Growth Indicator Tube) Flüssigmedium und das MB Redox Flüssigmedium. Diese Medien zeichnen sich dadurch aus, dass sie ein vergleichsweise schnelles Wachstum der Mykobakterien gewährleisten und damit eine schnellere Diagnostik ermöglichen. Ein weiterer Vorteil besteht in der höheren Nachweisrate aus Probenmaterial mit einer sehr geringen Erregermenge und besonders bei Proben, die in der Ziehl-Neelsen-Färbung negativ sind.

Das sog. BACTEC-460 System ist ein halbautomatisches System, bei dem das bakterielle Wachstum radiometrisch gemessen wird. Bei dem BACTEC 12B Medium handelt es sich um ein modifiziertes Middlebrook 7H9 Medium. Nachteile dieses Systems sind die hohen Kosten und die Gefährdung durch radioaktiven Abfall.

Auch beim MGIT Medium handelt es sich um ein modifiziertes Middlebrook 7H9 Medium. Der Verbrauch von Sauerstoff durch das Mykobakterienwachstum aktiviert die Fluoreszenz des enthaltenen Indikators. Diese Fluoreszenz kann im Transilluminator durch UV-Licht der Wellenlänge 365 nm sichtbar gemacht werden.

Das MB Redox Flüssigmedium besteht aus einem modifizierten Kirchner Medium, dem ein farbloses Tetrazolium-Salz zugegeben ist. Dieses wird durch das Redox-System der Mykobakterien zu einem pinkfarbenen, roten oder violetten Farbstoff (Formazan) reduziert. Das serumhaltige Kirchner Medium enthält das Antibiotikagemisch PACT (Polymyxin B, Amphotericin B, Carbenicillin, Trimethoprim), sowie einen speziellen Vitaminkomplex, welcher das Wachstum der Mykobakterien beschleunigt.

MB Redox Flüssigmedium ist ein selektives Medium. Im Gegensatz zu dem BACTEC 12B und dem MGIT Medium enthält es bereits verschiedene Antibiotika (Polymyxin B, Amphotericin B, Carbenicillin und Trimethoprim [PACT]) zur Hemmung der Begleitflora und ist damit als einziges der oben genannten Medien „ready-to-use“ (Heifets et al. 2000).

Während das MGIT Medium dem MB Redox Medium an Sensitivität etwas überlegen ist, liefert das MB Redox Medium schnellere Ergebnisse (Somoskövi and Magyar 1999).

Zu der Sensitivität der drei Flüssigmedien gibt es widersprüchliche Studien. Während in den Studien von Heifets et al. sowie Piersimoni et al. das Bactec System die höchste Nachweisrate aufweist, gefolgt von MB Redox Medium vor dem MGIT Medium, kommen Somoskövi et al. als einzige zu dem Ergebnis, dass das MGIT Medium dem MB Redox

Medium überlegen ist. In allen Studien liefert das MB Redox Medium gegenüber dem MGIT aber die schnelleren Ergebnisse (Heifets et al. 2000; Somoskövi and Magyar 1999; Piersimoni et al. 1999).

Bei dem neusten System von Becton, Dickinson and Company (BD) handelt es sich um das vollautomatische BACTEC MGIT 960 System. Als Medium wird MGIT verwendet und die Messung erfolgt über die entstehende Fluoreszenz.

Dem Bactec-460 System in Sensitivität und Geschwindigkeit ebenbürtig ist das neuere und ebenfalls vollautomatische BACTEC 9000MB System, bei dem Myco/F Medium verwendet wird. Auch beim Myco/F Flüssigmedium handelt es sich um ein modifiziertes Middlebrook 7H9 Medium und das Messverfahren beruht auf Fluoreszenztechnologie (Harausz et al. 2015).

Molekularbiologische Verfahren

Nachweis von *Mycobacterium* spp.

Zur Extraktion der DNA aus Mykobakterien gibt es eine Vielzahl von verschiedenen Verfahren. Zum einen finden sich Veröffentlichungen von laboreigenen Verfahren zur DNA-Extraktion (Kumar et al. 2016), zum anderen gibt es kommerziell erhältliche Extraktions-Kits von verschiedenen Firmen, die ein genaues Protokoll zur Vorgehensweise mit sich führen.

Eine besondere Schwierigkeit bei der DNA-Extraktion von Mykobakterien stellt der besondere Aufbau der Zellwand dar (Hosek et al. 2006). Die DNA-Extraktion von Mykobakterien wird durch eine Kombination verschiedener Lyseverfahren erreicht.

Prinzipiell kann bei der Lyse der Zellwand zwischen physikalischen, chemisch/enzymatischen und Kombinationen dieser zwei Verfahren unterschieden werden. Zu den physikalischen Verfahren gehören das Erhitzen, die Verwendung von Beads (kleinen Kügelchen) aus verschiedenen Materialien und Ultraschallbehandlungen. Zur enzymatischen Lyse der Zellwand wird besonders häufig Proteinkinase K und Lysozym verwendet. Chemische Lyse wird häufig mit SDS oder Triton X-100 erreicht (Amaro et al. 2008; Hosek et al. 2006; Aldous et al. 2005).

Bei Natriumdodecylsulfat (SDS, engl.= sodium dodecyl sulfate) handelt es sich um ein anionisches Detergens. Seine Wirkung bei der Zellyse basiert auf der Zerstörung der Tertiär- und Quatärstruktur von Proteinen durch die Unterbrechung ihrer nichtkovalenten Bindungen. Beim Octoxinol 9 (Handelsname Triton®X-100) handelt es sich um ein nichtionisches Tensid, das im Gegensatz zu SDS aber nicht denaturierend wirkt. Bei hohen Konzentrationen oder zusammen mit Lithiumchlorid kommt es zur Zellyse (Koley and Bard 2010). Lysozym wird meist aus Hühnereiweiß gewonnen und hydrolysiert die glycosidischen Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure (NAM) und N-Acetylglucosamin (NAG) im Murein-Sacculus der Bakterienzellwand. Die Serin-Protease Proteinkinase K spaltet gezielt Peptidbindungen und ihre optimale Reaktionstemperatur liegt zwischen 50 - 60°C.

Trotz der Kombination verschiedener Lysemethoden (auch in den Protokollen kommerzieller Kits) bei Mykobakterien, ist die gewonnene DNA-Menge oft gering und die Sensitivitätsgrenze liegt bei maximal 10^2 KBE/ml (Thakur et al. 2011; Käser et al. 2010).

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch **Polymerase Chain Reaction**) ist ein in vitro-Amplifikationsverfahren, bei dem eine definierte Zielsequenz vervielfältigt wird. Sie wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt, wofür er 1993 den Nobelpreis für Chemie bekam. Das Grundprinzip setzt sich dabei aus drei Schritten zusammen. Zunächst wird das doppelsträngige DNA-Molekül (Template) durch Hitze aufgetrennt (Denaturierung bei ca. 95 °C). An die als Einzelstränge vorliegende DNA können nun, bei etwas geringeren Temperaturen, zwei spezifisch für eine Zielsequenz ausgewählte Oligonukleotide (Primer) hybridisieren (Annealing). Die Primer dienen als Starter für die Polymerisation, durch die wieder doppelsträngige DNA-Moleküle entstehen. Dies geschieht mit Hilfe der DNA-Polymerase, einem Enzym, das die Polymerisation katalysiert. Üblicherweise wird hierfür eine aus thermophilen Bakterien (*Thermus aquaticus*) isolierte DNA-Polymerase (Taq-DNA-Polymerase) verwendet, da sie die im Denaturierungsprozess benötigten hohen Temperaturen unbeschadet übersteht (Saiki et al. 1988). Durch den Einbau von Nukleinsäurebausteinen in Form von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) kommt es zur Neusynthese eines komplementären Stranges zur Zielsequenz (Elongation oder Extension). Die zyklische Wiederholung dieser gesamten Reaktion bewirkt eine exponentielle Zunahme der Zielsequenz (Target). Lässt man 30 dieser identischen Zyklen ablaufen, erreicht man theoretisch einen Vervielfältigungsfaktor von ca. 109. In Folge kleinster Schwankungen der Amplifikationseffizienz kann es jedoch zu sehr großen Mengenunterschieden des Amplifikatgehaltes nach Abschluss der PCR kommen. Diese Schwankungen entstehen z. B. durch den zunehmenden Verbrauch von Primern und dNTP im Reaktionsgemisch und einen Aktivitätsverlust der DNA-Polymerase, der durch die Zunahme der Amplifikationsprodukte verursacht wird (Plateau-Effekt). Eine sichere Quantifizierung der Ausgangsmenge anhand des Endproduktes ist damit nicht möglich. Ein weiterer Nachteil der konventionellen PCR ist ihre hohe Anfälligkeit für Kontaminationen. Es ist daher immer notwendig eine Negativkontrolle (enthält keine Zielsequenz) mitzuführen (Schmidt et al. 1995). Zur Kontaminationsvermeidung ist eine strikte räumliche und organisatorische Trennung unverzichtbar. Auch inhibierende Faktoren in klinischem Material (z.B. Hämoglobin, EDTA), die zu falsch negativen Ergebnissen führen müssen berücksichtigt werden (Wilson 1997). Hierfür wird stets eine Positivkontrolle (enthält die Zielsequenz) mitgeführt. Vorteile der PCR sind ihre hohe Sensitivität und die schnelle Verfügbarkeit der Ergebnisse.

Der Nachweis der Amplifikate aus der PCR erfolgt üblicherweise durch die Auftrennung nach Größe in einem Agarosegel und ihrer Anfärbung z.B. mit Ethidiumbromid.

Besonders häufig zum Nachweis von *Mycobacterium spp.* werden Zielsequenzen des 16S rRNA-Gens verwendet. Das Vorkommen dieses Gens in jedem zellulären Organismus sichert die zuverlässige Nachweisbarkeit auf Grund der hohen Sensitivität. Sequenzen dieses hoch konservierten Gens wurden daher erfolgreich in einer Vielzahl von Studien zum Nachweis von *Mycobacterium spp.* verwendet. Ein Nachteil der Verwendung des 16S rRNA-Gens als Zielsequenz stellt die Tatsache dar, dass eine Differenzierung sowohl auf Spezies- als auch auf Subspeziesebene nicht immer möglich ist. Diese Problematik betrifft u.a. den Tuberkulose-Komplex, bei dem *M. tuberculosis* eine identische 16S rRNA-Sequenz mit *M. bovis* und *M. africanum* aufweist (Rogall et al. 1990b). Auch die Subspezies des *Mycobacterium avium*-Komplexes besitzen eine identische 16S rRNA-Sequenz (Turenne et al. 2001) und der pathogene Erreger *M. kansasii* kann nicht vom fakultativ pathogenen *M. gastri* unterschieden werden (Wayne and Sramek 1992; Rogall et al. 1990a). Für eine Differenzierung müssen andere Genabschnitte gewählt werden. Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung des 16S rRNA-Gens als Zielsequenz kann die Existenz von multiplen

heterogenen Kopien des Gens im Genom darstellen. Dies bereitet Probleme bei der Verwendung für phylogenetische Analysen (Case et al. 2007).

Eine bessere Alternative stellt die Verwendung des Gens dar, das die Beta-Untereinheit der RNA Polymerase codiert (*rpoB*). Das *rpoB*-Gen liegt anders als das 16S rRNA-Gen nur in einfacher Kopie im Genom vor. Es eignet sich sowohl zur Differenzierung auf Spezies- und Subspeziesebene als auch sehr gut für phylogenetische Studien (Adékambi et al. 2008; Adékambi et al. 2006; Kim et al. 1999).

Nachdem in den meisten Studien, die das *rpoB*-Gen als Zielsequenz verwendeten, Isolate aus dem humanmedizinischen Bereich stammten, wurden in einer Studie von Higgins et al. aus dem Jahr 2011 386 Isolate aus dem veterinärmedizinischen Bereich verwendet. Diese stammten von Haustieren, landwirtschaftlichen Nutztieren, Wildtieren und Zootieren und schlossen Proben von Amphibien, Reptilien, Vögeln und Säugetieren ein. Von den 386 Isolaten konnten 310 (80%) auf Spezieslevel identifiziert werden und wiesen dabei Übereinstimmungen von $\geq 98\%$ mit einer Referenzsequenz auf.

Bei der Real-time-PCR handelt es sich um ein quantitatives Nachweisverfahren. Sie stellt somit ein „Nachfolgemodell“ der konservativen PCR dar. Zu nächst fanden interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe wie Ethidiumbromid oder SYBR®Green I Verwendung. Durch den Einsatz sequenzspezifischer und fluoreszenzmarkierter Sonden, die sich zwischen die Doppelstränge einlagern, kann diese Fluoreszenz unter Licht einer bestimmten Wellenlänge gemessen werden und ist proportional zur Menge der entstandenen Amplifikate. Die Analyse der Amplifikatbildung geschieht also in Echtzeit (engl.: real-time). Das Grundprinzip der messbaren Fluoreszenzsignale ist die abstandsabhängige Energieübertragung der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Werden zwei Fluorochrome in eine räumliche Nähe von weniger als 70 Å gebracht, kommt es zum Energietransfer von einem angeregten Farbstoff auf den zweiten. Es gibt eine Vielzahl verschiedener FRET-Sonden, dazu zählen u.a. Hybridisierungssonden (LightCycler®-Sonden), Molecular Beacons, Scorpions™ und TaqMan®-Sonden (Beer and Haas 2011; Parashar et al. 2006).

Zur Detektion von Mykobakterien wurden bereits einige Real-time PCR-Assays erfolgreich verwendet. Dazu gehören die Anwendung von SYBR Green I, Minor groove binder (MGB), Duplex Scorpion-Primer, TaqMan®-Sonden, Molecular Beacons sowie Hybridisierungssonden (Tortoli et al. 2012; Wang et al. 2007; Ravva and Stanker 2005; Aldous et al. 2005; Shrestha et al. 2003; Fang et al. 2002).

Bei einer Schmelzkurvenanalyse, wird die Temperatur langsam und kontinuierlich erhöht. Mit ihrer Hilfe kann die Fragmentlänge unterschieden und damit die Spezifität der Amplifikate bestimmt werden. Jedes PCR-Produkt, bestehend aus doppelsträngiger DNA, hat einen spezifischen Schmelzpunkt, bei dem der Doppelstrang zu zwei Einzelsträngen denaturiert, was zu einem Abschmelzen der Sonden führt. Dieser liegt höher, als der Schmelzpunkt von unspezifischen Primerdimeren und somit können diese voneinander unterschieden werden. Durch das Abschmelzen der Sonden kommt es zu einem Abbruch der Fluoreszenz, welches gemessen werden kann (Ririe et al. 1997). Schmelzkurvenanalysen können u.a. bei der Diagnostik von Mykobakterien sowohl zur Unterscheidung von antibiotikaresistenten *M. tuberculosis*-Stämmen, als auch zur Differenzierung zwischen Vertretern des Tuberkulosekomplexes und nicht tuberkulösen Mykobakterien (NTM) angewendet werden (Pietzka et al. 2009; Shrestha et al. 2003).

Molekulare Differenzierung von *Mycobacterium* spp.

Zur weiteren Charakterisierung der erregerspezifischen Amplifikate gibt es verschiedene Methoden. Hierzu zählen Verfahren wie „Southernblot“, Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP), Spoligotyping, „Mycobacterial interspersed repetitive unit variable number of tandem repeats“ Analyse (MIRU/VNTR-Typing) und die Sequenzanalyse (Comas et al. 2009; Kremer et al. 1999; Yuen et al. 1993).

Beim „Southernblot“ wird in der Regel die Zielsequenz auf einer Festphase fixiert, zu Einzelsträngen denaturiert, mit markierten Sonden inkubiert und je nach Markierungstechnik mit einem bildgebenden Verfahren sichtbar gemacht (Röntgenfilm, Fluoreszenzdetektion u.a.). Diese Methode wurde z.B. für epidemiologische Studien zur genaueren Differenzierung von *M. tuberculosis*-Stämmen verwendet (Beer and Haas 2011; Yuen et al. 1993; Ross et al. 1991).

Wird die Zielsequenz vor der Größenauffrennung im Agarosegel mit ausgewählten Restriktionsenzymen behandelt, kommt es zur Spaltung in unterschiedlich große Fragmente und es ergibt sich ein bestimmtes Bandenmuster. Anhand dieses erregerspezifischen Restriktionsenzymfragmentmusters, kann eine genauere Charakterisierung erfolgen (Pavlik et al. 1999).

Spoligotyping oder Spacer oligonucleotide typing bezeichnet eine Methode, bei der Bakterienstämme durch den Vergleich sogenannte Spacer-Regionen unterschieden werden können. Diese Spacer-DNA-Sequenzen (auch Trenn-DNA-Sequenzen genannt) sind DNA-Abschnitte, die zwischen den Genen bzw. den Direct-Repeat (DR)-Regionen liegen. Das Spoligotyping wird verwendet zur Differenzierung von Erregern des MTC in Spezies und Subtypen (Kamerbeek et al. 1997).

Bei der MIRU/VNTR-Typisierung werden mykobakterienspezifische repetitive Einheiten bestimmt, die in variabler Anzahl an bestimmten Stellen des Genoms lokalisiert sind. Da diese Regionen einen großen Polymorphismus aufweisen, können sogar verschiedene Isolate unterschieden werden, was für die Ätiologie und Epidemiologie von großer Bedeutung ist (Supply et al. 2001; Supply et al. 2000).

Die Sequenzanalyse ist eine Methode zur vollständigen Bestimmung der Nukleotidabfolge eines DNA-Fragments (Rogall et al. 1990b). Die verbreitetste Methode dafür ist die von Frederick Sanger entwickelte Didesoxynukleotid-Kettenabbruchmethode. Dabei werden markierte Didesoxynukleosidtriphosphate verwendet, die an ihrem 3'-C-Atom nur ein H-Atom tragen, statt der für die weitere Elongation notwendigen OH-Gruppe. Dadurch kommt es zum Kettenabbruch. Die so entstandenen unterschiedlich lang synthetisierten Stücke, werden der Größe nach aufgetrennt und ergeben die Basenabfolge (Hof and Dörries 2009).

Pathomorphologischer Nachweis

Auf Grund der häufigen Schwierigkeiten der ante mortem Diagnostik bei Tieren aus zoologische Einrichtungen im Zusammenspiel mit der kaum oder unspezifisch auftretenden Symptomatik, im Falle einer Infektion mit Mykobakterien, spielt der pathomorphologische Nachweis eine große Rolle (Jurczynski et al. 2012; Lécuyer and Ball 2011). So waren viele Wildtiere und in zoologischen Einrichtungen lebende Tiere vorher nicht

tuberkuloseverdächtig, bei denen in der Sektion tuberkulöse Veränderungen festgestellt wurden (Kaneene et al. 2010). Auffällig sind hierbei typische granulomatöse Veränderungen im gesamten Tierkörper. Diese tuberkulösen Läsionen bestehen meist aus gelblich sekundär verkäsenden nekrotischen Zentren umgeben von weißem bis gräulichem fibrösem Gewebe (Valentin-Weigand 2011). Die histopathologische Untersuchung kann zu einer Erhärtung des Verdachts führen, liefert aber keinen erregerspezifischen Nachweis. Daher ist eine labordiagnostische Untersuchung des veränderten Gewebes zur Diagnosestellung unabdingbar. Histologisch gleichen sich die tuberkulösen Veränderungen von Wildtieren unterschiedlicher Spezies (Kaneene et al. 2010).

Eine besondere Bedeutung hat der pathomorphologische Nachweis auch im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung am Schlachtkörper (Moser et al. 2014; Valentin-Weigand 2011).

Ein großes Problem für den pathomorphologischen Nachweis ist das Erkennen der Infektion im Anfangsstadium. In diesem Stadium sind oft keine bzw. nicht erkennbare makroskopische oder nur unspezifische entzündliche Veränderungen im Tierkörper vorhanden. So konnte *M. bovis* bereits mehrfach aus Probenmaterial von Patienten ohne sichtbare Läsionen kultiviert werden (Moser et al. 2014; Kaneene et al. 2010).

2.5.2 Indirekter Erregernachweis (Nachweis einer Immunreaktion)

Hauttest

Der Tuberkulosehauttest wurde bereits bei einer großen Anzahl von Zootierarten (erfolgreich) angewendet. Von einer Validierung für einzelne Zootierspezies ist diese Methode aber weit entfernt (Lécu and Ball 2011). Bei der Durchführung werden Antigene in Form von „Purified Protein Derivative“ (PPD) von *M. tuberculosis*, *M. bovis* oder *M. avium* intrakutan appliziert und die jeweilige Injektionsstelle nach 24, 48 und 72 Stunden auf eine auftretende Schwellung überprüft. Diese tritt im positiven Fall durch eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion auf. Die übliche Injektionsstelle bei Boviden ist die Zervikalregion, während bei Kameliden in die Axillarregion und bei Primaten in das obere Augenlid injiziert wird (Kaneene et al. 2010).

Die sehr stark variierende Dicke und der unterschiedliche Aufbau der Haut bei den verschiedenen Spezies erschwert die Vergleichbarkeit und Interpretation des Testes. Richtlinien für die Interpretation des Tuberkulosehauttestes sind nur für Primaten, Rinder, Hirsche und Tapire beschrieben. Die Sensitivität des Testes ist zudem oft schlecht für Zootiere (50-90%) oder Daten zur Sensitivität fehlen ganz (Jurczynski et al. 2012; Lécu and Ball 2011; Cousins and Florisson 2005). Falsch positive Ergebnisse können durch Infektionen mit NTM hervorgerufen werden. Es wird daher empfohlen die Methode als Simultantest durchzuführen und auf einer Körperseite *M. avium*-PPD und auf der anderen Seite *M. bovis*-PPD zu verwenden. Des Weiteren sollten die Injektionsstellen nicht nur visuell betrachtet, sondern immer palpiert und die Hautdicke vermessen werden, um dadurch falsch negative Ergebnisse zu vermeiden. Dies ist bei Zootieren oft ein Problem, da eine wiederholte Immobilisation zur Beurteilung des Testes notwendig ist. Falsch negative Ergebnisse können auch durch Immunsuppression, Malnutrition, medikamentöse

Behandlungen oder Desensibilisierung nach wiederholtem Tuberkulinhauttest auftreten (Lécu and Ball 2011; Kaneene et al. 2010).

Nachweis von Interferon γ (IFG-Test)

Beim Interferon-Gamma-Test handelt es sich um eine in vitro Variante des auf die zellvermittelte Immunantwort basierenden Testverfahrens. Hierbei werden die T-Lymphozyten im Labor mit dem mykobakteriellen Antigen (meist aviäres oder bovines PPD) stimuliert. Bei bereits vorherigem Kontakt mit dem spezifischen Antigen, werden die T-Lymphozyten so zur Proliferation und Sekretion von Cytokinen, insbesondere Interferon- γ , angeregt. In einem zweiten Schritt wird dann die Menge des Interferon- γ mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) oder ELISPOT (enzyme-linked immunosorbent spot) bestimmt. Eine Schwierigkeit bei dieser Methode ist die Tatsache, dass die T-Lymphozyten auf dem Weg zum Labor nicht geschädigt werden dürfen. Das heißt Blutproben müssen das Labor spätestens 8-10 Stunden nach der Entnahme erreichen und kontinuierlich bei moderater Raumtemperatur (bis 22 °C) gelagert werden. Zwar gibt es einige kommerzielle Test-Kits auf dem Markt wie den BOVIGAM® der Fa. Prionics (mittlerweile Teil der Thermo Fisher Scientific Inc.) für Rinder, den PRIMAGAM® für Primaten (Thermo Fisher Scientific Inc.) oder QUANTIFERON GOLD® für die Humanmedizin (Quiagen N.V.). Diese sind teilweise auch bei einigen exotischen Tierarten anwendbar (z.B. der BOVIGAM-Test für Bisons, Büffel und andere exotische Boviden oder auch Giraffen), doch wurden in verschiedenen Feldstudien auch eine Reihe von Problemen beim Einsatz dieser Test-Kits bei nicht „validierten“ Tierarten festgestellt. So scheinen einige Paarhufer beispielsweise nur schwach auf das verwendete Antigen zu reagieren oder das produzierte IFG wird im ELISA nicht detektiert (Lécu and Ball 2011; Grobler et al. 2002).

Serologische Testverfahren

Serologische Testverfahren haben in den letzten Jahren auf Grund ihrer verbesserten Sensitivitäten und Spezifitäten in der Diagnostik von Mykobakterien wieder an Bedeutung gewonnen. Da ihre Sensitivität aber immer noch deutlich hinter anderen Testverfahren liegt, sollten sie nur in Kombination mit anderen Methoden verwendet werden. Für den Nachweis von Mykobakterien sind einige kommerzielle Testverfahren auf dem Markt wie z. B. ElephantTB STATPAK (Fa. Chembio Diagnostic Systems Inc., Medford, New York, USA) oder der PrimaTB STATPAK (Fa. Chembio). Diese vor allem beim Elefanten angewendeten Verfahren wurden in den letzten Jahren öfter von Autoren auch bei anderen Tierarten (Seelöwen, Nashorn, Tapire, Kamele, Hirsche, Primaten) als vielversprechend beschrieben (Jurczynski et al. 2012; Duncan et al. 2009; Greenwald et al. 2009; Moser et al. 2008; Lyashchenko et al. 2007). Für eine endgültige Aussage über Sensitivität und Spezifität reichen diese Daten aber bei weitem noch nicht aus (Moser et al. 2014; Lécu and Ball 2011).

3. Material und Methoden

3.1 Zoologische Einrichtungen

Es wurden sechs verschiedene zoologische Einrichtung in Deutschland beprobt, die nachfolgend mit A-F bezeichnet werden.

Zoologische Einrichtung A

Zoologische Einrichtung B

Zoologische Einrichtung C

Zoologische Einrichtung D

Zoologische Einrichtung E

Zoologische Einrichtung F

3.2 Probenmaterial und –entnahme

Es wurden Rachen- und Rektaltupfer von verschiedenen Tierarten aus sechs verschiedenen Einrichtungen genommen. Die Probenanzahl ist in den nachfolgenden Tabellen dargestellt und umfasst n = 1090 (Tupferproben).

Die Beprobung von Zootieren erfolgte über einem Zeitraum von zwei Jahren. Die Tupfer wurden überwiegend im Rahmen tierärztlicher Routineeingriffe oder Narkosen (Huf- und Klauenpflege, kleinere chirurgische Eingriffe, Impfungen, Umzüge, usw.) genommen. Hierzu wurden die sterilen Tupfer tief in den Rachen geschoben und großflächig unter drehenden Bewegungen das Probenmaterial bis zur vollständigen Aufnahmekapazität des Tupfers entnommen. Der Tupfer wurde sofort zurück in das sterile Behältnis gegeben und anschließend schnellst möglich bei -20 °C gelagert. Ebenso wurde mit den Tupfern aus dem Rektum verfahren.

3.2.1 Rachentupfer

Insgesamt wurden 115 Vögel und 441 Säugetiere einmalig beprobt, also 556 Rachentupfer untersucht.

Die genaue Verteilung der entnommenen Proben auf die einzelnen zoologischen Einrichtungen und deren Zuordnung zu den beprobten Tierspezies ist tabellarisch im Anhang dargestellt (Tabellen A1-A13).

3.2.2 Rektaltupfer

Insgesamt wurden Rektaltupfer von 115 Vögeln und 419 Säugetieren einmalig genommen. Dies entspricht 534 Proben.

Die genaue Verteilung der entnommenen Proben auf die einzelnen zoologischen Einrichtungen und deren Zuordnung zu den beprobten Tierspezies ist tabellarisch im Anhang dargestellt (Tabelle A1-A13).

3.2.3 Mehrfache Beprobung

Rachentupfer

Aus der zoologischen Einrichtung A wurden 37 Säugetiere zweifach beprobt, mit einem Mindestabstand von drei Monaten. Die Probenentnahme erfolgte bei allen Rachentupfern gleichermaßen.

Rektaltupfer

Aus der zoologischen Einrichtung A wurden 35 Säugetiere zweifach beprobt, mit einem Mindestabstand von drei Monaten. Die Probenentnahme erfolgte bei allen Rektaltupfern gleichermaßen

3.3 Material und Geräte

3.3.1 Material für die Probenentnahme

Für die Rachen- und Rektaltupferproben wurde steriles Abstrichbesteck ohne Medium bestehend aus Plastikröhrchen ca. 150 x 12 mm und Polystyrol-Stab mit Viskosekopf der Firma WDT (Nr. 93924) verwendet.

In einigen Ausnahmen musste auf Grund der Tierkörpergröße bei der Entnahme der Rektaltupfer auf kleinere Watteträger mit Metallstab (Baumwollkopf Ø 2 mm) der Firma WDT (Nr. 95924) zurückgegriffen werden.

3.3.2 Referenzstämme

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Referenzstämme

Taxonomische Bezeichnung	Stamm-Bezeichnung	Herkunft
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	Stamm Aulendorf	STUA Aulendorf
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	Stamm Aulendorf	STUA Aulendorf
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	DSM 44135	STUA Aulendorf
<i>M. bovis</i> BCG	DSM 45071	STUA Aulendorf

Alle verwendeten Stämme stammten aus dem nach ISO-Norm 11137 akkreditierten Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt Aulendorf (STUA). Die Stämme wurden dort auf ihre Reinheit überprüft.

3.3.3 Material und Geräte für die Laboruntersuchungen Chemikalien, Puffer, Lösungen

6 x DNA Loading Dye (Nr. R0611)	Thermo Scientific, Langensfeld, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat $\geq 99\%$ (Nr. 8043.1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure $\geq 99\%$ (Nr. 7332.1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut AnalAR NORMAPUR® ACS, Reag. Ph. Eur. zur Analyse (Nr. 20821.330)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromidlösung 0,025 % (Nr. HP47.1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gen Agarose LE (Nr. 3044.0500)	Genaxxon BioScience GmbH, Ulm, Deutschland
GenRuler DNA Ladder, ready-to-use (Nr. SM0313)	Thermo Scientific, Langensfeld, Deutschland
Lysozyme from chicken egg white lyophilized powder, protein $\geq 90\%$, $\geq 40,000$ units/mg protein (L6876-1G)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
PBS Phosphate Buffered Saline (Dulbecco) ohne/mit Ca^{2+} , Mg^{2+} , steril 500 ml (L1825)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Physiologische Kochsalzlösung NaCl (Merck Millipore) Aqua dest. (VWR International GmbH)	9 g 1000 ml
Tris Pufferan® $\geq 99,3\%$ (Nr. 4855.2)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Wasser Ph. Eur., USP, NF, gereinigt (Nr. 90200.9010)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Puffer

TAE-Puffer (50 X)
2 M Tris (242 g/l)
1 M Essigsäure (57,1 ml/l Eisessig)
0,1 M EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (37,2 g/l)

TE-Puffer (1 X)
10 mM Tris (pH 8)
1 mM EDTA

Nährmedien

Feste Nährböden:

Stonebrink-Nährboden mit Pyruvat und PACT ohne Glycerin (Nr. TV5107C) Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Löwenstein-Jensen Nährboden ohne Glycerin mit PACT (Nr. TV5101C) Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

BD BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar Slants with Mycobactin J and ANV (Nr. 222233) Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Flüssiges Nährmedium:

MB Redox 4 ml 5392r-20p (Nr. 1464240020) heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim, Deutschland

Material für DNA-Extraktion und PCR

Gen Elute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Nr. NA2010) Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

innuPREP Mycobacteria DNA Kit (Nr. 845-KS-6100010) Analytik Jena AG, Jena, Deutschland

HotStarTaq® Master Mix Kit (Nr. 203443) Qiagen N.V., Venlo, Niederlande

LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe (Nr. 03003248001) Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Primer und Sonden

Tabelle 2: Übersicht über die in der konventionellen PCR verwendeten Primer

Primer	Sequenz
RPO5'	5'-TCAAGGAGAAGCGCTACGA-3'
RPO3'	5'-GGATGTTGATCAGGGTCTGC-3'

Alle Primer und Sonden wurden durch die Fa. Metabion International AG (Planegg/Steinkirchen, Deutschland) hergestellt und in der Konzentration 100 pmol/µl verwendet.

Tabelle 3: Übersicht über die in der qPCR verwendeten Primer und Sonden

Primer/Sonde	Sequenz
Myco1-Fprimer	5'-ACGGAAAGGTCTCTTCG-3'
Myco2-Rprimer	5'-GTCGTCCGCTTGGTAG-3'
Myco-Probe1	5'-CATGTCTTGTGGTGGAAAGCG-fluorescein isothiocyanate-3'
Myco-Probe2	5'-LC Red 640-TTAGCGGTGTGGGATGAGCCC-phosphate-3'

Allgemeines Labor-Verbrauchsmaterial

Einmalimpfösen, dunkelblau, 10 µl (Nr. 09-420-5061)	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
Einmalpipetten 10 ml, Serologische Pipetten (Nr. 86.1254.001)	SARSTEDT AG&Co., Nümbrecht, Deutschland
Einmalpipetten 1 ml, Nunc™ Serological Pipettes (Nr. 170353)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Reaktionsgefäß (Eppis) PP natur 1,5 ml und 2,0 ml (Nr. 04-210-1100 und 04-230-1100)	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
np Safelock-Cap Reaktionsgefäß (Eppis) 0,5 ml (Nr. 04-332-1200)	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
PCR Tubes with Flat Caps 0.2 ml (Nr. TFI-0201)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Cellstar®Tubes 15 ml (Nr.188271)	greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen Ultratip, 100 - 1000 µL, BLAU (Nr. 686290)	greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen Ultratip, 10 - 100 µL, GELB (Nr. 685290)	greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Filterspitzen PP natur 0,5 - 10 µl (Nr. 07-612-7300)	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
Filterspitzen PP natur 0 - 100 µl (Nr. 07-642-7300)	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland

Filterspitze PP natur 100 - 1000 µl (Nr. 07-693-7300)	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
LightCycler®Capillaries (20 µl) (Nr. 04929292001)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Präzisionswischtücher (Nr. 38662)	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz, Deutschland
Geräte	
Einkanalpipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Heraeus™ Pico™ 17 Microcentrifuge (Nr. 75002410)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Microlitre Cenrifuge with Cooling system Z 233 MK	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland
Thermomixer BioShake iQ (Nr. 848-1808-0506)	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Vortex Reagenzglasnischer (Nr. 7-2020)	neoLab®, Heidelberg, Deutschland
LightCycler® 1.5 Instrumente	Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland
Thermocycler primus 25 advanced	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
HeraSafe KS (Sicherheitswerkbank)	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Kühlschrank FSK 5000 (4 °C ± 3)	Liebherr, Biberach, Deutschland
Gefrierschrank NoFrost premium (-20 °C ± 3)	Liebherr, Biberach, Deutschland
Brutschrank Heraeus	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Transilluminator Quantum ST4	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland

Spannungsquelle PowerPac™ Basic
Bio-Rad Laboratories
GmbH, München,
Deutschland

Gelkammer Mini-Sub® Cell GT
Bio-Rad Laboratories
GmbH, München,
Deutschland

Software und Datenbanken

LightCycler Data Analysis Software
Roche Diagnostic,
Mannheim, Deutschland

Quantum-Capt (ST4)
Vilber Lourmat
Deutschland GmbH,
Eberhardzell, Deutschland

NCBI Blast® (Basic Local Alignment Search Tool)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
NCBI, Bethesda MD, USA

EMBL-EBI fasta
<http://www.ebi.ac.uk/>,
EMBL-EBI,
Cambridgeshire, UK

3.4 Untersuchungsmethoden

3.4.1 Untersuchungen zur Sensitivität der verwendeten Methode

DNA-Extraktion aus Mykobakterien

Für die Etablierung eines optimierten Aufreinigungsverfahrens von Mykobakterien-DNA aus Tupferproben wurden zwei verschiedene kommerzielle DNA-Aufreinigungs-Kits evaluiert:

- Gen Elute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)
- innuPREP Mycobacteria DNA Kit (Analytik Jena AG, Jena, D)

Als Teststamm wurde ein Feldisolat von *Mycobacterium avium* ssp. *avium* (STUA Aulendorf) verwendet. Von einem bewachsenen Stonebrink-Schrägagarröhrchen wurden einige Impfösen in NaCl-Lösung suspendiert und die Suspension auf einen OD_{600 nm}-Wert von 0,4 eingestellt. Da dieser Wert bei Mykobakterien durch ihre Eigenschaft zur Verklumpung ungenau ist, diente er nur als Richtwert und aus der Lösung wurde die KBE als zugrundeliegende Einheit verwendet. Zur Berechnung der Bakterienkonzentration wurde aus dieser Suspension eine dekadische Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe 10⁻⁶ hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 0,1 ml pro Röhrchen Stonebrink-Nährboden mit einer sterilen Impföse gleichmäßig verteilt. Die beimpften Nährböden wurden für zwei Wochen bei 37°C bebrütet. Für die Berechnung der Bakterienkonzentration wurde anschließend die Verdünnungsstufe 10⁻⁵ gewählt, da hier die Kolonien gut einzeln

auszählbar waren. Der so ermittelte arithmetische Mittelwert betrug 5 Kolonien bei der Verdünnungsstufe 10^{-5} . Daraus ergibt sich:

$$c = 5 \times 10^5 \times 10$$

Es muss mit dem Faktor 10 multipliziert werden um von der verwendeten Ausgangsmenge 0,1 ml auf 1ml zu kommen.

Der $OD_{600 \text{ nm}}$ -Wert entspricht damit einer berechneten Bakterienkonzentration von 5×10^6 KBE/ml.

Aus dieser Stammlösung wurde eine dekadische Verdünnungsreihe hergestellt und die Bakterien-DNA aus jeder Verdünnungsstufe entsprechend der Herstellerangaben der beiden Extraktions-Kits isoliert. Zur Überprüfung der Extraktionsmethoden aus Tupferproben wurden die für die Probenentnahme verwendeten Tupfer in Bakteriensuspensionen mit den Konzentrationen 10^6 , 10^3 und 10^1 Bakterien pro ml getaucht.

Anschließend wurden die so behandelten Tupfer in 600 μ l physiologischer NaCl-Lösung gegeben und vorsichtig mit einer sterilen Schere der Viskosekopf abgeschnitten. Nach 24 Stunden wurde der Viskosekopf mittels einer sterilen Pinzette ausgedrückt und aus jeweils 200 μ l der Suspension die DNA extrahiert.

Das die DNA enthaltenden Eluat wurde anschließend für die qPCR verwendet und die Mittelwerte der gemessenen ct-Werte für jede Verdünnungsstufe ermittelt.

a) Gen Elute™ Bacterial Genomic DNA Kit

Das Probenmaterial wurde wie oben beschrieben vorbereitet und die Untersuchung im Doppelansatz durchgeführt. Bei jedem Durchlauf wurde eine Prozesskontrolle mitgeführt, diese enthielt statt Probenmaterial 200 µl PBS. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Arbeitsschritte des *Gen Elute™ Bacterial Genomic DNA Kit*



b) innuPREP Mycobacteria DNA-Extraktionskit

Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers

Arbeitsschritte des *innuPREP Mycobacteria DNA-Extraktionskits*



Anschließend wurden alle Proben mit der qPCR, die beim Feldversuch angewendet wurde, überprüft und die Mittelwerte der ct-Werte ermittelt und verglichen.

Voranreicherung zur Erhöhung der Sensitivität des Nachweisverfahrens

Zur Optimierung der Sensitivität zum Nachweis von Mykobakterien aus Rachen- bzw. Rektaltupferproben mittels PCR-Verfahren sollte über Anreicherungsversuche die Sensitivitätsgrenze verbessert werden.

1. Quantitativer Nachweis in Voranreicherungsmedium

Hierzu wurden jeweils sieben Rachen und sieben Rektaltupfer mit einer Lösung, der Verdünnungsstufe 10^5 KBE/ml des Stammes *M. avium avium* gespikt. Die verwendeten Tupfer stammten von vier gesunden Tieren (einem Poitou-Esel, einem Pony, zwei Ziegen). Die Tupfer wurden in die Bakterienlösung gegeben bis sie vollgesogen waren und anschließend in 2 ml-Reaktionsgefäße gegeben. Mit einer sterilen Schere wurden die Tupferenden vom Stiel abgetrennt und anschließend nach Zugabe von 800 μ l PBS über Nacht bei Raumtemperatur auf einen Schüttler (1600 rpm) gestellt. Am nächsten Tag wurden die Tupferenden mit einer sterilen Pinzette ausgedrückt und verworfen. Aus der zurückbleibenden Probenlösung wurden nach gründlichem Schütteln durch einen Vortexmischer 200 μ l entnommen und in 2 ml MB REDOX Flüssigmedium gegeben. Für einen Vergleichswert, wurden sogleich 200 μ l für die qPCR entnommen. Dieser Wert diente als Ausgangsbasis um eine eventuelle Verbesserung der Sensitivität nach Bebrütung messbar zu machen. Die Glasröhrchen wurden dann für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden wiederum 200 μ l entnommen und eine DNA-Extraktion mit anschließender qPCR durchgeführt.

In einem zweiten Versuch wurden im Doppelansatz sterile Tupfer mit der dekadischen Verdünnungsreihe von 10^1 bis 10^6 KBE/ml bis zur vollen Aufnahmekapazität benetzt. Hierfür wurde zunächst eine bereits vorbereitete Verdünnungsreihe aufgetaut und sogleich 200 μ l pro Verdünnungsstufe entnommen für eine DNA-Aufreinigung und anschließender qPCR zur Kontrolle der Verdünnungslösungen um eine eventuelle Schädigung durch das Einfrieren und Auftauen auszuschließen. Nach dem Benetzen der sterilen Tupfer, wurden die Tupferenden vom Stiel mit einer sterilen Schere getrennt und mit 800 μ l PBS über Nacht bei Raumtemperatur auf einen Schüttler (1600 rpm) gestellt. Am nächsten Tag wurden die Tupferenden mit einer sterilen Pinzette ausgedrückt und verworfen. Von den verbleibenden Probenlösungen wurden 200 μ l in 2 ml MB REDOX Flüssigmedium gegeben. Von den Probenlösungen wurden außerdem jeweils 200 μ l entnommen, für den Ausgangswert aufgereinigt und eine qPCR durchgeführt. Die Glasröhrchen mit dem MB REDOX Flüssigmedium wurden beschriftet und anschließend für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden 200 μ l entnommen für die DNA-Extraktion und Untersuchung in der qPCR.

Das Schema war wie folgt:

Tag 1: Verdünnungsreihe (10^6 bis 10^1) auftauen

→ 200 μ l für qPCR entnehmen (6 Proben, Kontrolle der Verdünnungsreihe)

→ Sterile Tupfer kontaminieren, mit 800 μ l PBS auf Schüttler (1600 rpm)

→ **insgesamt 12 Proben (2/Stufe)**

Tag 2: Kontaminierte Probenlösung (12 Proben)

→200 µl für qPCR (**Ausgangswert**)

→200 µl in MB Redox Flüssigmedium

Tag 3: nach 24 Stunden Bebrütung→200 µl für die PCR (12 Proben)

2. Verbesserung der Nachweisgrenze im zeitlichen Verlauf

Bei diesem Versuchsansatz wurden im Doppelansatz sterile Tupfer mit der dekadischen Verdünnungsreihe in den Stufen 10^1 bis 10^4 und 10^6 KBE/ml bis zur vollen Aufnahmekapazität benetzt. Hierfür wurde die gleiche Verdünnungsreihe, die im zweiten Ansatz verwendet wurde, benutzt. Nach dem Benetzen der sterilen Tupfer, wurden die Tupferenden vom Stiel mit einer sterilen Schere getrennt und mit 800 µl PBS über Nacht bei Raumtemperatur auf einen Schüttler (1600 rpm) gestellt. Am nächsten Tag wurden die Tupferenden mit einer sterilen Pinzette ausgedrückt und verworfen. Von der Probenlösung wurden 200 µl in 2 ml MB REDOX Flüssigmedium gegeben. Für den Vergleichswert wurden sogleich wieder 200 µl zur qPCR-Messung entnommen. Von den Probenlösungen wurden außerdem jeweils 200 µl entnommen, für den Ausgangswert mittels des Gen Elute™ Bacterial Genomic DNA Kits aufgereinigt und die DNA extrahiert sowie eine qPCR durchgeführt. Die Glasröhrchen mit dem MB REDOX Flüssigmedium wurden beschriftet und anschließend für drei bzw. sieben Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden sie über weitere 7 Wochen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und in wöchentlichen Abständen je 200 µl für die qPCR entnommen.

Das Schema war wie folgt:

Tag 1: Verdünnungsreihe (10^1 bis 10^4 und 10^6) auftauen

→ 200 µl für qPCR entnehmen (5 Proben, Kontrolle der Verdünnungsreihe)

→Sterile Tupfer kontaminieren, mit 800 µl PBS auf Schüttler (1600 rpm)

→**insgesamt 10 Proben (2/Stufe)**

Tag 2: Kontaminierte Probenlösung (10 Proben)

→200 µl für qPCR (**Ausgangswert**)

→200 µl in MB Redox Flüssigmedium

Tag 5 : 200 µl für PCR (10 Proben)

Tag 9 : 200 µl für PCR (10 Proben)

Tag 16: 200 µl für PCR (10 Proben)

Tag 23: 200 µl für PCR (10 Proben)

Tag 30: 200 µl für PCR (10 Proben)

Tag 37: 200 µl für PCR (10 Proben)

Tag 44: 200 µl für PCR (10 Proben)

Tag 62: 200 µl für PCR (10 Proben)

3.4.2 Untersuchung von Feldproben

Probenvorbereitung

Die Feldtupferproben wurden in zuvor beschriftete, sterile 2 ml-Reaktionsgefäße gestellt und mit einer sterilen Schere am Stiel abgetrennt. Zum Ausspülen des Probenmaterials wurden 600µl bei den Rachentupfern und 800 µl bei den Rektaltupfern PBS hinzugefügt, die Gefäße gut verschlossen und das ganze über Nacht zum Schütteln bei 1600 rpm auf eine rotierende Plattform gestellt.

Am nächsten Tag wurden die 2 ml-Reaktionsgefäße von der rotierenden Plattform genommen und geöffnet. Die Tupferenden wurden mit einer sterilen Pinzette gefasst, vorsichtig ausgedrückt und verworfen.

Von jeder Probe wurden anschließend 200 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäße für die DNA-Extraktion gegeben.

Das restliche Probenmaterial wurde zur Sicherheit als Rückstellprobe bei -20 °C gelagert.

DNA-Gewinnung

Zur DNA-Gewinnung wurde das im Vorversuch getestete Gen Elute™ Bacterial Genomic DNA Kit verwendet. Als Ausgangsmaterial wurden 200 µl der ausgespülten Tupferprobe verwendet. Bei jedem Durchgang wurde die DNA-Extraktion aus 200 µl PBS als zusätzlich eine Prozesskontrolle mitgemacht. Das Elutionsvolumen betrug ebenfalls 200 µl. Dieses Eluat wurde umgehend für die PCR eingesetzt bzw. kurzzeitig bei 4 °C, der Rest bei -20 °C gelagert

Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Zur Detektion und Quantifizierung der Spezies *Mycobacterium* wurden bereits in der Literatur veröffentlichte Primer und Hybridisierungssonden verwendet (SHRESTHA et al., 2003). Diese amplifizieren eine Sequenz aus dem mykobakteriellen 16S rRNA-Gen, das die hypervariable Region A enthält.

Tabelle 4: Die für die qPCR verwendeten Primer und Sonden

Primer/Sonde	Sequenz	Position (nt)
Myco1-Fprimer	5'-ACGGAAAGGTCTCTTCG-3'	29-45
Myco2-Rprimer	5'-GTCGTCGCCTTGAG-3'	242-227
Myco-Probe1	5'-CATGTCTTGTGGTGGAAAGCG-fluorescein isothiocyanate-3'	151-171
Myco-Probe2	5'-LC Red 640-TTAGCGGTGTGGGATGAGCCC-phosphate-3'	174-194

Zur Spezifitätsprüfung wurde das Primerpaar mit allen vier Kontrollstämmen aus Tabelle 15 getestet.

Als Kontrollstämmen wurden *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominisuis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* und *M. bovis* BCG eingesetzt.

M. avium subsp. *paratuberculosis* wurde auf Herrold's egg yolk medium (HEYM) kultiviert, alle anderen Kontrollstämmen auf Stonebrink und Loewenstein-Jensen-Agar.

Die Sensitivitätsgrenzen der qPCR wurden mit Hilfe kontaminierter Proben bestimmt. Die Proben wurden hierfür allesamt mit verschiedenen Verdünnungsstufen des Kontrollstamms *Mycobacterium avium avium* kontaminiert.

Der Primer-Sonden-Wasser-Mix (PPWM) wurde stets in einem gesonderten Raum pipettiert, in dem nicht mit DNA gearbeitet wurde. Es wurde mit sterilen Arbeitsmaterialien unter der Sicherheitswerkbank HeraSafe KS (Thermo Scientific, Langenselbold) gearbeitet, außerdem wurde ein extra Kittel für diesen Raum und sterile Handschuhe getragen. Hier wurde auch der Mastermix zum PCR-Ansatz hinzugegeben. Die Zugabe der Templates (Proben) erfolgte räumlich getrennt.

Für einen Reaktionsansatz von 20 µl wurden 11 µl des Primer-Sonden-Wasser-Mixes, 4 µl des Mastermixes (LC Fast Start DNA Master^{plus}, Roche), welcher durch das Pipettieren von 10 µl der Lösung 1a (Enzyme) in den Reaktionsmix 1b gebrauchsfertig gemacht wurde und 5 µl Template in ein Glaskapillarröhrchen pipettiert. Die Glaskapillarröhrchen wurden mit den dazugehörigen Deckeln verschlossen und 1 Minute bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das verwendete Programm am PC aufgerufen, ein Testdurchlauf des Light-Cyclers ohne Proben durchgeführt und dann alle Glaskapillarröhrchen in das Gerät gegeben. Im PC-Programm wurde jede Position mit der betreffenden Probennummer betitelt bzw. die positive Kontrolle mit „pos“, die negative Kontrolle mit „neg“ und die Standards jeweils mit „10e3“, „10e4“ und „10e5“.

Bei jedem PCR-Lauf wurde eine Negativ-Kontrolle in Form von 5 µl RNase freiem Wasser, eine Positiv-Kontrolle (DNA von *M. avium avium*) und drei Standards in den Konzentrationen 10³, 10⁴ und 10⁵ mitgeführt.

Der Primer-Sonden-Wasser-Mix wurde nach folgendem Pipettierprotokoll angesetzt:

Tab. 5: Pipettierprotokoll des Primer-Sonden-Wasser-Mixes für die qPCR

Reagenzien	Volumen
Myco-Probe1	0,1µl
Myco-Probe2	0,1µl
Myco1-Fprimer	0,2µl
Myco2-Rprimer	0,2µl
RNase freies Wasser	10,4µl
Gesamtvolumen (ein Ansatz)	11,0µl

Die qPCR wurde mittels LightCycler (LCTM 1.5 PCR, Roche Diagnostic, Mannheim) und der zugehörigen Software (LightCycler Data Analysis Software, Fa.Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland) nach folgendem Protokoll durchgeführt und anschließend ausgewertet:

Tab. 6: Protokoll der qPCR mittels LightCycler

Funktion	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Aktivierung der Taq-Polymerase	95	15min	1
Denaturierung	94	1min	35
Annealing	58	1min	
Extension	72	1min	
Endextension	72	7min	1
Kühlphase	8	unendlich	1

Eine Reaktion wurde als positiv bewertet, wenn der ct-Wert bei ≤ 31.99 lag und als negativ bei einem ct-Wert ≥ 35.00 . Bei ct-Werten zwischen 32.00-34.99 wurde die Reaktion wiederholt. Lag der zweite Wert im negativen Bereich wurde die Probe als negativ eingestuft, lag der Wert im positiven oder fraglichen Bereich als positiv.

Schmelzkurvenanalyse

Bei allen positiven Proben wurde die Schmelzkurvenanalyse zur Beurteilung herangezogen. Bei der Schmelzkurvenanalyse wurde mit einer Temperatureinstellung von 45 °C begonnen und die Temperatur mit einem Gradienten von 0.1 °C/s bis 75 °C erhöht. Hierbei wurden die Fluoreszenzsignale bis zum Erreichen der Maximaltemperatur kontinuierlich gemessen. Die spezifische Schmelztemperatur (T_m) des PCR-Produktes entspricht dem lokalen Maximum der Intensitätsabnahme des gemessenen Fluoreszenzsignals. Die Schmelzkurve wird als Peakkurve dargestellt, die der negativen ersten Ableitung der Schmelzkurve nach der Temperatur entspricht. Das Peakmaximum entspricht demnach der spezifischen Schmelztemperatur (T_m).

Die gemessenen Daten wurden mit der LightCycler Data Analysis Software ausgewertet.

Konventionelle PCR

Von 26 Proben mit einem positiven Ergebnis wurde anschließend mittels einer konventionellen PCR ein Stück des *rpoB* Gens amplifiziert. Hierfür wurden ebenfalls bereits in der Literatur verwendete Primer verwendet (Lee et al. 2003).

Tab. 7: Übersicht der verwendeten Primer in der konventionellen PCR

Primer	Sequenz
RPO5'	5'-TCAAGGAGAAGCGCTACGA-3'
RPO3'	5'-GGATGTTGATCAGGGTCTGC-3'

Auch bei dieser PCR wurden die Primer zur Spezifitätskontrolle mit allen vier bereits oben genannten Kontrollstämmen getestet.

Der Primer-Wasser-Mix (PWM) wurde nach folgendem Protokoll angesetzt:

Tab. 8: Pipettierprotokoll für die konventionelle PCR

Reagenzien	Volumen
RPO5'	0,2µl
RPO3'	0,2µl
RNAse freies Wasser	10,1µl
Gesamtvolumen (ein Ansatz)	10,5µl

Die Durchführung erfolgte wie bei der qPCR. Der Primer-Wasser-Mix wurde unter einer Sicherheitswerkbank (HeraSafe KS, Fa. Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) pipettiert. Die Templatezugabe erfolgte in einem anderen Raum. Die Reagenzien wurden in 0,5ml Safelock-Cap Reaktionsgefäß gegeben. Für ein Reaktionsansatz von 25 µl wurden 10,5 µl PWM, 12,5 µl des HotStartTaq®MasterMixKit (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) und 2 µl Template verwendet. Dieser Ansatz wurde anschließend in den Thermocycler primus 25 advanced (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) gestellt. Das verwendete Programm wird in Tabelle 23 dargestellt.

Tab. 9: Protokoll der konventionellen PCR

Funktion	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Aktivierung der Taq-Polymerase	95	15min	1
Denaturierung	94	1min	35
Annealing	58	1min	
Extension	72	1min	
Endextension	72	7min	1
Kühlphase	8	unendlich	1

Gelelektrophorese

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurde im Anschluss eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde ein 1,5 %iges Agarosegel hergestellt. Es wurden 1,5 g Agarose mit 100 ml 1 x TAE-Puffer in einen Messkolben gegeben und durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Anschließend wurde die flüssige Agaroselösung mit 3 µl Ethidiumbromidlösung versetzt. Das Ganze wurde mit kaltem Wasser gekühlt und anschließend in bereits vorbereitete Gelformen gegossen. Diese hatten je nach Probenanzahl Kämme für die entsprechende Taschenanzahl, in die PCR-Amplifikate, Längenstandard, sowie bei jedem Durchgang eine positiv und negativ Kontrolle pipettiert wurden. Nach Erstarren des Gels wurde der Gelträger in die Gelelektrophoresekammer (Mini-Sub®Cell GT, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gesetzt und vollständig mit 1 x TAE-Laufpuffer bedeckt. In die nach Entfernung der Kämme entstandenen Taschen wurde 10 µl eines 1 kb-Längenstandards (GenRuler, DNA Ladder, ready-to-use, Fa. Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) und 10 µl des PCR-Amplifikates mit 2 µl Ladepuffer (6 x DNA Loading Dye, Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) versetzt und der Reihe nach in die Taschen pipettiert. Zum Schluss kam jeweils 10 µl der Positivkontrolle (10^6 KBE/ml *M. a. avium*) und der Negativkontrolle (Rnase freies Aqua dest.).

Nach Zugabe aller Bestandteile, wurde die Gelelektrophoresekammer mit dem Deckel verschlossen und an die Spannungsquelle (PowerPac™Basic, Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland) angeschlossen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 Volt für ca. 45 Minuten.

Das Gel wurde auf einem Transilluminator mit UV-Licht (254 nm) durchleuchtet und als Bilddatei über eine Kamera auf dem angeschlossenen Computer dokumentiert. Die Darstellung erfolgte über die Software Quantum-Capt (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland). Die Auswertung erfolgte visuell auf Grund der sichtbaren Banden. Eine Probe wurde als positiv bewertet wenn an der zu erwartenden Stelle eine sichtbare Bande im Gel dargestellt werden konnte. Durch den Längenstandard konnte die Größe der PCR-Amplifikate bestimmt und deren Übereinstimmung mit der Positivkontrolle festgestellt werden.

Sequenzierung

Die Sequenzierung von 12 Rachenproben und 14 Rektalproben wurde, inklusive der Aufreinigung des PCR-Produktes, von der Fa. SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt.

Hierfür wurden je Probe 12 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit einem Barcode-Label versehen. Die Barcodenummer wurde der internen Probennummer zugeordnet und entsprechend im Formular vermerkt. Außerdem wurden pro Probe 3 µl Primer RPO3' (10 µM) für die Sequenzierung mitgeschickt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden als fasta-Dateien per E-Mail durch die Fa. SEQLAB versandt und anschließend mit Hilfe der BLAST und FASTA Algorithmen ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Sensitivität der verwendeten Methode

4.1.1 DNA-Extraktion aus Mykobakterien

Zur Optimierung der Extraktion von mykobakterieller DNA aus Tupferproben wurden zwei kommerzielle Kits verglichen; Kit A: Gen Elute™ Bacterial Genomic DNA-Kit und Kit B: innuPREP Mycobacteria DNA-Kit. Zur Überprüfung sowohl der Quantität als auch der Qualität der aufgereinigten DNA wurde die isolierte DNA mittels qPCR analysiert.

Als Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion wurden Bakteriensuspensionen in den Verdünnungsstufen 10^6 bis 10^0 verwendet und zusätzlich Probenupfer mit den Verdünnungsstufen 10^6 , 10^3 und 10^1 kontaminiert. Tabelle 10 zeigt die Mittelwerte der bestimmten ct-Werte.

Bei den Ergebnissen der ct-Werte lagen in den Verdünnungsstufen 10^1 und 10^0 die Werte des Testkits B um 0.57 und 3.80 niedriger als beim Testkit A. In allen anderen Verdünnungsstufen lagen die Mittelwerte der ct-Werte des Testkits A um 0.04 bis 3.90 niedriger als beim Testkit B. Bei beiden Testkits waren die ct-Werte ab der Verdünnungsstufe 10^4 positiv. Bei Testkit A ergaben die Messungen schon bei der Verdünnungsstufe 10^3 einen positiven ct-Wert. Die Werte der kontaminierten Probenupfer waren in der Verdünnungsstufe 10^6 alle positiv.

Tab. 10: Vergleichende Darstellung der Mittelwerte der gemessenen ct-Werte aus der q PCR unter Verwendung der mittels Testkits A bzw. B extrahierten DNA

Verdünnungsstufe	Mittelwerte der gemessenen ct-Werte	
	Testkit A	Testkit B
10^6	19.58	21.45
10^4	26.71	28.25
10^3	30.71	32.73
10^2	34.12	34.16
10^1	36.08	35.51
10^0	36.70	32.90
Tupfer 10^6	22.50	26.40
Tupfer 10^3	32.33	34.34
Tupfer 10^1	36.05	36.59

4.1.2 Voranreicherung zur Erhöhung der Sensitivität des Nachweisverfahrens

Die Verwendung eines Voranreicherungsmediums zur Diagnostik von Mykobakterien stellt ein übliches Verfahren dar. Für die Etablierung eines geeigneten Protokolls zum Nachweis von Mykobakterien aus einer großen Menge von Feldproben sollten die folgenden Punkte berücksichtigt werden:

1. Das Verfahren sollte möglichst einfach in der Handhabung sein
2. Das Verfahren sollte in möglichst kurzer Zeit Ergebnisse liefern können

3. Es sollte keine zusätzliche Dekontamination der Proben notwendig sein

Zur Überprüfung der Eignung eines Bebrütungsschrittes zur Steigerung der Sensitivität wurde in den zwei folgenden Versuchsreihen zunächst durch Bebrütung von kontaminierten Probenentpfer in Voranreicherungsmedium die Erhöhung der Sensitivität quantitativ bestimmt und anschließend die Erhöhung der Sensitivität im zeitlichen Verlauf gemessen.

1. Quantitativer Nachweis in Voranreicherungsmedium

Laut Herstellerangaben des verwendeten MB REDOX Flüssigmediums benötigt ein Nachweis von Mykobakterien zwei bis 20 Tage, in seltenen Fällen bis zu acht Wochen. Im ersten Messdurchgang sollte nachgewiesen werden, ob es bereits nach 24 Stunden Bebrütung zu einer bakteriellen Vermehrung kommt und entsprechend eine Herabsenkung der Nachweisgrenze erreicht werden kann.

Die Ergebnisse der gemessenen ct-Werte unter Verwendung der qPCR, bei dem kontaminierte Rachen- und Rektaltupfer für 24 Stunden in MB REDOX Flüssigmedium bebrütet wurden, sind in Tabelle 11 dargestellt. Die Tupfer wurden mit einer Lösung der Verdünnungsstufe 10^5 kontaminiert. Für die Ausgangswerte wurde das Probenmaterial sofort nach Zugabe in das MB REDOX Flüssigmedium entnommen und direkt ohne Bebrütung für die qPCR verwendet.

Tab. 11: Vergleichende Darstellung der Ausgangswerte aus kontaminierten Rachen- und Rektaltupfern zu den ct-Werten nach einer 24 Stunden-Bebrütung in MB REDOX Flüssigmedium

Tupfer	Ausgangswert Rachentupfer	Rachentupfer nach 24h Bebrütung	Ausgangswert Rektaltupfer	Rektaltupfer nach 24h Bebrütung
1	34.07	32.91	34.04	32.94
2	34.27	32.69	32.86	30.52
3	33.46	32.60	32.31	30.70
4	33.54	33.05	32.67	28.94
5	33.98	31.86	30.75	30.50
6	33.28	33.14	32.22	31.17
7	35.12	32.09	33.24	31.13
Durchschnitt	33.96	32.62	32.58	30.84

Bei allen Messungen konnte nach 24 Stunden Bebrütung eine Erniedrigung des ct-Werts zum Ausgangswert festgestellt werden. Die ct-Werte der Rachentupfer lagen mit Werten zwischen 0.14 und 3.03 niedriger, bei den Rektaltupfern schwankten die Werte zwischen 0.25 und 3.73. Kontaminationen durch die Begleitflora konnten makroskopisch weder bei den Rachen-, noch bei den Rektaltupfern festgestellt werden.

Der zweiten Messung lag zu Grunde, dass es sich bei den zu untersuchenden Proben um kleine Probenvolumina handelt, in denen nur eine geringe Erregeranzahl zu erwarten war. Das Volumen von 2 ml des Voranreicherungsmediums führt daher zu einer starken Verdünnung der Ausgangsproben. Es sollte nachgewiesen werden, ob das

Bakterienwachstum über 24 Stunden auch zu einer Herabsenkung der Nachweisgrenze im Vergleich zur direkten Verwendung der Probe in der qPCR führt.

Die Messung wurde im Doppelansatz unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen 10^1 – 10^6 durchgeführt. Die Mittelwerte der gemessenen ct-Werte von jeder Verdünnungsstufe in der Ausgangsprobe bzw. nach Zugabe in 2 ml Voranreicherungsmedium und anschließender Bebrütung für 24 Stunden wurde in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab. 12 : Vergleich der Mittelwerte (ct-Werte) des Ausgangswertes und nach 24 Stunden Bebrütung in MB REDOX Flüssigmedium der Verdünnungsstufen 10^1 bis 10^6

Verdünnungsstufe	Ausgangsprobe	24h Bebrütung in MB REDOX
10^1	32,35	34,48
10^2	33,69	35,60
10^3	30,60	33,43
10^4	26,93	32,89
10^5	24,40	29,57
10^6	20,79	25,92

Bei den Werten der Ausgangsproben konnten positive Proben (≤ 31.99) bis zur Verdünnung von 10^3 gemessen werden, während die Werte nach dem Hinzufügen in das Voranreicherungsmedium und anschließender Bebrütung für 24 Stunden bis zur Verdünnungsstufe 10^4 positiv waren. Die Erregermenge konnte über 24 Stunden Bebrütung demnach nicht soweit erhöht werden, dass eine Steigerung der Nachweisbarkeit zu erwarten wäre.

2. Verbesserung der Nachweisgrenze im zeitlichen Verlauf

Es konnte festgestellt werden, dass eine Bebrütung in MB REDOX Flüssigmedium prinzipiell sowohl bei den Rachen-, als auch bei den Rektaltupfern eine Verbesserung der Sensitivität erbracht hatte. Diese Verbesserung lag aber nach 24 Stunden Bebrütung durch den Verdünnungseffekt nicht über dem Ausgangswert. Somit bringt die Bebrütung von 24 Stunden noch keinen Vorteil für die Untersuchungsmethode. In einem Langzeitversuch sollte nun geklärt werden, nach wie viel Zeit der Bebrütung im MB REDOX Flüssignährmedium eine Verbesserung der Nachweisgrenze und damit ein niedrigerer ct-Wert als jener des Ausgangswertes erzielt werden kann. Hierfür wurden Proben der Verdünnungsstufen 10^1 bis 10^4 und 10^6 im Doppelansatz über 60 Tage im MB REDOX Flüssignährmedium bebrütet und an unterschiedlichen Tagen der ct-Wert gemessen. Die Ergebnisse der Mittelwerte der gemessenen ct-Werte sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tab. 13: Mittelwerte der ct-Werte aus der Langzeitmessung an den verschiedenen Untersuchungstagen von unterschiedlichen Verdünnungsstufen, die in MB REDOX Flüssigmedium bebrütet wurden und die jeweiligen Ausgangswerte

Verdünnungs- stufe	Ausgangswerte	Tag 5	Tag 9	Tag 16	Tag 23	Tag 30	Tag 37	Tag 44	Tag 62
10¹	39.43	41.00	41.00	39.69	39.40	41.00	34.18	35.81	33.47
10²	37.43	41.00	33.96	39.94	35.92	29.68	26.97	24.46	19.68
10³	34.14	36.93	35.26	39.73	36.64	32.85	27.80	26.91	25.99
10⁴	29.61	32.01	32.09	29.49	25.93	22.14	20.16	18.89	17.90
10⁶	23.40	26.92	24.06	22.67	23.36	21.65	20.03	19.39	18.43

Ab der Verdünnungsstufe 10^4 konnten bei den Ausgangsproben positive ct-Werte gemessen werden. In dieser Verdünnungsstufe konnte nach Zugabe in das Voranreicherungsmedium und Bebrütung erst am Tag 16 ein positiver ct-Wert gemessen werden. In der Verdünnungsstufe 10^3 konnte ab Tag 37 und in der Verdünnungsstufe 10^2 ab Tag 30 ein positiver ct-Wert gemessen werden. In der Verdünnungsstufe 10^1 konnte weder aus der Ausgangsprobe noch nach 60 tägiger Bebrütung im Voranreicherungsmedium ein positiver ct-Wert erreicht werden. Die Werte der Verdünnungsstufe 10^6 waren mit und ohne Voranreicherungsmedium immer positiv.

Die Nachweisgrenze konnte demnach durch die Bebrütung im Voranreicherungsmedium in den Verdünnungsstufen 10^3 und 10^2 herabgesenkt werden, dies aber erst ab Tag 30 bzw. 37.

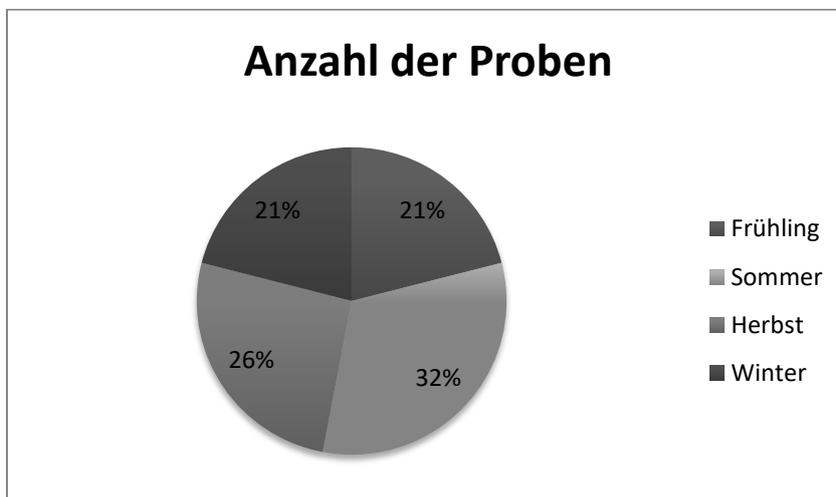
Da bei einer Bakteriendichte von 10^4 KBE/ml bereits ein positiver Ausgangswert vorlag, wäre eine Bebrütung zur Steigerung der Sensitivität erst ab einer geringeren Bakteriendichte sinnvoll. Dies würde aber einen zeitlichen Aufwand von 30 bis 37 Tagen bedeuten. Bei einer Bakteriendichte von 10^1 KBE/ml kann auch durch eine Bebrütung im Voranreicherungsmedium mittels qPCR kein Nachweis erfolgen.

Auf Grund der Voruntersuchungen wurde zur DNA-Extraktion für den molekularbiologischen Nachweis von *Mycobacterium spp.* das Testkit A verwendet. Die ermittelte Nachweisgrenze lag dabei bei 10^3 KBE/ml. Auf die Verwendung eines Voranreicherungsmediums wurde verzichtet.

4.2 Untersuchung von Feldproben (Rachentupfer, Rektaltupfer)

Über einen Zeitraum von zwei Jahren wurden in sechs zoologischen Einrichtungen insgesamt 1090 Tupferproben von verschiedenen Tierarten genommen. Die 556 Rachen- und 534 Rektaltupfer wurden anschließend auf das Vorkommen von *Mycobacterium spp.* untersucht. Hierfür wurde eine qPCR verwendet, die eine Sequenz aus dem mykobakteriellen 16S rRNA-Gen amplifiziert. Von einigen der positiven Proben (13 Rachen- und 18 Rektalproben) wurde dann mittels eines konventionellen PCR-Verfahrens ein Stück des rpoB-Gens amplifiziert und anschließend sequenziert für eine genauere (Sub-) Speziesbestimmung. Die Probenentnahme erfolgte relativ gleichmäßig auf die vier Jahreszeiten verteilt. Nur im Sommer lag die Anzahl der Probenentnahmen etwas höher gegenüber den anderen Jahreszeiten (Abb.1).

Abb.1: Anteil der Proben verteilt auf die vier Jahreszeiten



4.2.1 Rachentupfer Quantitative PCR (16S rRNA)

Alle 556 Proben wurden mittels qPCR auf das Vorhandensein der mykobakteriellen Sequenz des 16S rRNA-Gens, das die hypervariable Region A enthält, untersucht. Dies sollte zunächst feststellen, wie vielen Proben positiv für *Mycobacterium* spp sind. Eine Probe wurde als positiv bewertet, wenn der ct-Wert bei ≤ 31.99 lag. Bei ct-Werten zwischen 32.00 - 34.99 wurde die Reaktion wiederholt. Lagen die neuen Werte ≤ 31.99 oder im Bereich 32.00 - 34.99 wurde die Probe ebenfalls als positiv gewertet. Proben mit ct-Werten ≥ 35.00 wurden als negativ bewertet.

Die Ergebnisse zeigen, dass von 556 Proben bei 14 der entsprechende Genabschnitt von *Mycobacterium* spp. nachgewiesen werden konnte. Dies entspricht einer Prävalenz von 2,52 %. Die positiven Proben stammten von acht unterschiedlichen Tierspezies (2 Vogelspezies und 6 Säugetierspezies) und aus drei der sechs zoologischen Einrichtungen.

Die Ergebnisse der qPCR sind in den Tabellen 14 nach Einrichtung und Prävalenz, sowie in Tabelle 15 nach Spezies dargestellt.

Tabelle 14: Anzahl der positiven Proben in den zoologischen Einrichtungen und die daraus resultierende Prävalenz

Zoologische Einrichtung	Probenzahl insgesamt	Anzahl positiver Proben	Prävalenz (%)
A	339	10	2,95
B	8	2	25
C	12	2	16,67
D	84	0	0
E	40	0	0
F	73	0	0
Gesamt	556	14	2,52

Tabelle 15: Anzahl positiver Tiere einer Spezies. Es wurden alle Spezies aufgeführt, bei denen mindestens ein positives Tier vorkam

Spezies (Deutsch)	Spezies (Latein)	Positive Tiere
Spitzschwanzamadine	<i>Poephila acuticauda</i>	2
Ringelstrild	<i>Stizoptera bichenovii</i>	1
Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>	4
Dschelada	<i>Theropithecus gelada</i>	2
Shetlandpony	<i>Equus ferus caballus</i>	2
Asiatischer Elefant	<i>Elephas maximus</i>	1
Alpaka	<i>Vicugna pacos</i>	1
Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>	1
Gesamt		14

Schmelzkurvenanalyse

Jedes Amplifikat einer qPCR besteht aus doppelsträngiger DNA. Unterzieht man diesen Amplifikaten eine kontinuierliche Temperaturerhöhung, kommt es zur Denaturierung des Doppelstranges zu zwei Einzelsträngen. Die erreichte Temperatur, bei welcher der Doppelstrang zu zwei Einzelsträngen denaturiert, wird als spezifische Schmelztemperatur (T_m) bezeichnet. Die spezifische Schmelztemperatur ist abhängig von der Fragmentlänge und Basenzusammensetzung der Amplifikate. Durch die Ermittlung der spezifischen Schmelztemperatur aller Amplifikate aus den positiven Proben konnten zwei Erkenntnisse gewonnen werden. Zum einen liegt der spezifische Schmelzpunkt eines PCR-Produktes deutlich über dem spezifischen Schmelzpunkt von unspezifischen Primerdimeren. Damit ist eine Unterscheidung möglich, ob das positiv gemessene Fluoreszenzsignal tatsächlich von einem gesuchten Amplifikat stammt. Zum anderen ist durch die Messung der spezifischen Schmelztemperatur die Unterscheidung verschiedener Mykobakterienspezies möglich, vor allem eine Unterscheidung zwischen dem Tuberkulose-Komplex und NTM. Die spezifische Schmelztemperatur (T_m) aller positiven Rachenproben lag zwischen 50.65 - 57.39 °C. Da die spezifische Schmelztemperatur für *M. tuberculosis* (und *M. bovis*) deutlich über 60 °C liegt, kann das Vorliegen dieser Erreger im Untersuchungsmaterial ausgeschlossen werden. Die spezifischen Schmelztemperaturen aus der Schmelzkurvenanalyse für die 14 positiven Proben sind in der Tabelle 16 dargestellt.

Tab. 16: Spezifische Schmelztemperaturen (T_m) aus der Schmelzkurvenanalyse von den 14 positiven Rachenproben in Grad Celsius und die Spezies von der die jeweilige Probe genommen wurde

Proben	T_m (C°)	Spezies (Deutsch)	Spezies (Latein)
1	56.85	Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>
2	52.20	Spitzschwanzamadine	<i>Poephila acuticauda</i>
3	51.79	Spitzschwanzamadine	<i>Poephila acuticauda</i>
4	53.80	Ringelastrild	<i>Stizoptera bichenovii</i>
5	57.24	Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>
6	57.09	Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>
7	56.30	Dschelada	<i>Theropithecus gelada</i>
8	57.00	Dschelada	<i>Theropithecus gelada</i>
9	50.65	Shetlandpony	<i>Equus ferus caballus</i>
10	50.69	Shetlandpony	<i>Pan troglodytes</i>
11	57.35	Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>
12	57.39	Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>
13	57.38	Asiatischer Elefant	<i>Elephas maximus</i>
14	57.05	Alpaka	<i>Vicugna pacos</i>

Analyse des rpoB-Gens der positiven Proben

Amplifikation

Zur weiteren Charakterisierung der in der qPCR amplifizierten *Mycobacterium spp.* wurde bei 12 Proben in einer konventionellen PCR ein 360 bp-großes Fragment des rpoB-Gens amplifiziert. Das Amplifikat enthält einige stark konservierte und eine stark variable Regionen

Ergebnisse

(Lee et al.). Anhand dieser variablen Region können unterschiedliche Mykobakterien auf der Speziesebene differenziert werden.

Bei den 12 Rachenproben konnte nach der Durchführung der PCR eine Bande an der zu erwartenden Stelle im Gel dargestellt werden und damit der entsprechende Abschnitt des *rpoB*-Gens nachgewiesen werden.

Tab. 17: Ergebnisse der konventionellen PCR (*rpoB*-PCR) und Ursprung der Probe (Tierart und zoologischen Einrichtung)

Proben	Tierart	Zoo	<i>rpoB</i> -PCR
1	Bezoar	A	pos
2	Spitzschwanzamadine	A	pos
3	Spitzschwanzamadine	A	pos
4	Ringelastrild	A	pos
5	Schimpanse	B	pos
6	Schimpanse	B	pos
7	Dschelada	A	pos
8	Dschelada	A	pos
9	Shetlandpony	A	pos
10	Shetlandpony	A	pos
11	Schimpanse	C	pos
12	Asiatischer Elefant	A	pos

pos: positiv

neg: negativ

Sequenzierung

Die 12 Proben aus der konventionellen PCR, bei denen eine Bande im Gel an der zu erwartenden Position darstellbar war, wurden für die Sequenzierung an die Fa. SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH weitergeleitet. Bei dieser wurde sowohl eine Reinigung der PCR-Amplifikate, als auch die Sequenzierung durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte zum einen durch die Anwendung des BLAST-Algorithmus (NCBI) und zum anderen durch die Anwendung des FASTA-Algorithmus (EMBL-EBI). In beiden Fällen wurden die ermittelten mit Sequenzen aus den Datenbanken verglichen und Übereinstimmungen angezeigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt. In der Tabelle sind die Treffer mit der höchsten Übereinstimmung bezogen auf die Spezies *Mycobacterium spp.* (sofern dies möglich war) aufgeführt. Bei Anwendung des BLAST-Algorithmus wiesen dabei sechs von 12 Proben Übereinstimmungen zwischen 85 und 93% auf. Bei Anwendung des FASTA-Algorithmus gab es bei einer Probe eine Übereinstimmung mit einer Mykobakterienspezies. Diese Probe stammte von einem Ringelastrild (*Stizoptera bichenovii*) aus der zoologischen Einrichtung A.

Tabelle 18: Sequenzierungsergebnisse des rpoB-Genabschnitts der 12 positiven Proben aus der konventionellen PCR

Probennummer	NCBI Blast Beste Übereinstimmung Mycobacterium sp.	Übereinstimmung in Prozent (%)	embl-fasta Beste Übereinstimmung Mycobacterium sp.	Sequenzlänge
1	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10, complete genome 40.1 149 90% 0.056 NC_002944.2	93	k.Ü.	sehr kurze Sequenz (30)
2	k.Ü.	0	k.Ü.	Sequenz 1140
3	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10, complete genome 364 364 51% 4e-98 NC_002944.2	87	<i>Mycobacterium triplex</i> DNA-directed RNA polymerase subunit beta 3363 1167 87.5 87.5 1.3E-70 EM_CDS:CDO86983	Sequenz 580
4	<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155 chromosome, complete genome 187 187 29% 1e-44 NC_008596.1	85	k.Ü.	Sequenz 589
5	k.Ü.	0	k.Ü.	Sequenz 581
6	k.Ü.	0	k.Ü.	Sequenz 788
7	k.Ü.	0	k.Ü.	Sequenz 782
8	<i>Mycobacterium chubuense</i> NBB4 chromosome, complete genome 147 147 100% 3e-33 NC_018027.1	87	k.Ü.	Sequenz 126
9	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1 chromosome, complete genome 206 206 21% 3e-50 NC_008726.1	91	k.Ü.	Sequenz 695
10	k.Ü.	0	k.Ü.	Sequenz 714
11	k.Ü.	0	k.Ü.	Sequenz 586
12	<i>Mycobacterium chubuense</i> NBB4 chromosome, complete genome 217 217 18% 2e-53 NC_018027.1	89	k.Ü.	Sequenz 901

k.Ü. : keine Übereinstimmung

4.2.2 Rektaltupfer Quantitative PCR (16S rRNA)

Auch die Rektaltupfer wurden mittels qPCR auf das Vorhandensein der mykobakteriellen Sequenz des 16S rRNA-Gens untersucht. Von 534 Proben konnte bei 143 der entsprechende Genabschnitt von *Mycobacterium* spp. nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Prävalenz von 26,78 %. Das Ergebnis ist in der Tabellen 19 nach Prävalenz in der jeweiligen zoologischen Einrichtung und in den Tabellen 20 und 21 nach Anzahl der positiven Tierspezies dargestellt. Die positiven Proben stammten von 18 verschiedenen Vogelspezies und 35 Säugetierspezies. Aus fünf der sechs zoologischen Einrichtungen konnte wenigstens eine positive Probe identifiziert werden.

Tab. 19: Anzahl der positiven Proben in den zoologischen Einrichtungen und die daraus resultierende Prävalenz

Zoologische Einrichtung	Probenzahl insgesamt	Anzahl positiver Proben	Prävalenz (%)
A	316	79	25,00
B	10	0	0
C	12	2	16,67
D	83	3	3,61
E	40	33	82,5
F	73	26	35,62
Gesamt	534	143	26,78

Tab. 20: Anzahl positiver Vögel (Aves) einer Spezies. Es wurden alle Spezies aufgeführt, bei denen mindestens ein positives Tier vorkam

Spezies (Deutsch)	Spezies (Latein)	Positive Tiere
Waldrapp	<i>Geronticus eremita</i>	1
Spitzschwanzamadine	<i>Poephila acuticauda</i>	3
Ringelstrild	<i>Stizoptera bichenovii</i>	1
Ceresamadine	<i>Aidemosyne modesta</i>	1
Zebrafink	<i>Taeniopygia guttata castanotis</i>	1
Eurasischer Kranich	<i>Grus grus</i>	1
Rosaflamingo	<i>Phoenicopterus roseus</i>	1
Chileflamingo	<i>Phoenicopterus chilensis</i>	1
Heiliger Ibis	<i>Threskiornis aethiopicus</i>	1
Kronenkranich	<i>Balearica pavonina</i>	1
Dunkelroter Ara	<i>Ara chloroptera</i>	2
Rosapelikan	<i>Pelecanus onocrotatus</i>	1
Meerespelikan	<i>Pelecanus occidentalis</i>	2
Uhu	<i>Bubo bubo</i>	1
Wüstenbussard	<i>Parabuteo unicinctus</i>	1
Gelbkopfgeier	<i>Cathartes burrovianus</i>	1
Rabengeier	<i>Coragyps atratus</i>	1
Graupapagei	<i>Psittacus erithacus</i>	5
Gesamt		26

Ergebnisse

Tab. 21: Anzahl positiver Säugetiere (Mammalia) einer Spezies. Es wurden alle Spezies aufgeführt, bei denen mindestens ein positives Tier vorkam

Spezies (Deutsch)	Spezies (Latein)	Positive Tiere
Westl. Flachland Gorilla	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	1
Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>	2
Bonobo	<i>Pan paniscus</i>	3
Dschelada	<i>Theropithecus gelada</i>	10
Katta	<i>Lemur catta</i>	1
Roter Vari	<i>Varecia rubra</i>	1
Brauner Klammeraffe	<i>Ateles hybridus</i>	1
Totenkopffaffe	<i>Saimiri sciureus</i>	1
Schneeleopard	<i>Panthera uncia</i>	1
Jaguar	<i>Panthera onca</i>	1
Nasenbär	<i>Nasua nasua</i>	2
Rotes Riesenkänguruh	<i>Macropus rufus</i>	2
Gravyzebra	<i>Equus grevyi</i>	1
Poitou-Esel	<i>Equus asinus asinus</i>	5
Somali-Wildesel	<i>Equus africanus somalicus</i>	1
Hausesel	<i>Equus asinus asinus</i>	3
Przewalski-Pferd	<i>Equus przewalskii</i>	1
Shetlandpony	<i>Equus ferus caballus</i>	6
Dülmener Wildpferd	<i>Equus ferus caballus</i>	1
Okapi	<i>Okapia johnstoni</i>	1
Flugfuchs	<i>Pteropus vampyrus</i>	5
Nilflughund	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	1
Hutiaconga	<i>Capromys pilorides</i>	2
Großer Tenrek	<i>Tenrec ecaudatus</i>	1
Klippschliefer	<i>Procavia capensis</i>	2
Erdmännchen	<i>Suricata suricatta</i>	1
Hausschwein	<i>Sus scrofa domestica</i>	3
Alpaka	<i>Vicugna pacos</i>	4
Kleiner Kudu	<i>Tragelaphus imberbis</i>	1
Hausschaf	<i>Ovis orientalis aries</i>	1
Mufflon	<i>Ovis orientalis musimon</i>	1
Skudde	<i>Ovis orientalis aries</i>	6
Kamerunschaf	<i>Ovis ammon f. aries</i>	8
Mähnenschaf	<i>Ammotragus lervia</i>	1
Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>	6
Alpensteinbock	<i>Capra ibex</i>	6
Zwergziege	<i>Capra aegagrus f. hircus</i>	13
Markhor	<i>Capra falconeri</i>	6
Hausziege	<i>Capra aegagrus hircus</i>	4
Gesamt		117

Schmelzkurvenanalyse

Wie bei den Rachenproben, wurden alle positiven Proben aus der qPCR einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen. Damit kann das Vorliegen unspezifischer Primerdimere ausgeschlossen werden, da diese auf Grund ihrer kurzen Länge eine deutlich niedrigere spezifische Schmelztemperatur aufweisen. Außerdem kann festgestellt werden ob es sich bei den Proben um Mykobakterien des Tuberkulose-Komplexes handelt, deren spezifische Schmelztemperatur über 60 °C liegt. Die spezifische Schmelztemperatur (T_m) aller positiven Rektaltupfer lag zwischen 55.42 und 57.82 °C. Bei keiner Probe lag die spezifische Schmelztemperatur über 60 °C. Dies bedeutet, dass es sich bei keiner der untersuchten Proben um Mykobakterien des TBC handelte. Die spezifischen Schmelztemperaturen aus der Schmelzkurvenanalyse für die 143 positiven Proben sind in den Tabellen 22 bis 27 dargestellt.

Tab. 22: Vögel (Aves), Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse und Herkunft der Proben (Zoo und Spezies)

Probe	T_m (°C)	Zoo	Spezies (Deutsch)	Spezies (Latein)
1	56.41	A	Spitzschwanzamadine	<i>Poephila acuticauda</i>
2	56.75	A	Spitzschwanzamadine	<i>Poephila acuticauda</i>
3	56.46	A	Spitzschwanzamadine	<i>Poephila acuticauda</i>
4	55.62	A	Ringelstrild	<i>Stizoptera bichenovii</i>
5	56.96	A	Ceresamadine	<i>Aidemosyne modesta</i>
6	56.61	A	Zebrafink	<i>Taeniopygia guttata castanotis</i>
7	57.16	D	Eurasischer Kranich	<i>Grus grus</i>
8	56.58	E	Rosaflamingo	<i>Phoenicopterus roseus</i>
9	57.53	D	Chileflamingo	<i>Phoenicopterus chilensis</i>
10	56.46	F	Heiliger Ibis	<i>Threskiornis aethiopicus</i>
11	56.53	F	Kronenkranich	<i>Balearica pavonina</i>
12	56.83	F	Dunkelroter Ara	<i>Ara chloroptera</i>
13	57.07	F	Dunkelroter Ara	<i>Ara chloroptera</i>
14	56.62	F	Rosapelikan	<i>Pelecanus onocrotatus</i>
15	56.50	F	Meerespelikan	<i>Pelecanus occidentalis</i>
16	56.87	F	Meerespelikan	<i>Pelecanus occidentalis</i>
17	57.53	F	Uhu	<i>Bubo bubo</i>
18	57.56	F	Wüstenbussard	<i>Parabuteo unicinctus</i>
19	57.36	F	Gelbkopfgeier	<i>Cathartes burrovianus</i>
20	57.41	F	Rabengeier	<i>Coragyps atratus</i>
21	57.47	F	Graupapagei	<i>Psittacus erithacus</i>
22	57.56	F	Graupapagei	<i>Psittacus erithacus</i>
23	57.47	F	Graupapagei	<i>Psittacus erithacus</i>
24	57.26	F	Graupapagei	<i>Psittacus erithacus</i>
25	56.86	F	Graupapagei	<i>Psittacus erithacus</i>
26	57.39	F	Waldrapp	<i>Geronticus eremita</i>

T_m : spezifische Schmelztemperatur in Grad Celsius

pos : positiv neg : negativ

Tab. 23: Säugetiere (Mammalia) Teil 1, Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse und Herkunft der Proben (Zoo und Spezies)

Probe	T _m	Zoo	Spezies (Deutsch)	Spezies (Latein)
27	56.67	C	Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>
28	57.25	A	Hutiaconga	<i>Capromys pilorides</i>
29	55.73	A	Hutiaconga	<i>Capromys pilorides</i>
30	56.68	A	Nasusbär	<i>Nasua nasua</i>
31	56.80	A	Rotes Riesenkänguruh	<i>Macropus rufus</i>
32	56.54	A	Gravzebra	<i>Equus grevyi</i>
33	56.46	A	Hausschwein	<i>Sus scrofa domestica</i>
34	57.16	A	Hausschwein	<i>Sus scrofa domestica</i>
35	56.98	A	Poitou-Esel	<i>Equus asinus asinus</i>
36	56.42	A	Bonobo	<i>Pan paniscus</i>
37	56.92	A	Poitou-Esel	<i>Equus asinus asinus</i>
38	56.51	A	Poitou-Esel	<i>Equus asinus asinus</i>
39	56.64	A	Rotes Riesenkänguruh	<i>Macropus rufus</i>
40	56.11	A	Großer Tenrek	<i>Tenrec ecaudatus</i>
41	56.74	A	Okapi	<i>Okapia johnstoni</i>
42	56.67	A	Bonobo	<i>Pan paniscus</i>
43	56.60	A	Bonobo	<i>Pan paniscus</i>
44	56.75	A	Dschelada	<i>Theropithecus gelada</i>
45	56.25	A	Dschelada	<i>Theropithecus gelada</i>
46	56.44	A	Dschelada	<i>Theropithecus gelada</i>
47	56.04	A	Dschelada	<i>Theropithecus gelada</i>
48	56.82	A	Dschelada	<i>Theropithecus gelada</i>
49	56.92	A	Dschelada	<i>Theropithecus gelada</i>
50	56.90	A	Dschelada	<i>Theropithecus gelada</i>

T_m: spezifische Schmelztemperatur in Grad Celsius

Tab. 24: Säugetiere (Mammalia) Teil 2, Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse und Herkunft der Proben (Zoo und Spezies)

Probe	T _m	Zoo	Spezies (Deutsch)	Spezies (Latein)
51	56.62	A	Dschelada	<i>Theropithecus gelada</i>
52	56.42	A	Dschelada	<i>Theropithecus gelada</i>
53	56.63	A	Dschelada	<i>Theropithecus gelada</i>
54	55.95	A	Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>
55	57.49	A	Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>
56	56.43	A	Gorilla	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>
57	57.08	A	Mufflon	<i>Ovis orientalis musimon</i>
58	57.13	A	Kamerunschaf	<i>Ovis ammon f. aries</i>
59	56.60	A	Kamerunschaf	<i>Ovis ammon f. aries</i>
60	56.82	A	Poitou-Esel	<i>Equus asinus asinus</i>
61	57.18	A	Shetlandpony	<i>Equus ferus caballus</i>
62	56.89	A	Dülmener Wildpferd	<i>Equus ferus caballus</i>
63	56.92	A	Alpensteinbock	<i>Capra ibex</i>
64	56.42	A	Alpensteinbock	<i>Capra ibex</i>
65	55.88	A	Alpensteinbock	<i>Capra ibex</i>
66	56.47	A	Alpensteinbock	<i>Capra ibex</i>
67	56.82	A	Alpensteinbock	<i>Capra ibex</i>
68	57.20	A	Alpensteinbock	<i>Capra ibex</i>
69	56.73	A	Alpaka	<i>Vicugna pacos</i>
70	56.35	A	Kleiner Kudu	<i>Tragelaphus imberbis</i>
71	57.34	A	Zwergziege	<i>Capra aegagrus f. hircus</i>
72	57.31	A	Zwergziege	<i>Capra aegagrus f. hircus</i>
73	54.51	A	Schneeleopard	<i>Panthera uncia</i>
74	57.15	A	Klippschliefer	<i>Procavia capensis</i>

T_m: spezifische Schmelztemperatur in Grad Celsius

Ergebnisse

Tab. 25: Säugetiere (Mammalia) Teil 3, Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse und Herkunft der Proben (Zoo und Spezies)

Probe	T _m	Zoo	Spezies (Deutsch)	Spezies (Latein)
75	56.91	A	Klippschliefer	<i>Procavia capensis</i>
76	57.59	A	Flugfuchs	<i>Pteropus vampyrus</i>
77	57.79	A	Flugfuchs	<i>Pteropus vampyrus</i>
78	57.65	A	Flugfuchs	<i>Pteropus vampyrus</i>
79	56.85	A	Flugfuchs	<i>Pteropus vampyrus</i>
80	56.80	A	Flugfuchs	<i>Pteropus vampyrus</i>
81	57.01	A	Poitou-Esel	<i>Equus asinus asinus</i>
82	56.73	A	Somali Wildesel	<i>Equus africanus somalicus</i>
83	56.93	A	Markhor	<i>Capra falconeri</i>
84	56.97	A	Markhor	<i>Capra falconeri</i>
85	56.68	A	Markhor	<i>Capra falconeri</i>
86	56.85	A	Markhor	<i>Capra falconeri</i>
87	56.75	A	Markhor	<i>Capra falconeri</i>
88	57.01	A	Jaguar	<i>Panthera onca</i>
89	57.82	A	Totenkopffäffchen	<i>Saimiri boliviensis</i>
90	55.42	A	Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>
91	57.46	A	Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>
92	56.05	A	Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>
93	57.13	A	Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>
94	56.80	E	Alpaka	<i>Vicugna pacos</i>
95	56.97	E	Alpaka	<i>Vicugna pacos</i>
96	56.24	E	Shetlandpony	<i>Equus ferus caballus</i>
97	56.97	E	Shetlandpony	<i>Equus ferus caballus</i>
98	56.87	E	Shetlandpony	<i>Equus ferus caballus</i>
99	56.74	E	Shetlandpony	<i>Equus ferus caballus</i>

T_m : spezifische Schmelztemperatur in Grad Celsius

Tab. 26: Säugetiere (Mammalia) Teil 4, Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse und Herkunft der Proben (Zoo und Spezies)

Probe	T _m	Zoo	Spezies (Deutsch)	Spezies (Latein)
100	57.31	E	Shetlandpony	<i>Equus ferus caballus</i>
101	57.07	E	Hausesel	<i>Equus asinus asinus</i>
102	56.79	E	Hausesel	<i>Equus asinus asinus</i>
103	56.87	E	Hausesel	<i>Equus asinus asinus</i>
104	56.83	E	Skudde	<i>Ovis orientalis aries</i>
105	56.51	E	Skudde	<i>Ovis orientalis aries</i>
106	56.83	E	Skudde	<i>Ovis orientalis aries</i>
107	56.52	E	Skudde	<i>Ovis orientalis aries</i>
108	56.20	E	Skudde	<i>Ovis orientalis aries</i>
109	57.05	E	Skudde	<i>Ovis orientalis aries</i>
110	57.25	E	Kamerunschaf	<i>Ovis ammon f. aries</i>
111	57.06	E	Kamerunschaf	<i>Ovis ammon f. aries</i>
112	57.18	E	Kamerunschaf	<i>Ovis ammon f. aries</i>
113	57.01	E	Kamerunschaf	<i>Ovis ammon f. aries</i>
114	56.64	E	Kamerunschaf	<i>Ovis ammon f. aries</i>
115	56.17	E	Kamerunschaf	<i>Ovis ammon f. aries</i>
116	56.24	E	Zwergziege	<i>Capra aegagrus f. hircus</i>
117	56.17	E	Zwergziege	<i>Capra aegagrus f. hircus</i>
118	56.95	E	Zwergziege	<i>Capra aegagrus f. hircus</i>
119	56.50	E	Zwergziege	<i>Capra aegagrus f. hircus</i>
120	56.42	E	Zwergziege	<i>Capra aegagrus f. hircus</i>
121	56.95	E	Zwergziege	<i>Capra aegagrus f. hircus</i>
122	56.71	E	Zwergziege	<i>Capra aegagrus f. hircus</i>
123	56.78	E	Zwergziege	<i>Capra aegagrus f. hircus</i>
124	56.71	E	Zwergziege	<i>Capra aegagrus f. hircus</i>

T_m: spezifische Schmelztemperatur in Grad Celsius

Tab. 27: Säugetiere (Mammalia) Teil 5, Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse und Herkunft der Proben (Zoo und Spezies)

Probe	T _m	Zoo	Spezies (Deutsch)	Spezies (Latein)
125	56.15	E	Zwergziege	<i>Capra aegagrus f. hircus</i>
126	56.23	A	Erdmännchen	<i>Suricata suricatta</i>
127	57.80	A	Przewalski-Pferd	<i>Equus przewalskii</i>
128	57.02	A	Nilflughund	<i>Rousettus aegyptiacus</i>
129	56.76	A	Mähnenschaf	<i>Ammotragus lervia</i>
130	57.42	A	Brauner Klammeraffe	<i>Ateles hybridus</i>
131	57.50	A	Markhor	<i>Capra falconeri</i>
132	57.25	C	Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>
133	56.99	A	Alpaka	<i>Vicugna pacos</i>
134	56.67	D	Afrikanische Zwergziege	<i>Capra aegagrus hircus</i>
135	56.05	F	Nasenbär	<i>Nasua nasua</i>
136	57.36	F	Schaf	<i>Ovis orientalis aries</i>
137	57.73	F	Ziege	<i>Capra aegagrus hircus</i>
138	57.28	F	Ziege	<i>Capra aegagrus hircus</i>
139	57.06	F	Hausschwein	<i>Sus scrofa domestica</i>
140	56.92	F	Ziege	<i>Capra aegagrus hircus</i>
141	57.30	F	Ziege	<i>Capra aegagrus hircus</i>
142	56.71	F	Katta	<i>Lemur catta</i>
143	56.17	F	Roter Vari	<i>Varecia rubra</i>

T_m: spezifische Schmelztemperatur in Grad Celsius

Analyse des rpoB-Gens der positiven Proben

Amplifikation

Wie bei den Rachenproben wurde zur weiteren Charakterisierung einige positive Proben der qPCR mittels einer konventionellen PCR eine Sequenz des rpoB-Gens amplifiziert. Hierbei konnte bei 14 Proben nach der Durchführung der PCR eine Bande an der zu erwartenden Stelle im Gel dargestellt werden und damit der entsprechende Abschnitt des rpoB-Gen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind der Tabelle 28 zu entnehmen.

Tab. 28: Ergebnisse der konventionellen PCR (rpoB-PCR) und Ursprung der Probe (Tierart und zoologischen Einrichtung)

Probe	Tierart	Zoo	rpoB-PCR
1	Kronenkranich	F	pos
2	Dunkelroter Ara	F	pos
3	Dunkelroter Ara	F	pos
4	Rosapelikan	F	pos
5	Meerespelikan	F	pos
6	Meerespelikan	F	pos
7	Waldrapp	F	pos
8	Schaf	F	pos
9	Ziege	F	pos
10	Hauschwein	F	pos
11	Ziege	F	pos
12	Ziege	F	pos
13	Katta	F	pos
14	Roter Vari	F	pos

pos = positiv

Sequenzierung

Die 14 Proben, bei denen eine Bande im Gel an der zu erwartenden Stelle festgestellt werden konnte, wurden an die Fa. SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH weitergeleitet. Bei dieser wurde sowohl eine Reinigung der PCR-Amplifikate, als auch die Sequenzierung durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte, wie bei den Rachenproben, durch die Anwendung des BLAST-Algorithmus (NCBI) und des FASTA-Algorithmus (EMBL-EBI). Die Ergebnisse sind in den Tabellen 29 und 30 dargestellt. Hier wurden Übereinstimmungen mit *Mycobacterium spp.* (sofern möglich) verglichen. Es gab in keinem Fall eine 100%ige Übereinstimmung mit einer bekannten *Mycobacterium spp.*. Bei Anwendung des BLAST-Algorithmus wiesen fünf von 14 Proben Übereinstimmungen zwischen 84 und 97% auf. Bei Anwendung des FASTA-Algorithmus gab es drei Übereinstimmungen zwischen 61,6 und 96,7%. Generell konnten bei dem Vergleich der Ergebnisse beider Datenbanken deutliche Unterschiede festgestellt werden. Bei zwei Proben gab es bei Anwendung beider Algorithmen eine Übereinstimmung.

Ergebnisse

Tab. 29: Sequenzierungsergebnisse des rpoB-Genabschnitts der 14 positiven Proben aus der konventionellen PCR, Teil 1

Proben	NCBI Blast Beste Übereinstimmung Mycobacterium spp.	Übereinstimmung in Prozent (%)	embl-fasta Beste Übereinstimmung Mycobacterium spp.	Übereinstimmung in Prozent (%)	Sequenz- länge
1	<i>Mycobacterium chubuense</i> NBB4 chromosome, complete genome 99.0 99.0 100% 3e-19 NC_018027.1	94	<i>Mycobacterium sp.</i> FL04-60-84LA RNA polymerase B subunit (rpoB) gene, partial cds 266 296 95.3% 3.0E-13 EM_PRO:EU619932	93,3	sehr kurze Sequenz (64)
2	k.Ü.	0	k.Ü.	0	Sequenz 848
3	<i>Mycobacterium gilvum</i> Spyr1 chromosome, complete genome 137 137 13% 2e-29 NC_014814.1	85	k.Ü.	0	Sequenz 1001
4	k.Ü.	0	<i>Mycobacterium conceptionense</i> strain IoA4 partial rpoB gene for ribosomal RNA polymerase B subunit 321 288 61.6% 5.6E-15 EM_PRO:AM885922	61,6	Sequenz 706
5	<i>Mycobacterium abscessus</i> chromosome, complete sequence 52.0 132 93% 2e-05 NC_010397.1	97	<i>Mycobacterium neoaurum</i> VKM Ac-1815D, complete genome 5438192 144 96.7% 0.0066 EM_PRO:CP006936	96,7	sehr kurze Sequenz (32)
6	k.Ü.	0	k.Ü.	0	Sequenz 748

k.Ü.: keine Übereinstimmung

Tab. 30: Sequenzierungsergebnisse des rpoB-Genabschnitts der 14 positiven Proben aus der konventionellen PCR, Teil 2

Probennummer	NCBI Blast Beste Übereinstimmung Mycobacterium spp.	Übereinstimmung in Prozent (%)	embl-fasta Beste Übereinstimmung Mycobacterium spp.	Übereinstimmung in Prozent (%)	Sequenzlänge
7	k.Ü.	0	k.Ü.	0	Sequenz 1200
8	<i>Mycobacterium rhodesiae</i> NBB3 chromosome, <i>Mycobacterium gilvum</i> Spyr1 chromosome, <i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK chromosome, <i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155 chromosome, complete genome 171 171 23% 1e-39 NC_016604.1 NC_014814.1 NC_009338.1 NC_008596.1	87	k.Ü.	0	Sequenz 555
9	k.Ü.	0	k.Ü.	0	Sequenz 770
10	<i>Mycobacterium gilvum</i> Spyr1 chromosome, complete genome 102 102 33% 2e-19 NC_014814.1	84	k.Ü.	0	Sequenz 284
11	k.Ü.	0	k.Ü.	0	Sequenz 296
12	k.Ü.	0	k.Ü.	0	Sequenz 585
13	k.Ü.	0	k.Ü.	0	Sequenz 235
14	k.Ü.	0	k.Ü.	0	Sequenz 266

k.Ü.: keine Übereinstimmung

4.2.3 Mehrfach Beprobung

Da bekannt ist, dass Mykobakterien durch den Wirt intermittierend ausgeschieden werden, wurden von 37 Tiere zweimal Rachen- und von 35 Tieren zweimal Rektaltupfer entnommen. Bei der Probenentnahme wurde ein Zeitabstand von mindestens drei Monaten eingehalten. Die mehrfache Beprobung sollte zeigen, ob bei den Proben desselben Tieres zu unterschiedlichen Zeitpunkten, unterschiedliche Ergebnisse festgestellt werden können.

Rachentupfer

Bei den 37 Tieren, die zweimal beprobt wurden, gab es zwei positive Ergebnisse. Ein Shetlandpony (*Equus ferus caballus*) und ein Asiatischer Elefant (*Elephas maximus*). In beiden Fällen war ein Tupfer positiv, der zweite zu einem anderen Zeitpunkt entnommene Tupfer negativ. Die Bezeichnung „positiv“(pos) und „negativ“(neg) beziehen sich auf das Ergebnis der qPCR.

Tab. 31: Ergebnisse der Rachentupfer aus der qPCR der doppelt beprobten Tiere

Spezies (Deutsch)	Spezies (Latein)	1. Probe	2. Probe
Westlicher Flachlandgorilla	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	neg	neg
Bonobo	<i>Pan paniscus</i>	neg	neg
Brauner Klammeraffe	<i>Ateles hybridus</i>	neg	neg
Haubenlangur	<i>Trachypithecus auratus</i>	neg	neg
Totenkopffäffchen	<i>Saimiri boliviensis</i>	neg	neg
Onager	<i>Equus hemionus onager</i>	neg	neg
Poitou-Esel	<i>Equus asinus asinus</i>	neg	neg
Shetlandpony	<i>Equus ferus caballus</i>	pos	neg
Erdmännchen	<i>Suricata suricatta</i>	neg	neg
Asiatischer Elefant	<i>Elephas maximus</i>	neg	neg
Asiatischer Elefant	<i>Elephas maximus</i>	neg	pos
Zweifingerfaultier	<i>Choloepus didactylus</i>	neg	neg
Klippschliefer	<i>Procavia capensis</i>	neg	neg
Klippschliefer	<i>Procavia capensis</i>	neg	neg
Klippschliefer	<i>Procavia capensis</i>	neg	neg
Klippschliefer	<i>Procavia capensis</i>	neg	neg
Trampeltier	<i>Camelus bactrianus</i>	neg	neg
Okapi	<i>Okapia johnstoni</i>	neg	neg
Kleiner Kudu	<i>Tragelaphus imberbis</i>	neg	neg
Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>	neg	neg
Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>	neg	neg
Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>	neg	neg
Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>	neg	neg
Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>	neg	neg
Alpensteinbock	<i>Capra ibex</i>	neg	neg
Zwergziege	<i>Capra aegagrus f. hircus</i>	neg	neg
Markhor	<i>Capra falconeri</i>	neg	neg
Kamerunschaf	<i>Ovis orientalis aries</i>	neg	neg
Hutiaconga	<i>Capromys pilorides</i>	neg	neg
Gundi	<i>Ctenodactylus gundi</i>	neg	neg
Gundi	<i>Ctenodactylus gundi</i>	neg	neg
Gundi	<i>Ctenodactylus gundi</i>	neg	neg
Gundi	<i>Ctenodactylus gundi</i>	neg	neg
Großer Tenrek	<i>Tenrec ecaudatus</i>	neg	neg
Großer Tenrek	<i>Tenrec ecaudatus</i>	neg	neg
Igeltanrek	<i>Echinops telfairi</i>	neg	neg
Igeltanrek	<i>Echinops telfairi</i>	neg	neg

pos = positiv

neg = negativ

Rektaltupfer

Bei den 35 Tieren, die doppelt beprobt wurden, waren 17 Tupfer positiv. Bei einem Tier waren beide zu unterschiedlichen Zeiten genommenen Proben positiv. Dabei handelte es sich um eine Bezoarziege (*Capra aegagrus cretica*). Bei den übrigen 15 Tieren waren je ein Tupfer positiv und ein Tupfer negativ. Die Bezeichnung „positiv“ (pos) und „negativ“ (neg) beziehen sich auf das Ergebnis der qPCR.

Tab. 32: Ergebnisse der Rektaltupfer aus der qPCR der doppelt beprobten Tiere

Spezies (Deutsch)	Spezies (Latein)	1. Probe	2. Probe
Westlicher Flachlandgorilla	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	neg	pos
Bonobo	<i>Pan paniscus</i>	neg	pos
Haubenlangur	<i>Trachypithecus auratus</i>	neg	neg
Totenkopffäffchen	<i>Saimiri boliviensis</i>	pos	neg
Onager	<i>Equus hemionus onager</i>	neg	neg
Poitou-Esel	<i>Equus asinus asinus</i>	pos	neg
Shetlandpony	<i>Equus ferus caballus</i>	neg	neg
Erdmännchen	<i>Suricata suricatta</i>	neg	neg
Asiatischer Elefant	<i>Elephas maximus</i>	neg	neg
Asiatischer Elefant	<i>Elephas maximus</i>	neg	neg
Klippschliefer	<i>Procavia capensis</i>	neg	pos
Klippschliefer	<i>Procavia capensis</i>	pos	neg
Klippschliefer	<i>Procavia capensis</i>	neg	neg
Klippschliefer	<i>Procavia capensis</i>	neg	pos
Klippschliefer	<i>Procavia capensis</i>	neg	neg
Trampeltier	<i>Camelus bactrianus</i>	neg	neg
Okapi	<i>Okapia johnstoni</i>	neg	neg
Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>	neg	pos
Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>	pos	pos
Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>	neg	neg
Bezoarziege	<i>Capra aegagrus cretica</i>	pos	neg
Alpensteinbock	<i>Capra ibex</i>	pos	neg
Zwergziege	<i>Capra aegagrus f. hircus</i>	neg	neg
Markhor	<i>Capra falconeri</i>	neg	pos
Kamerunschaf	<i>Ovis orientalis aries</i>	pos	neg
Hutiaconga	<i>Capromys pilorides</i>	pos	neg
Hutiaconga	<i>Capromys pilorides</i>	pos	neg
Gundi	<i>Ctenodactylus gundi</i>	neg	neg
Gundi	<i>Ctenodactylus gundi</i>	neg	neg
Gundi	<i>Ctenodactylus gundi</i>	neg	neg
Gundi	<i>Ctenodactylus gundi</i>	neg	neg
Großer Tenrek	<i>Tenrec ecaudatus</i>	neg	neg
Großer Tenrek	<i>Tenrec ecaudatus</i>	pos	neg
Igeltanrek	<i>Echinops telfairi</i>	neg	neg
Igeltanrek	<i>Echinops telfairi</i>	neg	neg

pos = positiv

neg = negativ

4.3 Ergebnis aller positiven Feldproben nach Entnahmezeitpunkt

Jede Feldprobe wurde nach ihrem Entnahmezeitpunkt einer Jahreszeit zugeordnet. Diese erfolgte nach folgender Definition:

Frühling: Probenentnahme in den Monaten März, April, Mai

Sommer: Probenentnahme in den Monaten Juni, Juli, August

Herbst: Probenentnahme in den Monaten September, Oktober, November

Winter: Probenentnahme in den Monaten Dezember, Januar, Februar

Dabei zeigte sich, dass die meisten positiven Proben in der Jahreszeit Frühling auftraten. Hier war die Prävalenz am höchsten, während im Sommer eine deutlich geringere Prävalenz ermittelt wurde (Tab. 33).

Tab. 33: Anzahl der Proben, die in der jeweiligen Jahreszeit entnommen wurden und Anzahl der positiven Proben in der jeweiligen Jahreszeit (absolut und prozentual im Verhältnis zur Anzahl entnommener Proben in der jeweiligen Jahreszeit)

Jahreszeit	Anzahl Proben insgesamt	Anzahl positiver Proben	Anzahl positiver Proben in Prozent
Frühling	234	55	23,50%
Sommer	348	24	6,89%
Herbst	281	37	13,17%
Winter	227	41	18,06%

5 Diskussion

Das Vorkommen von Mykobakterien bei in zoologischen Einrichtungen gehaltenen Tieren in Deutschland ist aktuell von großer Bedeutung. Dies liegt zum einen an dem hohen zoonotischen Potential einiger Mykobakterienspezies und zum anderen an dem großen Problem einer zuverlässigen und schnellen Diagnostik (Jurczynski et al. 2012; Lécú and Ball 2011). Besonders Infektionen mit Mykobakterien aus dem Tuberkulose-Komplex stellen eine Bedrohung für Menschen und Tiere dar. Schon der Verdachtsfall oder positive Befund von „säurefesten Stäbchen“ versetzt Untersuchungsämter, Amtstierärzte und Zootierärzte in höchste Alarmbereitschaft. In ungeklärten oder bestätigten Fällen von „Tuberkulose“ kommt es zu ausgedehnten und kostenintensiven diagnostischen Untersuchungen im gesamten Umfeld des betroffenen Tieres. Dies bezieht sich auf vergesellschaftete Tiere und alle Mitarbeiter, die mit dem Tier in Kontakt gestanden haben. Die aufwendige, oft langwierige und unzuverlässige Diagnostik stellt dabei ein großes Hindernis für die Erhaltung der Gesundheit bzw. des Lebens aller betroffenen Individuen dar. Ein „falsch positives“ Ergebnis ist dabei besonders gravierend bei der Haltung extrem seltener Tierarten und genetisch sehr wertvoller Einzeltiere. Therapien, sofern erlaubt, sind zeitaufwändig, kostenintensiv und bei Tieren schwierig zu handhaben. Die Tiere müssten über einen sehr langen Zeitraum unter strikten Sicherheitsbedingungen in Quarantäne gehalten werden. In den meisten Fällen wird daher von einer Therapie abgesehen und die Tiere werden euthanasiert. Falsch positive Ergebnisse oder Verdachtsfälle entstehen vor allem durch Infektionen mit bzw. den Nachweis von NTM. Gerade über das Vorkommen und die Bedeutung von NTM bei Zootieren in deutschen Einrichtungen ist aber wenig bekannt. Aus diesem Grund ist auch eine Risikobewertung zum Vorkommen von Mykobakterien in deutschen zoologischen Einrichtungen derzeit schwierig. Es existieren Einzelfallbeschreibungen aus verschiedenen Einrichtungen, aber systematische umfassende Untersuchungen fehlen. Da bei einer Infektion mit Mykobakterien nicht immer auch eine Ausscheidung stattfindet, muss zunächst geklärt werden, wann und wie häufig Mykobakterien ausgeschieden werden, um der Frage nach dem Risikopotential einer Infektion von Kontaktpersonen/-tieren nachzugehen.

Ziel dieser Arbeit war es daher einen ersten Überblick über das Vorkommen von *Mycobacterium* spp. bei in zoologischen Einrichtungen gehaltenen Säugetier- und Vogelspezies zu schaffen. Dies geschah mit besonderem Blick auf die Ausscheidung der Erreger und der damit verbundenen Möglichkeit einer Übertragung auf andere Individuen.

Um das Ziel dieser Arbeit zu erreichen, wurde zunächst der Fragestellung nach dem effektivsten und sensitivsten Nachweisverfahren bei der Verwendung eines qPCR-Verfahrens nachgegangen.

Alle Versuche zur Sensitivität der verwendeten Methode wurden mit dem Referenzstamm *M. avium* subsp. *avium* Stamm Aulendorf durchgeführt. Dieser Stamm wurde zum einen aus Gründen des Arbeitsschutzes und der damit verbundenen einfacheren Handhabung gewählt, zum anderen auf Grund seines schnellen Wachstums und der damit verbundenen schnellen Bereitstellung großer Mengen Probenmaterials. Da der Aufbau der Zellwand bei den unterschiedlichen Mykobakterienspezies ähnlich ist, wurde dieser Stamm als Referenz für verschiedene Mykobakterienspezies verwendet (Zuber et al. 2008; Amaro et al. 2008; Jarlier and Nikaido 1994).

Die Proben wurden im Rahmen verschiedener tierärztlicher Eingriffe und Narkosen gesammelt. Die Verfolgung eines systematischen Probenplans war daher aus technischen Gründen nicht praktikabel. Der Zeitrahmen betrug zwei Jahre und es waren sechs zoologische Einrichtungen beteiligt. Die in diesem Zeitraum gesammelte Probenmenge umfasste insgesamt 1090 Proben von Säugetieren ($n = 860$) und Vögeln ($n = 230$). Starke jahreszeitliche Unterschiede ergaben sich nicht. Nur im Sommer war die Anzahl der Probenentnahmen etwas höher gegenüber den drei restlichen Jahreszeiten.

Bei der Auswahl des Probenmaterials mussten verschiedene Faktoren berücksichtigt werden. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, sollte stets das gleiche Material und die gleiche Menge verwendet werden. Da die zu beprobenden Tierarten sehr starke Unterschiede z.B. in Größe oder produzierter Kotmenge pro Tag aufwiesen, wurde entschieden auf standardisierte Tupfer zurückzugreifen. Einen weiteren wichtigen Faktor für die Probenentnahme stellte die Herausforderung einer möglichst schnellen und wenig invasiven Entnahme der Proben dar. Auch hier eigneten sich Tupfer besonders gut.

Bei PCR-basierten Nachweismethoden für Mykobakterien ist aufgrund der speziellen Zellwandmorphologie die Methode des Zellaufschlusses und der anschließenden DNA-Extraktion von besonderer Bedeutung (Park et al. 2014; Amaro et al. 2008; Hosek et al. 2006). Ein wichtiger Aspekt bei der Auswahl des Extraktionsverfahrens ist auch das Ausgangs- bzw. Probenmaterial. So konnte (Großpietsch 2011) in seiner Arbeit einen Unterschied in der Effektivität unterschiedlicher Zellaufschlussverfahren feststellen, je nachdem ob eine Reinkultur als Ausgangsmaterial verwendet wurde oder Gewebematerial. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene kommerzielle DNA-Extraktionsmethoden untersucht. Dabei zeigte sich, dass beide Methoden zum PCR-basierten Nachweis geeignet sind. Methode A zeigte aber eine höhere Ausbeute und erreichte damit eine höhere Sensitivität von 10^3 KBE/ml. Dieses Ergebnis entspricht zwar der häufig in der Literatur angegebenen Sensitivitätsgrenze für den PCR-basierten Nachweis von Mykobakterien aus Probenmaterial (de Kruijf et al. 2017; Sevilla et al. 2015; Schonenbrucher et al. 2008), doch gibt es bereits neue Veröffentlichungen mit PCR-Verfahren, die Sensitivitäten z.B. für den Nachweis von MAP aus Kotproben von 6 KBE/g oder für den Nachweis von MTC aus verschiedenen Probenmaterialien von 30 KBE /ml aufweisen (Yin et al. 2016; Park et al. 2014).

Die Sensitivität stellt ein wichtiges Kriterium für die Auswahl einer Nachweismethode für epidemiologische Untersuchungen dar. Aus diesem Grund wurden bereits in der Vergangenheit durch viele Autoren Optimierungsversuche getätigt, um eine Steigerung der Sensitivität zu erreichen bei Verwendung kommerzieller DNA-Extraktionskits. Dies gelang durch verschiedenste Modifizierungen des Zellaufschlussverfahrens, wie z.B. das Hinzufügen eines mechanischen Schrittes zur Zellyse (Schonenbrucher et al. 2008). In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit die Sensitivität durch die Integration eines Voranreicherungsschrittes in das Versuchsprotokoll gesteigert werden kann. Es zeigte sich, dass durch die Bebrütung in einem Voranreicherungsmedium die Sensitivität um eine Zehnerpotenz auf 10^2 KBE/ml erhöht werden kann. Dazu ist aber eine lange Zeitspanne von 30 Tagen nötig.

Bei dem Vergleich der zwei kommerziellen Testkits zeigen die Ergebnisse, dass Testkit A höhere DNA-Konzentrationen und damit niedrigere ct-Werte liefert, als Testkit B. Die DNA-Aufreinigung, sowohl aus den Bakteriensuspensionen, als auch aus den Tupferproben scheint effizienter. Während die Sensitivität für Testkit A bei 10^3 liegt, ist diese für Testkit B

bei 10^4 , also eine Zehnerpotenz höher. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Art des Probenmaterials nicht optimal für dieses Kit geeignet ist. Deutlich wird aber, dass es auch bei kommerziellen Testkits deutliche Unterschiede gibt. Dies konnte auch in einem Vergleich von sechs verschiedenen Testkits für DNA-Extraktion aus MAP festgestellt werden (Leite et al. 2013). Auch hier gab es zum Teil sehr große Schwankungen zwischen den Testkits bezüglich der gemessenen DNA-Konzentrationen und der Reinheit der extrahierten DNA.

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Feldproben musste von einer geringen Erregermenge pro Probe ausgegangen werden. Dies lag zum einen daran, dass es sich bei allen beprobten Tieren um nicht krankheits- oder ansteckungsverdächtige Probanden ohne klinische Symptomatik handelte. Zum anderen lag es an der begrenzten Aufnahmekapazität der Tupfer. Aus diesem Hintergrund ergab sich die Frage nach der Möglichkeit einer Voranreicherung der Erreger im Probenmaterial für eine bessere Nachweisbarkeit durch die qPCR. Hierzu wurden drei weitere Vorversuche durchgeführt.

Im ersten Versuch wurde analysiert, ob eine Voranreicherung im Probenmaterial ohne vorherige Dekontaminationsverfahren möglich ist oder ob es durch eine Zunahme der Begleitflora zur Hemmung des Wachstums von Mykobakterien kommt. Die Ergebnisse zeigten, dass bei einer Bebrütung für 24 Stunden keine Probleme bei der Verwendung von Rachen- oder Rektaltupfern auftreten. In keiner Probe kam es zu einer Trübung des MB REDOX Flüssigmediums oder Störung der anschließenden PCR. Auf die vom Hersteller empfohlene Vorbehandlung mit N-Acetyl-L-Cystein/NaOH-Lösung konnte verzichtet werden. Durch die Anwendung von Dekontaminationsverfahren wie der Verwendung von NALC/NaOH-Lösungen kommt es immer auch zu einer Schädigung der Mykobakterien selbst und damit zu einer Verringerung der Erregermenge (Owusu et al. 2017; Gitteh et al. 2016; Buijtelts and Petit 2005; Palomino and Portaels 1998).

Da das Volumen des MB REDOX Flüssigmediums mit 2 ml immer noch deutlich über denen des Probenmaterials (600 μ l bei Rachentupfern und 800 μ l bei Rektaltupfern) liegt, musste in einem weiteren Versuch geprüft werden, ob die Vermehrungsrate der Mykobakterien in 24 Stunden so hoch war, dass der entstandene Verdünnungseffekt dadurch ausgeglichen werden konnte. Die Ergebnisse zeigen, dass die ct-Werte in allen Verdünnungsstufen nach Bebrütung im Flüssigmedium deutlich über den Ausgangswerten lagen. Der spezifische DNA-Gehalt ist demnach geringer, als in der Ausgangsprobe. Die im ersten Versuch festgestellte Erregervermehrung scheint nicht hoch genug zu sein, um den Verdünnungseffekt auszugleichen. Zu überlegen wäre deshalb, ob eine weitere Reduzierung der Menge des Flüssigmediums eine Lösung für den starken Verdünnungseffekt darstellen könnte. Es könnte ebenfalls geprüft werden, ob mit einer Isolierung der Erreger aus dem Flüssigmedium (vom Hersteller werden Abzentrifugieren und Filtration beschrieben) bessere Ergebnisse erzielt werden können. Hierbei muss aber mit Problemen durch eventuelle Kotpartikel u.ä. aus dem Probenmaterial gerechnet werden.

Da die Erregervermehrung nach 24 Stunden Bebrütung noch nicht über den Werten bei direkter Verwendung des Probenmaterials lag, wurde in einem dritten Versuch getestet ob bzw. ab welcher Bebrütungsdauer mit einer Verbesserung der Nachweisrate zu rechnen wäre. Die Ergebnisse zeigten, dass erst ab einer Bebrütungsdauer von 14 Tagen niedrigere ct-Werte erreicht werden konnten. Dies war aber nur in den Verdünnungsstufen mit hohem Erregergehalt (ab 10^4 KBE/ml) feststellbar. In diesen Verdünnungsstufen ergab bereits der Ausgangswert einen positiven ct-Wert, da die Erregermenge oberhalb der Detektionsgrenze der qPCR liegt. In diesem Bereich wäre durch eine zusätzliche Bebrütung keine höhere

Nachweisrate zu erzielen. Auch bei Proben mit sehr niedrigen Erregergehalten (10^1), konnten die ct-Werte durch die Bebrütung zwar ab Tag 16 gesenkt werden, aber selbst nach einer Bebrütung von 60 Tagen erreichten die ct-Werte nicht den festgelegten positiven Bereich (≤ 31.99). Auch hier kann nicht von einer Erhöhung der Nachweisrate ausgegangen werden. Anders sieht es in den Bereichen 10^2 und 10^3 aus. Der Ausgangswert in der Verdünnungsstufe 10^2 liegt im negativen Bereich, aber ab einer Bebrütung von 28 Tagen können positive ct-Werte gemessen werden. In der Verdünnungsstufe 10^3 liegt der Ausgangswert im fraglichen Bereich, ab einer Bebrütungsdauer von 35 Tagen können aber positive ct-Werte gemessen werden. Das heißt, bei längeren Bebrütungszeiten von 28 bzw. 35 Tagen kann es zu einer Erhöhung der Nachweisgrenze kommen. Auch hier müsste aber noch durch weitere Versuche geklärt werden, ob bei einer längeren Bebrütungsdauer bei Feldproben Probleme mit der Begleitflora auftreten könnten. Eine weitere wichtige Frage ist auch, ob sich die unterschiedlichen Mykobakterienspezies aufgrund ihrer sehr stark variierenden Wachstumsgeschwindigkeit unterschiedlich verhalten. So wäre zu erwarten, dass es für Mykobakterien des Tuberkulose-Komplexes weitaus längerer Bebrütungszeiten bedarf. Es müsste also getestet werden, ob die Bedingungen für Mykobakterien aus dem Tuberkulose-Komplex und die nichttuberkulösen Mykobakterien vergleichbar sind. Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse wurde letztendlich für die Untersuchung der Feldproben auf eine Voranreicherung verzichtet.

Um eine Aussage über das Vorkommen und die Häufigkeit der Ausscheidung von Mykobakterien bei Tieren in zoologischen Einrichtungen machen zu können, wurden insgesamt 115 Vögel und 441 Säugetiere untersucht. Obwohl Mykobakterien auch bei Reptilien, Amphibien und Fischen nachgewiesen werden konnten, sollte sich in der vorliegenden Studie zunächst auf Vögel und Säugetiere konzentriert werden, da diese die zwei am häufigsten in zoologischen Einrichtungen gehaltenen Wirbeltierklassen darstellen (Donnelly et al. 2016; Hikima et al. 2016; Ullmann et al. 2016; Bouricha et al. 2014; Willson et al. 2013; Densmore and Green 2007).

Da von einigen Mykobakterienspezies bekannt ist, dass die Ausscheidung über den Wirt intermittierend erfolgt, wurden einige Tiere doppelt beprobt. Es zeigte sich dabei, dass bei einigen Tieren unterschiedliche Ergebnisse an den unterschiedlichen Beprobungstagen vorkamen. Bei den Rachentupfern traten bei zwei der 37 beprobten Tieren ein positives Ergebnis auf. Bei einem Shetlandpony war die erste, bei einem Asiatischen Elefant die zweite Probe positiv. Bei den Rektaltupfern gab es sogar bei 16 der 35 beprobten Tieren ein positives Ergebnis. Hierbei war bei zehn Tieren die erste Probe positiv und bei sieben Tieren die zweite Probe. Nur bei einem einzigen Tier, einer Bezoarziege, war dabei sowohl die erste, als auch die zweite Probe positiv. Nur bei 2,86% der beprobten Tiere war damit in beiden Fällen ein positives Ergebnis aus den Rektaltupfern nachweisbar. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die ausgeschiedenen Mykobakterien von fast allen Individuen intermittierend ausgeschieden werden. Dies bestätigt die für Nutz- bzw. Haustiere bereits in der Literatur beschriebene erhöhte Schwierigkeit der Nachweisbarkeit auch für Zootiere und muss deshalb für epidemiologische Studien berücksichtigt werden (Mortier et al. 2014; Srivastava et al. 2008).

Der Probenumfang dieser epidemiologischen Studie umfasst 1090 Tupferproben von Säugetieren ($n=860$) und Vögeln ($n=230$). Die Proben stammten aus 6 zoologischen Einrichtungen, die sich in vier verschiedenen Bundesländern befinden. Bei den Bundesländern handelt es sich um Baden-Württemberg, Nordrhein-Westfalen, Mecklenburg-

Vorpommern und Rheinland-Pfalz. Während bei drei der sechs zoologischen Einrichtungen positive Rachen- und Rektaltupfer vorkamen, konnten sogar bei fünf der sechs Einrichtungen positive Rektaltupfer festgestellt werden. In jeder Einrichtung traten mindestens zwei positive Fälle auf. Die Prävalenz lag damit bei insgesamt 14,4 %. Da es wenige Veröffentlichungen über die Epidemiologie von Mykobakterien in den einzelnen zoologischen Einrichtungen gibt, gibt dieses Ergebnis erstmals eine konkrete Einschätzung über die Häufigkeit von Mykobakterien in Ausscheidungen von in zoologischen Einrichtungen gehaltenen Säugetieren und Vögeln. In einer Veröffentlichung von 2012 wurden Sammelkotproben von insgesamt 21 Tierspezies (Säugetiere und Vögel) aus einer zoologischen Einrichtung in Nordrhein-Westfalen auf das Vorkommen von MAP untersucht. Dabei traten bei 14 Tierspezies positive Ergebnisse auf. Da es sich bei allen Proben um Sammelkotproben mehrerer Individuen einer Spezies handelt, ist die Prävalenz nur bedingt vergleichbar mit der vorliegenden Arbeit. Das Ergebnis zeigt aber, dass MAP bei vielen Spezies, sowohl bei den Säugetieren, als auch bei den Vögeln, die in zoologischen Einrichtungen gehalten werden, über den Kot ausgeschieden wird (Münster 2012).

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte das interessante Ergebnis festgestellt werden, dass sowohl bei den beprobten Vögeln, als auch bei den Säugetieren positive Rachen- und Rektaltupfer vorkamen. Dabei zeigten sich für beide Gruppen sehr ähnliche Prävalenzen bei den Rachenproben von 2,61 % bei Vögeln und 2,49 % bei Säugetieren. Durch die Untersuchung von Rektaltupfern konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz insgesamt höher lag als bei den Rachenproben. Für Vögel lag sie bei 22,61 % und für Säugetiere bei 27,92 %. Deshalb liegt der Schluß nahe, dass *Mycobacterium* spp über den fäkalen Transmissionsweg weitaus häufiger ausgeschieden werden, als auf dem aerogenen Weg. Dieses Ergebnis lässt sich eventuell mit dem Umstand erklären, dass es sich bei den vorliegenden Mykobakterienspezies mit hoher Wahrscheinlichkeit um NTM handelt, da die Durchführung der Schmelzkurvenanalyse beim Nachweis des 16S rRNA-Genabschnitts keinen Verdacht auf eine Spezies aus dem Tuberkulose-Komplex ergab. Die spezifische Schmelztemperatur des gesuchten Genabschnitts war bereits für einige Mykobakterienspezies bekannt und lag für *M. tuberculosis*, im Unterschied zu allen anderen Mykobakterienspezies, deutlich über 60°C (Shrestha et al. 2003). Diese deutlich höhere spezifische Schmelztemperatur konnte durch eigene Untersuchungen auch für *M. bovis* BCG ermittelt werden und lässt die Vermutung zu, dass die Vertreter des Tuberkulose-Komplexes aufgrund ihrer bekanntermaßen hohen DNA-Homologie sehr ähnliche spezifische Schmelztemperaturen bei dem gesuchten Genabschnitt aufweisen und somit von den NTM unterschieden werden können. In der vorliegenden Arbeit konnten bei 18 der 44 Vogelspezies und bei 36 der 75 beprobten Säugetierspezies Mykobakterien nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die bereits in der Literatur beschriebene große Vielfalt von Spezies bei denen Mykobakterien vorkommen können (Broughan et al. 2013; Münster et al. 2013; Dhama et al. 2011; Lécu and Ball 2011; Kaneene et al. 2010; Cousins et al. 2003; de Lisle et al. 2001; Aranaz et al. 1999).

Im Unterschied zu einer Studie aus dem Jahr 2015 über den Nachweis von MAP durch qPCR, bei der die Prävalenz im Sommer und Herbst deutlich höher als im Frühling und Winter war, konnte in der vorliegenden Doktorarbeit gezeigt werden, dass die Prävalenz von Mykobakterien im Frühling deutlich höher und die Prävalenz im Sommer deutlich niedriger lag. Dieser Unterschied kann zum einen mit der Tatsache zusammenhängen, dass es sich in der Studie ausschließlich um den Nachweis von MAP handelte und zum anderen mit den unterschiedlichen Haltungsbedingungen von Zootieren und den in der Studie untersuchten

Milchkühen zusammenhängen. Interessant ist aber, dass es in beiden Fällen scheinbar jahreszeitlich bedingte Einflussfaktoren gibt, die die Häufigkeit der Ausscheidung von Mykobakterienspezies durch den Wirt beeinflussen. Ob dies eventuell mit verschiedenen „Stressfaktoren“ (z.B. der Paarungszeit, Trächtigkeit, Hochlaktation) oder auch erhöhtem Infektionsdruck (z.B. durch Vergrößerung der Wirtsgruppe aufgrund von Geburtszugängen) zusammenhängt, kann zunächst vermutet werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

In der qPCR wurde ein Sequenzabschnitt aus dem mykobakteriellen 16S rRNA-Gen amplifiziert, das die hypervariable Region A enthält. Die verwendeten Primer wurden bereits von Shrestha et al (2003) beschrieben und erfolgreich für verschiedene Mykobakterienspezies getestet. Die Verwendung einer Zielsequenz des 16S rRNA-Gens verspricht auf Grund der zuverlässigen Nachweisbarkeit eine hohe Sensitivität. Dies sollte zunächst oberste Priorität in der epidemiologischen Untersuchung haben. Von verschiedenen Autoren wird die hypervariable Region A als nützlich für die Unterscheidung von Mykobakterienspezies beschrieben. Dies gilt aber nicht für die Unterscheidung aller Spezies (z. B. keine Unterscheidung zwischen *M. kansasii* und *M. gastri* möglich).

Zur weiteren Charakterisierung der amplifizierten Feldproben (n= 26) wurde mit diesen eine zweite PCR durchgeführt. Diese basiert auf der Amplifikation eines 360 bp-großen Abschnitt des *rpoB*-Gens und erlaubt eine phylogenetische Differenzierung von *Mycobacterium* spp. (Adékambi et al. 2008; Adékambi et al. 2006; Kim et al. 1999). Die Verwendung des *rpoB*-Gens liefert in Bezug auf die Sensitivität vergleichbare Ergebnisse wie die des 16S rRNA-Gens. Besonders bei sehr eng verwandten Spezies oder zur Unterscheidung verschiedener Subspezies mit stark ausgeprägter genetischer Homologie ist aber das *rpoB*-Gen auf Grund seiner höheren diskriminatorischen Potenz besser für phylogenetische Untersuchungen geeignet (Case et al. 2007).

Zur Spezies-Differenzierung wurden zunächst die Amplifikate aus der *rpoB*-PCR von 12 der Rachenproben und 14 der Rektalproben sequenziert und analysiert. Von den sequenzierten Rachenproben wiesen sechs Proben Übereinstimmungen mit Mykobakterienspezies auf. Diese Übereinstimmungen lagen zwischen 85 und 93 %. Von den 14 sequenzierten Rektalproben wiesen fünf Proben Übereinstimmungen zwischen 61,6 und 97 % mit Mykobakterienspezies auf. Bei den Mykobakterienspezies handelt es sich dabei ausschließlich um NTM. Das bestätigt ebenso die Schmelzkurvenanalyse. Auch das Vorliegen von noch nicht in den Datenbanken erfassten Mykobakterienspezies oder – subspezies muss in Betracht gezogen werden. Dies ist nicht nur sehr interessant im Hinblick auf die Entdeckung neuer Mykobakterienspezies, sondern unter der Berücksichtigung der großen Bandbreite an den unterschiedlichsten Tierarten, die beprobt wurden auch im besonderen Maße auf die Entdeckung bisher unbekannter sogenannter Tier- adaptierter Mykobakterienspezies. Bekannt sind diese Tier-adaptierten Vertreter bereits im MTC und umfassen bisher die drei bekannten Spezies *M. mungi*, *M. suricattae* und *Dassie Bacillus* (Clarke et al. 2016). Interessant wäre es, ob auch bei den NTM solche Tieradaptation aufreten und ob solche adaptierten Mykobakterienspezies bereits in deutschen zoologischen Einrichtungen vorkommen. Zwar besitzen die Tier-adaptierten Vertreter beschriebene geografische Verbreitungsgebiete (im Zusammenhang mit dem Verbreitungsgebiet des jeweiligen Wirtes), aber bereits im Jahr 1994 beschrieben Cousins et al. einen Fall, bei dem *Dassie Bacillus* bei einem aus Südafrika importierten Klippschliefer (*Procavia capensis*) in einem australischen Zoo diagnostiziert wurde (Cousins et al. 1994).

Der Import aus dem Ursprungsgebiet und der Austausch von Tierarten zwischen zoologischen Einrichtungen können somit weltweit zu einer Verbreitung führen.

Die vorliegende Doktorarbeit bestätigt die große Bandbreite an Tierarten, bei denen Mykobakterien vorkommen können und lässt die Vermutung zu, dass es sich bei den nachgewiesenen Bakterienspezies auch um bisher unbekannte Spezies oder Subspezies handeln könnte. Außerdem zeigte sich, dass Mykobakterien häufig von Zootieren ausgeschieden werden und weitere Studien unbedingt notwendig sind. Die vorliegende Doktorarbeit zeigt auch, dass eine Voranreicherung von Mykobakterien aus Probenmaterial nur bei langer Bebrütungsdauer zu einer Verbesserung der Nachweisgrenze führt und damit nur bedingt für den Einsatz in der Routinediagnostik sinnvoll und empfehlenswert ist.

6 Zusammenfassung

Untersuchung zum Vorkommen und zur Bedeutung ausgewählter Mykobakterien bei Zootieren

Mykobakterien sind säurefeste Stäbchenbakterien. Ihr Auftreten wird immer wieder mit Gesundheitsproblemen und Erkrankungen bei Zootieren in Verbindung gebracht. Besonders durch den internationalen Austausch von (Zucht-) Tieren zwischen den zoologischen Einrichtungen und der häufig klinisch inapparenten Infektionen mit Mykobakterien besteht ein hohes Verbreitungsrisiko. Umfassende Zahlen zur Häufigkeit und Prävalenz von Mykobakterien in deutschen zoologischen Einrichtungen gab es jedoch bisher nicht. Ziel dieser Arbeit war es, die Häufigkeit des Auftretens von Mykobakterien in deutschen Zoos zu ermitteln und eine Einschätzung über das damit verbundene zoonotische Risikopotential abzuleiten. Hierfür wurden 1090 Feldproben aus sechs deutschen zoologischen Einrichtung von Säugetieren (n = 860) und Vögeln (n = 230) untersucht. Für die Diagnostik wurde eine quantitative PCR verwendet, die eine Sequenz aus dem mykobakteriellen 16S rRNA-Gen amplifiziert. Die Prävalenz lag insgesamt bei 14,4%. Die Ausscheidung von Mykobakterien erfolgte dabei deutlich häufiger über den fäkalen, als den oralen Weg. Die Prävalenz bei den Rachentupfern lag bei 2,5%, bei den Rektaltupfern bei 26,8%. In allen Fällen konnte ein Verdacht auf Mykobakterien aus dem Tuberkulose-Komplex ausgeschlossen werden. Am höchsten war die Prävalenz bei den im Frühling genommenen Proben. Die Ergebnisse zeigen, dass Mykobakterien häufig von klinisch unauffälligen Zootieren ausgeschieden werden. Zur weiteren Charakterisierung auf (Sub-)Speziesebene wurde von einigen Proben (n = 26) mittels konventioneller PCR ein Abschnitt des rpoB-Gens amplifiziert und sequenziert. Bei allen Übereinstimmungen mit Mykobakterienspezies handelte es sich um nichttuberkulöse Mykobakterien. Da es keine 100%ige Übereinstimmung mit einer Spezies aus den aktuellen Datenbanken gab, muss auch das Vorliegen von noch nicht bekannten Mykobakterienspezies in Betracht gezogen werden. Diese neuen Ergebnisse zeigen, dass weitere Untersuchungen zum Vorkommen und zur Epidemiologie von *Mycobacterium* spp. bei Zootieren unbedingt notwendig sind, um deren weitere Verbreitung verhindern zu können.

7 Summary

Prevalence and relevance of mycobacteria in zoo animals

Mycobacteria are acid fast rod-bacteria. Their presence in zoo animals may be linked to various health disorders and cases of disease. Due to international exchange of (breeding) animals and the common existence of clinical unapparent mycobacterial infections of animals there is a high risk of spread. Unfortunately, comprehensive data on incidence and prevalence of mycobacteria in zoological gardens in Germany are not available. The aim of this study was to evaluate the prevalence of mycobacteria in German zoological gardens in order to derive an assessment of the zoonotic risk potential. Therefore, 1,090 field samples from six zoological gardens in Germany were tested. This included samples from mammals (n = 860) and birds (n = 230). A quantitative PCR, amplifying a sequence of the mycobacterial 16S rRNA amplification, was applied. The resulting overall mycobacterial prevalence was 14,4 %. Faecal excretion of mycobacteria was significantly higher than oral excretion. The resulting prevalence from testing oral swabs was 2,5 % and from rectal swabs 26,8 %. In all cases presence of mycobacteria from the tuberculosis-complex could be excluded. The highest prevalence was detected in samples taken during the spring. These results showed that zoo animals shedding mycobacteria do not usually present clinical symptoms. For further characterization at the (sub-) species level, some of the samples (n = 26) were PCR amplified and sequenced applying a conventional PCR for the rpoB gene amplification. All PCR confirmed samples were non-tuberculous mycobacteria. As there was no 100% match with any of the known mycobacteria species from the current data bases the possible unknown mycobacterial species may have been observed. Based on these results further studies of the occurrence and epidemiology of the identified *Mycobacterium* spp. in zoo animals could prevent their further spread.

8 Literaturverzeichnis

ADÉKAMBI T, Shinnick TM, Raoult D, Drancourt M (2008) Complete rpoB gene sequencing as a suitable supplement to DNA–DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1807-1814

ADÉKAMBI T, Berger P, Raoult D, Drancourt M (2006) rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:133-143

AGDESTAIN A, Johansen TB, Kolbjornsen O, Jorgensen A, Djonne B, Olsen I (2012) A comparative study of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* in experimentally infected pigs. *BMC Vet Res* 8:11-6148-8-11. doi:10.1186/1746-6148-8-11

ALDOUS WK, Pounder JI, Cloud JL, Woods GL (2005) Comparison of six methods of extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol* 43:2471-2473. doi:43/5/2471

ALEXANDER KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, Gey van Pittius NC (2010) Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis* 16:1296-1299. doi:10.3201/eid1608.100314

ALFREDSEN S, Saxegaard F (1992) An outbreak of tuberculosis in pigs and cattle caused by *Mycobacterium africanum*. *Vet Rec* 131:51-53

ALVAREZ J, Castellanos E, Romero B, Aranaz A, Bezos J, Rodriguez S, Mateos A, Dominguez L, De Juan L (2011) Epidemiological investigation of a *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* outbreak in swine. *Epidemiol Infect* 139:143-148

AMANFU W (2006) The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest. *Tuberculosis* 86:330-335

AMARO A, Duarte E, Amado A, Ferronha H, Botelho A (2008) Comparison of three DNA extraction methods for *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Lett Appl Microbiol* 47:8-11

AMBROSIO SR, Oliveira, Eugenia Márcia de Deus, Rodriguez CAR, Ferreira Neto JS, Amaku M (2008) Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. *Brazilian J Microbiol* 39:241-244

ANDERSON RM, Trehwella W (1985) Population dynamics of the badger (*Meles meles*) and the epidemiology of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 310:327-381

ANONYMUS (2016) Ratgeber "Paratuberkulose". Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. doi:https://www.bmel.de/DE/Tier/Tiergesundheit/Tierseuchen/_texte/AndereTierkrankheitenDossier.html?docId=377324

ARANAZ A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L (2003) Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1785-1789

ARANAZ A, Liébana E, Gómez-Mampaso E, Galán JC, Cousins D, Ortega A, Blázquez J, Baquero F, Mateos A, Suárez G (1999) *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol* 49:1263-1273

ASHFORD DA, Whitney E, Raghunathan P, Cosivi O (2001) Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Rev Sci Tech* 20:325-337

BALLESTEROS D, Garino E, Consalvo D, Imhoff-Jullier G, Giacchino A, Suarez MF, Russo G, Gomez R, Leiguarda R (2016) Meningo-Encephalitis Associated to Secondary Cerebral Vasculitis in a Patient with Disseminated *Mycobacterium Avium* Complex Infection and AIDS (P1. 303). *Neurology* 86:P1. 303

BANG D, Herlin T, Stegger M, Andersen AB, Torkko P, Tortoli E, Thomsen VO (2008) *Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2398-2402. doi:10.1099/ijs.0.65503-0

BEER M, Haas L (2011) Direkter Erregernachweis bei Virusinfektionen. In: Selbitz H, Truyen U, Valentin-Weigand P (eds) *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 9th edn. Enke Verlag, Stuttgart, pp 61-77

BEN SALAH I, Cayrou C, Raoult D, Drancourt M (2009) *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2803-2808. doi:10.1099/ijs.0.010637-0

BENGIS R, Kriek N, Keet D, Raath J, De Vos V, Huchzermeyer H (1996) An outbreak of bovine tuberculosis in a free-living African buffalo (*Syncerus caffer*-Sparrman) population in the Kruger National Park: a preliminary report. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 63:15-18

BIET F, Boschioli ML, Thorel MF, Guilloteau LA (2005) Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC). *Vet Res* 36:411-436

BLAHUTKOVA M, Fictum P, Skoric M, Bezdekova B, Jahn P, Kriz P, Mrlik V, Slana I, Kaevska M, Pavlik I (2011) *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection in two sibling Fjord horses diagnosed using quantitative real time PCR: a case report. *Vet Med* 56:294-301

BÖTTGER EC (2001) Die Familie der *Mycobacteriaceae*. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister G, Pulverer G (eds) *Medizinische Mikrobiologie*, 8th edn. Urban & Fischer, München, Jena, pp 407-434

BOURICHA M, Castan B, Duchene-Parisi E, Drancourt M (2014) *Mycobacterium marinum* infection following contact with reptiles: vivarium granuloma. *International Journal of Infectious Diseases* 21:17-18

BRIONES V, de Juan L, Sanchez C, Vela AI, Galka M, Montero, Goyache J, Aranaz A, Dominguez L (2000) Bovine tuberculosis and the endangered Iberian lynx. *Emerg Infect Dis* 6:189-191. doi:10.3201/eid0602.000214

BROUGHAN J, Downs S, Crawshaw T, Upton P, Brewer J, Clifton-Hadley R (2013) *Mycobacterium bovis* infections in domesticated non-bovine mammalian species. Part 1:

- Review of epidemiology and laboratory submissions in Great Britain 2004–2010. *The Veterinary Journal* 198:339-345
- BRUNING-FANN CS, Schmitt SM, Fitzgerald SD, Fierke JS, Friedrich PD, Kaneene JB, Clarke KA, Butler KL, Payeur JB, Whipple DL (2001) Bovine tuberculosis in free-ranging carnivores from Michigan. *Journal of Wildlife Diseases* 37(1):58-64
- BRUNING-FANN CS, Schmitt SM, Fitzgerald SD, Payeur JB, Whipple DL, Cooley TM, Carlson T, Friedrich P (1998) *Mycobacterium bovis* in Coyotes from Michigan. *Journal of Wildlife Diseases* 34(3):632-636
- BUIJTELS PC, Petit PL (2005) Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Microbiol Methods* 62:83-88
- CAMBIER C, Falkow S, Ramakrishnan L (2014) Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 159:1497-1509
- CAMPORA L, Corazza M, Zullino C, Ebani VV, Abramo F (2011) *Mycobacterium avium* subspecies hominissuis disseminated infection in a Basset Hound dog. *J Vet Diagn Invest* 23:1083-1087. doi:10.1177/1040638711418616
- CARRICAJO A, Fonsale N, Vautrin AC, Aubert G (2001) Evaluation of BacT/Alert 3D liquid culture system for recovery of mycobacteria from clinical specimens using sodium dodecyl (lauryl) sulfate-NaOH decontamination. *J Clin Microbiol* 39:3799-3800. doi:10.1128/JCM.39.10.3799-3800.2001
- CASE RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmstrom C, Doolittle WF, Kjelleberg S (2007) Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* 73:278-288. doi:AEM.01177-06
- CASTETS M, Rist N, Boisvert H (1969) La variété africaine du bacille tuberculeux humain. *Med Afr Noire* 16:321-322
- CAVANAGH R, Begon M, Bennett M, Ergon T, Graham IM, De Haas PE, Hart CA, Koedam M, Kremer K, Lambin X, Roholl P, Soilingen Dv D (2002) *Mycobacterium microti* infection (vole tuberculosis) in wild rodent populations. *J Clin Microbiol* 40:3281-3285
- CHO HS, Kim YH, Park NY (2006) Disseminated mycobacteriosis due to *Mycobacterium avium* in captive Bengal tiger (*Panthera tigris*). *J Vet Diagn Invest* 18:312-314
- CLARKE C, Van Helden P, Miller M, Parsons S (2016) Animal-adapted members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex endemic to the southern African subregion. *J S Afr Vet Assoc* 87:1-7
- CLARKE C (1997) The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol* 116:217-261
- CLIFTON-HADLEY R, Wilesmith J, Richards M, Upton P, Johnston S (1995) The occurrence of *Mycobacterium bovis* infection in cattle in and around an area subject to extensive badger (*Meles meles*) control. *Epidemiol Infect* 114:179-193
- COLEMAN J, Cooke M (2001) *Mycobacterium bovis* infection in wildlife in New Zealand. *Tuberculosis* 81:191-202

COLLINS FM (1989) Mycobacterial disease, immunosuppression, and acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Microbiol Rev* 2:360-377

COMAS I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S (2009) Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One* 4:e7815

CORN JL, Manning EJ, Sreevatsan S, Fischer JR (2005) Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl Environ Microbiol* 71:6963-6967. doi:71/11/6963

COUSINS D (2006) Tuberculosis in fur seals and sea lions caused by *Mycobacterium pinnipedii*. In: Thoen CO, Steele JH, Gilsdorf MJ (eds) *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, 2nd edn. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, pp 258-270

COUSINS D, Peet R, Gaynor W, Williams S, Gow B (1994) Tuberculosis in imported hyrax (*Procavia capensis*) caused by an unusual variant belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet Microbiol* 42:135-145

COUSINS DV, Florisson N (2005) A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Rev Sci Tech* 24:1039-1059

COUSINS DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodriguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A (2003) Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1305-1314

DAVID HL, Jahan M, Jumin A, Grandry J, LEHMAN EH (1978) Numerical taxonomy analysis of *Mycobacterium africanum*. *Int J Syst Bacteriol* 28:464-472

DE KRUIJF M, Coffey A, O'Mahony J (2017) The investigation of the truncated *mbtA* gene within the mycobactin cluster of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis as a novel diagnostic marker for real-time PCR. *J Microbiol Methods* 136:40-48

DE LISLE GW, Mackintosh CG, Bengis RG (2001) *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Rev Sci Tech* 20:86-111

DEFORGES L, Boulouis H, Thibaud J, Boulouha L, Sougakoff W, Blot S, Hewinson G, Truffot-Pernot C, Haddad N (2004) First isolation of *Mycobacterium microti* (Llama-type) from a dog. *Vet Microbiol* 103:249-253

DENSMORE CL, Green DE (2007) Diseases of amphibians. *ILAR J* 48:235-254

DESPIERRES L, Cohen-Bacrie S, Richet H, Drancourt M (2012) Diversity of *Mycobacterium avium* subsp. hominissuis mycobacteria causing lymphadenitis, France. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 31:1373-1379

DHAMA K, Mahendran M, Tiwari R, Dayal Singh S, Kumar D, Singh S, Sawant PM (2011) Tuberculosis in Birds: Insights into the *Mycobacterium avium* Infections. *Vet Med Int* 2011:712369. doi:10.4061/2011/712369

- DIETRICH CR, Flynn JL (2011) HIV-1/mycobacterium tuberculosis coinfection immunology: how does HIV-1 exacerbate tuberculosis? *Infect Immun* 79:1407-1417. doi:10.1128/IAI.01126-10
- DOMINGOS M, Amado A, Botelho A (2009) IS1245 RFLP analysis of strains of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* isolated from pigs with tuberculosis lymphadenitis in Portugal. *Vet Rec* 164:116-120. doi:164/4/116
- DONNELLY K, Waltzek TB, Wellehan JF, Jr, Stacy NI, Chadam M, Stacy BA (2016) *Mycobacterium haemophilum* infection in a juvenile leatherback sea turtle (*Dermochelys coriacea*). *J Vet Diagn Invest* 28:718-721. doi:1040638716661746
- DREWE J, Foote A, Sutcliffe R, Pearce G (2009) Pathology of *Mycobacterium bovis* Infection in Wild Meerkats (*Suricata suricatta*). *J Comp Pathol* 140:12-24
- DUNCAN AE, Lyashchenko K, Greenwald R, Miller M, Ball R (2009) Application of Elephant TB STAT-PAK assay and MAPIA (multi-antigen print immunoassay) for detection of tuberculosis and monitoring of treatment in black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 40:781-785
- DVORSKA L, Matlova L, Ayele W, Fischer O, Amemori T, Weston R, Alvarez J, Beran V, Moravkova M, Pavlik I (2007) Avian tuberculosis in naturally infected captive water birds of the Ardeidae and Threskiornithidae families studied by serotyping, IS 901 RFLP typing, and virulence for poultry. *Vet Microbiol* 119:366-374
- EHRlich P (1882a) Diskussion zur Färbung des Tuberkelbazillus. *Deutsche medizinische Wochenschrift*:365-365
- EHRlich P (1882b) Über die Färbung der Tuberkelbazillen. *Deutsche medizinische Wochenschrift*:269-270
- EMMANUEL FX, Seagar AL, Doig C, Rayner A, Claxton P, Laurenson I (2007) Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. *Emerg Infect Dis* 13:1924-1927. doi:10.3201/eid1312.061536
- ENGLUND S, Bolske G, Johansson KE (2002) An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 209:267-271. doi:S0378109702005529
- ERLER W, Martin G, Sachse K, Naumann L, Kahlau D, Beer J, Bartos M, Nagy G, Cvetnic Z, Zolnir-Dovc M (2004) Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from Central Europe. *J Clin Microbiol* 42:2234-2238
- ERUME J, Spargser J, Rosengarten R (2001) Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by nested PCR. *African health sciences* 1:83-89
- EUZÉBY JP (1997) List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *international journal of systematic and evolutionary microbiology*:590-592. doi:<http://www.bacterio.net>
- FALKINHAM JO, 3rd (1996) Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 9:177-215

FANG Y, Wu WH, Pepper JL, Larsen JL, Marras SA, Nelson EA, Epperson WB, Christopher-Hennings J (2002) Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine fecal samples. *J Clin Microbiol* 40:287-291

FELLER M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, Pfyffer GE, Jemmi T, Baumgartner A, Egger M (2007) *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases* 7:607-613

FIEBIG L (2016) Welttuberkulosestag 2016: Gemeinsam gegen Tuberkulose. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 10/11. doi:10.17886/EpiBull-2016-014

FROTHINGHAM R, Hills HG, Wilson KH (1994) Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 32:1639-1643

GARNIER T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG (2003) The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7877-7882. doi:10.1073/pnas.1130426100

GEY VAN PITTIUS NC, van Helden PD, Warren RM (2012) Characterization of *Mycobacterium orygis*. *Emerg Infect Dis* 18:1708-1709. doi:10.3201/eid1810.120569

GITTEH E, Otu JK, Jobarteh T, Mendy F, Faal-Jawara IT, Ofori-Anyinam NB, Ayorinde A, Secka O, Gehre F (2016) Evaluation of sodium hydroxide–N-acetyl-L-cysteine and 0.7% chlorhexidine decontamination methods for recovering *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples: A comparative analysis (The Gambia Experience). *International Journal of Mycobacteriology* 5:S167-S168

GLAWISCHNIG W, Steineck T, Spersger J (2006) Infections caused by *Mycobacterium avium* subspecies *avium*, *hominissuis*, and paratuberculosis in free-ranging red deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) in Austria, 2001–2004. *J Wildl Dis* 42:724-731

GOMIS D, Moisson P, Lyashchenko K, Moser I, Bakker D, Gutiérrez M, Boschioli M, Gravet A (2008) Tuberculosis outbreaks in Mulhouse Zoo, 1992–96 and 2005–06: diagnostic perspectives. *2008:157-171*

GORTAZAR C, Vicente J, Samper S, Garrido JM, Fernández-De-Mera IG, Gavín P, Juste RA, Martín C, Acevedo P, De La Puente M (2005) Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Vet Res* 36:43-52

GREENWALD R, Lyashchenko O, Esfandiari J, Miller M, Mikota S, Olsen JH, Ball R, Dumonceaux G, Schmitt D, Moller T, Payeur JB, Harris B, Sofranko D, Waters WR, Lyashchenko KP (2009) Highly accurate antibody assays for early and rapid detection of tuberculosis in African and Asian elephants. *Clin Vaccine Immunol* 16:605-612. doi:10.1128/CVI.00038-09

GROBLER D, Michel AL, De Klerk L, Bengis RG (2002) The gamma-interferon test: its usefulness in a bovine tuberculosis survey in African buffaloes (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park.

GROSSPIETSCH R (2011) Eignung unterschiedlicher Primer und DNA-Extraktionsmethoden zum PCR-Nachweis von Vertretern des Mycobacterium avium-intracellulare-Komplexes (MAIC)

GDAN A, Artukovic B, Cvetnic Ž, Špičic S, Beck A, Hohšteter M, Naglic T, Bata I, Grabarevic Ž (2008) Disseminated tuberculosis in hyrax (*Procavia capensis*) caused by *Mycobacterium africanum*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 39:386-391

GÜMÜSSOY KS, Beyaz L, Aydin F, Özcan M, Atasever A (2006) Avian Tuberculosis in Kayseri Zoo. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 3:25-28

GUNNES G, Nord K, Vatn S, Saxegaard F (1995) A case of generalised avian tuberculosis in a horse. *Vet Rec* 136:565-566

HAIST V, Seehusen F, Moser I, Hotzel H, Deschl U, Baumgärtner W, Wohlsein P (2008) *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection in 2 pet dogs, Germany. *Emerging infectious diseases* 14:988

HARAUSZ E, Lusiba JK, Nsereko M, Johnson JL, Toossi Z, Ogwang S, Boom WH, Joloba ML, Tuberculosis Research Unit (TBRU) (2015) Comparison of MGIT and Myco/F lytic liquid-based blood culture systems for recovery of *Mycobacterium tuberculosis* from pleural fluid. *J Clin Microbiol* 53:1391-1394. doi:10.1128/JCM.02742-14

HAVLIR DV, Barnes PF (1999) Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 340:367-373

HEIFETS L, Linder T, Sanchez T, Spencer D, Brennan J (2000) Two liquid medium systems, mycobacteria growth indicator tube and MB redox tube, for *Mycobacterium tuberculosis* isolation from sputum specimens. *J Clin Microbiol* 38:1227-1230

HEJLICEK K, Tremil F (1995) Comparison of the pathogenesis and epizootologic importance of avian mycobacteriosis in various types of domestic and free-living syntropic birds. *Vet Med (Praha)* 40:187-194

HELMAN R, Russell W, Jenny A, Miller J, Payeur J (1998) Diagnosis of tuberculosis in two snow leopards using polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 10:89-92

HENRICH M, Moser I, Weiss A, Reinacher M (2007) Multiple Granulomas in Three Squirrel Monkeys (*Saimiri sciureus*) Caused by *Mycobacterium microti*. *J Comp Pathol* 137:245-248

HIGGINS J, Camp P, Farrell D, Bravo D, Pate M, Robbe-Austerman S (2011) Identification of *Mycobacterium* spp. of veterinary importance using *rpoB* gene sequencing. *BMC veterinary research* 7:77

HIKIMA J, Sakai M, Aoki T, Takeyama H, Hawke J, Mori K, Tashiro K, Kuhara S (2016) Draft Genome Sequence of the Fish Pathogen *Mycobacterium pseudoshottsii* Strain JCM15466, a Species Closely Related to *M. marinum*. *Genome Announc* 4:10.1128/genomeA.01630-15. doi:10.1128/genomeA.01630-15

HOF H, Dörries R (2009) Molekulare Virologie und Genetik. In: Hof H, Dörries R (eds) *Medizinische Mikrobiologie*, 4th edn. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, pp 148-154

HOSEK J, Svastova P, Moravkova M, Pavlik I, Bartos M (2006) Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. *Vet Med* 51:180-192

HUITEMA H, Jaartsveld F (1967) Mycobacterium microti infection in a cat and some pigs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 33:209-212

ILG B (2003) Nachweis und Charakterisierung aquatischer Mykobakterien. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

IWAMOTO T, Nakajima C, Nishiuchi Y, Kato T, Yoshida S, Nakanishi N, Tamaru A, Tamura Y, Suzuki Y, Nasu M (2012) Genetic diversity of Mycobacterium avium subsp. hominissuis strains isolated from humans, pigs, and human living environment. *Infection, Genetics and Evolution* 12:846-852

JARLIER V, Nikaido H (1994) Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 123:11-18

JOHANSEN TB, Olsen I, Jensen MR, Dahle UR, Holstad G, Djonne B (2007) New probes used for IS1245 and IS1311 restriction fragment length polymorphism of Mycobacterium avium subsp. avium and Mycobacterium avium subsp. hominissuis isolates of human and animal origin in Norway. *BMC Microbiol* 7:14. doi:1471-2180-7-14

JOHNE H, Frothingham L (1895) Ein eigenthuemlicher fall von tuberculose beim rind. *Dtsch.Z.Tiermed.Pathol* 21:438-454

JURCZYNSKI K, Widmer D, Langer S, Kempf H, Baumgartner K, Fluegger M, Prah A (2013) Aviäre Tuberkulose bei Humboldtpinguinen (*Spheniscus humboldti*) - Grenzen der Diagnostik. 32 Arbeitstagung der Zootierärzte im deutschsprachigen Raum Tagungsbericht 2012:196-198

JURCZYNSKI K, Lyashchenko KP, Scharpegge J, Fluegger M, Lacave G, Moser I, Tortschanoff S, Greenwald R (2012) Use of Multiple Diagnostic Tests to Detect Mycobacterium pinnipedii Infections in a Large Group of South American Sea Lions (*Otaria flavescens*). *Aquat Mamm* 38

JURCZYNSKI K, Lyashchenko KP, Gomis D, Moser I, Greenwald R, Moisson P (2011) Pinniped tuberculosis in Malayan tapirs (*Tapirus indicus*) and its transmission to other terrestrial mammals. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 42:222-227

KAMERBEEK J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35:907-914

KANEENE J, Miller R, De Kantor I, Thoen C (2010) Tuberculosis in wild animals [Serialised article. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. Number 4 in the series]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 14:1508-1512

KÄSER M, Ruf MT, Hauser J, Pluschke G (2010) Optimized DNA preparation from mycobacteria. *Cold Spring Harb Protoc* 2010:pdb.prot5408. doi:10.1101/pdb.prot5408

KEYMER I, Jones D, Pugsley S, Wadsworth P (1982) A survey of tuberculosis in birds in the Regent's Park Gardens of the Zoological Society of London. *Avian Pathol* 11:563-569

KIERS A, Klarenbeek A, Mendelts B, Van Soolingen D, Koeter G (2008) Transmission of Mycobacterium pinnipedii to humans in a zoo with marine mammals. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 12:1469-1473

- KIM BJ, Choi BS, Lim JS, Choi IY, Lee JH, Chun J, Kook YH, Kim BJ (2012) Complete genome sequence of *Mycobacterium intracellulare* strain ATCC 13950(T). *J Bacteriol* 194:2750-12. doi:10.1128/JB.00295-12
- KIM BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Chae GT, Kim EC, Cha CY, Kook YH (1999) Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol* 37:1714-1720
- KOECK J, Fabre M, Simon F, Daffé M, Garnotel E, Matan A, Gérôme P, Bernatas J, Buisson Y, Pourcel C (2011) Clinical characteristics of the smooth tubercle bacilli '*Mycobacterium canettii*' infection suggest the existence of an environmental reservoir. *Clinical Microbiology and Infection* 17:1013-1019
- KOLEY D, Bard AJ (2010) Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16783-16787. doi:10.1073/pnas.1011614107
- KREMER K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C, Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakrus MA, Musser JM, van Embden JD (1999) Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 37:2607-2618
- KREMER K, van Soolingen D, van Embden J, Hughes S, Inwald J, Hewinson G (1998) *Mycobacterium microti*: more widespread than previously thought. *J Clin Microbiol* 36:2793-2794
- KRIZ P, Kralik P, Slany M, Slana I, Svobodova J, Parmova I, Barnet V, Jurek V, Pavlik I (2011) *Mycobacterium pinnipedii* in a captive Southern sea lion (*Otaria flavescens*): a case report. *Vet Med* 56:307-313
- KRIZ P, Jahn P, Bezdekova B, Blahutkova M, Mrlik V, Slana I, Pavlik I (2010) *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection in horses. *Emerging infectious diseases* 16:1328
- KUBICA T, Rüsç-Gerdes S, Niemann S (2003) *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J Clin Microbiol* 41:3070-3077
- KUMAR P, Marathe S, Bhaskar S (2016) Isolation of Genomic DNA from *Mycobacterium* Species. *bio-protocol* Vol 6 , Iss 5. doi:http://www.bio-protocol.org/e1751
- LACAVE G, Malliot A, Alerte V, Boschirolì M, Lecu A (2009) Atypical case of *Mycobacterium pinnipedii* in a Patagonian sea lion (*Otaria flavescens*) and tuberculosis cases history review in pinnipeds.
- LANTOS A, Niemann S, Mezosi L, Sos E, Erdelyi K, David S, Parsons LM, Kubica T, Rusch-Gerdes S, Somoskovi A (2003) Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in captive Siberian tiger. *Emerg Infect Dis* 9:1462-1464. doi:10.3201/eid0911.030297
- LÉCU A, Ball R (2011) Mycobacterial infections in zoo animals: relevance, diagnosis and management*. *International Zoo Yearbook* 45:183-202

- LEDWON A, Szeleszczuk P, Zwolska Z, Augustynowicz-Kopec E, Kozak M (2008) Occurrence of *Mycobacterium* in the faeces of parrots kept in zoological gardens and private aviaries in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy* 52:341-346
- LEHMANN K, Neumann R (1896) *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik*. J. F. Lehmann, München
- LEITE FL, Stokes KD, Robbe-Austerman S, Stabel JR (2013) Comparison of fecal DNA extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25:27-34
- LEWERIN SS, Olsson S, Eld K, Röken B, Ghebremichael S, Koivula T, Källenius G, Bölske G (2005) Outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* infection among captive Asian elephants in a Swedish zoo. *Vet Rec* 156:171-175
- LITTLE T, Swan C, Thompson H, Wilesmith J (1982) Bovine tuberculosis in domestic and wild mammals in an area of Dorset. III. The prevalence of tuberculosis in mammals other than badgers and cattle. *J Hyg* 89:225-234
- LUTZE-WALLACE C, Turcotte C, Glover G, Cousins D, Bell J, Berlie-Surujballi G, Barbeau Y, Randall G (2006) Isolation of a *Mycobacterium microti*-like organism from a rock hyrax (*Procavia capensis*) in a Canadian zoo. *Can Vet J* 47:1011-1013
- LYASHCHENKO KP, Greenwald R, Esfandiari J, Mikota S, Miller M, Moller T, Vogelnest L, Gairhe KP, Robbe-Austerman S, Gai J, Waters WR (2012) Field application of serodiagnostics to identify elephants with tuberculosis prior to case confirmation by culture. *Clin Vaccine Immunol* 19:1269-1275. doi:10.1128/CVI.00163-12
- LYASHCHENKO KP, Greenwald R, Esfandiari J, Greenwald D, Nacy CA, Gibson S, Didier PJ, Washington M, Szczerba P, Motzel S, Handt L, Pollock JM, McNair J, Andersen P, Langermans JA, Verreck F, Ervin S, Ervin F, McCombs C (2007) PrimaTB STAT-PAK assay, a novel, rapid lateral-flow test for tuberculosis in nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol* 14:1158-1164. doi:CVI.00230-07
- MADIGAN MT, Martinko JM (2006) *Actinobacteria: Mycobacterium*. In: Anonymous Brock *Mikrobiologie*, 11th edn. Pearson Studium, München, pp 436-439
- MANGLANI RP, Khaja M, Hennessey K, Kennedy O (2015) Pleural *Mycobacterium avium* complex infection in an immunocompetent female with no risk factors. *Case reports in pulmonology* 2015
- MANN PC, Montali RJ, Bush M (1982) *Mycobacterial osteomyelitis in captive marsupials*. *J Am Vet Med Assoc* 181:1331-1333
- MARTÍN-ATANCE P, Palomares F, González-Candela M, Revilla E, Cubero MJ, Calzada J, León-Vizcaíno L (2005) Bovine tuberculosis in a free ranging red fox (*Vulpes vulpes*) from Doñana National Park (Spain). *J Wildl Dis* 41:435-436
- MASLOW JN, Brar I, Smith G, Newman GW, Mehta R, Thornton C, Didier P (2003) Latent infection as a source of disseminated disease caused by organisms of the *Mycobacterium avium* complex in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J Infect Dis* 187:1748-1755

- MATLOVA L, Dvorska L, Ayele WY, Bartos M, Amemori T, Pavlik I (2005) Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement. *J Clin Microbiol* 43:1261-1268. doi:43/3/1261
- MATLOVA L, Dvorska L, Palecek K, Maurenc L, Bartos M, Pavlik I (2004) Impact of sawdust and wood shavings in bedding on pig tuberculous lesions in lymph nodes, and IS1245 RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* of serotypes 6 and 8 isolated from pigs and environment. *Vet Microbiol* 102:227-236
- MATTHEWS PR, McDiarmid A (1977) *Mycobacterium avium* infection in freeliving hedgehogs (*Erinaceus europaeus* L.). *Res Vet Sci* 22:388
- MAY T, Brel F, Beuscart C, Vincent V, Perronne C, Doco-Lecompte T, Saint-Marc T, Dautzenberg B, Grosset J (1997) Comparison of combination therapy regimens for treatment of human immunodeficiency virus-infected patients with disseminated bacteremia due to *Mycobacterium avium*. ANRS Trial 033 Curavium Group. Agence Nationale de Recherche sur le Sida. *Clin Infect Dis* 25:621-629
- MEE JF, Richardson E (2008) Epidemiology and economic impact of Johne's disease in Irish dairy herds
- MICHEL AL, Venter L, Espie IW, Coetzee ML (2003) *Mycobacterium tuberculosis* infections in eight species at the National Zoological Gardens of South Africa, 1991-2001. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 34:364-370
- MIJS W, de Haas P, Rossau R, Van der Laan T, Rigouts L, Portaels F, van Soolingen D (2002) Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1505-1518
- MÖBIUS P, Lentzsch P, Moser I, Naumann L, Martin G, Köhler H (2006) Comparative macrorestriction and RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from man, pig, and cattle. *Vet Microbiol* 117:284-291
- MOISSON P, Lacroix F, Manson C, André-Fontaine G, Bakker D, Fiette L, Thorel M, Lernoald J (1998) Tuberculosis outbreak in some felid species and southern sea lions in Mulhouse Zoo from 1992 to 1996: diagnostic perspectives. *Proc.Eur.Assoc.Zoo Wildl.Vet* 1998:98-112
- MONTALI RJ, Mikota SK, Cheng LI (2001) *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. *Rev Sci Tech* 20:291-303
- MONTALI RJ, Bush M, Thoen CO, Smith E (1976) Tuberculosis in captive exotic birds. *J Am Vet Med Assoc* 169:920-927
- MORAVKOVA M, Trcka I, Lamka J, Pavlik I (2008) A mixed infection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. a. hominissuis* in one red deer (*Cervus elaphus*) studied by IS900 BstEII and IS1245 PvuII RFLP analyses: a case report. *Vet Med* 53:445-451
- MORRIS P, Thoen C, Legendre A (1996) Pulmonary tuberculosis in an African lion (*Panthera leo*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*:392-396

MORTIER RA, Barkema HW, Orsel K, Wolf R, De Buck J (2014) Shedding patterns of dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Res* 45:71

MOSER I, Köhler H, Menge C (2014) Die Tuberkulose des Rindes–überraschend wieder oder immer noch präsent? *Tierärztliche Praxis Großtiere* 42:240-249

MOSER I, Prodinger W, Hotzel H, Greenwald R, Lyashchenko K, Bakker D, Gomis D, Seidler T, Ellenberger C, Hetzel U (2008) *Mycobacterium pinnipedii*: Transmission from South American sea lion (*Otaria byronia*) to Bactrian camel (*Camelus bactrianus bactrianus*) and Malayan tapirs (*Tapirus indicus*). *Vet Microbiol* 127:399-406

MÜNSTER P (2012) Epidemiological investigations on the occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in different matrices from cattle and zoo animals by IS900 polymerase chain reaction assays. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen

MÜNSTER P, Fechner K, Völkel I, von Buchholz A, Czerny C (2013) Distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in a German zoological garden determined by IS900 semi-nested and quantitative real-time PCR. *Vet Microbiol* 163:116-123

MURAKAMI PS, Monego F, Ho JL, Gibson A, Javorouski ML, Bonat M, Lacerda O, Brockelt SR, Biesdorf SM, Nakatani SM (2012) DETECTION OF RD^{RIO} STRAIN OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN TAPIRS (TAPIRUS TERRESTRIS) FROM A ZOO IN BRAZIL. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43:872-875

MURCIA MI, Tortoli E, Menendez MC, Palenque E, Garcia MJ (2006) *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2049-2054. doi:56/9/2049

NAPIER JE, Hinrichs SH, Lampen F, Iwen PC, Wickert RS, Garrett JL, Aden TA, Restis E, Curro TG, Simmons LG (2009) An outbreak of avian mycobacteriosis caused by *Mycobacterium intracellulare* in little blue penguins (*Eudyptula minor*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 40:680-686

NASER SA, Ghobrial G, Romero C, Valentine JF (2004) Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *The Lancet* 364:1039-1044

NEILL S, Pollock J, Bryson D, Hanna J (1994) Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* 40:41-52

NIEMANN S, Richter E, Rüscher-Gerdes S (2002) Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:433-436

NIGHTINGALE SD, Byrd LT, Southern PM, Jockusch JD, Cal SX, Wynne BA (1992) Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Infect Dis* 165:1082-1085

NOLL H, Bloch H, Asselineau J, Lederer E (1956) The chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta* 20:299-309

- OH P, Granich R, Scott J, Sun B, Joseph M, Stringfield C, Thisdell S, Staley J, Workman-Malcolm D, Borenstein L (2002) Human exposure following Mycobacterium tuberculosis infection of multiple animal species in a metropolitan zoo. *Emerging infectious diseases* 8:1290-1293
- OWUSU E, Newman MJ, Akumwena A, Bannerman E, Pluschke G (2017) Evaluating decontamination protocols for the isolation of Mycobacterium ulcerans from swabs. *BMC microbiology* 17:2
- PALGRAVE C, Benato L, Eatwell K, Laurenson I, Smith N (2012) *Mycobacterium microti* Infection in Two Meerkats (*Suricata suricatta*). *J Comp Pathol* 146:278-282
- PALOMINO JC, Portaels F (1998) Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of Mycobacterium ulcerans in the BACTEC system. *J Clin Microbiol* 36:402-408
- PARASHAR D, Chauhan D, Sharma V, Katoch V (2006) Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. *Indian J Med Res* 124:385
- PARK H, Shin M, Sung KY, Park H, Cho Y, Yoo HS (2014) Effective DNA extraction method to improve detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in bovine feces. *Korean Journal of Veterinary Research* 54:55-57
- PARSONS SD, Drewe JA, Gey van Pittius NC, Warren RM, van Helden PD (2013) Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. *Emerg Infect Dis* 19:2004-2007. doi:10.3201/eid1912.130268
- PATE M, Žolnir-Dovč M, Krt B, Ocepek M (2008) IS1245 RFLP-based genotyping study of Mycobacterium avium subsp. hominissuis isolates from pigs and humans. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31:537-550
- PATE M, Švara T, Gombač M, Paller T, Žolnir-Dovč M, Emeršič I, Prodingler WM, Bartoš M, Zdovc I, Krt B (2006) Outbreak of tuberculosis caused by Mycobacterium caprae in a zoological garden. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 53:387-392
- PATTYN S, Antoine-Portaels F, Kageruka P, Gigase P (1970) Mycobacterium microti infection in a zoo-llama: Lama vicugna (Molina). *Acta Zool.Path.Antverp.*:17-24.
- PAVLIK I, Machackova M, Yayo Ayele W, Lamka J, Parmova I, Melicharek I, Hanzlikova M, Kormendy B, Nagy G, Cvetnic Z (2002) Incidence of bovine tuberculosis in wild and domestic animals other than cattle in six Central European countries during 1990-1999. *VETERINARNI MEDICINA-PRAHA-* 47:122-131
- PAVLIK I, Horvathova A, Dvorska L, Bartl J, Svastova P, du Maine R, Rychlik I (1999) Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *J Microbiol Methods* 38:155-167
- PFYFFER GE, Auckenthaler R, van Embden JD, van Soolingen D (1998) Mycobacterium canettii, the smooth variant of M. tuberculosis, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerg Infect Dis* 4:631-634. doi:10.3201/eid0404.980414
- PIERSIMONI C, Scarparo C, Cichero P, Del Pezzo M, Covelli I, Gesu G, Nista D, Scagnelli M, Mandler F (1999) Multicenter evaluation of the MB-Redox medium compared with radiometric Bactec system, Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT), and Löwenstein-

Jensen medium for detection and recovery of acid-fast bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34:293-299

PIETZKA AT, Indra A, Stoger A, Zeinzinger J, Konrad M, Hasenberger P, Allerberger F, Ruppitsch W (2009) Rapid identification of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by *rpoB* gene scanning using high-resolution melting curve PCR analysis. *J Antimicrob Chemother* 63:1121-1127. doi:10.1093/jac/dkp124

PLESKER R, Teschner K, Behlert O, Prenger-Berninghoff E, Hillemann D (2010) Airborne *Mycobacterium avium* infection in a group of red-shanked douc langurs (*Pygathrix nemaeus nemaeus*). *J Med Primatol* 39:129-135

PORTAELS F, Chemlal K, Elsen P, Johnson PD, Hayman JA, Hibble J, Kirkwood R, Meyers WM (2001) *Mycobacterium ulcerans* in wild animals. *Rev Sci Tech* 20:252-264

PORTAELS F, Realini L, Bauwens L, Hirschel B, Meyers WM, de Meurichy W (1996) Mycobacteriosis caused by *Mycobacterium genavense* in birds kept in a zoo: 11-year survey. *J Clin Microbiol* 34:319-323

PROBST C, Speck S, Hofer H (2011) Serosurvey of zoo ungulates in central Europe. *International Zoo Yearbook* 45:168-182

RAVVA SV, Stanker LH (2005) Real-time quantitative PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and differentiation from other mycobacteria using SYBR Green and TaqMan assays. *J Microbiol Methods* 63:305-317

RAYMOND KN, Müller G, Matzanke BF (1984) Complexation of iron by siderophores a review of their solution and structural chemistry and biological function. In: Anonymous *Structural Chemistry*. Springer, pp 49-102

RICHTER E (2009) Mykobakterien. In: Neumeister B, Geiss HK, Braun R, Kimmig P (eds) *Mikrobiologische Diagnostik*, 2nd edn. Thieme Verlag KG, Stuttgart, pp 398-418

RIETSCHER W (2004) TB or not TB (nicht von Shakespeare). *Zoolog Garten N F* 74 4-5:289-298

RIRIE KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245:154-160

RODRÍGUEZ MARTÍNEZ G, León Franco CI, Guerrero Guerrero MI, Neira Rairán R, Arias Bernal L, Silva Iguá, Á del P (2011) Study of avian tuberculosis in a zoo at the Bogota savannah through tuberculin testing and active epidemiologic surveillance. *Revista de Medicina Veterinaria*:99-113

RODRIGUEZ S, Bezos J, Romero B, de Juan L, Alvarez J, Castellanos E, Moya N, Lozano F, Javed MT, Saez-Llorente JL, Liebana E, Mateos A, Dominguez L, Aranaz A, Spanish Network on Surveillance and Monitoring of Animal Tuberculosis (2011) *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerg Infect Dis* 17:532-535. doi:10.3201/eid1703.100618

ROGALL T, Flohr T, Bottger EC (1990a) Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *J Gen Microbiol* 136:1915-1920

- ROGALL T, Wolters J, Flohr T, Bottger EC (1990b) Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Bacteriol* 40:323-330
- ROMANO M, Amadio A, Bigi F, Klepp L, Etchechoury I, Llana MN, Morsella C, Paolicchi F, Pavlik I, Bartos M (2005) Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. *Vet Microbiol* 110:221-237
- ROSS BC, Raios K, Jackson K, Sievers A, Dwyer B (1991) Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains by use of a nonradioactive Southern blot hybridization method. *J Infect Dis* 163:904-907
- RÜFENACHT S, Bögli-Stuber K, Bodmer T, Jaunin VF, Jmaa DC, Gunn-Moore DA (2011) *Mycobacterium microti* infection in the cat: a case report, literature review and recent clinical experience. *J Feline Med Surg* 13:195-204. doi:10.1016/j.jfms.2011.01.012
- RUNYON EH (1959) Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am* 43:273-290
- RUSSELL DG (2001) *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2:569-586
- RYAN E, Dwyer P, Connolly D, Fagan J, Costello E, More S (2008) Tuberculosis in alpaca (*Lama pacos*) on a farm in Ireland. 1. A clinical report. *Ir Vet J* 61:527-531. doi:10.1186/2046-0481-61-8-527
- SAIKI RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
- SANDERSON JD, Moss MT, Tizard ML, Hermon-Taylor J (1992) *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 33:890-896
- SCHEIBE T, Klomburg S, Baumgärtner W, Ziegler S (2012) "Vogeltuberkulose" - (*Mycobacterium avium* ssp.-Infektionen) bei Blauhalssträußen. 31 Arbeitstagung der Zootierärzte im deutschsprachigen Raum Tagungsbericht 2011:136-143
- SCHMIDBAUER SM, Wohlsein P, Kirpal G, Beineke A, Müller G, Müller H, Moser I, Baumgartner W (2007) Outbreak of *Mycobacterium bovis* infection in a wild animal park. *Vet Rec* 161:304-307. doi:161/9/304
- SCHMIDT T, Hummel S, Herrmann B (1995) Evidence of contamination in PCR laboratory disposables. *Naturwissenschaften* 82:423-431
- SCHONENBRUCHER H, Abdulmawjood A, Failing K, Bulte M (2008) New triplex real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* 74:2751-2758. doi:10.1128/AEM.02534-07
- SEVILLA IA, Molina E, Elguezabal N, Perez V, Garrido JM, Juste RA (2015) Detection of mycobacteria, *Mycobacterium avium* subspecies, and *Mycobacterium tuberculosis* complex by a novel tetraplex real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 53:930-940. doi:10.1128/JCM.03168-14

- SHARBATI-TEHRANI S, Stephan J, Holland G, Appel B, Niederweis M, Lewin A (2005) Porins limit the intracellular persistence of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 151:2403-2410. doi:151/7/2403
- SHITAYE EJ, Grymova V, Grym M, Halouzka R, Horvathova A, Moravkova M, Beran V, Svobodova J, Dvorska-Bartosova L, Pavlik I (2009) *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection in a pet parrot. *Emerging Infectious Diseases* 15:617
- SHRESTHA NK, Tuohy MJ, Hall GS, Reischl U, Gordon SM, Procop GW (2003) Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 41:5121-5126
- SILVA ADEL P, Leon CI, Guerrero MI, Neira R, Arias L, Rodriguez G (2009) Avian tuberculosis of zoonotic importance at a zoo on the Bogota Andean plateau (Sabana), Colombia. *Can Vet J* 50:841-845
- SILVER H, Sonnenwirth AC, Alex N (1966) Modifications in the fluorescence microscopy technique as applied to identification of acid-fast bacilli in tissue and bacteriological material. *J Clin Pathol* 19:583-588
- SINGH S, Singh A, Singh P, Kumar A, Singh B (2011) Molecular identification and characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in free living non-human primate (Rhesus macaques) from North India. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 34:267-271
- SOMOSKÖVI A, Magyar P (1999) Comparison of the mycobacteria growth indicator tube with MB redox, Lowenstein-Jensen, and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 37:1366-1369
- SORGE U (2013) Paratuberkulose-ein Update zur Epidemiologie und zu Kontrollansätzen. *Veterinär-Spiegel* 23:122-126
- SPARGO BJ, Crowe LM, Ionedo T, Beaman BL, Crowe JH (1991) Cord factor (alpha, alpha-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:737-740
- SRIVASTAVA K, Chauhan D, Gupta P, Singh H, Sharma V, Yadav V, Thakral S, Dharamdheeran J, Nigam P, Prasad H (2008) Isolation of *Mycobacterium bovis* & *M. tuberculosis* from cattle of some farms in north India-possible relevance in human health. *Indian J Med Res* 128:26
- STETTER MD, Mikota SK, Gutter AF, Monterroso ER, Dalovisio JR, Degraw C, Farley T (1995) Epizootic of *Mycobacterium bovis* in a zoologic park. *J Am Vet Med Assoc* 207:1618-1621
- SUPPLY P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C (2001) Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 39:3563-3571. doi:10.1128/JCM.39.10.3563-3571.2001
- SUPPLY P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C (2000) Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 36:762-771

- TASARA T, Stephan R (2005) Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl Environ Microbiol* 71:5957-5968. doi:71/10/5957
- THAKUR R, Sarma S, Goyal R (2011) Comparison of DNA Extraction Protocols for *Mycobacterium Tuberculosis* in Diagnosis of Tuberculous Meningitis by Real-time Polymerase Chain Reaction. *J Glob Infect Dis* 3:353-356. doi:10.4103/0974-777X.91057
- THEUSS T, Aupperle H, Eulenberger K, Schoon H, Richter E (2010) Disseminated Infection with *Mycobacterium genavense* in a Grizzled Giant Squirrel (*Ratufa macroura*) Associated with the Isolation of an Unknown *Mycobacterium*. *J Comp Pathol* 143:195-198
- THOEN C, LoBue P, De Kantor I (2006) The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol* 112:339-345
- THOMPSON PJ, Cousins DV, Gow BL, Collins DM, Williamson BH, Dagnia HT (1993) Seals, seal trainers, and mycobacterial infection. *Am Rev Respir Dis* 147:164-164
- THOREL M, Karoui C, Varnerot A, Fleury C, Vincent V (1998) Isolation of *Mycobacterium bovis* from baboons, leopards and a sea-lion. *Vet Res* 29:207-212
- THOREL M, Huchzermeyer H, Weiss R, Fontaine J (1997) *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review. *Vet Res* 28:439-447
- THOREL MF (1980) Isolation of *Mycobacterium africanum* from monkeys. *Tubercle* 61:101-104
- THOREL MF, Krichevsky M, Levy-Frebault VV (1990) Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 40:254-260
- TIMPE A, Runyon EH (1954) The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. *J Lab Clin Med* 44:202-209
- TIWARI A, VanLeeuwen JA, McKenna SL, Keefe GP, Barkema HW (2006) Johne's disease in Canada Part 1: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Canadian veterinary journal* 47:874
- TIWARI A, VanLeeuwen JA, Dohoo IR, Stryhn H, Keefe GP, Haddad JP (2005) Effects of seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* on culling in dairy cattle in four Canadian provinces. *Vet Microbiol* 109:147-158
- TORTOLI E, Urbano P, Marcelli F, Simonetti TM, Cirillo DM (2012) Is real-time PCR better than conventional PCR for *Mycobacterium tuberculosis* complex detection in clinical samples? *J Clin Microbiol* 50:2810-2813. doi:10.1128/JCM.01412-12
- TORTOLI E, Rindi L, Garcia MJ, Chiaradonna P, Dei R, Garzelli C, Kroppenstedt RM, Lari N, Mattei R, Mariottini A, Mazzarelli G, Murcia MI, Nanetti A, Piccoli P, Scarparo C (2004) Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1277-1285. doi:10.1099/ijs.0.02777-0

TSILIMPARIS N, Debus ES, Reeves JG (2014) Latent Mycobacterium Avium Infection Causing a Mycotic Suprarenal Aortic Aneurysm in a Human Immunodeficiency Virus–Positive Patient. *Ann Vasc Surg* 28:1035. e1-1035. e4

TURENNE CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A (2001) Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous Mycobacterium species. *J Clin Microbiol* 39:3637-3648. doi:10.1128/JCM.39.10.3638-3648.2001

TWORT F, Ingram G (1912) A Method for Isolating and Cultivating the Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis, Johne, and some Experiments on the Preparation of a Diagnostic Vaccine for Pseudo-tuberculous Enteritis of Bovines. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*:517-542

ULLMANN LS, das Neves Dias-Neto R, Cagnini DQ, Yamatogi RS, Oliveira-Filho JP, Nemer V, Teixeira RHF, Biondo AW, Araújo JP (2016) Mycobacterium genavense infection in two species of captive snakes. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 22:27

VALENTIN-WEIGAND P (2011) Gattung Mycobacterium. In: Selbitz H, Truyen U, Valentin-Weigand P (eds) *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre*, 9th edn. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 308-318

VAN COPPENRAET LB, De Haas P, Lindeboom J, Kuijper E, Van Soolingen D (2008) Lymphadenitis in children is caused by Mycobacterium avium hominissuis and not related to 'bird tuberculosis'. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 27:293-299

VAN INGEN J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, van Soolingen D (2012) Characterization of Mycobacterium orygis as M. tuberculosis complex subspecies. *Emerging Infect Dis* 18:653-655

VAN INGEN J, Boeree MJ, Kusters K, Wieland A, Tortoli E, Dekhuijzen PN, van Soolingen D (2009) Proposal to elevate Mycobacterium avium complex ITS sequevar MAC-Q to Mycobacterium vulneris sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2277-2282. doi:10.1099/ijs.0.008854-0

VAN SOOLINGEN D, van der Zanden AG, de Haas PE, Noordhoek GT, Kiers A, Foudraine NA, Portaels F, Kolk AH, Kremer K, van Embden JD (1998) Diagnosis of Mycobacterium microti infections among humans by using novel genetic markers. *J Clin Microbiol* 36:1840-1845

VAN SOOLINGEN D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaels F, Top J, Schouls LM, van Embden JD (1997) A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 47:1236-1245

VANSNICK E (2004) Johne's disease in zoo animals: development of molecular tools for the detection and characterisation of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. PhD study, RUGhent 10

VERMA-KUMAR S, Abraham D, Dendukuri N, Cheeran JV, Sukumar R, Balaji KN (2012) Serodiagnosis of tuberculosis in Asian elephants (Elephas maximus) in Southern India: a latent class analysis. *PloS one* 7:e49548

- WANG H, Zhong M, Shu C, Chen S, Yin Y (2007) Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA by fluorescent quantitative PCR assay using duplex scorpion primers.
- WAYNE LG, Sramek HA (1992) Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin Microbiol Rev* 5:1-25
- WAYNE LG, Kubica GP (1986) The mycobacteria. In: Sneath PHA, Holt JG (eds) *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, 2nd edn. Williams & Wilkins, pp 1435-1457
- WEBER A, Reischl U, Naumann L (1998) Demonstration of *Mycobacterium africanum* in a bull from North Bavaria. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 111:6-8
- WEBER A, Gurke R, Bauer K, Schreyer K (1992) Bacterial studies on the occurrence of *Mycobacterium paratuberculosis* in fecal samples of zoo ruminants. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 105:161-164
- WELLS AQ (1953) *Mycobacterium tuberculosis* var. *muris*. *J Gen Microbiol* 9:149
- WHIPPLE DL, Callihan DR, Jarnagin JL (1991) Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J Vet Diagn Invest* 3:368-373
- WILLSON SJ, Kaufman MG, Merritt RW, Williamson HR, Malakauskas DM, Benbow ME (2013) Fish and amphibians as potential reservoirs of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer disease. *Infection ecology & epidemiology* 3
- WILSON IG (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 63:3741-3751
- WILSON P, Weavers E, West B, Taylor M, Kavanagh J, Jones P (1984) *Mycobacterium bovis* infection in primates in Dublin Zoo: epidemiological aspects and implications for management. *Lab Anim* 18:383-387
- YIN X, Wu L, Zheng L, Mao X, Zhang S, Wang Q (2016) Quantification of colony-forming units for *M. tuberculosis* complex using *gyrB*-based real-time PCR assay. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 20:967-972
- YONG H, Choi G, Lee BS, Whang J, Shin SJ (2011) Disseminated infection due to *Mycobacterium avium* subsp. *avium* in an Asian elephant (*Elephas maximus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 42:743-746
- YUEN LK, Ross BC, Jackson KM, Dwyer B (1993) Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. *J Clin Microbiol* 31:1615-1618
- ZANOLARI P, Robert N, Lyashchenko K, Pfyffer G, Greenwald R, Esfandiari J, Meylan M (2009) Tuberculosis caused by *Mycobacterium microti* in South American camelids. *Journal of veterinary internal medicine* 23:1266-1272
- ZUBER B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, Griffiths G, Daffe M (2008) Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol* 190:5672-5680. doi:10.1128/JB.01919-07

9 Anhänge

9.1 Tabellen

Zoologische Einrichtung A

Tab. A1: Anzahl der beprobten Vögel (Aves) für Rachen- und Rektaltupfer

Art	Anzahl
Braunkopfliest (<i>Halcyon albiventris</i>)	1
Schwarzstorch (<i>Ciconia nigra</i>)	1
Kuhreiher (<i>Bubulcus ibis</i>)	1
Hirtenregenpfeifer (<i>Charadrius pecuarius</i>)	1
Harlekinwachtel (<i>Coturnix delegorguei</i>)	1
Amethystglanzstar (<i>Cinnyricinclus leucogaster</i>)	2
Chin.Zwergwachtel (<i>Excalfactoria chinensis</i>)	1
Diamanttäubchen (<i>Stictopelia cuneata</i>)	7
Diamantfink (<i>Stagonopleura guttata</i>)	2
Spitzschwanzamadine (<i>Poephila acuticauda</i>)	4
Ringelastrild (<i>Stizoptera bichenovii</i>)	2
Ceresamadine (<i>Aidemosyne modesta</i>)	1
Zebrafink (<i>Taeniopygia guttata castanotis</i>)	7
Gemalte Amadine (<i>Emblema picta</i>)	1
Waldrapp (<i>Geronticus eremita</i>)	1
Strauß (<i>Struthio camelus</i>)	2
Chinasittich (<i>Psittacula derbiana</i>)	1
Gesamt	36

Tab. A2: Anzahl der beprobten Säugetiere (Mammalia) für Rachentupfer

Art	Anzahl
Westlicher Flachlandgorilla (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)	12
Sumatra Orang-Utan (<i>Pongo abelii</i>)	1
Bonobo (<i>Pan paniscus</i>)	13
Brauner Klammeraffe (<i>Ateles hybridus</i>)	4
Japanmakake (<i>Makaka fuscata</i>)	2
Haubenlangur (<i>Trachypithecus auratus</i>)	6
Weißgesichtseidenäffchen (<i>Callithrix geoffroy</i>)	1
Dschelada (<i>Theropithecus gelada</i>)	22
Totenkopffäffchen (<i>Saimiri boliviensis</i>)	8
Weißhandgibbon (<i>Hylobates lar</i>)	1
Springtamarin (<i>Callimico goeldii</i>)	2
Goldkopflöwenäffchen (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>)	1
Onager (<i>Equus hemionus onager</i>)	3
Poitou-Esel (<i>Equus asinus asinus</i>)	7

Art	Anzahl
Grevyzebra (<i>Equus grevyi</i>)	3
Shetlandpony (<i>Equus ferus caballus</i>)	3
Dülmener Wildpferd (<i>Equus ferus caballus</i>)	2
Muli (<i>Equus a. f. asinus x E. f. caballus</i>)	1
Somali-Wildesel (<i>Equus africanus somalicus</i>)	2
Przewalski-Pferd (<i>Equus przewalskii</i>)	1
Panzernashorn (<i>Rhinoceros unicornis</i>)	2
Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	1
Schneeleopard (<i>Panthera uncia</i>)	4
Nasenbär (<i>Nasua nasua</i>)	4
Waldhund (<i>Speothos venaticus</i>)	1
Erdmännchen (<i>Suricata suricatta</i>)	9
Fennek (<i>Vulpes zerda</i>)	1
Mähnenwolf (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	1
Asiatischer Elefant (<i>Elephas maximus</i>)	2
Zweifingerfaultier (<i>Choloepus didactylus</i>)	4
Klippschliefer (<i>Procavia capensis</i>)	9
Trampeltier (<i>Camelus bactrianus</i>)	2
Alpaka (<i>Vicugna pacos</i>)	18
Vikunja (<i>Vicugna vicugna</i>)	5
Schwäbisch-Hällisches Schwein (<i>Sus scrofa domestica</i>)	7
Pekari-Schwein (<i>Pecari tajacu</i>)	1
Netzgiraffe (<i>Giraffa camelopardalis reticulata</i>)	2
Okapi (<i>Okapia johnstoni</i>)	3
Mesopotamischer Damhirsch (<i>Dama d. mesopotamica</i>)	8
Bongo (<i>Tragelaphus eurycerus</i>)	1
Kleiner Kudu (<i>Tragelaphus imberbis</i>)	2
Bezoarziege (<i>Capra aegagrus cretica</i>)	13
Schneeziege (<i>Oreamnos americanus</i>)	4
Alpensteinbock (<i>Capra ibex</i>)	6
Zwergziege (<i>Capra aegagrus f. hircus</i>)	9
Takin (<i>Budorcas taxicolor</i>)	1
Markhor (<i>Capra falconeri</i>)	9
Skudde (<i>Ovis orientalis aries</i>)	10
Mähnenschaf (<i>Ammotragus lervia</i>)	3
Mufflon (<i>Ovis orientalis musimon</i>)	5
Kamerunschaf (<i>Ovis orientalis aries</i>)	7
Hutiaconga (<i>Capromys pilorides</i>)	4
Gundi (<i>Ctenodactylus gundi</i>)	6
Flachland-Viscacha (<i>Lagostomus maximus</i>)	3
Greifstachler (<i>Coendu prehensilis</i>)	1
Großer Tenrek (<i>Tenrec ecaudatus</i>)	5

Art	Anzahl
Igeltanrek (<i>Echinops telfairi</i>)	2
Nilflughund (<i>Rousettus aegyptiacus</i>)	12
Flugfuchs (<i>Pteropus vampyrus</i>)	18
Rotes Riesenkänguruh (<i>Macropus rufus</i>)	3
Gesamt	303

Tab A3: Anzahl der beprobten Säugetiere (Mammalia) für Rektaltupfer

Art	Anzahl
Westlicher Flachlandgorilla (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)	11
Sumatra Orang-Utan (<i>Pongo abelii</i>)	1
Bonobo (<i>Pan paniscus</i>)	13
Brauner Klammersaffe (<i>Ateles hybridus</i>)	3
Japanmakake (<i>Makaka fuscata</i>)	1
Haubenlangur (<i>Trachypithecus auratus</i>)	6
Weißgesichtseidenäffchen (<i>Callithrix geoffroy</i>)	1
Dschelada (<i>Theropithecus gelada</i>)	22
Totenkopffäffchen (<i>Saimiri boliviensis</i>)	8
Weißhandgibbon (<i>Hylobates lar</i>)	1
Springtamarin (<i>Callimico goeldii</i>)	2
Goldkopflöwenäffchen (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>)	1
Onager (<i>Equus hemionus onager</i>)	3
Poitou-Esel (<i>Equus asinus asinus</i>)	8
Grevyzebra (<i>Equus grevyi</i>)	3
Shetland-Pony (<i>Equus ferus caballus</i>)	3
Dülmener Wildpferd (<i>Equus ferus caballus</i>)	2
Muli (<i>Equus a. f. asinus x E. f. caballus</i>)	1
Somali-Wildesel (<i>Equus africanus somalicus</i>)	2
Przewalski-Pferd (<i>Equus przewalskii</i>)	1
Panzernashorn (<i>Rhinoceros unicornis</i>)	1
Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	1
Schneeleopard (<i>Panthera uncia</i>)	4
Nasenbär (<i>Nasua nasua</i>)	4
Waldhund (<i>Speothos venaticus</i>)	1
Erdmännchen (<i>Suricata suricatta</i>)	9
Fennek (<i>Vulpes zerda</i>)	1
Mähnenwolf (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	1
Asiatischer Elefant (<i>Elephas maximus</i>)	2
Zweifingerfaultier (<i>Choloepus didactylus</i>)	4
Klippschliefer (<i>Procavia capensis</i>)	9
Trampeltier (<i>Camelus bactrianus</i>)	2
Alpaka (<i>Vicugna pacos</i>)	2

Art	Anzahl
Vikunja (<i>Vicugna vicugna</i>)	1
Schwäbisch-Hällisches Schwein (<i>Sus scrofa domestica</i>)	12
Hirscheber (<i>Babyrousa babyrussa</i>)	1
Pekari-Schwein (<i>Pecari tajacu</i>)	1
Okapi (<i>Okapia johnstoni</i>)	3
Mesopotamischer Damhirsch (<i>Dama d. mesopotamica</i>)	7
Bongo (<i>Tragelaphus eurycerus</i>)	1
Kleiner Kudu (<i>Tragelaphus imberbis</i>)	1
Bezoarziege (<i>Capra aegagrus cretica</i>)	11
Schneeziege (<i>Oreamnos americanus</i>)	4
Alpensteinbock (<i>Capra ibex</i>)	6
Zwergziege (<i>Capra aegagrus f. hircus</i>)	9
Takin (<i>Budorcas taxicolor</i>)	1
Markhor (<i>Capra falconeri</i>)	9
Skudde (<i>Ovis orientalis aries</i>)	10
Mähnenschaf (<i>Ammotragus lervia</i>)	3
Mufflon (<i>Ovis orientalis musimon</i>)	5
Kamerunschaf (<i>Ovis orientalis aries</i>)	7
Hutiaconga (<i>Capromys pilorides</i>)	4
Gundi (<i>Ctenodactylus gundi</i>)	6
Flachland-Viscacha (<i>Lagostomus maximus</i>)	3
Greifstachler (<i>Coendu prehensilis</i>)	1
Großer Tenrek (<i>Tenrec ecaudatus</i>)	5
Igeltanrek (<i>Echinops telfairi</i>)	2
Nilflughund (<i>Rousettus aegyptiacus</i>)	12
Flugfuchs (<i>Pteropus vampyrus</i>)	18
Rotes Riesenkänguruh (<i>Macropus rufus</i>)	3
Gesamt	280

Zoologische Einrichtung B

Tab. A4: Anzahl der beprobten Säugetiere für Rachentupfer

Art	Anzahl
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	8
Gesamt	8

Tab. A5: Anzahl der beprobten Säugetiere (Mammalia) für Rektaltupfer

Art	Anzahl
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	10
Gesamt	10

Anhänge

Zoologische Einrichtung C

Tab. A6: Anzahl der beprobten Säugetiere (Mammalia) für Rachen- und Rektaltupfer

Art	Anzahl
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	12
Gesamt	12

Zoologische Einrichtung D

Tab. A7: Anzahl der beprobten Vögel (Aves) für Rachen- und Rektaltupfer

Art	Anzahl
Humboldt-Pinguin (<i>Spheniscus humboldti</i>)	2
Kronenkränich (<i>Balearica pavonina</i>)	1
Eurasischer Kranich (<i>Grus grus</i>)	1
Graukopfkasarka (<i>Tadorna cana</i>)	2
Witwenpfeifgans (<i>Dendrocygna viduata</i>)	3
Chileflamingo (<i>Phoenicopterus chilensis</i>)	10
Rosalöffler (<i>Ajaia ajaja</i>)	8
Roter Sichler (<i>Eudocimus ruber</i>)	6
Ecuadoramazone (<i>Amazona autumnalis lilacina</i>)	1
Graupapagei (<i>Psittacus erithacus</i>)	1
Gesamt	35

Tab. A8: Anzahl der beprobten Säugetiere (Mammalia) für Rachtentupfer

Art	Anzahl
Dromeda (<i>Camelus dromedarius</i>)	3
Afrikanische Zwergziege (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	31
Hartmann-Bergzebra (<i>Equus zebra hartmannae</i>)	1
Südl. Streifengnu (<i>Connochaetes taurinus taurinus</i>)	1
Watussirind (<i>Bos primigenius taurus</i>)	2
Mara (<i>Dolichotis patagonum</i>)	1
Fennek (<i>Vulpes zerda</i>)	1
Eurasischer Luchs (<i>Lynx lynx</i>)	1
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	1
Weißhandgibbon (<i>Hylobates lar</i>)	2
Braunkopflammeraffe (<i>Ateles fusciceps</i>)	2
Katta (<i>Lemur catta</i>)	1
Totenkopffäffchen (<i>Saimiri sciureus</i>)	1
Goldgelbes Löwenäffchen (<i>Leontopithecus rosalia</i>)	1
Gesamt	49

Tab. A9: Anzahl der beprobten Säugetiere (Mammalia) für Rektaltupfer

Art	Anzahl
Dromeda (<i>Camelus dromedarius</i>)	3
Afrikanische Zwergziege (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	31
Hartmann-Bergzebra (<i>Equus zebra hartmannae</i>)	1
Südl.Streifengnu (<i>Connochaetes taurinus taurinus</i>)	1
Watussirind (<i>Bos primigenius taurus</i>)	1
Mara (<i>Dolichotis patagonum</i>)	1
Fennek (<i>Vulpes zerda</i>)	1
Eurasischer Luchs (<i>Lynx lynx</i>)	1
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	1
Weißhandgibbon (<i>Hylobates lar</i>)	2
Braunkopfklammeraffe (<i>Ateles fusciceps</i>)	2
Katta (<i>Lemur catta</i>)	1
Totenkopffäffchen (<i>Saimiri sciureus</i>)	1
Goldgelbes Löwenäffchen (<i>Leontopithecus rosalia</i>)	1
Gesamt	48

Zoologische Einrichtung E

Tab A10: Anzahl der beprobten Vögel (Aves) für Rachen- und Rektaltupfer

Art	Anzahl
Rosaflamingo (<i>Phoenicopterus roseus</i>)	2
Gesamt	2

Tab. A11: Anzahl der beprobten Säugetiere (Mammalia) für Rachen- und Rektaltupfer

Art	Anzahl
Alpaka (<i>Vicugna pacos</i>)	3
Skudde (<i>Ovis orientalis aries</i>)	7
Kamerunschaf (<i>Ovis ammon f. aries</i>)	7
Zwergziege (<i>Capra aegagrus f. hircus</i>)	12
Hausesel (<i>Equus asinus asinus</i>)	4
Shetlandpony (<i>Equus ferus caballus</i>)	5
Gesamt	38

Zoologische Einrichtung F

Tab A12: Anzahl der beprobten Vögel (Aves) für Rachen- und Rektaltupfer

Art	Anzahl
Rosapelikan (<i>Pelecanus onocrotatus</i>)	6
Meerespelikan (<i>Pelecanus occidentalis</i>)	4
Rotfußseriema (<i>Cariama cristata</i>)	1
Südl.Hornrabe (<i>Bucorvus leadbeateri</i>)	1
Marabbu (<i>Leptoptilos crumeniferus</i>)	2
Heiliger Ibis (<i>Threskiornis aethiopicus</i>)	2
Waldrapp (<i>Geronticus eremita</i>)	5
Kronenkranich (<i>Balearica pavonina</i>)	3
Dunkelroter Ara (<i>Ara chloroptera</i>)	3
Großer Soldatenara (<i>Ara ambiguus</i>)	1
Graupapagei (<i>Psittacus erithacus</i>)	5
Rotmilan (<i>Milvus milvus</i>)	1
Steppenadler (<i>Aquila nipalensis</i>)	1
Wüstenbussard (<i>Parabuteo unicinctus</i>)	1
Bartkauz (<i>Strix nebulosa</i>)	1
Uhu (<i>Bubo bubo</i>)	1
Karakara (<i>Caracara plancus</i>)	1
Gelbkopfgeier (<i>Cathartes burrovianus</i>)	1
Rabengeier (<i>Coragyps atratus</i>)	2
Gesamt	42

Tab A13: Anzahl der beprobten Säugetiere (Mammalia) für Rachen- und Rektaltupfer

Art	Anzahl
Alpaka (<i>Vicugna pacos</i>)	2
Schaf (<i>Ovis orientalis aries</i>)	4
Ziege (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	4
Hausschwein (<i>Sus scrofa domestica</i>)	2
Nasenbär (<i>Nasua nasua</i>)	2
Weißkopfsaki (<i>Pithecia pithecia</i>)	2
Springtamarin (<i>Callimico goeldii</i>)	4
Lisztäffchen (<i>Saguinus oedipus</i>)	4
Katta (<i>Lemur catta</i>)	4
Roter Vari (<i>Varecia rubra</i>)	3
Gesamt	31

9.2 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
BCG	Bacille Calmette-Guérin
bp	Basenpaare
ct-Wert	Cycle threshold-Wert
d	Tag
DR-Region	Direct-Repeat-Regionen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EAZA	European Association of Zoo and Aquaria
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEP	European Endangered Species Program
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme-linked immunosorbent spot
ESB	European StudBook
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
HIV	human immunodeficiency virus
HPC	Hexadecylpyridiniumchlorid
IFN _γ	Interferon-gamma
IS	Insertionssequenz
IZW	Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung Berlin
KbE	Koloniebildende Einheit
M.	<i>Mycobacterium</i>
MAA	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>avium</i>
MAC	<i>Mycobakterium avium</i> complex
MAH	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>hominissuis</i>
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>
MDR-TB	Multi-drug resistant-Tuberkulose
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex

Anhänge

MIRU	Mycobacterial interspersed repetitive unit
MOTT	Mycobacteria other than tuberculosis
NaOH	Natriumhydroxid
NALC	N-Acetyl-L-Cystein
NTM	Nichttuberkulöse Mykobakterien
OTF-Status	Officially bovine tuberculosis free-Status
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PPD	Purified Protein Derivative
qPCR	Quantitative PCR
rpm	Rotation per minute
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RKI	Robert Koch-Institut
s	Sekunde
SDS	Natrium-Laurylsulfat
SNP	Single nucleotide polymorphism
spp.	Spezies (pluralis)
subsp.	Subspezies
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Tuberkulose
TBC	Tuberkulosekomplex
TDR-TB	Total drug resistant-Tuberkulose
VNTR	Variable number of tandem repeats
WHO	World health organisation
XDR-TB	Extensively-drug resistant-Tuberkulose
ZN-Färbung	Ziehl-Neelsen-Färbung

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. L Hölzle für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas bedanken und vor allem für die zahlreichen Stunden seiner Zeit, die er der Betreuung und Korrektur dieser Arbeit gewidmet hat. Einen großen Dank für die Geduld und die immer offene Bürotür hinter der man Zuspruch, Aufmunterung und fachliche Unterstützung fand.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Alex Greenwood für die Betreuung und Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei der Grimminger Stiftung bedanken für die finanzielle Unterstützung und das Möglichmachen dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Wolfram Rietschel, Dr. Tobias Knauf-Witzens und Dr. Annika Weigold für die enge und kollegiale Zusammenarbeit, die fachliche und berufliche Unterstützung und die vielen schönen Stunden bei dem ein oder anderen Gläschen Wein.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei dem Team der Tierkrankenstation der Wilhelma für die tolle Zusammenarbeit und vor allem bei Martina Balz für ihren besonderen Einsatz.

Ein weiterer Dank gilt Elisabeth Blaschke und Beate Filohn für fachlichen Austausch und Hilfe im Labor, Dr. Werner Philipp für das Zukommen lassen diverser Fachliteratur, René Eling, Christina Zübert und Nadja Hartmann für viele konstruktive Diskussionen und manch schöne Mittags-/Kaffeepause und Stefanie Lassek für deinen Optimismus und die Motivation für den sportlichen Ausgleich („Mens sana in corpore sano“).

Allen Zoos und Tierparks, die diese Arbeit unterstützt haben danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit, sowie Dr. Irmgard Moser (FLI) für einige hilfreiche Anmerkungen und Hinweise im Vorfeld und Dr. Andreas Salditt (STUA Aulendorf) für die Einarbeitung und die Hilfestellung bei der Durchführung der Diagnostik.

Ein großer Dank geht auch an Dr. Frank Salchow und Kerstin Giese für das Korrekturlesen.

Mein größter Dank geht an meine Familie, die mich immer unterstützt und ermutigt hat und an Kevin Rüffer, dass du mir den Rücken freigehalten hast und immer für mich da warst.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, 01.03.2018

Annike Maja Salchow



9 783863 878870
mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-887-0