

INHALTSVERZEICHNIS

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

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

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

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