

Begründungspapier zur Einstufung des Stammes *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2 in Risikogruppe 2 nach BioStoffV

Stand Dezember 2013

Die Gattung *Mycobacterium*

Die Gattung *Mycobacterium* wurde bereits 1896 von Lehmann und Neumann gültig beschrieben, umfasst heute mehr als 130 Arten (Spezies) und ist das einzige Genus der 1897 von Chester vorgeschlagenen Familie *Mycobacteriaceae*.

Der **natürliche Standort** der meisten Mitglieder dieser Gattung ist die freie Natur, wo sie vor allem im Erdboden und im Oberflächenwasser angetroffen werden (Magee & Ward, 2012). Einige Arten leben allerdings ausschließlich als obligate Parasiten im geschädigten Körpergewebe des Menschen und verschiedener tierischer Wirtsorganismen. Am bekanntesten als gefährliche **menschliche Krankheitserreger** sind *Mycobacterium leprae*, der Erreger des seit dem Altertum gefürchteten Aussatzes, und *Mycobacterium tuberculosis*, der immer noch weltweit verbreitete, menschliche Tuberkuloseerreger. Ebenso bekannt in der Humanmedizin ist aber auch *Mycobacterium bovis*, der Erreger der Rindertuberkulose (Karlson & Lessel, 1970), der als typischer **Zoonoseerreger** leicht vom Rind auf den Menschen übertragen werden kann. Es gibt außerdem eine nennenswerte Zahl weiterer *Mycobacterium*-Arten, die Mensch und Tier ebenfalls befallen können. Dazu gehören nicht nur die phylogenetisch äußerst nahe mit *M. bovis* und *M. tuberculosis* (Lehmann & Neumann, 1896) verwandten, obligat pathogenen Spezies *Mycobacterium africanum* (in Afrika vorkommende Variante von *M. tuberculosis*) (Castets et al., 1969), *Mycobacterium caprae* (Erreger der Tuberkulose von Ziegen und einer Reihe anderer Tierarten) (Aranaz et al., 2003), *Mycobacterium microti* (Erreger der Wühlmaus/Wildnagertuberkulose) (Reed, 1957) und *Mycobacterium pinnipedii* (Erreger der Robbentuberkulose) (Cousins et al., 2003), sondern auch eine größere Zahl weiterer Mykobakterien, die überwiegend als opportunistische Krankheitserreger zu gelten haben (Magee & Ward, 2012). Die oben genannten Tuberkuloseerreger werden auch unter dem Begriff „**Mycobacterium-tuberculosis-Komplex**“ zusammengefasst. Sie unterscheiden sich zwar in einigen wenigen phänotypischen Merkmalen und ihren bevorzugten Wirtsspezies voneinander, besitzen aber identische 16S rRNA-Gen- und IS-Sequenzen. Ihre DNA-DNA-Homologie liegt bei 99,9-100%, so dass man sie auch als Standort- und/oder Pathovarietäten derselben Spezies auffassen kann (Magee & Ward, 2012).

Mykobakterien besitzen einige **auffällige Eigenschaften**: Sie sind zwar prinzipiell grampositive, stäbchenförmige Bakterien; wie der Namensbestandteil „Myko-“, (griechisch: mykes = Pilz) zum Ausdruck bringt, können sie aber gelegentlich verzweigte Wuchsformen und sogar myzelartige Strukturen sowie ledrige Oberflächenhäutchen in flüssigen Kulturen ähnlich den „echten“ Pilzen ausbilden, ohne dabei aber eine biologische Verwandtschaft zu diesen Mikroorganismen zu besitzen. Außerdem sind sie ungewöhnlich reich an wachsartigen Lipiden, besonders auf und in der Zellwand, deren charakteristischer Bestandteil die sogenannten **Mykolsäuren** sind. Dies sind α -verzweigte, β -hydroxylierte Fettsäuren, die auch bei einigen anderen Bakteriengattungen vorkommen, aber bei Mykobakterien besonders langkettige, verzweigte Moleküle aus 60 bis 90 C-Atomen bilden. Die Wachsschicht macht die Mykobakterienzellen ausgesprochen hydrophob, was nicht nur ihre Anfärbung mit wasserlöslichen Farben behindert, sondern auch eine erhebliche Resistenz gegen verschiedene Umwelteinflüsse (z.B. kationische Detergenzien, manche Desinfektionsmittel, Austrocknung) bedingt und offenbar auch wenigstens teilweise für das sehr langsame Wachstum einiger Arten verantwortlich ist.

Die prinzipiell schlechte Anfärbbarkeit macht man sich für eine praktisch sehr hilfreiche Spezialfärbung, die **ZIEHL-NEELEN-Färbung**, nutzbar: Durch Erhitzen der Färbelösung erhöht sich die Fluidität der Wachsschicht und lässt den Farbstoff (klassisch: Fuchsin) gut in die Zellen eindringen. Nach Erkalten durch Abspülen schließen die erstarrten Wachse dann die Farbe fest ein, so dass sie sich nicht leicht wieder herauslösen lässt. Selbst mit verdünnter Säure (1%ige Schwefelsäure) oder Salzsäure-Alkohol kann sie in kurzer Zeit nicht ausgewaschen werden, was bei fast allen anderen Bakterien leicht gelingt, so dass sich mit dieser Färbung Mykobakterien einfach an ihrer Rotfärbung erkennen lassen, besonders wenn vorhandene weitere Bakterien und zelluläre oder amorphe, andere organische Strukturen mittels einer kontrastierenden, sogenannten Gegenfärbung (z.B. mit Methylenblau) sichtbar gemacht werden. Da sich die Mykobakterien durch Säure- oder Säure-Alkohol-Behandlung nicht oder nur schwer entfärben lassen, nennt man sie **säurefest** bzw. säurealkoholfest; dieser Eigenschaft kommt, da sie leicht nachzuweisen ist, große diagnostische Bedeutung zu.

Anhand der **Vermehrungsgeschwindigkeit** lassen sich langsam (sichtbare Koloniebildung erst nach sieben oder mehr Bebrütungstagen) und schnell wachsende (sichtbare Koloniebildung nach weniger als sieben Bebrütungstagen) Mykobakterien unterscheiden. Die meisten typischen menschlichen Krankheitserreger einschließlich *Mycobacterium bovis* gehören zur Gruppe der langsam wachsenden Mykobakterien (Magee & Ward, 2012).

Der *Mycobacterium-bovis*-Wildtyp

Die formale Erstbeschreibung der Spezies *Mycobacterium bovis* erfolgte erst 1970 durch Karlson und Lessel, obwohl Th. Smith bereits 1896 und 1898 dargelegt hatte, dass sich die Erreger der menschlichen und bovinen Tuberkulose deutlich voneinander unterscheiden. Unter „Vorwegnahme“ der heute bekannten, äußerst engen genetischen Verwandtschaft mit *M. tuberculosis* prägten Lehmann und Neumann 1907 den Begriff „*Mycobacterium tuberculosis* Typus *bovinus*“ und Bergey et al. 1934 (zitiert nach Euzéby, 2012) die Bezeichnung „*Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*“. Die erst Anfang dieses Jahrhunderts vorgeschlagene Reklassifizierung als „*Mycobacterium bovis* subsp. *bovis*“ (Niemann et al., 2002) wurde wieder hinfällig, nachdem die zweite Subspezies dieser Art, „*Mycobacterium bovis* subsp. *caprae*“, zu einer eigenständigen Spezies erhoben worden war (Aranaz et al., 2003).

Das vorliegende Dossier für *Mycobacterium bovis* enthält alle wichtigen Daten zur umfassenden Charakterisierung dieser Bakterienart; die Daten machen darüber hinaus deutlich, warum der Wildtyp dieser Spezies wie *M. tuberculosis* in Risikogruppe 3 eingestuft wurde. Auf viele der bakteriologischen Details des Dossiers kann hier Bezug genommen werden, ohne sie im Einzelnen wiederholen zu müssen.

Im Zusammenhang dieses Dossiers ist es aber sinnvoll, wichtige Informationen zur **Pathogenität** von *Mycobacterium bovis* erneut aufzugreifen, weil daran zu bemessen ist, ob und inwieweit sich die BCG-Impfstämme von *Mycobacterium bovis* vom Wildtyp der Spezies unterscheidet und ob ggf. gefundene Unterschiede ausreichen, um die BCG-Stämme in eine andere als die Risikogruppe 3 einzustufen.

Mycobacterium bovis ist **obligat pathogen** für **Rinder** und eine Vielzahl weiterer Wirbeltiere, insbesondere Säugetiere (Haus-, Zoo- und Wildtierarten) sowie für den **Menschen** und ruft bei diesen **Tuberkulose** hervor. Die Spezies ist im Allgemeinen für Tiere virulenter als *M. tuberculosis*, aber weniger virulent für den Menschen. Besonders empfänglich für eine experimentelle *M.-bovis*-Infektion sind Kälber, Kaninchen und Meerschweinchen, die rasch und schwer erkranken. Geringer ausgeprägte Pathogenität besteht für Hamster und Mäuse und sehr geringe für Katzen, Hunde, Pferde und Ratten. Geflügel wird üblicherweise nicht befallen, aber wohl Papageien und wahrscheinlich Raubvögel (Magee & Ward, 2012; Sattelmair, 2005).

M. bovis ist primär der Erreger der **Rindertuberkulose**, die wegen der grauen, perlenartigen Knötchen auf serösen Häuten wie dem Lungenfell (Pleura) auch Perlsucht genannt wird (Müller, 1950). Beim **Menschen** äußert sich eine Infektion mit *M. bovis* am häufigsten als **Lymphknotentuberkulose** im Hals- („Halsdrüsentuberkulose“) oder Abdominalbereich („Darmdrüsen- oder Mesenteriallymphknotentuberkulose“), seltener als Lungen- oder Nierentuberkulose. **Hauttuberkulose** durch *M. bovis* ist als Berufskrankheit von **Metzgern** und **Tierärzten** bekannt, kommt aber heute in Mitteleuropa praktisch nicht mehr vor (Müller, 1950; Sattelmair, 2005).

Wie bei menschlichen Infektionen mit *M. tuberculosis* lassen sich bei der Erkrankung des mit *M. bovis* infizierten Rindes mehrere **Stadien** unterscheiden:

Im **ersten Stadium** entwickelt sich eine Entzündung an der Eintrittspforte (auch beim Rind meist die Lunge) und in den regionären Lymphknoten (Primärkomplex). Diese kann unbemerkt völlig ausheilen oder wie bei der menschlichen Tuberkulose in eine lang dauernde Latenz übergehen. Die Tuberkulinreaktion wird dabei wie beim Menschen positiv.

Das **zweite (subprimäre) Stadium**, das bei unzureichender Abwehr des befallenen Rindes auftritt, ist durch Erregeraussaat (Bakteriämie) und Streuung in innere Organe gekennzeichnet (Frühgeneralisation). Dabei entwickeln sich entweder vereinzelt oder sehr zahlreich (Miliartuberkulose) typische Tuberkuloseknötchen (Perlsucht). Auch in diesem Stadium ist klinische Abheilung möglich!

Das **dritte Stadium (Postprimärtuberkulose)** entsteht durch endogene Reaktivierung oder Superinfektion und führt durch Ausbreitung entlang vorgebildeter Kanalwege (z.B. Bronchien, Milchausführungsgänge im Euter) zur isolierten chronischen Organtuberkulose (z.B. Lungentuberkulose, Geschlechtstuberkulose, Eutertuberkulose). Eine Beteiligung der regionären Lymphknoten fehlt.

Das **vierte Stadium** wird auch **Niederbruchphase** genannt und führt wegen schlechter Immunlage zum Übergreifen (lympho-, hämatogen) auf viele Organe (Spätgeneralisation – Miliartuberkulose, *Pneumonia caseosa*, *Mastitis caseosa*) und endet häufig tödlich (Köpke et al., 2012; Sattelmair, 2005).

Die **aerogene Erregerübertragung** durch Einatmen von „Tröpfchenkernen“ (< 5µm im Durchmesser), welche das erkrankte Rind aushustet, oder von infektiösem Stallstaub ist auch beim **Rind** der epidemiologisch wichtigste Übertragungsweg (Sattelmair, 2005). Dabei kommt dem Erreger seine ausgeprägte Trocknungsresistenz zugute. Das Rind kann den Erreger aber auch durch Verschlucken, nicht nur von erregerhaltiger Milch, sondern ebenso von kontaminiertem Futter oder Wasser, aufnehmen (Sattelmair, 2005).

Für den **Menschen** ist **Milch** (Rohmilch und Rohmilchprodukte) von Kühen mit Eutertuberkulose die wichtigste Infektionsquelle; der vorherrschende Infektionsweg ist also peroral-alimentär mit dem Mund als Eintrittspforte. Eine aerogene Erregerübertragung kam früher in erster Linie bei Landwirten und deren Angehörigen sowie in Schlachtbetrieben vor (Bange et al., 2012; Böttger, 2001; Sattelmair, 2005). Außer über Milch kann das tuberkulöse Rind die Erreger nämlich auch über **Kot**, **Urin** und **Genitalsekrete** ausscheiden, was zu hohen Erregerkonzentrationen in Aerosolen in der Umgebung kranker Tiere führen kann (Sattelmair, 2005). Ausnahmsweise kann *M. bovis* auch über die Haut durch **Inokulation** übertragen werden, wenn es zu Verletzungen mit einem scharfen oder spitzen, kontaminierten Gegenstand (z.B. bei der Schlachtung oder der tierärztlichen Untersuchung) gekommen ist (Diel et al., 2011).

M. bovis ist ein typischer **Zoonoseerreger**, der vom Tier auf den Menschen und umgekehrt übertragen werden kann: **Hauptwirt** ist das **Rind**; viele andere Haus-, Nutz- und Wildtiere

können aber ebenfalls erkranken und zur Infektionsquelle werden. Nach der weitgehenden Tilgung der primären Rindertuberkulose wurden erst in den letzten Jahrzehnten **wild lebende Tiere** als relevante **Infektionsquellen** für erneut aufgetretene, enzootische Rindertuberkulosefälle identifiziert: In Nordamerika waren das z.B. **Hirsche**, in Großbritannien und Irland **Dachse**, in Kontinentaleuropa **Wildschweine**, in Neuseeland **Opossums** und in Südafrika **Büffel** (Abernethy et al., 2013; Fitzgerald & Kaneene, 2012; Ramsey & Cowan, 2003; Sattelmair, 2005). Darüber hinaus blieb in manchen Entwicklungsländern wie Äthiopien die Durchseuchung der dortigen Zebu-Rinderherden in Milcherzeugungsbetrieben mit einer Prävalenz von 50% außerordentlich hoch (Firdessa et al., 2012). Eine – wenn auch heute in Mitteleuropa seltene – Infektionsquelle für das Rind stellen schließlich Menschen mit reaktivierter, offener boviner Tuberkulose dar (Sattelmair, 2005).

In Deutschland war die Bedeutung der Rindertuberkulose bis Mitte des 20. Jahrhunderts mit bis zu **60% infizierter Rinderbestände** für die menschliche Gesundheit erheblich. Es wurden deshalb große Anstrengungen unternommen, die Krankheit zunächst einzudämmen und dann zu tilgen, und gleichzeitig durch konsequente Pasteurisierung der in den Handel kommenden Milch die Ansteckungsgefahr für den Menschen, insbesondere für Kleinkinder, zu minimieren. Die ehemalige BRD galt seit 1962 als rindertuberkulosefrei, die ehemalige DDR erst seit 1970; Gesamtdeutschland ist seit 1997 durch die Europäische Union amtlich als rindertuberkulosefrei anerkannt (= bei mindestens 99,9% der Rinderbestände einer Region oder eines Landes dürfen im Rahmen jährlicher Untersuchungen seit ≥ 10 Jahren Tuberkulosen durch *M. bovis* und *M. caprae* nicht mehr nachweisbar sein) (Moser, 2012). Unter den 167.954 deutschen Rinderhaltungsbetrieben wurden im Jahr 2011 aber immerhin fünf Betriebe identifiziert, bei denen Rindertuberkulose aufgetreten war. In den Jahren 2008/9 und 2012/3 kam es sogar zu größeren Ausbrüchen, ohne dass dadurch aber der Status „rindertuberkulosefrei“ verloren ging (Köpke et al., 2012; Moser, 2012; Bericht Ärzte-Zeitung online, 2009; Bericht Augsburgener Allgemeine Zeitung, 2012).

In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts waren **menschliche Infektionen mit *M. bovis*** häufig und machten mehr als 10% aller menschlichen Tuberkulosefälle aus, die damals insgesamt eine hohe Prävalenz aufwiesen. In den letzten Jahren lag der Anteil boviner Tuberkulosen bei starkem allgemeinem Rückgang der Erkrankung nur noch bei etwa 2%, und dabei dürfte es sich im Wesentlichen um Reaktivierungen oder importierte Infektionen gehandelt haben (Moser, 2012). Ähnliche Verhältnisse gelten prinzipiell für die U.S.A. (durchschnittlicher Anteil der *M.-bovis*-Infektionen beim Menschen 1,5%) und andere Länder mit vergleichbarem Lebensstandard. Eine auffällig hohe und zwischen 1994 und 2005 sogar ansteigende Inzidenz von bovinen menschlichen Tuberkulosen wurde allerdings in San Diego, Kalifornien, und Umgebung mit 0,65/100.000 Einwohner 1994 und 0,93/100.000 Einwohner 2005 beobachtet, was fast ausschließlich (>90%) auf Einwohner mit spanisch-sprachiger Herkunft und in erheblichem Umfang (25%) auf deren Kinder zurückging (LoBue et al., 2003; Rodwell et al., 2008). Dieser bemerkenswerte Endemieherd konnte einerseits auf die weiterhin erhebliche Verbreitung der Rindertuberkulose im angrenzenden Mexiko (Tijuana) und andererseits auf die Vorliebe der aus Mexiko stammenden, amerikanischen Bevölkerung für mexikanische, nicht-pasteurisierte Milch und mexikanischen Rohmilchkäse zurückgeführt werden (Rodwell et al., 2008). Wegen der Seltenheit ansteckungsfähiger boviner Tuberkulosen des Menschen in Mitteleuropa spielt heute die „Rückinfektion“ tuberkulosefreier Rinderbestände durch den infizierten Menschen, die zum Wesen einer Zoonose gehörte und in den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts 20-50% ausgemacht haben soll (Sattelmair, 2005), keine Rolle mehr.

Aktuelle Angaben zur **Mortalität** und **Letalität** von **menschlichen *M.-bovis*-Infektionen** sind wegen der heutigen Seltenheit der entsprechenden Erkrankung in Deutschland nicht verfügbar. In einer Studie über *M.-bovis*-Infektionen aus dem Raum San Diego, Kalifornien (Rodwell et al., 2008), lag die Gesamtletalität aller Tuberkuloseerkrankungen vor oder während der Behandlung bei 9,8%. Dabei war die Wahrscheinlichkeit, vor Abschluss der Therapie zu

sterben, bei den *M.-bovis*-Patienten 2,55 mal höher als bei den *M.-tuberculosis*-Patienten (LoBue et al., 2005; Rodwell et al., 2008).

Mortalität und Letalität **tierischer** Tuberkuloseerkrankungen sind schwer einzuschätzen: Tuberkulöse Rinder werden seit vielen Jahren unmittelbar nach Feststellung der Infektion ausgemerzt, bevor der natürliche Tod oder gar die Heilung eintritt. Eine Studie an wild lebenden Opossums in Neuseeland (Ramsey & Cowan, 2003) über 2,5 Jahre ergab, dass die mittlere Überlebenszeit von Opossums mit klinischer Tuberkulose 4,7 Monate betrug. Die zusätzliche Mortalität durch klinische Tuberkulose wurde auf 1,08-2,38 pro Jahr geschätzt.

Der G+C-Gehalt des *M.-bovis*-Genoms beträgt 65,63 mol% (Euzéby, 2012; Magee & Ward, 2012). Die EMBL Sequence Accession no. für die Sequenz des **vollständigen Genoms** des *M.-bovis*-Stammes AF2122/97 (= voll virulentes Isolat von einer Kuh mit verkäsender Lungentuberkulose) ist BX248333 (Garnier et al., 2003). Die Sequence Accession no. für das 16S rRNA-Gen lautet: AB292583 bzw. AF547903 (Typstamm ATCC 19210) (Euzéby, 2012; Magee & Ward, 2012). *M. bovis* besitzt ein 4,3 Mb großes, zirkuläres Chromosom (4.345.492 bp) mit 3.952 Proteine kodierenden Genen einschließlich eines Prophagen und 42 IS-Elementen (Stamm AF2122/97) (Garnier et al., 2003); auf der Nukleotid-Ebene besteht >99,95% Identität mit *M. tuberculosis* (Chromosom 4,4 Mb groß – 4.419.977 bp – mit einem G+C-Gehalt von 65,61 mol%). Das Genom von *M. bovis* ist damit – als Folge von 11 Deletionen (Größe ~1 bis 12,7 kb) – etwas kleiner als das von *M. tuberculosis* H37Rv (Garnier et al., 2003; Zheng et al., 2008). Nur ein Genlocus (TbD1), der bei *M. bovis* vorhanden ist, fehlt bei den meisten *M.-tuberculosis*-Stämmen (Garnier et al., 2003).

Die von *M. bovis* und von *M. tuberculosis* hervorgerufenen Infektionskrankheiten unterscheiden sich in ihrem klinischen Bild und ihrem Verlauf nicht wesentlich voneinander, was im Hinblick auf die enge genetische Verwandtschaft der beiden Erreger auch nicht verwundern kann. Erst die vollständige Sequenzierung beider Genome (Cole et al., 1998; Garnier et al., 2003; Zheng et al., 2008) erbrachte eindeutigere Hinweise auf die genetische Basis der trotzdem vorhandenen Unterschiede im Wirtsspektrum, in der Virulenz und in einigen wenigen physiologischen Eigenschaften zwischen diesen beiden Mitgliedern des *M.-tuberculosis*-Komplexes.

In diesem Komplex besitzt *M. bovis* das kleinste Genom, aber das breiteste Wirtsspektrum, was eine „Feinanpassung“ an bestimmte Wirtsstandorte widerspiegeln könnte (Brosch et al., 2001). Dabei führten jedoch offenbar keine zusätzlichen neuen *M.-bovis*-spezifischen Virulenzgene zu einer Wirtsadaptation, sondern vielmehr ein durch zahlreiche **Deletionseignisse** bedingter Genverlust und eine durch **Sequenzvariation** geänderte Genexpression (Brosch et al., 2001, 2002; Garnier et al., 2003). Aufgrund dieser Deletionen besitzt *M. bovis* eine um ca. 1 bis 12,7 kb geringere Gesamt-Genomgröße; auf Nukleotidebene besteht jedoch eine >99,5%ige Homologie mit dem Genom von *M. tuberculosis* (Garnier et al., 2003).

DNA-Hybridisierungsexperimente (DNA microarrays) ergaben zunächst **14 variable DNA-Regionen (Region-of-Difference(RD)-Regionen)**, an welchen deletionsbedingter DNA-Verlust bei *M. bovis* BCG (Impfstämme „Pasteur“ und „Japan“) im Vergleich zu *M. tuberculosis* H37Rv zu verzeichnen war (Behr et al., 1999; Brosch et al., 2002; Gordon et al., 1999). Interessanterweise fehlen viele dieser RD-Regionen (nämlich RD 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 und 13) auch in „klassischen“ *M.-bovis*-Isolaten von Rindern aus Argentinien, Holland, England und Spanien sowie vom Menschen aus Spanien (multiresistenter *M.-bovis*-Stamm); den attenuierten *M.-bovis*-BCG-Stämmen fehlen darüber hinaus nicht nur die RD 1, 2 und 14 (Brosch et al., 2002), sondern weitere RD, die bei *M.-bovis*-Wildtypstämmen vorhanden sind (Behr et al. 1999)! Inzwischen wurden insgesamt sogar 42 RD-Regionen identifiziert (Brosch et al., 2007), die ~170 Gene betreffen, von denen der Stamm BCG Pasteur 1173P2 133 Gene verloren hat.

M. bovis bildet wie *M. tuberculosis* **keine Exotoxine** und seine **Pathogenität** beruht wie die von *M. tuberculosis* auf dem Zusammenspiel **zahlreicher, verschiedener Virulenzfaktoren**. Eine zentrale Rolle spielen hierbei Zellwandkomponenten, zahlreiche Enzyme und sekretorische Proteine, deren Funktion ausführlich im *M.-tuberculosis*-Dossier beschrieben wurde. Ein solcher Komplex aus Proteinen bzw. Enzymen, der für die Pathogenität von *M. bovis* und *M. tuberculosis* essentiell ist, wird in einer der oben genannten RD-Regionen, der **RD 1-Region**, kodiert. Dieses neun Gene umfassende Sekretionssystem (ESX-1 Locus) beinhaltet die beiden Hauptvirulenzfaktoren ESAT-6 und CFP-10 (Guo et al. 2012). Die letzteren beiden Proteine sind hauptsächlich bei der Translokation der Mykobakterien vom Phagosom ins Zytosol und der anschließenden intrazellulären Ausbreitung beteiligt. Eine Deletion dieser Region findet sich bei allen attenuierten *M.-bovis*-BCG-Stämmen (Lewis et al., 2003; Mahairas et al., 1996; Romagnoli et al., 2012; Saviola & Bishai, 2006; Stoop et al., 2011).

Es ist bemerkenswert, dass auch im ***M.-bovis*-Wildtyp-Genom** einige Deletionen und damit einhergehende Sequenzvariationen innerhalb der ESAT-6-Protein-Genfamilie entdeckt wurden (Garnier et al., 2003). So führt ein Genverlust in einer der Enhancer-Strukturen im ESX-1-Operon zu einer geringeren Transkriptionsrate und damit niedrigeren Expression des ESX-1-Sekretionssystems (Hunt et al., 2012).

Weitere Deletionen betreffen Sequenzbereiche der DNA, die wichtige Zellwandkomponenten, Oberflächenproteine und Genexpression-regulierende Proteine kodieren. Hierbei sind Gene betroffen, die für die Synthese und den Transport von Polyketiden (*pks*-Gene) und komplexen Lipiden verantwortlich sind (Garnier et al., 2003). Die letzteren **Phthiocerol-Dimycocerosate (PDIMs)** und **Glycosylphenol-PDIM (phenolische Glykolipide – PGL)** sind Resultat eines komplizierten Biosyntheseweges und zählen zu den Hauptvirulenzfaktoren von *M. bovis* (Camacho et al., 1999; Cox et al., 1999; Garnier et al., 2003; Hotter & Collins, 2011; Hotter et al., 2005).

Auch die bei *M. tuberculosis* als Virulenzfaktoren beschriebenen PE-PGRS- und PPE-Proteine, die an der Zelladhäsion und Immunmodulation beteiligt sind (Banu et al., 2002; Brennan et al., 2001), zeigen in ihrer Gensequenz bei *M. bovis* eine ausgeprägte Sequenzvariation (Brosch et al., 2001; Cole et al., 1998; Garnier et al., 2003).

Wie bei *M. tuberculosis* führt **Resistenz gegen Isoniazid** auch bei *M. bovis* zu einem Verlust der Virulenz für Meerschweinchen und Kaninchen sowie zu einem Verlust der Katalase-Aktivität (Magee & Ward, 2012).

Histologisch finden sich beim Rind wie beim Menschen zwei Reaktionsformen: die exsudative und die produktive (proliferative) Reaktionsform.

Die **exsudative Reaktionsform** entsteht als Folge einer *M.-bovis*-Infektion bei Tieren und Menschen, die vorher noch nicht mit dem Erreger in Kontakt gekommen waren oder als Folge einer Spätgeneralisation in der Niederbruchsphase. Diese Reaktionsform ist gekennzeichnet durch akute bis subakute Entzündungszeichen mit Exsudatbildung und Ansammlung polymorphkerniger Leukozyten und äußert sich beim Rind typischerweise als azinöse und lobärverkäsende Lungentuberkulose, die auch als galoppierende Tuberkulose oder Niederbruchsform bezeichnet wird (Sattelmair, 2005).

Die **produktive (granulomatöse) Reaktionsform** entwickelt sich als Ausdruck der aktivierten zellulären Immunabwehr bei Individuen, die bereits einen Primärkomplex hinter sich haben. Die zugehörige Läsion ist der – als Namensgeber der Krankheit fungierende – Tuberkel, der Makrophagen charakteristischer Morphologie, sogenannte Epitheloidzellen, enthält. Im Zentrum des Tuberkels verschmelzen diese Epitheloidzellen zu mehrkernigen LANGERHANSschen Riesenzellen (Böttger, 2001; Sattelmair, 2005). Im nekrotischen

Inneren der granulomatösen Herde entwickelt sich durch Zerfall der abgestorbenen Zellmasse eine amorphe, käsige Substanz, die verkäsende Nekrose. Verkäsende Läsionen in der Lunge oder den regionären Lymphknoten können unter Fibrosierung und Verkalkung gegebenenfalls mit erheblicher Narbenbildung ausheilen, enthalten aber meist weiterhin vermehrungsfähige Erreger, die Ausgangspunkt einer Reaktivierungstuberkulose werden können (Bange et al., 2012; Böttger, 2001; Sattelmair, 2005; Ziegler et al., 2012).

Während die Erstinfektion des Rindes überwiegend aerogen die Lunge betrifft, infizieren sich Menschen meist schon im Kindesalter vor allem peroral-alimentär durch Verzehr von Rohmilch oder Rohmilchprodukten tuberkulöser Kühe. Verlauf und Prognose der in der Regel resultierenden Lymphknotentuberkulosen (Mesenterial-, seltener Hals- oder Achsellymphknotentuberkulose) sind oft so günstig, dass sie zeitweilig als harmlos und sogar nützlich (Impfeffekt!) angesehen wurden (Müller, 1950). Die klinisch manifeste bovine Tuberkulose des erwachsenen Menschen, die oft in Kombination mit einer HIV-Infektion beobachtet wird, ist dagegen sogar deutlich schwieriger zu behandeln als eine analoge *M.-tuberculosis*-Erkrankung und führt auch in einem höheren Prozentsatz zum Tode der betroffenen Patienten (LoBue & Moser, 2005).

Bei der alimentären *M.-bovis*-Infektion der Lymphknoten von Kindern spielen **prädisponierende Faktoren (Risikofaktoren)** im Vergleich zu *M.-tuberculosis*-Infektionen kaum eine Rolle. Sie gewinnen aber an Bedeutung, wenn es um die Reaktivierung einer bovinen Tuberkulose geht (Bang et al., 2012; Böttger, 2001).

Hinsichtlich der Details der tierischen und menschlichen Tuberkuloseerkrankungen durch *M. bovis*, der durch sie verursachten pathologisch-anatomischen Veränderungen, ihrer Diagnose und Therapie sei an die ausführliche Darstellung im Dossier für *Mycobacterium bovis* verwiesen.

***Mycobacterium bovis* BCG (Bacille Calmette-Guérin)**

Mycobacterium bovis BCG (Bacille Calmette-Guérin) ist die Stammbezeichnung für einen attenuierten Lebendimpfstoff gegen Tuberkulose. Er wurde von dem Mikrobiologen Albert Calmette und dem Veterinärmediziner Camille Guérin zwischen 1908 und 1921 an den Pasteur-Instituten in Lille und Paris durch ununterbrochen fortlaufende Subkulturpassagen von *M. bovis* auf Kartoffelscheiben, die mit Glycerin und Rindergalle getränkt waren, erhalten (Calmette, 1927; Calmette & Guérin, 1908). Seit 1928 ist er vom Völkerbund als Impfstoff anerkannt (Liu et al., 2009).

Bis in die 1960er Jahre wurde der Impfstoff durch kontinuierliche Subkultivierung eigener BCG-Tochterstämme in verschiedenen Laboratorien gewonnen, was zu einer zunehmenden **Heterogenität der BCG-Stämme** (Brosch et al., 2007; Liu et al., 2009; Walker et al., 2010) führte, die sich auch in ihrer unterschiedlichen Schutzwirkung äußerte (Behr, 2002). Die Sequenzen der vollständigen Genome verschiedener BCG-Stämme zeigten inzwischen außerdem, dass sich auf DNA-Ebene korrespondierende Unterschiede nachweisen lassen (Brosch et al., 2007; Mahairas et al., 1996; Pan et al., 2011; Seki et al., 2009). Allein die American Type Culture Collection (ATCC) listet in ihrem gegenwärtig gültigen Katalog neun verschiedene BCG-Stämme auf, was das Ausmaß der möglichen Heterogenität unterstreicht, ohne dabei aber alle weltweit vorhandenen BCG-Varianten zu repräsentieren.

Um eine weitere Diversifizierung der Impfstämme zu unterbinden, galt seit den 1960er Jahren die Empfehlung, bei der Impfstoffherstellung nicht mehr als 12 Subkulturpassagen von einer konservierten Ausgangspräparation vorzunehmen. Der Stamm *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2, dessen Genom von Brosch et al. (2007) vollständig sequenziert wurde, entspricht z.B. einem Stamm, der nach insgesamt 1.113 Subkulturpassagen konserviert in die Sammlung des

Institut Pasteur aufgenommen wurde (Brosch et al., 2007) und auch als lyophilisierter Impfstoff zur Verfügung steht (Brosch et al., 2000).

Vor diesem Hintergrund wäre es nicht angemessen, alle vorhandenen BCG-Stämme pauschal in eine Risikogruppe einstuft zu wollen. Wegen ihrer **phänotypischen und genetischen Heterogenität** darf man vielmehr nur genau definierte und individuell untersuchte Tochterstämme, deren Eigenschaften umfassend und im Detail bekannt sind, für eine Einstufung vorsehen. Der Stamm *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 ist eindeutig ein derart umfassend charakterisierter Stamm. In dem zugehörigen Datenblatt wird der Stamm ATCC 35734 auch als BCG Pasteur bezeichnet und müsste deshalb mit dem vorstehend genannten Stamm weitgehend oder sogar vollständig identisch sein.

Im Gegensatz zum Stamm *M. tuberculosis* H37Ra, dessen Attenuierung allein anhand der stark verminderten krankmachenden Wirkung auf verschiedene Versuchstiere gesichert wurde, wurde *M. bovis* BCG bereits unmittelbar, nachdem Calmette und Guérin sich im Tierversuch von der Attenuierung ihres Stammes überzeugt hatten, als **attenuierter Lebendimpfstoff** am Menschen angewendet. Ab 1921 wurde die Impfung zunächst als **orale Lebendvaccine** bei Säuglingen in den ersten 10 Lebenstagen erprobt (3 mal 10 mg BCG in 48stündigem Abstand mit Milch); seit 1924 impfte man subkutan, wobei es zu wochenlangen Eiterungen kam. Deshalb ging man bald zur **intrakutanen Applikation** über, die wesentlich besser vertragen wurde (Müller, 1950). Es wird geschätzt, dass bis heute weltweit wenigstens drei Milliarden Impfdosen zur Immunisierung gegen Tuberkulose zum Einsatz kamen (Brosch et al., 2000). In der überwältigenden Mehrzahl der Fälle wurde die BCG-Impfung gut vertragen, so dass die Attenuierung von *M. bovis* BCG als milliardenfach am Menschen erwiesen gelten kann.

Die **Schutzwirkung** der Impfung gegen Lungentuberkulose hat sich allerdings als sehr variabel erwiesen (Fine, 1995). Zuverlässiger war dagegen der Schutz vor den disseminierten Erkrankungsformen Miliartuberkulose und *Meningitis tuberculosa* (Bloom & Fine, 1994). Da außerdem bald beobachtet wurde, dass bei Tuberkulin-positiven Impfungen überschießende Lokalreaktionen an der Injektionsstelle des Impfstoffs auftraten, wurde die Impfung vornehmlich bei Neugeborenen – und sonst nur nach Tuberkulintestung – eingesetzt. Die Impfung verhindert nicht eine Infektion mit *M. tuberculosis*, sondern in erster Linie die Entstehung einer Miliartuberkulose oder tuberkulösen Meningitis im Kindesalter; Geimpfte sollen aber auch etwa 7-20mal seltener an klinisch manifester Tuberkulose erkranken als Nichtgeimpfte (Böttger, 2001).

Die überzeugende **Verträglichkeit** des Impfstoffs besagt allerdings nicht, dass die verschiedenen Tochterstämme von *M. bovis* BCG ihre Pathogenität für den Menschen völlig verloren haben. Schon früh wurde nämlich beobachtet (s.o.), dass es gelegentlich an der Impfstelle, vor allem bei versehentlich subkutaner Injektion, zu lokalen Nekrosen mit wochenlanger eiternder Ulkusbildung, zur Entstehung von Abszessen und zu erheblichen anschließenden Vernarbungen kommen kann (Böttger, 2001; Müller, 1950). Bei Vorliegen eines schweren angeborenen Immundefektes verbietet sich die BCG-Impfung völlig, weil es bei diesen Kindern zu schwersten disseminierten Infektionen mit tödlichem Ausgang kommen kann. Dasselbe gilt für erworbene Immundefizienzen (z.B. AIDS) (Böttger, 2001).

Neben lokalisiert bleibenden Infektionsprozessen an der BCG-Injektionsstelle sind **Lymphadenitiden** besonders häufig und lange bekannt und werden in einer Häufigkeit von 0,1 bis 0,3/1000 beobachtet (Govindarajan & Chai, 2011; Krysztopa-Grzybowska et al., 2012). Diese treten nicht nur bei versehentlich geimpften HIV-Infizierten (Vera et al., 2012), sondern auch bei vor der Impfung völlig gesunden Kindern auf (Bukhari et al., 2012) und betreffen meist die axillären, aber auch die supraklavikulären oder beide Lymphknotensysteme. Außerdem kann die BCG-Impfung im Rahmen einer Generalisierung auch zu Osteomyelitiden führen (Al-Jassir et al., 2012; Cuello-García et

al., 2013). Da die lokalisierten Prozesse einschließlich der Lymphadenitiden in der Regel innerhalb von 4 bis 6 Monaten auch ohne antimikrobielle Therapie ausheilen, sind Antituberkulotika nur zur Behandlung der schweren Erkrankungen von Immunsupprimierten erforderlich (Cuello-García et al., 2013).

Die „Restpathogenität“ der BCG-Impfstämme hat auch bei uns wieder größere Beachtung und praktische Bedeutung erlangt, seit zur **Behandlung von Frühformen des Blasenkrebses** (*Carcinoma in situ*) die **intravesikale Instillation** einer BCG-Aufschwemmung verwendet wird. Diese Krebstherapieform hat sich als schonend, effizient und nebenwirkungsarm erwiesen. In Einzelfällen kann sie aber zur Aussaat der Mykobakterien mit sepsisähnlichen Symptomen (Dammert et al., 2013) oder unter dem Bilde einer vertebrealen Osteomyelitis, Diszitis und mykotischem Aortenaneurysma kommen (Samadian et al. 2013). Ekzematische Hautveränderungen im Gefolge einer BCG-Instillation wurden ebenfalls beschrieben (Lowther et al., 2013).

Die vorstehend zitierten Veröffentlichungen belegen eindeutig, dass BCG-Impfstämme nicht völlig avirulent sind, sondern sich ein deutliches pathogenes Potenzial erhalten haben, das besonders bei Menschen mit Immundefizienz voll zur Entfaltung kommt. Dies ist auch der Grund dafür, dass die BCG-Impfung heute nur noch in Ländern mit hoher Tuberkulose-Inzidenz und -Prävalenz zum Einsatz kommt, weil nur hier Nutzen und Nebenwirkungsrate in einem angemessenen Verhältnis stehen. Sollen BCG-Stämme oder einer von ihnen in eine Risikogruppe eingestuft werden, ist demnach zu prüfen, wie ausgeprägt diese „Restpathogenität“ ist und wie sie im Hinblick auf die Definition der Risikogruppen in der Biostoffverordnung zu bewerten ist. Dazu ist es hilfreich wenn nicht unerlässlich, die heute verfügbaren Genom-Sequenzierungsdaten und ihre Interpretation heranzuziehen.

Auf DNA-Ebene sind die BCG-Stämme *M. bovis* nicht ähnlicher als *M. tuberculosis*. Anhand von Pyrolyse-Massenspektrometrie-Untersuchungen ließ sich sogar zeigen, dass die Ähnlichkeit von BCG-Stämmen mit Labor-adaptierten *M.-tuberculosis*-Stämmen größer ist als mit kürzlich aus Krankheitsprozessen isolierten *M.-bovis*- und *M.-tuberculosis*-Stämmen (Magee & Ward, 2012; Pan et al., 2011), was die Auswirkung längerer Subkultivierung ebenso unterstreicht wie die nahe Verwandtschaft der Mitglieder des *M.-tuberculosis*-Komplexes untereinander.

Die **vollständige Sequenzierung** des Genoms von ***M. bovis* BCG Pasteur 1173P2** (Brosch et al., 2007) ergab ein zirkuläres Chromosom in einer Größe von 4.374.522 bp. Es ist damit trotz verschiedener Deletionen fast 30 kb größer als das Chromosom des *M.-bovis*-Wildtypstammes AF2122/97 (Größe: 4.345.492 bp) (Garnier et al., 2003), offenbar als Folge von zwei voneinander unabhängigen Tandem-Verdoppelungen DU1 und DU2 (Brosch et al., 2000). Es ist aber immer noch deutlich kleiner als das Genom von *M. tuberculosis* (Größe: 4.419.977 bp) (Cole et al., 1998).

Das BCG-Genom enthält 3.945 Protein-kodierende Gene, von denen 58 in zwei Kopien vorliegen, da es zu den beiden genannten Tandem-Verdoppelungen (DU1 und DU2) gekommen war (Brosch et al., 2007). DU1 ist auf den Stamm BCG Pasteur beschränkt. DU2 kommt in vier Formen vor: DU2-I ist auf sogenannte frühe BCG-Stämme wie BCG Japan beschränkt, während DU2-III und DU2-IV in sogenannten späten Vakzinen vorhanden sind. Das Gen für die Glyzerin-3-Phosphatdehydrogenase (*glpD2*) ist eines der drei einzigen Gene, die allen vier DU2-Varianten gemeinsam sind (Brosch et al., 2007). Daraus hat man geschlossen, dass BCG-Stämme höhere Konzentrationen dieses Enzyms benötigen, um auf Glyzerin wachsen zu können. Als Folge der Verdoppelungen ist Stamm BCG Pasteur diploid für 58 Protein-kodierende und zwei tRNA-Gene. 48 repetitive Elemente korrespondieren mit Insertionssequenzen und Repetitionen, aber mit keinem der bei *M. tuberculosis* bekannten Prophagen (Brosch et al., 2007). Insgesamt fanden sich mehr als 350 Einzel-

Nukleotid-Polymorphismen zwischen BCG-Stämmen und *M. bovis*; 170 davon waren spezifisch für BCG und fehlten bei *M. bovis* und *M. tuberculosis* (Pan et al., 2011).

Wie bereits bei der Darstellung der *M.-bovis*-Wildtypstämme ausgeführt, betrifft der deletionsbedingte DNA-Verlust von *M. bovis* im Vergleich zu *M. tuberculosis* eine ganze Reihe von RD-Regionen. Bei *M. bovis* BCG fehlen alle 14 zunächst beschriebenen RD-Regionen, also auch RD 1, 2 und 14, die beim Wildtyp vorhanden sind (Brosch et al., 2002). Damit dürfte die genetische Ursache für die Attenuierung von *M. bovis* BCG im Gegensatz zu *M. tuberculosis* H37Ra in erster Linie in diesen umfangreicheren Deletionen zu suchen sein. Es konnte sogar gezeigt werden, dass die experimentelle Deletion der RD 1-Region bei *M. tuberculosis* zu BCG-ähnlicher Attenuierung führte (Lewis et al., 2003).

Die bei BCG-Stämmen deletierte RD 1-Region kodiert, wie oben angegeben, ein neun Gene umfassendes Sekretionssystem (ESX-1 Locus), zu dem die Hauptvirulenzfaktoren ESAT-6 und CFP-10 gehören (Guo et al., 2012). Demnach ist bei BCG-Stämmen die Translokation der Mykobakterien vom Phagosom ins Zytosol und deren anschließende intrazelluläre Ausbreitung behindert (Lewis et al., 2003; Mahairas et al., 1996; Romagnoli et al., 2012; Saviola & Bishai, 2006; Stoop et al., 2011). Allerdings bewirkt die Wiedereinführung von ESX-1 in BCG Pasteur keine vollständige Wiederherstellung der Virulenz, so dass man weitere Gendefekte bei den BCG-Impfstämmen annehmen muss.

Von den 14 neuen, bis 2007 beschriebenen RD-Regionen betreffen und beeinträchtigen 11 PE-PRGS- oder PPE-Gene (Brosch et al., 2007) und eine andere korrespondiert mit einer 57-bp-Tandem-Verdoppelung in *leuA*. Variationen in den PE-PRGS- und PPE-Genen dürften sich auf die Zelladhäsion und immunmodulierende Fähigkeit der BCG-Stämme auswirken (Banu et al., 2002; Brennan et al., 2001); sieben Gene dieser Genfamilie zeigten nämlich bei BCG eine verminderte Expression (Brosch et al., 2007).

Weitere genetische Unterschiede zwischen BCG-Stämmen und *M. tuberculosis* und *M. bovis* (Wildtyp) betreffen Sigma-Faktoren, die essentielle Bestandteile der RNA-Polymerase darstellen und die Promotor-Selektivität bestimmen (Helmann, 2002; Karls et al., 2006; Sun et al., 2004). Die Sigma(σ)-Faktoren mit extrazytoplasmatischer Funktion sind kleine regulatorische Proteine, deren Sequenz sich erheblich von anderen σ -Faktoren unterscheidet. Drei von 10 dieser letzteren σ -Faktoren sind bei *M. bovis* BCG Pasteur verloren gegangen oder inaktiviert. Das *sigK*-Gen weist bei BCG Pasteur eine „Missense-Mutation“ in seinem Startkodon auf, was zu einem Verlust der Expression der wichtigen Antigene MPB70 und MPB83 führt (Brosch et al., 2007).

Zusätzlichen Einfluss auf die Virulenz hat eine Inaktivierung im Bereich des Zwei-Komponenten-Systems PhoP-PhoR bei BCG-Stämmen (Chesne-Seck et al., 2008; Gonzalo Asenso et al., 2006; Walker et al., 2006). Die Inaktivierung dieses Systems führt zum Verlust von Diacetyl-Trehalosen, Polyacetyl-Trehalose und Sulfolipiden, ohne dass allerdings deren Bedeutung für die Virulenz völlig geklärt ist. Es könnte allerdings sein, dass ein inaktives PhoP-PhoR-System bei BCG-Stämmen die Phosphat-Aufnahme behindert, so dass ihr Wachstum durch niedrige Phosphatkonzentrationen begrenzt werden könnte (Brosch et al., 2007). Ein anderer Regulations-Locus ist *BCG3734*, der das cAMP-Rezeptorprotein Crp kodiert. Verlust dieses Gens könnte den Intermediärstoffwechsel bei Glukosemangel und das Wachstum unter mikroaerophilen Bedingungen beeinträchtigen (Brosch et al. 2007).

Die größten Unterschiede in der Genexpression zwischen BCG-Pasteur und *M. bovis* Wildtyp zeigte das *mceG*-Gen, das für die Funktion verschiedener *mce*-Loci essentiell ist, die für den Zelleintritt verantwortlich sind. Mutation von *mceG* führte bei *M. tuberculosis* zu einer drastischen Attenuierung, so dass seine Repression bei BCG eine weitere Erklärung für dessen Attenuierung liefert (Brosch et al., 2007).

Gutachterliche Bewertung der nachgewiesenen phänotypischen und genetischen Veränderungen des *Mycobacterium-bovis*-Stammes BCG Pasteur 1173P2 (ATCC 35734) im Vergleich zum Typstamm der Spezies *Mycobacterium bovis* (ATCC 19210)

Calmette und Guérin hatten einen *M.-bovis*-Stamm durch 13-jährige (zwischen 1908 und 1921), fortlaufende Subkultivierung auf mit Glycerin und Rindergalle getränkten Kartoffelscheiben so verändert, dass er sich im Tierversuch als attenuiert erwies, ohne dass man damals allerdings auch nur ansatzweise sagen konnte, worauf diese Attenuierung beruhte. Vor dem Hintergrund heutiger Rechts- und Ethiknormen erscheint es uns deshalb geradezu heroisch, dass Calmette (Calmette, 1927) praktisch umgehend zur Anwendung am Menschen übergang und der Völkerbund bereits 1928 den ursprünglichen oder möglicherweise einen analogen Stamm als Lebendimpfstoff gegen Tuberkulose zur Anwendung am Menschen anerkannte (Liu et al., 2009).

Dieser Bacille Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG) genannte Impfstamm wurde zunächst in vielen verschiedenen Laboratorien unter nicht völlig einheitlichen Bedingungen subkultiviert, was zu zunehmender Heterogenität sowohl hinsichtlich der Schutzwirkung als auch hinsichtlich der Attenuierung führte (Behr, 2002; Brosch et al., 2007; Liu et al., 2009; Walker et al., 2010). Deshalb wäre es nicht angemessen, alle vorhandenen BCG-Stämme pauschal einer Risikogruppe zuzuordnen. Hier wurde deshalb der besonders umfassend untersuchte Stamm *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 für eine Einstufung ausgewählt, dem offenbar der Stamm ATCC 35734 entspricht. Bei diesem Stamm handelt es sich darüber hinaus um den als Lyophilisat erhältlichen und weiterhin besonders in Entwicklungsländern verwendeten, aktuellen Tuberkulose-Impfstoff.

Damit kann seine Attenuierung phänotypisch weiterhin als vielfach bewiesen gelten und muss an dieser Stelle nicht nochmals hinterfragt werden. Die genetische Basis für diese Attenuierung konnte inzwischen durch die vollständige Sequenzierung der Genome von *M. tuberculosis* und *M. bovis* sowie die Genomsequenzvergleiche mehrerer BCG-Stämme zunehmend erhellt werden (Brosch et al., 2007; Cole et al., 1998; Garnier et al., 2003). Bei diesen genetischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass bereits das Genom des *M.-bovis*-Wildtyps im Vergleich zu dem von *M. tuberculosis* eine ganze Reihe von Deletionen im Bereich sogenannter RD-Regionen aufweist, wodurch das *M.-bovis*-Genom etwas kleiner ist als das *M.-tuberculosis*-Genom. Die DNA-DNA-Ähnlichkeit beider Genome beträgt trotzdem >99,95%, was die äußerst enge genetische Verwandtschaft beider Spezies unterstreicht.

BCG-Stämme, insbesondere *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2, weisen zusätzliche Deletionen in Virulenz-relevanten Genombereichen auf, womit sich die Attenuierung dieser Stämme im Vergleich zum *M.-bovis*-Wildtyp heute zu einem guten Teil erklären lässt (Brosch et al., 2007). Erstaunlich erscheint dabei aber zunächst, dass das BCG-Genom (BCG Pasteur 1173P2) trotz zusätzlicher Deletionen fast 30 kb größer ist als das des Wildtyps. Dieser Größenunterschied ließ sich auf die zwei genannten, voneinander unabhängige Tandem-Verdopplungen (DU1 und DU2) zurückführen (Brosch et al., 2000). Da sich das Gen für die Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase (*glpD2*) bei den DU2-Varianten findet, hat man geschlossen, dass BCG-Stämme höhere Konzentrationen dieses Enzyms (Diploidie für *glpD2*) benötigen, um auf Glycerin wachsen zu können.

Zentrale Bedeutung für die Virulenzabschwächung von BCG-Stämmen hat die **Deletion der RD1-Region**, die ein Sekretionssystem kodiert (ESX-1 Locus), zu dem die Hauptvirulenzfaktoren ESAT-6 und CFP-10 gehören (Guo et al., 2012). Zusätzlichen Einfluss auf die Attenuierung haben **Beeinträchtigungen der PE-PRGS- oder PPE-Gene**, einiger **σ -Faktor-Gene**, des **PhoP-PhoR-Systems** sowie insbesondere auch des ***mceG*-Gens** (Brosch et al., 2007).

Trotz der **phänotypisch wie genotypisch gut dokumentierten Attenuierung** von *M. bovis* BCG bleibt zu prüfen, welches Ausmaß dieser Attenuierung zukommt, denn davon hängt ab, in welche Risikogruppe BCG-Stämme und insbesondere *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 einzustufen sind. Dazu muss, anders als bei *M. tuberculosis* H37Ra, nicht auf – für ihre Bewertung immer mit einer gewissen Unsicherheit belastete – Tierversuchsergebnisse zurückgegriffen werden, sondern man kann sich unmittelbar auf die Erfahrungen stützen, die mit milliardenfachen BCG-Impfungen des Menschen gewonnen wurden.

Diese zeigen, dass praktisch alle bekannten BCG-Stämme **nicht als völlig avirulent** angesehen werden können. Denn die subkutane anstelle der intrakutanen Injektion des Lebendimpfstoffs führt bereits zu einer nennenswerten Lokalreaktion mit **Nekrose** und wochenlang eiternder **Ulkusbildung, Abszessen** und erheblicher anschließender **Vernarbung** (Böttger, 2001; Müller, 1950), was als Folge einer deutlichen nekrotisierenden Infektion durch den Impfstamm zu deuten ist.

Ausgeprägter äußert sich das verbliebene pathogene Potenzial der BCG-Stämme, wenn sie – unbeabsichtigt – bei Menschen mit angeborenen oder erworbenen (z.B. durch HIV-Infektion) Immundefekten zur Anwendung kommen, bei denen es zu schwersten **disseminierten Infektionen** mit tödlichem Ausgang kommen kann (Böttger, 2001).

Auch bei Impfungen, insbesondere den in erster Linie geimpften Kindern, mit intaktem Immunsystem entwickeln sich nicht ganz selten (0,1 bis 0,3/1000 Geimpfte) **Lymphadenitiden** (Bukhari et al., 2012; Govindarajan & Chai, 2011; Krysztopa-Grzybowska et al., 2012). Diese betreffen meist die axillären, aber auch die supraklavikulären oder beide Lymphknotensysteme. Schließlich kann die BCG-Impfung im Rahmen einer Generalisierung auch zu **Osteomyelitiden** führen (Al-Jassir et al., 2012; Cuello-Garcia et al., 2013). Die lokalisierten Infektionsprozesse einschließlich der Lymphadenitiden heilen allerdings in der Regel innerhalb von 4 bis 6 Monaten klinisch, meist unter Hinterlassung lebender, „verkapselter“ *M.-bovis*-BCG-Bakterien, spontan auch ohne spezifische Therapie ab, so dass man diese „Nebenwirkung“ der Impfung toleriert hatte und weiter toleriert, solange und wo ein hohes Erkrankungsrisiko an Tuberkulose bestand bzw. besteht. Dabei darf aber nicht unterschlagen werden, dass „ruhende“ BCG-Bakterien später im Leben des Impflings reaktiviert werden und zur Erkrankung führen können, wenn seine Immunabwehr stark geschwächt sein sollte.

Die Tatsache, dass BCG-Stämme einschließlich *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 ihre Virulenz keineswegs vollständig verloren haben, hat in neuerer Zeit auch in den Ländern, in denen die BCG-Impfung nicht mehr durchgeführt wird, wieder praktische Bedeutung erlangt, seit der Impfstoff zur Behandlung von Frühformen des Blasenkrebses (*Carcinoma in situ*) in die Harnblase instilliert wird. Denn als Folge dieser Behandlung wurden vereinzelt Generalisierungen mit septischen Symptomen (Dammert et al., 2013) oder unter dem Bilde einer vertebrealen Osteomyelitis, einer Diszitis oder eines mykotischen Aortenaneurysmas beobachtet (Samadian et al., 2013).

Einstufung des Stammes *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 in eine Risikogruppe

Der Stamm *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 ist außerordentlich umfassend phänotypisch und molekulargenetisch charakterisiert und ist als lyophilisierter Impfstoff im Arzneimittelhandel erhältlich. Seine Attenuierung kann deshalb als stabil und zuverlässig gesichert gelten. Wegen der Vielzahl der Deletionen und Punktmutationen muss mit einer Spontanremission nicht gerechnet werden.

Als ebenso zuverlässig gesichert muss aber angesehen werden, dass die BCG-Stämme einschließlich BCG Pasteur zu lokalen und sogar disseminierten, meist nekrotisierenden Entzündungsreaktionen bei Abwehrgesunden wie bei Immunsupprimierten führen können, die sogar lebensbedrohlich werden können. Daraus ergibt sich, dass *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 zwar deutlich attenuiert, aber nicht avirulent ist, so dass es sogar zu einer Reaktivierungsinfektion Jahre nach der Impfung kommen kann.

Wegen der deutlichen und zweifelsfrei bewiesenen Attenuierung im Vergleich zum *M.-bovis*-Wildtyp wäre also eine Einstufung des genannten BCG-Stammes in Risikogruppe 3 sicherlich nicht angemessen. Das nachweislich verbliebene pathogene Potenzial verbietet aber auch eine Einstufung des Impfstammes in Risikogruppe 1. Deshalb stuft der ABAS den Stamm *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2 in

Risikogruppe 2

ein.

Literatur

(siehe auch Literaturzitate im Dossier für *Mycobacterium bovis*)

- Abernethy, D. A., Upton, P., Higgins, I. M., McGrath, G., Goodchild, A. V., Rolfe, S. J., Broughan, J. M., Downs, S. H., Clifton-Hadley, R., Menzies, F. D., de la Rúa-Domenech, R., Blissitt, M. J., Duignan, A., & More, S. J. 2013. Bovine tuberculosis trends in the UK and the Republic of Ireland, 1995-2010. *Vet. Rec.* (Epub ahead of print)
- Al-Jassir, F. F., Aldeeri, R. A., Alsiddiky, A. M., & Zamzam, M. M. 2012. Osteomyelitis following Bacille Calmette-Guérin vaccination. *Saudi Med. J.* 33(1): 87-90.
- 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.
- Bange, F.-C., Hahn, H., Kaufmann, S. H. E., & Ulrichs, T. 2012. 41 Mykobakterien, in: Suerbaum, S., Hahn, H., Burchard, G.-D., Kaufmann, S. H. E., & Schulz, Th. (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 7. Aufl., pp. 341-355. Springer, Berlin-Heidelberg.
- Banu, S., Honore, N., Saint-Joanis, B., Philpott, D., Prevost, M.C., and Cole, S.T. 2002. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Mol. Microbiol.* 44(1), 9-19.
- Behr, M. A. 2002. BCG – different strains, different vaccines? *Lancet Infect. Dis.* 2: 86-92.
- Behr, M. A., Wilson, M. A., Gill, W. P., Salamon, H., Schoolnik, G. K., Rane, S., & Small, P. M. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284: 1520-1523.
- Bloom, B. R., & Fine, P. E. M. 1994. The BCG experience: implications for future vaccines against tuberculosis, in: Bloom, B. R. (Editor): *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*, pp. 531-557. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Böttger, E. C. 2001. 4.22 Die Familie der Mycobacteriaceae, in: Köhler, W., Eggers, H. J., Fleischer, B., Marre, R., Pfister, H., & Pulverer, G. (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Aufl., pp. 407-434. Urban & Fischer, München-Jena.
- Brennan, M. J., Delogu, G., Chen, Y., Bardarov, S., Kriakov, J., Alavi, M. and Jacobs, W. R. Jr. 2001. Evidence that mycobacterial PE-PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells, *Infect. Immun.* 69(12), 7326-7333.
- Brosch, R., Philipp, W. J., Stavropoulos, E., Colston, M. J., Cole, S. T., & Gordon, S. V. 1999. Genomic analysis reveals variation between *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the attenuated *M. tuberculosis* H37Ra strain. *Infect. Immun.* 67(11): 5768-5774.
- Brosch, R., Gordon, S. V., Buchrieser, C., Pym, A. S., Harnier, Th., & Cole, S. T. 2000. Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. *Yeast* 17: 111-123.
- Brosch, R., Gordon, S. V., Garnier, Th., Eiglmeier, K., Frigui, W., Valenti, P., Dos Santos, S., Duthoy, S., Lacroix, C., Garcia-Pelayo, C., Inwald, J. K., Golby, P., Garcia, J. N., Hewinson, R. G., Behr, M. A., Quail, M. A., Churcher, C., Barrell, B. G., Parkhill, J., & Cole, S. T. 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *PNAS* 104(13): 5596-5601.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., van Soolingen, D., and Cole, S.T. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *PNAS* 99(6), 3684-3689.
- Brosch, R., Pym, A. S., Gordon, S. V., & Cole, S. T. 2001. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends Microbiol.* 9(9): 452-458.
- Bukhari, E., Alzahrani, M., Alsubaie, S., Alrabiaah, A., & Alzamil, F. 2012. Bacillus Calmette-Guérin lymphadenitis: a 6-year experience in two Saudi hospitals. *Indian J. Pathol.*

- Microbiol. 55(2): 202-205.
- Calmette, A. 1927. La Vaccination Préventive Contre la Tuberculose. Masson, Paris. Calmette, A., & Guérin, C. 1908. Sur quelques propriétés du bacille tuberculeux culture sur la bile. C. R. Acad. Séances 147: 1456-1459.
- Camacho, L.R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B. and Guilhot, C. 1999. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis, Mol. Microbiol. 34(2), 257-267.
- Castets, M., Rist, N., & Boisvert, H. 1969. La variété africaine du bacille tuberculeux humain. Médecine d'Afrique Noire 16: 321-322.
- Chesne-Seck, M.-L., Barilone, N., Boudou, F., Gonzalo Asensio, J., Kolattukudy, P. E., Martín, C., Cole, S. T., Gicquel, B., Gopaul, D., N., & Jackson, M. 2008. A point mutation in the two-component regulator PhoP-PhoR accounts for the absence of polyketide-derived acetyltrehaloses but not that of phthiocerol dimycocerosates in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. J. Bacteriol. 190(4): 1329-1334.
- Chester, F. D. 1897. Report of the mycologist: bacteriological work. In: Delaware College of Agriculture Experimental Station 9th Annual Report. Mercantile Printing Co., Wilmington, DE, pp. 38-145.
- Cole, S.T, Brosch, R, Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E. 3rd, Tekaiia, F., Badcock, K., Basham ,D., Brown ,D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., & Barrell, B.G. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 393.
- Cousins, D. V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D. M., Butler, W. R., Dawson, D., Rodríguez, D., Loureiro, J., Romano, M. I., 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.
- Cox, J. S., Chen, B., McNeil, M., & Jacobs, W. R. Jr. 1999. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Nature 402: 79- 83.
- Cuello-García, C. A., Pérez-Gaxiola, G., & Jiménez Gutiérrez, C. 2013. Treating BCG-induced disease in children. Cochrane Database of Systematic Reviews 2013, Issue 1. Art. No. CD008300. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, NJ.
- Dammert, P., Boujaoude, Z., Rafferty, W., & Kass, J. 2013. Fever of unknown origin and pancytopenia caused by culture-proven delayed onset disseminated bacillus Calmette-Guérin (BCG) infection after intravesical instillation. BMJ Case Rep. pii: bcr2013008949. doi: 10.1136/bcr-2013-008949.
- Diel, R., Loytved, G., Nienhaus, A., Castell, S., Detjen, A., Geerdes-Fenge, H., Haas, W., Hauer, B., Königstein, B., Maffei, D., Magdorf, K., Priwitzer, M, Zellweger, J.- P., & Loddenkemper, R. 2011. Neue Empfehlungen für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose. Pneumologie 65: 359-378.
- Euzéby, J. F. 2012. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr>
- Fine, P. E. M. 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. Lancet 346: 1339-1345.
- Firdessa, R., Tschopp, R., Wubete, A., Sombo, M., Hailu, E., Erenso, G., Kiros, T., Yamuah, L., Vordermeier, M., Hewinson, R. G., Young, D., Gordon, S. V., Sahile, M., Aseffa, A., & Berg. S. 2012. High prevalence of bovine tuberculosis in dairy cattle in central Ethiopia: Implications for the dairy industry and public health. PLoS One 7(12): e52851.
- Fitzgerald, S. D., & Kaneene, J. B. 2012. Wildlife reservoirs of bovine tuberculosis worldwide: Hosts, pathology, surveillance, and control. Vet. Pathol. (Epub ahead of print).
- Fleischmann, R. D., Alland, D., Eisen, J. A., Carpenter, L., White, O., Peterson, J., DeBoy, R., Dodson, R., Gwinn, M., Haft, D., Hickey, E., Kolonay, J. F., Nelson, W. C., Umayam, L.

- A., Ermolaeva, M., Salzberg, S. L., Delcher, A., Utterback, T., Weidman, J., Khouri, H., Gill, J., Mikula, A., Bishai, W., Jacobs, W. R. Jr., Venter, J. C., & Fraser, C. M. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J. Bacteriol.* 184(19): 5479-5490.
- Garnier, Th., Eiglmeier, K., Camus, J.-C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P. R., Parkhill, J., Barrell, B. G., Cole, S. T., Gordon, S. V., & Hewinson, R. G. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *PNAS* 100(13): 7877-7882.
- Gonzalo Asensio, J., Maia, C., Ferrer, N. L., Barilone, N., Laval, F., Soto, C. Y., Winter, N., Daffé, M., Gicquel, B., Martín, C., & Jackson, M. 2006. The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 281(3): 1313-1316.
- Gordon, S. V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., & Cole, S. T. 1999. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol. Microbiol.* 32(3): 643-655.
- Govindarajan, K. K., & Chai, F. Y. 2011. BCG adenitis – need for increased awareness. *Malays. J. Med. Sci.* 18(2): 66-69.
- Guo, S., Xue, R., Li, Y., Wang, S.M., Ren, L., & Xu, J.J. 2012. The CFP10/ESAT6 complex of *Mycobacterium tuberculosis* may function as a regulator of macrophage cell death at different stages of tuberculosis infection. *Med. Hypoth.* 78 (3): 389-392.
- Helmann, J. D. 2002. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv. Microb. Physiol.* 46: 47-110.
- Hotter, G.S., and Collins, D.M. 2011. *Mycobacterium bovis* lipids: virulence and vaccines, *Vet. Microbiol.* 151, 91-98.
- Hotter, G. S., Wards, B. J., Mouat, P., Besra, G. S., Gomes, J., Singh, M., Bassett, R., Kawakami, P., Wheeler, P. R., de Lisle, G. W., & Collins, D. M. 2005. Transposon mutagenesis of Mb0100 at the *pp1-nrp* locus in *Mycobacterium bovis* disrupts phthiocerol dimycocerosates (PDIM) and glycosylphenol-PDIM biosynthesis, producing an avirulent strain with vaccine properties at least equal to those of *M. bovis* BCG. *J. Bacteriol.* 187(7): 2267-2277.
- Hunt, D.M., Sweeney, N.P., Mori, L., Whalan, R.H., Comas, I., Norman, L., Cortes, R., Arnvig, K.B., Davis, E.O., Stapleton, M.R., Green, J., and Buxton, R.S. 2012. Long-range transcriptional control of an operon necessary for virulence-critical ESX-1 secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 194(9), 2307-2320.
- Karls, R. K., Guarner, J., McMurray, D. N., Birkness, K. A., & Quinn, F.D. 2006. Examination of *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor mutants using low-dose aerosol infection of guinea pigs suggests a role for SigC in pathogenesis. *Microbiol.* 152: 1591-1600.
- Karlson, A. G., & Lessel, E. F. 1970. *Mycobacterium bovis* nom. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20(3): 273-282.
- Köpke, S., N. N., Graf von Westphalen, G., & Beutler, B. 2012. Tuberkulose des Rindes. http://flexikon.doccheck.com/de/Tuberkulose_des_Rindes
- Krysztopa-Grzybowska, K., Paradowska-Stankiewicz, I., & Lutyńska, A. 2012. The rate of adverse events following BCG vaccination in Poland. *Przegl. Epidemiol.* 66(3): 465-469.
- Lehmann, K. B., & Neumann, R. 1896. Atlas und Grundriss der Bacteriologie und (Hrsg.), München.
- Lehmann, K. B., & Neumann, R. O. 1907. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik, 4. Aufl., pp. 550-553. J. F. Lehmann, München
- Lewis, K.N., Liao, R., Guinn, K.M., Hickey, M.J., Smith, S., Behr, M.A., & Sherman, D.R. 2003. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics Bacille Calmette-Guérin attenuation. *J. Infect. Dis.* 187 (1): 117-123.
- Liu, J., Tran, V., Leung, A. S., Alexander, D. C., & Zhu, B. L. 2009. BCG vaccines: Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Hum. Vaccin.* 5: 70-78.

- LoBue, P. A., & Moser, K. S. 2005. Treatment of *Mycobacterium bovis* infected tuberculosis patients: San Diego County, California, United States, 1994-2003. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 9(3): 333-338.
- Lowther, C., Miedler, J. D., & Cockerell, C. J. 2013. Id-like reaction to BCG therapy for bladder cancer. *Cutis* 91(3): 145-146.
- Magee, J. G., & Ward, A. C. 2012. Family III. *Mycobacteriaceae* Chester 1897, 63^{AL} and Genus I. *Mycobacterium* Lehmann and Neumann 1896, 363^{AL}. In: Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Suzuki, K.-i., Ludwig, W., & Whitman, W. B. (Eds.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, Volume 5: The Actinobacteria, Part A. Springer, New York-Dordrecht-Heidelberg-London, pp. 312-375.
- Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C., & Stover, C.K. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J. Bacteriol.* 178 (5): 1274-1282.
- Moser, I. 2012. Tuberkulose bei Nutz- und Wildtieren. *Epid. Bull.* Nr. 12/2012, pp. 104-105.
- Müller, R. 1950. *Medizinische Mikrobiologie – Parasiten, Bakterien, Immunität*, 4. Aufl., pp. 275-287. Urban & Schwarzenberg, München-Berlin.
- 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.
- N. N. 2009. Rindertuberkulose im Allgäu. *Ärzte-Zeitung online*, 02. 09. 2009, 13:30 Uhr. <http://www.aerztezeitung.de/extras/druckansicht/?sid=563821&pid=563812>
- N. N. 2012. Tuberkulose bei Rinderherden im Allgäu entdeckt. *Augsburger Allgemeine* 20. 12. 2012, 17:02 Uhr. <http://www.augsburger-allgemeine.de/bayern/Tuberkulose-bei-Rinderherden-im-Allgäu>
- Pan, Y., Yang, X., Duan, J., Lu, N., Leung, A. S., Tran, V., Hu, Y., Wu, N., Liu, D., Wang, Z., Yu, X., Chen, C., Zhang, Y., Wan, K., Liu, J., & Zhu, B. 2011. Whole-genome sequences of four *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. *J. Bacteriol.* 193(12): 3152-3153.
- Ramsey, D., & Cowan, P. 2003. Mortality rate and movements of brushtail possums with clinical tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) infection. *N Z Vet. J.* 51(4): 179- 185.
- Reed, G. B. 1957. Genus *Mycobacterium* (species affecting warm-blooded animals except those causing leprosy, in: Breed, R. S., Murray, E. G. D., & Smith, N. R. (Eds.): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th Edition, pp. 703-704. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Rodwell, T. C., Moore, M., Moser, K. S., Brodine, S. K., & Strathdee, S. A. 2008. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 14(6): 909-916.
- Romagnoli, A., Etna, M. P., Giacomini, E., Pardini, M., Remoli, M. E., Corazzari, M., Falasca, L., Goletti, D., Gafa, V., Simeone, R., Delogu, G., Piacentini, M., Brosch, R., Fimia, G. M., & Coccia, E. M. 2012. ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *Autophagy* 8(9): 1357-1370.
- Samadian, S., Phillips, F. M., & Deeb, D. 2013. *Mycobacterium bovis* vertebral osteomyelitis and discitis with adjacent mycotic abdominal aortic aneurysm caused by intravesical BCG therapy: a case report in an elderly gentleman. *Age Ageing* 42(1): 129-131.
- Sattelmair, H. 2005. *Die Tuberkulose des Rindes – ein Beitrag zur Geschichte der Haustierkrankheiten*. Inaug.-Diss., Berlin (Journal-Nr.: 2940).
- Saviola, B. & Bishai, W. 2006. The Genus *Mycobacterium* – Medical, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. & Stackebrandt, E. (Eds.): *The Prokaryotes*, Vol. 3 part 6, pp. 919-933, Springer, New York.
- Seki, M., Honda, I., Fujita, I., Yano, I., Yamamoto, S., & Koyama, A. 2009. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine* 27(11): 1710-

1716.

- Smith, Th. 1896. Two varieties of the tubercle bacillus from mammals. *Trans. Assn. Am. Physicians* 11: 75-93.
- Smith, Th. 1898. A comparative study of bovine tubercle bacilli and of human bacilli from sputum. *Trans. Assn. Am. Physicians* 13: 417-470.
- Stoop, E.J.M., Schipper, T., Rosendahl Huber, S.K., Nezhinsky, A.E., Verbeek, F.J., Gurcha, S.S., Besra, G.S., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Bitter, W., & van der Sar, A.M. 2011. Zebrafish embryo screen for mycobacterial genes involved in the initiation of granuloma formation reveals a newly identified ESX-1 component. *Dis. Models & Mechanisms* 4: 526-536.
- Sun, R., Converse, P.J., Ko, C., Tyagi, S., Morrison, N.E., & Bishai, W.R. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor *sigC* is required for lethality in mice and for the conditional expression of a defined gene set. *Mol. Microbiol.* 52 (1): 25-38.
- Vera, J. H., Hill, S. C., & Rubinstein, L. 2012. Bacille Calmette-Guérin disease following Bacille Calmette-Guérin vaccination of an HIV-infected health-care worker. *Int. J. STD AIDS* 23(7): e1-2.
- Walker, K. B., Brennan, M. J., Ho, M. M., Eskola, J., Thiry, G., Sadoff, J., Dobbelaer, R., Grode, L., Liu, M. A., Fruth, U., & Lambert, P. H. 2010. The second Geneva Consensus: Recommendations for novel live TB vaccines. *Vaccine* 28(11): 2259- 2270.
- Walters, S. B., Dubnau, E., Kolesnikova, I., Laval, F., Daffé, M., & Smith, I. 2006. The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 60(2): 312- 330.
- Zheng, H., Lu, L., Wang, B., Pu, S., Zhang, X., Zhu, G., Shi, W., Zhang, L., Wang, H., Wang, S., Zhao, G., & Zhang, Y. 2008. Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS ONE* 3(6): e2375.
- Ziegler, R., Just, H.-M., Castell, S., Diel, R., Gastmeier, P., Haas, W., Hauer, B., Loytved, G., Mielke, M., Moser, L., Nienhaus, A., Richter, E., Rüden, H., Rüsck-Gerdes, S., Schaberg, T., Wischniewski, N., & Loddenkemper, R. 2012. Infektionsprävention bei Tuberkulose – Empfehlungen des DZK. *Pneumologie* 66: 269-282.