

„Frühdiagnostik von Infektionen mit *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) bei Rindern“

„*Early diagnosis of infection with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP) in cattle*“

FKZ

28-1-32.006-06

Laufzeit

01.04.2007 – 30.06.2010

Projektnehmer/Institution

Justus-Liebig-Universität Gießen,
Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde des Fachbereiches Veterinärmedizin sowie
Klinik für Wiederkäuer und Schweine (Innere Medizin und Chirurgie) und
Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere

Ansprechpartner

Prof. Dr. med. vet. Klaus Doll
Prof. Dr. med. vet. Rolf Bauerfeind
Prof. Dr. M. Bülte

Kooperationspartner

Friedrich-Loeffler-Institut,
Institut für molekulare Pathogenese
PD Dr. med. vet. Christian Menge
TransMIT GmbH Gießen und Marburg

Kurzfassung der Ergebnisse

MAP ist das ätiologische Agens der Paratuberkulose der Wiederkäuer, einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, die weltweit verbreitet und unheilbar ist. Aufgrund der vergleichbaren pathomorphologischen Veränderung der beim Menschen als Morbus Crohn (MC) bezeichneten chronisch entzündlichen Darmerkrankung wurde bereits zu Beginn des vorigen Jahrhunderts der Verdacht geäußert, dass Mykobakterien auch bei dieser Erkrankung eine Rolle spielen.

Im Rahmen der Entwicklung und Validierung von Nachweisverfahren für eine frühzeitige Diagnostik einer MAP-Infektion bei Kälbern wurden drei Longitudinalstudien (L1-L3) an Kälbern sowie verschiedene Kohortenstudien an Rindern und Kälbern vorgesehen. Die Rekrutierung der ersten sechs Versuchskälber (L1; negative Kontrollgruppe) gelang, nachdem sich vier von 16 Milchviehbetrieben serologisch, mikrobiologisch-kulturell und molekularbiologisch als MAP-unverdächtig einstufen ließen. Diese Betriebe dienten – nach erneuter Kontrolle – gleichermaßen für die Rekrutierung der Milchkälber für die L2- und die L3-Studie (Infektionsgruppen).

Sämtliche Kälber dieser beiden Gruppen konnten mit einer definierten Menge des hinsichtlich Identität, Vermehrungsfähigkeit und Reinheit überprüften Infektionsstammes MAP-K10 (BAA-968) erfolgreich infiziert werden. Bei allen Kälbern konnte zu dem jeweils in der Versuchsplanung festgelegten Zeitpunkt entsprechendes Probenmaterial (Lymphknotenbiopate, Kotproben, Blutproben) zur Untersuchung entnommen werden.

Sämtliche, bis zum jetzigen Zeitpunkt erfolgten Operationen zur Entnahme von Lymphknotenbiopaten verliefen ohne intra- und postoperative Komplikationen. Die Untersuchungen der L1- ebenso wie der L2-Gruppe sind überwiegend abgeschlossen. Alle Kälber der Kontrollgruppe erwiesen sich mit allen Verfahren (Anzucht, Real time-PCR, ELISA) als MAP-negativ. Von den sechs Kälbern der L2-Studie erwiesen sich alle mit der Real time-PCR und in der kulturellen Anzucht bei der Untersuchung von Biopateproben ab dem 90. Tag *post infectionem* als positiv.

Zum Nachweis MAP-spezifischer Immunglobuline wurde ein von Eda et al. (2005) beschriebenes, auf der Durchflusszytometrie (DFZM) basierendes Verfahren weiter entwickelt und geprüft. Die von uns etablierte DFZM-Methode erzielte die besten Resultate, wenn die Serumproben mit *M. phlei* präadsorbiert, IgG₁ gemes-

sen und die Messwerte über die Messdaten der MAA-Ansätze normalisiert wurden. Betrachtet man die Kotuntersuchung als Goldstandard, so wies die DFZM-Methode an adulten Rindern bei einer Spezifität von 100% eine Sensitivität von 83% auf, während der kommerziell verfügbare Pourquier-ELISA bei gleicher Spezifität nur zu 61% sensitiv war. Die infizierten Kälber der L2-Studie reagierten bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt (9. bzw. 12. Lebensmonat) in diesem Test sowie im ELISA allerdings stets negativ. Aufgrund der höheren Sensitivität bei gleichbleibend hoher Spezifität kann die neue DFZM-Methode dennoch geeignet sein, die serologische MAP-Diagnostik zumindest bei adulten Rindern zu verbessern.

Zur Erfassung einer MAP-spezifischen zellulären Immunreaktion wurden verschiedene antigenstimulierte T-Zellpopulationen aus Blutproben mit der DFZM analysiert. MAP-spezifische T-Zellen waren am besten zu erkennen, wenn die γ -IFN-Menge in CD4+ Zellen oder die CD25-Expression auf CD4+/CD45RO+ Zellen als Indikatoren genutzt wurden. Während alle Kälber der L1-Studie (Kontrolltiere) in diesen Tests negativ reagierten, überschritten die Werte aller infizierten Kälber der L2-Studie den Cutoff frühestens ab der 8. und spätestens ab der 20. Woche *post infectionem*. Im Vergleich zur DFZM-basierten Methodik lieferte der modifizierte Bovigam®-Test häufiger falsche oder nicht auswertbare Ergebnisse. Sollte sich die DFZM-basierte T-Zellen-Analyse im Feld bewähren, könnte sie zu einem wichtigen Instrument der MAP-Frühdiagnostik werden.

Entwicklung eines Rotlaufimpfstoffes für Geflügel

Development of a vaccine against Erysipelas in Poultry

FKZ

28-1-34.003-07

Laufzeit

01.09.2008 – 30.08.2010

Projektnehmer/Institution

Lohmann Tierzucht GmbH

Ansprechpartner

Dr. Hans C. Philipp

Dr. Christa Ewers

Kooperationspartner

Freie Universität Berlin

Fachbereich Veterinärmedizin

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen

Kurzfassung der Ergebnisse

Mit der sukzessiven Zunahme alternativer Haltungssysteme in der Geflügelindustrie, die mit dem Verbot der herkömmlichen Käfighaltung ab dem 1. Januar 2012 (Richtlinie 1999/74/EG) ihren Höhepunkt finden wird, sehen wir uns mit neuen bzw. wieder aufkeimenden infektionsmedizinischen Problemen konfrontiert. Ohne die positiven Auswirkungen derartiger Haltungssysteme in Abrede stellen zu wollen, sind die Tiere zukünftig auch höheren hygienischen Belastungen und einem dauerhaften Infektionsdruck ausgesetzt. Dies ist u.a. an einem signifikanten Anstieg von Rotlaufkrankungen beim Geflügel in den letzten Jahren festzumachen. Da die Bekämpfung dieser durch *Erysipelothrix rhusiopathiae* verursachten Infektionskrankheit insbesondere bei Legehennen erhebliche Therapielücken und Prophylaxenotstände aufweist, wurde das vorliegende Projekt initiiert.

Das Ziel des Projektes, die Entwicklung eines Impfstoffes gegen die Rotlaufkrankung beim Geflügel, setzt voraus, dass fundierte Kenntnisse über die Epidemiologie des bakteriellen