

# Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung 2021 zum kulturellen und molekularbiologischen Nachweis von MAP in Rinderkotproben

Heike Köhler

FLI, Institut für molekulare Pathogenese, Nationales Referenzlabor für Paratuberkulose



Heike Köhler  
(© M. Pfau, FLI)

Das NRL für Paratuberkulose am FLI führte 2021/2022 die fünfte Laborvergleichsuntersuchung (LVU) zum kulturellen und molekularbiologischen Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in Rinderkotproben durch. Die Methode für den kulturellen Nachweis von MAP in Kotproben ist in der Amtlichen Methodensammlung niedergelegt. Für den Direktnachweis von MAP-Genom in Kotproben stehen derzeit sechs in Deutschland zugelassene qPCR-Kits zur Verfügung (s. Liste der zugelassenen Mittel auf der Homepage der Zulassungsstelle).

An der Vergleichsstudie nahmen 28 Labore aus dem In- und Ausland sowie das NRL für Paratuberkulose selbst teil. Die teilnehmenden Labore waren aufgefordert, die bereitgestellten Proben mit dem in ihrem Haus etablierten Kulturverfahren und/oder Direkt-PCR-Verfahren zum Nachweis von MAP in Kotproben zu untersuchen. Für die Studie wurden elf MAP-positive und neun MAP-negative native Kotproben von Rindern vorbereitet. Die positiven Proben stammten von Rindern, bei denen in mindestens einer vorangegangenen Untersuchung MAP kulturell im Kot nachgewiesen worden war. Die MAP-negativen Proben

stammten von Tieren aus Paratuberkulose-unverdächtigen Beständen. Es wurden positive Proben mit hoher (n=3), mittlerer (n=5) und schwacher Belastung (n=3) mit MAP zur Verfügung gestellt.

## Methodik des kulturellen Erregernachweises

Insgesamt 18 Labore führten den kulturellen Erregernachweis und 27 den Direktnachweis von MAP mittels PCR durch. Seit der letzten Laborvergleichsuntersuchung, die 2016/2017 stattfand, wurde die Vorgehensweise der Labore bei der kulturellen Anzucht von MAP einheitlicher. Die Dekontamination der Proben erfolgte überwiegend im Sedimentationsverfahren, es wurden 2-5 Kulturröhrchen pro Probe eingesetzt und die Kulturdauer betrug zwischen 12 und 20 Wochen. Die Speziesbestätigung von MAP erfolgte in der Mehrzahl der Labore mittels PCR und lediglich in einem Labor mittels MALDI-TOF. Zwei Labore führten dazu ausschließlich den Nachweis der Mykobaktin-Abhängigkeit durch.

## Ergebnisse des kulturellen Erregernachweises

68 Prozent der teilnehmenden Labore erkannten mindestens neun der elf positiven Proben (81,8 Prozent) als positiv. Die Nachweisrate sank mit abnehmender MAP-Belastung der Proben ab (Tab. 1). Eindeutige methodische Gründe für unbefriedigende Ergebnisse bei der kulturellen Anzucht waren nicht erkennbar. Weder das verwendete Dekontaminationsverfahren noch die Kulturdauer wirkte sich eindeutig auf das Kulturergebnis aus (Abb. 1 a und b). Niedrige Nachweisraten scheinen überwiegend durch die praktische Durchführung der Methoden und die Erfahrung des Personals bedingt zu sein.

Probe	Übermitteltes Ergebnis																			korrekte Befunde		
	2	3	7	13	14	19	21	22	24	15	8	1	4	11	17	23	25	12	6	8	negative Proben	positive Proben
4	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	9 / 9	11 / 11
4	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	9 / 9	10 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	MAP	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	9 / 9	10 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	kW	MAP	MAP	MAP	9 / 9	10 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kont	MAP	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	9 / 9	9 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	kW	MAP	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	8 / 9	9 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	MAP	kW	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	9 / 9	8 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	aM	kont	MAP	kont	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	8 / 9	8 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	kW	MAP	kW	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	9 / 9	6 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	kont	kW	MAP	MAP	kW	kW	MAP	MAP	9 / 9	5 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	MAP	kW	MAP	aM	aM	aM	MAP	aM	aM	9 / 9	4 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	MAP	kW	kW	kW	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	9 / 9	3 / 11

kW - kein Wachstum; MAP - MAP nachgewiesen; aM - andere Mykobakterien nachgewiesen; kont - kontaminiert; (+)-++++ - Wachstumsintensität, aufsteigend

Tab. 1: Zusammenfassung der Ergebnisse des kulturellen Nachweises von MAP in 9 negativen (Probe 2,3,7,13,14,19,21,22,24) und 11 positiven (Probe 15, 8, 1, 4, 11, 17, 23, 25, 12, 6, 8 mit aufsteigender Wachstumsintensität) Kotproben von Rindern

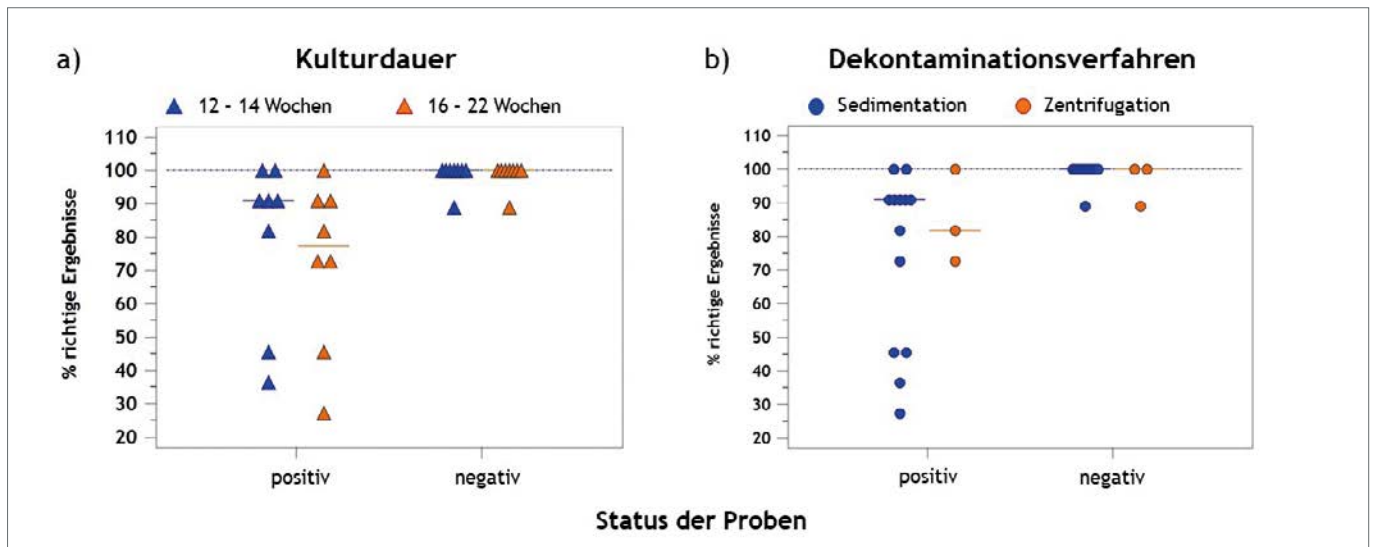


Abb. 1: Kulturelle Anzüchtung – Anteil richtiger Kulturergebnisse je Labor in Abhängigkeit von der Kulturdauer (a) und dem verwendeten Dekontaminationsverfahren (b)

### Methodik des molekularbiologischen Nachweises mittels qPCR

Die Protokolle der Labore für den Direktnachweis von MAP in Kotproben waren sehr heterogen. Es kamen 15 verschiedene DNA-Extraktionsmethoden (Tab. 2) sowie fünf der sechs derzeit zugelassenen qPCR-Kits (Tab. 3) zum Einsatz. Rund

zwei Drittel der Labore setzten Magnetseparationsverfahren für die DNA-Extraktion ein und etwa zweidrittel verwendeten für die Extraktion Kits, die von den Herstellern empfohlen wurden. Nur rund 30 Prozent der Labore beurteilten die Testergebnisse anhand der in den Gebrauchsinformationen vorgegebenen Cut-off-Werte.

Anzahl Labore	Übermittelte Ergebnisse																		korrekte Befunde				
	2	3	7	13	14	19	21	22	24	15	8	1	4	11	17	23	25	12	6	18	negativ	positiv	
	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	0-+	(+)	(+)-+	+	+	+	+	+	++	++++	++++			
13																					9 / 9	11 / 11	
3																						9 / 9	10 / 11
1																						9 / 9	10 / 11
1																						9 / 9	10 / 11
1																						9 / 9	9 / 11
1																						8 / 9	10 / 11
1																						7 / 9	11 / 11
1																						8 / 9	9 / 11
1																						8 / 9	9 / 11
1																						9 / 9	7 / 11
1																						9 / 9	7 / 11
2																						9 / 9	2 / 11

kW - kein Wachstum; (+)-++++ - Wachstumsintensität, aufsteigend  
 □ negativ □ positiv □ uneindeutig □ nicht auswertbar

Tab. 2: Zusammenfassung der Ergebnisse des molekularbiologischen Direktnachweises von MAP in 9 negativen und 11 positiven Kotproben von Rindern

	DNA-Extraktionsverfahren	Anzahl Labore (n)
Magnetseparation	ADIAMAG/Adiapure	1
	ADIAMAG ohne Filter	1
	EZ PREP + ID Gene Mag Paratuberculosis Extraction Kit	2
	ID Gene™ Mag Paratuberculosis Extraction Kit	1
	IndiMag Pathogen Kit	3
	innuPrep AniPath DNA/RNA Kit	2
	Kylt RNA/DNA Purification HTP	1
	MagMAX Core Nucleic Acid Purification Kit	2
	MM Core & Mech Lyss Module + Nucleic Acid Purification Kit	1
	NukEx Mag RNA/DNA Extreme SC Kit	3
	RSC Blood Kit	1
Säulenbasiert	MN NucleoSpin Soil	2
	EZ PREP + ID Gene Spin Universal Extraction Kit	1
	Indispin Pathogen Kit	3
	IndiSpin QIAcube HT Pathogen Kit	1

Tab. 3: Methodik des molekularbiologischen MAP-Nachweises: Prinzip des DNA-Extraktionsverfahrens, verwendete Kits und Anzahl der Labore, die die jeweiligen Kits verwenden

### Ergebnisse des molekularbiologischen Nachweises mittels qPCR

86 Prozent der teilnehmenden Labore erkannten mindestens neun der elf positiven Proben (81,8 Prozent) als positiv. Die Nachweisrate war bei den schwach mit MAP belasteten Proben am geringsten (Tab. 4). Auch beim Direktnachweis mittels PCR konnten keine eindeutigen methodischen Ursachen für unbefriedigende Ergebnisse identifiziert

werden. Unabhängig vom verwendeten qPCR-Kit war eine relativ große Variabilität der CT-Werte bei den einzelnen Proben festzustellen (Abb. 2 a). Das Prinzip des verwendeten DNA-Extraktionsverfahrens (Magnetseparation vs. säulenbasiertes Verfahren) hatte keinen entscheidenden Einfluss auf das qPCR-Ergebnis (Abb. 2 b). Bei einem Teilnehmer könnte die Verwendung eines für Kotproben ungeeigneten DNA-Extraktionskits für die niedrige Nachweisrate verantwortlich sein.

qPCR-Kit	Anzahl Labore (n)
bactotype MAP PCR Kit	9
ADIAVET PARATB REAL TIME	7
ID Gene Paratuberculosis Duplex	4
diarellaMAP vet real time PCR Kit	3
VetMAX MAP Real-Time PCR Screening Kit	2

Tab. 4: Übersicht über die qPCR-Kits, die für den molekularbiologischen Nachweis von MAP in Kotproben verwendet werden und Anzahl der Labore, die das jeweilige Kit einsetzen

## Fazit

Der molekularbiologische Nachweis von MAP in Kotproben mittels qPCR wird inzwischen in einer größeren Anzahl an Laboren durchgeführt als der kulturelle Nachweis. Während sich die Vorgehensweise der Labore beim kulturellen Nachweis im Vergleich zu vorangegangenen Laborvergleichsuntersuchungen immer mehr angeglichen hat, ist eine große methodische Heterogenität beim molekularbiologischen Nachweis zu verzeichnen. Bei beiden Verfahren waren die Nachweisraten bei schwach mit MAP

belasteten Proben am geringsten. Eindeutige methodische Ursachen für unbefriedigende Nachweisraten konnten jedoch nicht identifiziert werden. Deshalb lässt sich schlussfolgern, dass einer sorgfältigen praktischen Durchführung der Verfahren durch gut eingearbeitetes Personal eine besondere Bedeutung zukommt.

Ich danke den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der teilnehmenden Labore für die gute Zusammenarbeit und Sandy Werner für die exzellente technische Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der LVU.

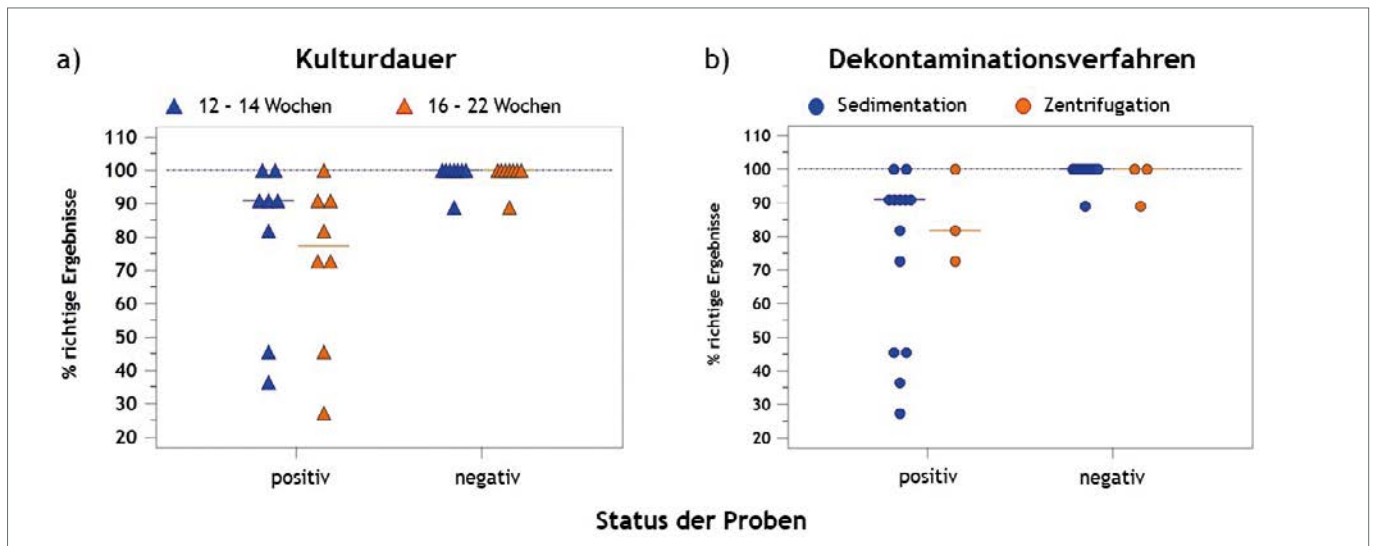


Abb. 2: Molekularbiologischer Nachweis mittels qPCR – Verteilung der CT-Werte, die die Labore bei den einzelnen Proben erreichten in Abhängigkeit vom Prinzip der DNA-Extraktion (a) und dem verwendeten qPCR-Kit (b)