

Zusammenfassung

Anna Katharina Schwalm

Paratuberkulose-Diagnostik beim Rind: Optimierung des Erregernachweises aus Kot mittels Kultivierung und PCR

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen

Eingereicht im September 2019

44 Seiten, 1 Abbildung, 75 Literaturangaben, 2 Publikationen

Schlüsselwörter: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Flüssigmedium M7H9C, Direkt-PCR, Kotproben, Sockentupfer, Trockenstehphase

Einleitung

Die Paratuberkulose (Johne'sche Erkrankung) ist eine chronische bakterielle Darmerkrankung mit weltweiter Bedeutung, hervorgerufen durch *Mycobacterium avium* subsp.

paratuberculosis (MAP). Neben selten ausgeprägten klinischen Symptomen wie Durchfall und Abmagerung führen vor allem Milchleistungsabfall, erhöhte Krankheitsanfälligkeit und verminderte Schlachterlöse zu ökonomischen Verlusten. Ein Zusammenhang zwischen einer Infektion mit MAP und Morbus Crohn, einer chronischen Darmerkrankung des Menschen, wird seit langem diskutiert.

Die Anzucht auf Festkultur HEYM (Herrold's Egg Yolk Agar) ist aufgrund von mäßiger Sensitivität und langer Anzuchtdauer bis zu 16 Wochen keine optimale Referenzmethode, bietet jedoch eine hohe Testspezifität. Die Anzucht in Flüssigkultur wird als Alternative mit kürzerer Anzuchtdauer und höherer Sensitivität beschrieben. Für den Erregernachweis wird neben der Anzucht der DNA-Nachweis aus Kot mittels PCR-Verfahren (Direkt-PCR) als schnelle, automatisierbare Methode in der Paratuberkulose-Diagnostik verwendet.

Die fäkal-orale Übertragung von MAP von der Kuh auf das Kalb gilt als wichtige Infektionsquelle innerhalb einer Herde. Die Kenntnis über den MAP-Status des Muttertieres vor der Geburt ist besonders hilfreich, um frühzeitig Maßnahmen zum Schutz des Kalbes treffen zu können.

Ziele der Untersuchungen

Vorrangiges Ziel dieser Arbeit war die optimierte Verwendung und Validierung von Methoden für einen raschen, sensitiven und automatisierbaren Nachweis von MAP innerhalb von maximal acht Wochen und unter Berücksichtigung der Anwendbarkeit für Paratuberkulose-Kontrollprogramme.

Material und Methoden

Zu Beginn wurden 20 Kotproben mit Direkt-PCR-Verfahren (DNA-Extraktion und DNA-Nachweis direkt aus Kot) untersucht: Konkret wurden zwei kommerzielle Kombinationskits (DNA-Extraktionskit für Kotproben mit real-time PCR in einem Kit) mit sechs weiteren DNA-Extraktionskits mit publizierter real-time PCR verglichen. Die zwei Kombinationskits dienten im Nachgang zur Untersuchung von 107 positiven und 50 negativen Kotproben. Parallel wurden diese Proben auf Festkultur HEYM und in Flüssigmedium M7H9C für 12 Wochen kultiviert.

Für die anschließende Feldstudie wurden 245 Einzelkotproben und 12 Sockentupfer aus drei Milchviehbetrieben mit Laufstallhaltung entnommen und mit einer Direkt-PCR (Kombinationskit) und dem Flüssigmedium M7H9C nach 6-wöchiger Anzucht untersucht. Der statistische Vergleich der positiven und negativen Ergebnisse der Methoden sowie der Vergleich der Anzahl positiver Kulturröhrchen und der PCR-Signalstärke nach Kultivierung wurden mit dem Fisher's Exakt-Test durchgeführt. Ein Typ 1-Fehler α von $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

Ergebnisse

Die Kombinationskits zeigten signifikant mehr positive Ergebnisse als die anderen sechs getesteten Extraktionskits ($p < 0,04$). Beide Kombinationskits erreichten eine Sensitivität von 86 % bzw. 89 % bei 100 % Spezifität im Vergleich zur Anzucht in dem Flüssigmedium M7H9C, welches nach 6-wöchiger Anzucht 97 % und nach 12 Wochen 100 % der positiven Proben erkannte, ebenfalls bei 100 % Spezifität. Auf Festkultur HEYM (12-wöchige Anzucht) gelang bei 74 % der Proben ein Erregernachweis. In der Feldstudie wurde MAP-DNA in Sockentupfer-Proben von allen Betrieben mit Direkt-PCR und Flüssigkultur nachgewiesen. Bei der Untersuchung der Einzelkotproben stimmten 74 % der positiven Ergebnisse beider Methoden überein. Die Stärke des PCR-Signals nach Kultivierung unterschied sich signifikant zwischen Proben mit positivem Signal in nur einem Röhrchen und Proben mit positivem Signal in zwei oder drei Röhrchen.

Schlussfolgerungen

Die Direkt-PCR ist bei Verwendung von Kombinationskits gut geeignet als schnelle automatisierbare Methode für die Detektion von Erregerausscheidern. In Herden mit niedriger Ausscheidungsrate wird die Anzucht in dem Flüssigmedium M7H9C als Methode mit höherer Nachweisrate und Ergebnissen nach maximal acht Wochen empfohlen. Dieses Zeitfenster ermöglicht zusätzlich die Untersuchung während der Trockenstehphase und bietet Informationen zum MAP-Status der Mutterkuh bereits vor der Abkalbung.