

Serologische und molekulardiagnostische Untersuchungen zur Charakterisierung einer experimentellen Infektion mit dem Erreger der Lungenseuche des Rindes (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

M. Heller¹, J. Hänske^{1,4}, S. Bahrmann¹, E. Schubert¹, C. Schnee¹, J. Jores^{2,3}, R. Kammerer¹

¹Friedrich-Loeffler-Institut Jena; ²International Livestock Research Institute Nairobi, Kenia; ³Universität Bern, Schweiz, ⁴Landesuntersuchungsamt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen, Dresden

Einleitung

Bei der Lungenseuche des Rindes handelt es sich um eine in der EU anzeigepflichtige hochkontagiöse Erkrankung des Respirationsapparates des Rindes. Sie wird verursacht durch *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (*Mmm*), ein zellwandloses Bakterium aus der Klasse der *Mollicutes*. Die Krankheit ist derzeit nur in den afrikanischen Gebieten südlich der Sahara endemisch verbreitet. Der letzte Fall in Deutschland trat 1926 auf. Europa ist seit ca. 2000 seuchenfrei. Im Rahmen eines durch das Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung geförderten Verbundprojektes mit Partnern aus Afrika und Deutschland wurde ein Infektionsversuch zur Lungenseuche des Rindes durchgeführt. Das Ziel dieses Versuches bestand zum einen darin, ein reproduzierbares Infektionsmodell zu etablieren und zum anderen, den Einfluss von antiinflammatorischen Substanzen auf den klinischen Verlauf und die Ausprägung pathomorphologischer Läsionen und der damit im Zusammenhang stehenden immunologischen Prozesse zu untersuchen. Auf diesem Poster werden schwerpunktmäßig die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen sowie die Nachweise des Erregers in den einzelnen Geweben und Sekreten mittels kultureller Anzucht und PCR beschrieben.

Material und Methoden

Durchführung des Infektionsversuches: Die Infektion erfolgte bei 20 Färsen von Holstein-Schwarzbunt intranasal 3 x mit jeweils 10⁸ cfu von *Mmm* Afadé mittels Vernebler (atomizer device) im Abstand von einem Tag. Die letzte Infektionsdosis von 10⁹ cfu wurde durch intratracheale Intubation am Tag 5 nach der ersten intranasalen Infektion verabreicht. Die Hälfte der Tiere erhielt eine antiphlogistische Behandlung mit Meloxicam (siehe Abb.2)

Probenmaterial: Blutproben und Nasentupfer wurden an 11 verschiedenen Terminen gewonnen (siehe Abb. 2). Alle Gewebeproben von Lunge, Lungen- und Mediastinallymphknoten, von Niere, Milz sowie Pleuralflüssigkeit, Gelenkflüssigkeit und sonstige Organproben wurden am Tag der Tötung gewonnen.

Kultur von *Mmm*: in modifiziertem Hayflick-Medium als Bouillon und Agarplatten bei 37 °C und 8% CO₂

KBR: Durchführung entsprechend OIE-Manual

Cocktail-ELISA: indirekter ELISA mit rekombinanten *Mmm*-Proteinen, Durchführung siehe Heller et al. (2017): J Clin Microbiol. 54: 1557-65.

***Mycoplasma bovis*-AK-ELISA** (BIO K 302-Monoscreen AbELISA, Bio-X Diagnostics),

PCR zum Nachweis von *Mmm*: siehe Schnee et al. (2011): BMC Vet Res. DOI: 10.1186/1746-6148-7-47

Ergebnisse

Tab. 1: Zusammenfassung der Ergebnisse mit allen Tieren (* = mit Meloxicam behandelt)

Tier-Nr.	Serokonversion		<i>Mmm</i> -PCR (direkt aus Gewebe oder aus Kultur)				Re-Isolierung der Erregers (isoliert aus)
	Cocktail-ELISA	KBR	Lunge	Lungen-LK	Niere	Nasentupfer	
5548*	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv (Lunge, Lungen-LK, Niere)
85533*	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	positiv (Lunge, Lungen-LK)
9549*	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	positiv (Lunge, Lungen-LK)
1031*	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv (Lunge, Lungen-LK, Niere)
1050	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv (Lunge)
1027	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv (Lunge, Lungen-LK, Niere)
1020	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv (Lunge, Niere)
9507	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	positiv (Lunge, Lungen-LK)
1040	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv (Lunge, Lungen-LK, Niere, Blut, Gelenkflüssigkeit)
5510*	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv (Lunge)
5518*	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	positiv	positiv (Lunge)
95533*	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ
5536*	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	positiv (Lunge, Lungen-LK)
5539	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
5540	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv (Lunge)
5554	positiv	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	positiv (Lungen-LK)
5561	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	positiv (Lunge, Lungen-LK)
8374	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv (Lunge)
8368*	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
8367*	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv (Lunge)

- Von 20 Tieren zeigten 17 Tiere Serokonversion mit beiden serologischen Verfahren (KBR ab 10. Tag, Cocktail-ELISA ab 14. Tag nach der Infektion, wobei es große individuelle Unterschiede gab).
- Re-Isolierungen des Infektionsstammes gelangen am erfolgreichsten aus der Lunge, weniger oft aus den Lungenlymphknoten und aus der Niere.
- Aus Nasentupfern war nur zweimal ein *Mmm*-Nachweis mittels PCR positiv. Re-Isolierungen waren bei allen untersuchten Nasentupfern negativ.
- Insgesamt waren nur bei drei Tieren die Re-Isolierungen des Infektionsstammes negativ, bei zwei Tieren davon trat auch keine Serokonversion ein bzw. war auch die *Mmm*-PCR aus dem Gewebe negativ.
- Bei einem Tier gelang die Re-Isolierung des Erregers aus dem Blut, bei zwei weiteren Tieren war die *Mmm*-PCR mit Blutproben positiv (Hinweis auf Septikämie).
- In Urinproben konnten keine Erreger nachgewiesen werden (weder Anzucht noch *Mmm*-PCR). Einmal gelang der Nachweis von *Mmm* in Gelenkflüssigkeit.
- Bei den meisten Tieren konnten Antikörper gegen *Mycoplasma* (*M.*) *bovis* nachgewiesen werden. Der Erregernachweis durch eine spezifische PCR (Sachse et al. Vet J., 2010) gelang allerdings nur bei zwei Tieren und konnte bei einem dieser Tiere durch die kulturelle Anzucht von *M. bovis* bestätigt werden. Gegenüber dem Wert vor der Infektion wurde bei positiven Tieren fast immer ein Titeranstieg der *M. -bovis*-Antikörper festgestellt (Kreuzreaktionen!).
- In Pleuralflüssigkeit konnte kein *Mmm* nachgewiesen werden (zu wenig Pleuralflüssigkeit).

Diskussion und Schlussfolgerungen

- Das verwendete Infektionsmodell erwies sich für eine erfolgreiche Infektion mit *Mmm* als geeignet.
- Die Behandlung mit Meloxicam hatte keinen signifikanten Einfluss auf die hier beschriebenen Ergebnisse.
- Die mittels KBR festgestellte zeitigere Serokonversion gegenüber dem Cocktail-ELISA ist darauf zurückzuführen, dass mit der KBR auch IgM-Antikörper nachgewiesen werden und mit dem Cocktail-ELISA vorwiegend IgG-Antikörper.
- Die Untersuchungen zeigen, dass Nasentupfer nicht das geeignete Probenmaterial sind, obgleich diese von der OIE zur Probennahme bei Lungenseucheverdacht empfohlen werden. Deshalb wird eine Probenentnahme aus den tieferen Atemwegen eher für sinnvoll erachtet (Trachealabstriche). Vermehrte Pleuralflüssigkeit war in diesem Infektionsversuch nicht vorhanden, so dass dieses Probenmaterial, das laut OIE ebenfalls als sehr geeignet gilt, nicht zur Verfügung stand.
- Urinproben waren ebenfalls durchgängig negativ, obgleich in der Literatur die Ausscheidung des Erregers über den Urin beschrieben wird.
- Der verwendete kommerzielle ELISA zum Nachweis von *M. -bovis*-Antikörpern zeigt eindeutig Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen *Mmm*. Da in Deutschland *Mmm*-Antikörper derzeit nicht zu erwarten sind, steht der Verwendung des *M. -bovis*-ELISAs nichts entgegen.

Danksagung:

Diese Studie wurde gefördert durch das Ministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (Projekt-Nr. 09.7860.1-001.00, Vertrags-Nr. 81121408 und Projekt-Nr. 09.7860.1-001.00, Vertrags-Nr. 81170269). Die Autoren bedanken sich bei Victoria Andres, Annegret Jahn, Kerstin Barth und Christine Grajetzki für ihre exzellente Arbeit im Labor.



Abb. 1. An Lungenseuche erkrankte Rinder, typisch ist die nach vorn gestreckte Haltung beim vorderen Tier (A), Bild der bunten Marmorierung der Lunge bei Lungenseuche (B), Fotos F. Thiaucourt, Montpellier

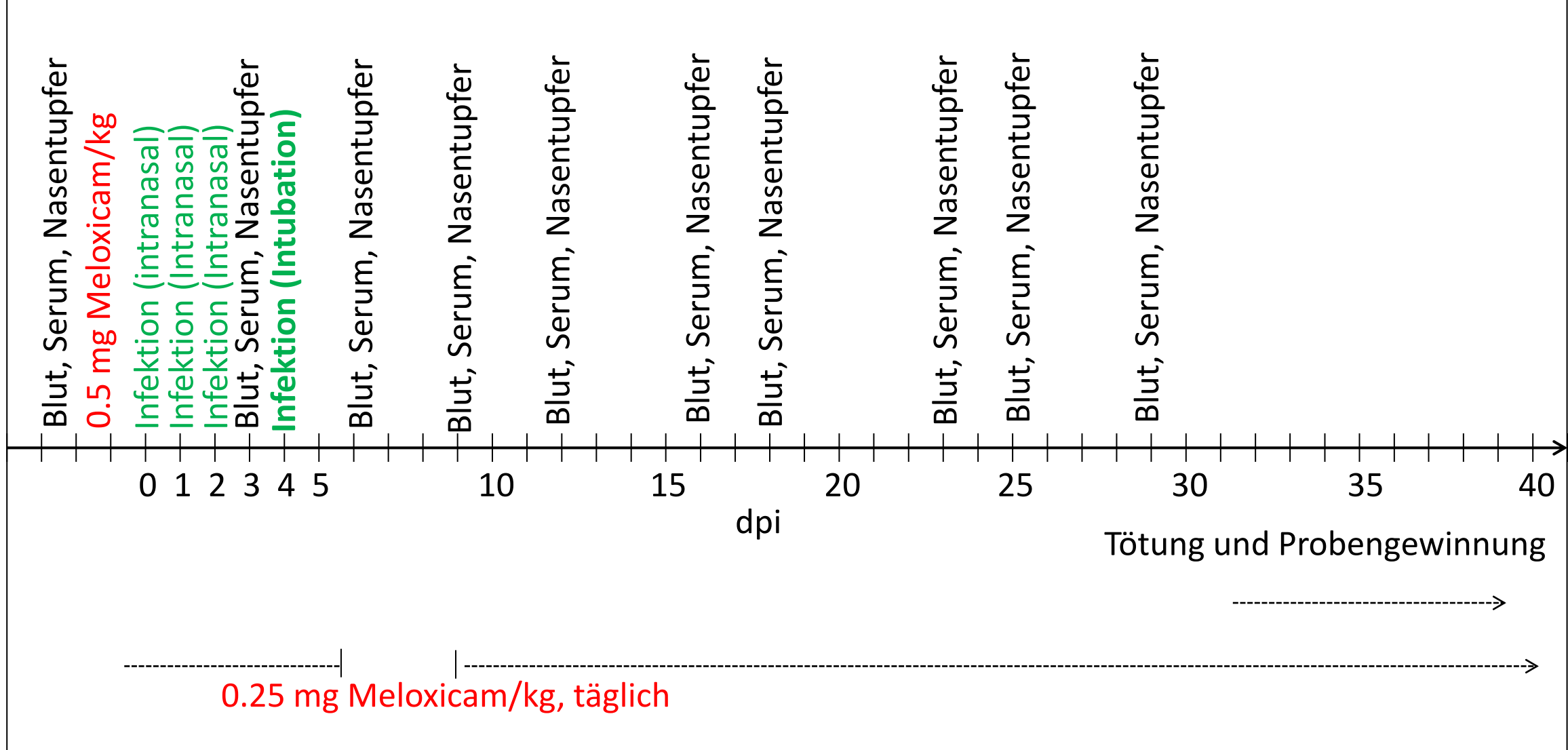


Abb. 2. Zeitschema zum Ablauf des Tierversuches

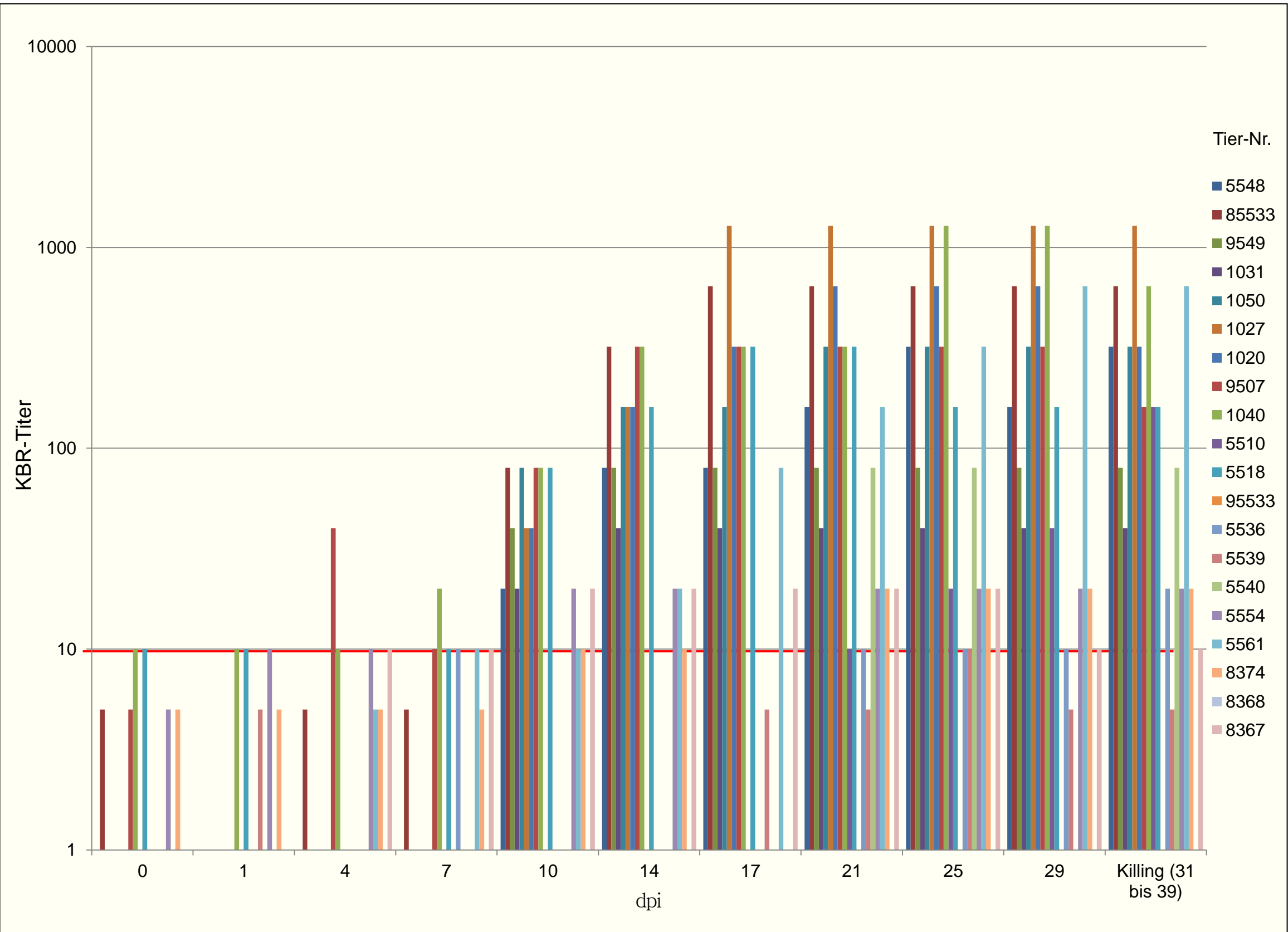


Abb. 3. Ergebnisse der *Mmm*-Antikörperbestimmung mit KBR im zeitlichen Verlauf nach der Infektion (die rote Linie markiert den cut off)

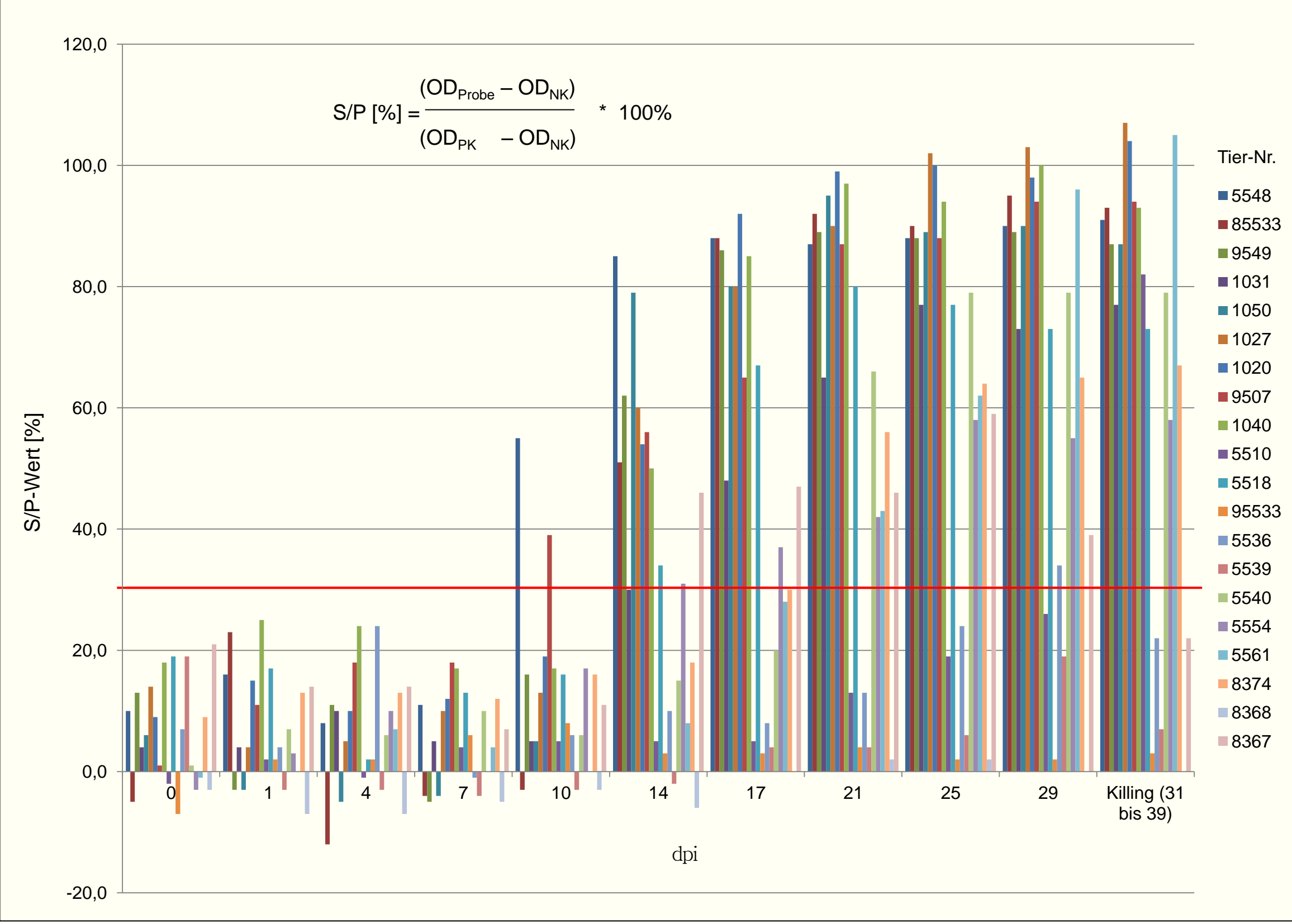


Abb. 4. Ergebnisse der *Mmm*-Antikörperbestimmung mittels Cocktail-ELISA im zeitlichen Verlauf nach der Infektion (die rote Linie markiert den Cut Off)

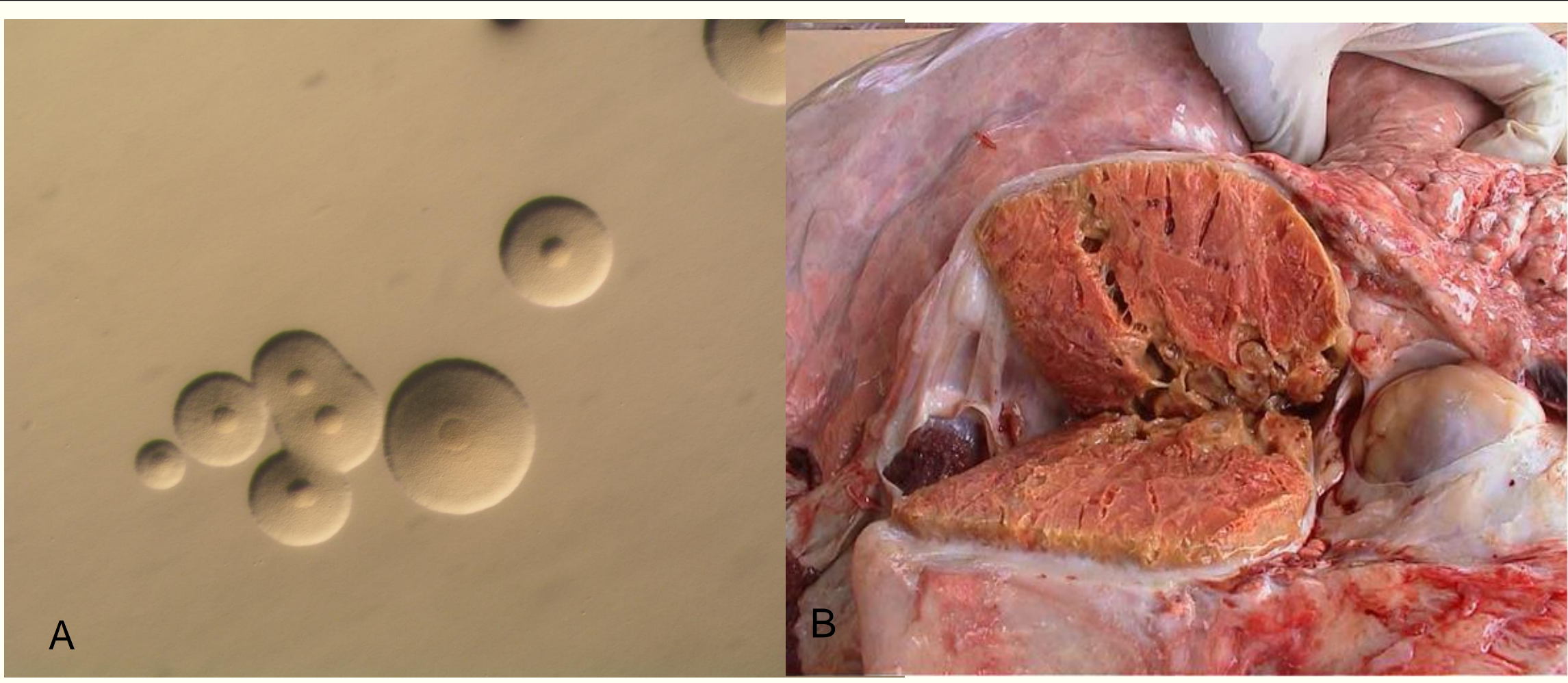


Abb. 5. Mykoplasmen-Kolonien auf Agar (A), Sequesterbildung in der Lunge bei chronischer Lungenseuche (B), Fotos M. Heller (A) und F. Thiaucourt, Montpellier (B)