

Stellenwert des Genomnachweises von MAP in Kotproben in der Paratuberkulose-Diagnostik

Heike Köhler
Nationales Referenzlabor für Paratuberkulose

Einzeltierdiagnostik

Herdendiagnostik

Antikörper-NW (ELISA)

Individuelle
Proben

- Sp 98,6 - 99,3 %
- Se abhängig vom
Erkrankungsstadium

- Se abhängig von Prävalenz
- Keine Prävalenzschätzung
möglich

Tankmilchproben

-

- Se abhängig von Prävalenz
- nur Nachweis stark
durchseuchter Herden möglich

Erregernachweis (Kultur)

Individuelle
Proben

- Sp 100 %
- Hohe Se, abhängig vom
Erkrankungsstadium

- Se abhängig von Prävalenz
- Höhere NWR als Ak-NW

Poolproben

-

- Se abhängig von Prävalenz und
Poolgröße

Sp = Spezifität; Se = Sensitivität

Paratuberkulose - diagnostisches Dilemma

Einzeltierdiagnostik

Herdendiagnostik

Antikörper-NW (ELISA)

Individuelle
Proben

- Sp 98,6 - 99,3 %
- Se abhängig vom
Erkrankungsstadium

- Se abhängig von Prävalenz
- Keine Prävalenzschätzung
möglich

Tankmilchproben

-

- Se abhängig von Prävalenz
- nur Nachweis stark
durchseuchter Herden möglich

Erregernachweis (Kultur)

Individuelle
Proben

- Sp 100 %

- Se abhängig von Prävalenz

Poolproben

Poolgröße

Nachteil: hoher Personal-, Arbeits- und Zeitaufwand

Sp = Spezifität; Se = Sensitivität



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

seit 1910

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Direkt-PCR für MAP - Potenzial

- Schnelles, hochdurchsatzfähiges diagnostisches Verfahren mit hoher analytischer/diagnostischer Sensitivität
- Hohe Spezifität
- Reproduzierbarkeit



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

seit 1910

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Direkt-PCR für MAP - in D zugelassene Kits

Kit	Proben
➤ VetMAX MAP Real Time PCR (Life Technologies/Thermo)	Kot
➤ ADIAVET PARATB REAL TIME (Biomerieux)	Kot, Milch, Gewebe, Bakterienkulturen
➤ <i>bactotype</i> MAP PCR Kit (Qiagen)	Kot, Gewebe, Spülproben, von Kulturen, Koloniematerial

Charakteristika

- Hohe analytische Sensitivität (**diagnostische Sensitivität ??**)
- 100% Spezifität (keine Kreuzreaktionen mit anderen (Myko)bakterien)
- Empfehlungen für geeignete DNA-Extraktionsprotokolle für verschiedene Matrices



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

seit 1910

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Offene Fragen

- ✓ Diagnostischen Sensitivität der qPCR bei der Einzeltierdiagnostik der ParaTB im Vergleich zu anderen etablierten Methoden.
- ✓ Einsatzmöglichkeiten für die qPCR bei der Untersuchung von Umgebungsproben auf MAP, insbesondere in niedrig prävalenten Herden



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

seit 1910

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

- Ermittlung der diagnostischen Sensitivität der qPCR bei der Einzeltierdiagnostik der ParaTB im Vergleich zur kulturellen Anzucht und zum Antikörpernachweis im Serum.
- Bewertung von Proben mit schwach positivem oder nicht eindeutigem qPCR-Ergebnis.

Studie 1: Tierauswahl und diagnostische Methoden

Tierauswahl

Bestände

ParaTB unverdächtig (n=10)

ParaTB positiv (n=10)

Kühe (je n=110)
Alter > 24 Monate

↓
11 Tiere/Bestand

↓
11 Tiere/Bestand
(Kot+)

Tests

- Kulturelle Anzucht (Kultur, gem. Amtlicher Methodensammlung)
- Antikörpernachweis im Serum mittels ELISA (IDEXX Paratuberculosis Screening)
- Direktnachweis von MAP-Genom in Kotproben
 - DNA-Extraktion: QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) nach Filtration über Adiafilter
 - Real-Time PCR: ADIAVET PARATB REAL TIME Kit

Köhler et al., unveröffentlicht



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

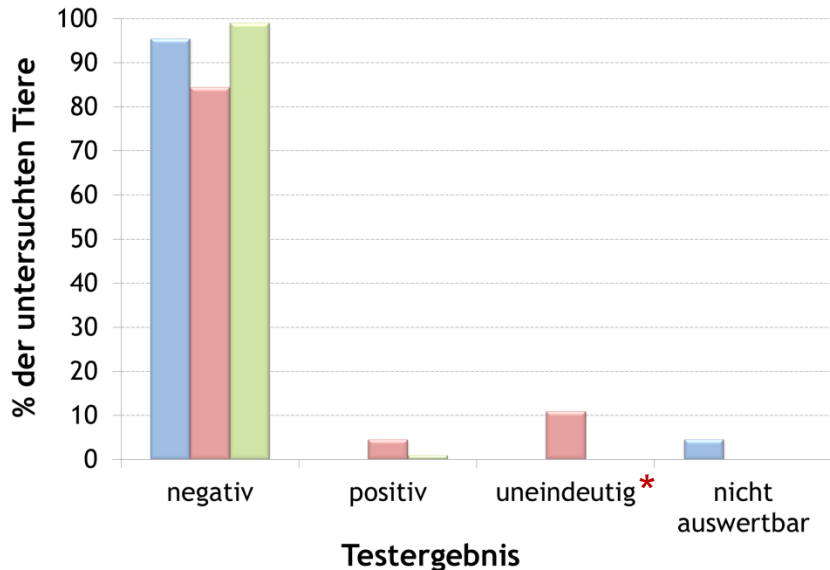
seit 1910

FLI

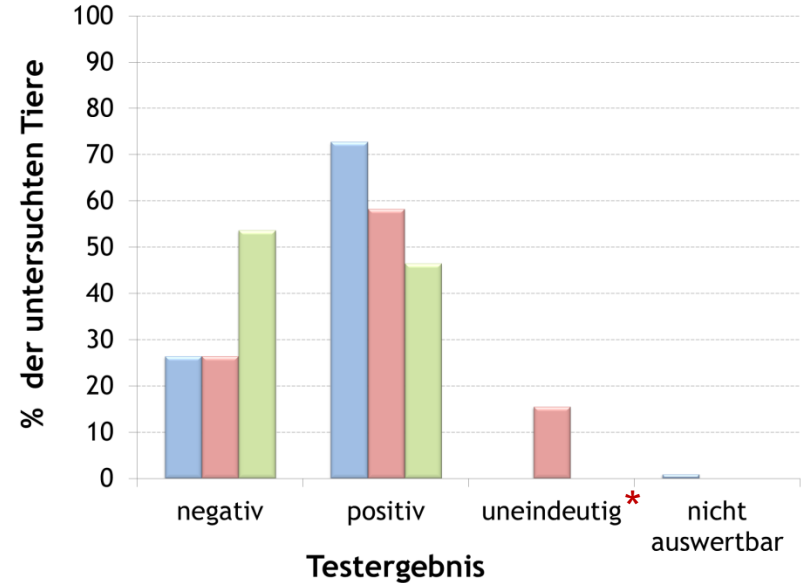
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Testergebnisse bei Einzeltieren

ParaTB unverdächtig



ParaTB positiv



 Kotkultur

 qPCR

 ELISA

* qPCR Doppelbestimmung: $1 \times C_T < 40$, $1 \times C_T \geq 40$

Köhler et al., unveröffentlicht



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

seit 1910

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Übereinstimmung der Befunde bei ParaTB⁺ Einzeltieren

		qPCR			Gesamt
		negativ	positiv	uneindeutig	
ELISA	negativ	22	21	16	59
	positiv	7	43	1	51
Gesamt		29	64	17	110

		qPCR			Gesamt
		negativ	positiv	uneindeutig	
Kultur	negativ	19	3	7	29
	positiv	9	61	10	80
	n. a.	1	0	0	1
Gesamt		29	64	17	110

Köhler et al., unveröffentlicht



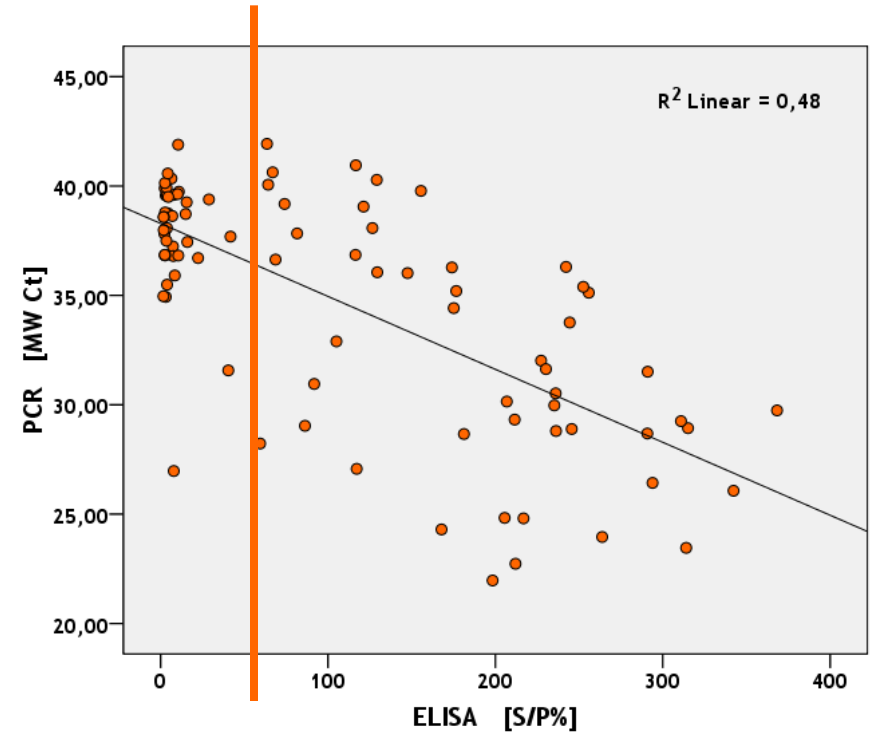
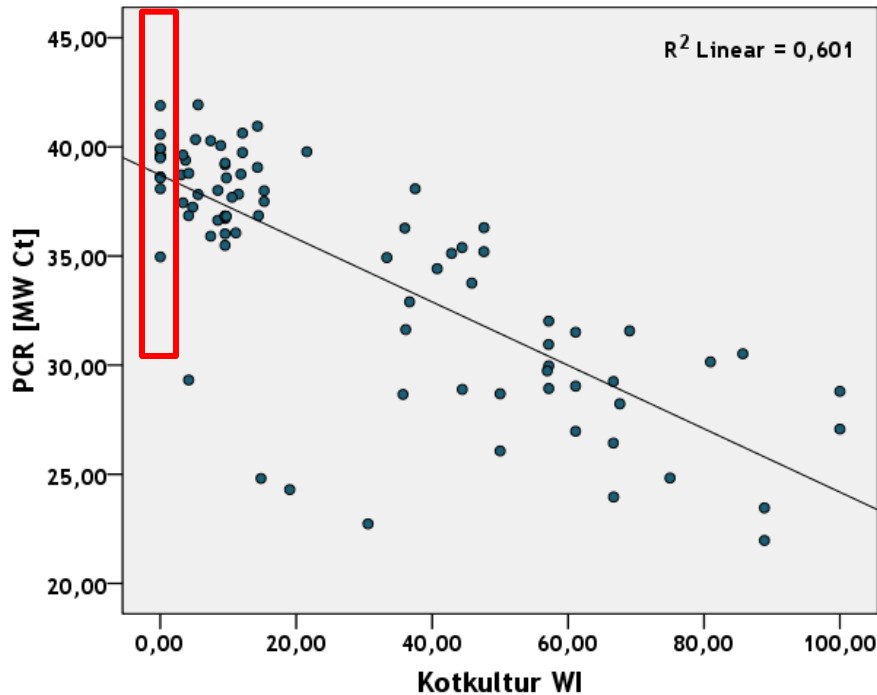
FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

seit 1910

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Korrelation zwischen Testergebnissen bei ParaTB⁺ Einzeltieren



Cut-off ELISA (S/P%): 45% ≤ fraglich < 55%
qPCR (C_T): positiv < 40 < negativ

Köhler et al., unveröffentlicht



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

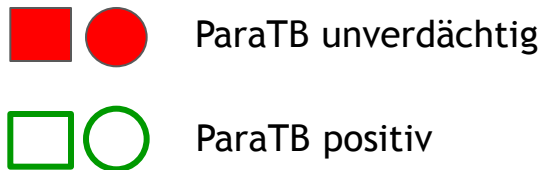
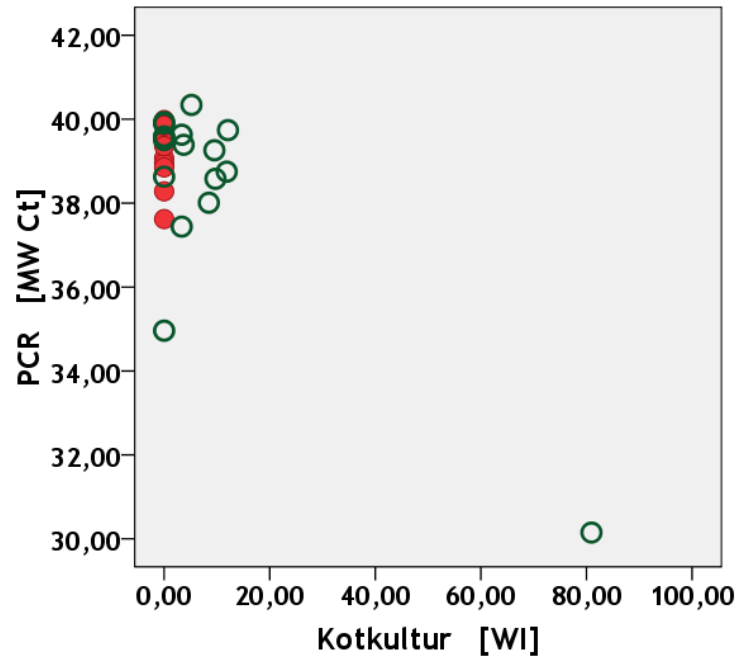
seit 1910

FLI

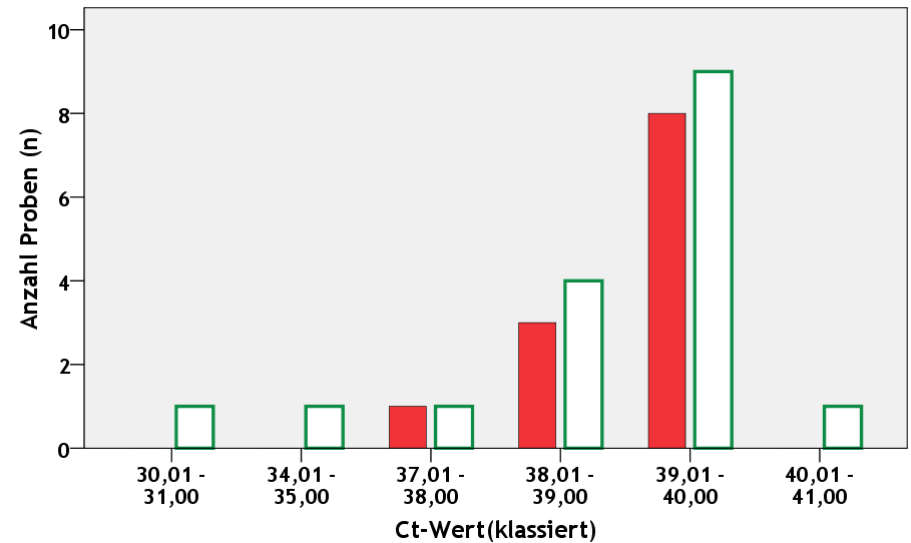
Bundforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Schwach positive/uneindeutige Proben (hoher C_T-Wert)

Vergleich mit Kulturergebnis



Verteilung der C_T-Werte (> 30)



Amplifikation bei Proben aus ParaTB-unverdächtigen Beständen

- Laborkontamination?
- Nicht kultivierbare MAP?

Köhler et al., unveröffentlicht



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

seit 1910

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

- Die qPCR weist eine höhere Sensitivität für die Einzeltierdiagnostik der Paratuberkulose auf als der Antikörpernachweis mittels ELISA.
- Es gibt einen Zusammenhang zwischen der Höhe des C_T -Werts und den S/P%-Werten im ELISA bzw. der Erregerdichte in den Kotproben.
- Proben mit einem hohen C_T -Wert lassen sich nicht eindeutig als positiv oder negativ zuordnen. Es ist ratsam, die Tiere erneut zu untersuchen.

Schätzung des Schwellenwertes der Inner-Herden-Prävalenz (IHP), der es bei einer einmaligen Untersuchung mit 90%iger Wahrscheinlichkeit erlaubt, eine Milchviehherde als MAP positiv zu identifizieren

- a) bei separater Anwendung von Sockentupfern oder Gülleproben
- b) bei Verwendung eines Paares aus Sockentupfer und Gülle aus einem Bestand

Untersuchungsmethoden

- a) Kulturelle Anzucht von MAP oder Direktnachweis mittels qPCR
- b) Kombinierte Anwendung von kultureller Anzucht und Direktnachweis mittels PCR

Bestände und Schätzung der Inner-Herden-Prävalenz (IHP)

	ParaTB negativ	ParaTB positiv	
Anzahl (n)	19	47	11
Schätzung IHP	zertifiziert ≥ 3 Jahre keine MAP-Ausscheider	Jährliche kulturelle Untersuchung des Gesamtbestandes [MAP ⁺ / MAP ⁺ + MAP ⁻]	US individueller Kotproben am Tag der Umgebungsprobenahme
Bundesland	TH, SN	TH, SN	HE
Ø Herdengröße	356 (27-1170)		
Haltung	Milchvieh, Laufstall		

Donat et al., Epidem. Infect., 2015, im Druck



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

seit 1910

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Proben und diagnostische Methoden

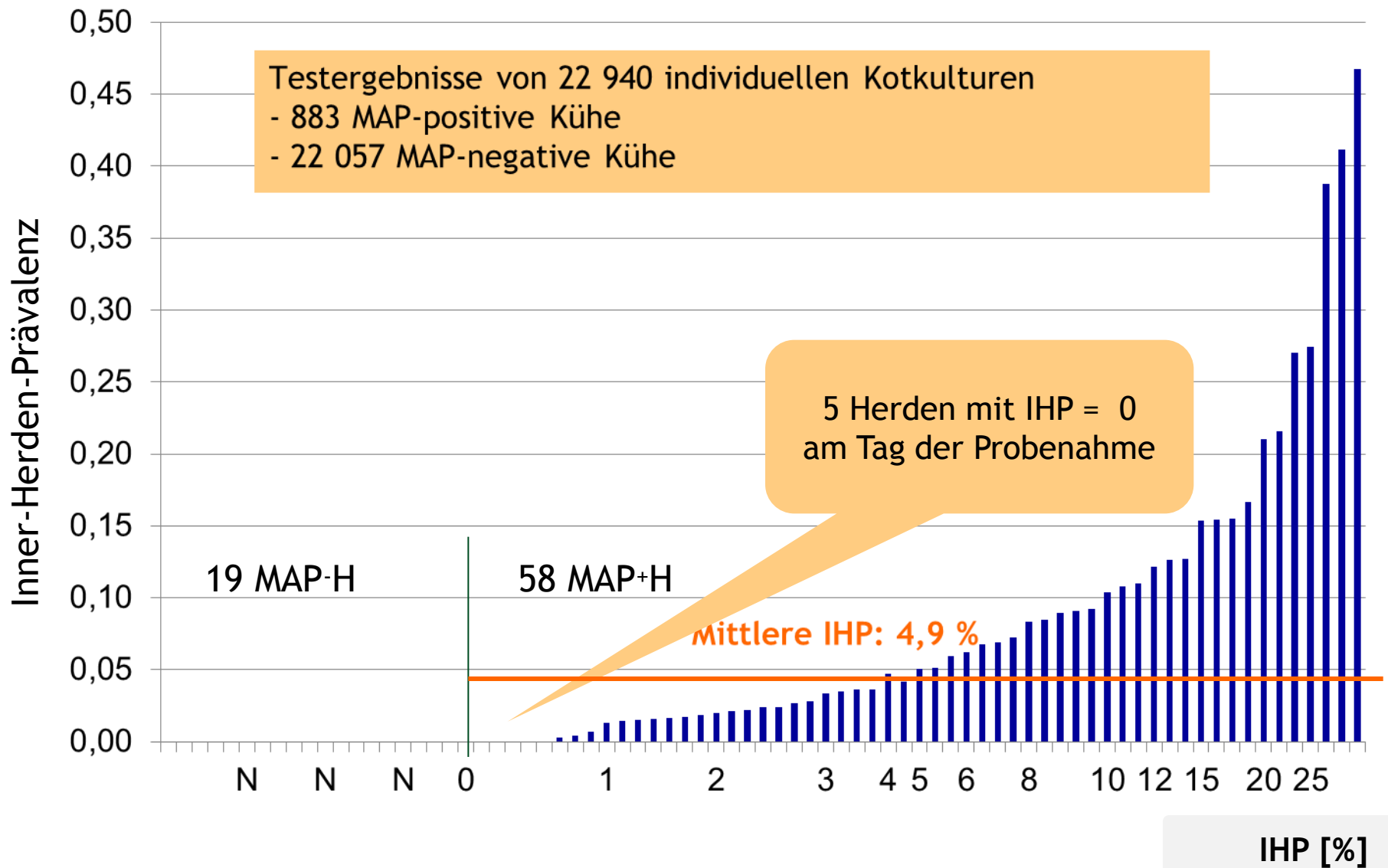
Proben

- **Sockentupfer** aus Bereichen mit hohem Tierverkehr und hoher Kotkonzentration (Laufställe, Triebwege, Quergänge, Vorwartehefe)
- **Gülle** aus Tanks, Becken, Gruben oder Güllekanälen (50 ml)

Methoden

- Kulturelle Anzucht (gem. Amtlicher Methodensammlung)
- **PCR A** DNA-Extraktion QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) nach Filtration über Adiafilter (Biomerieux)
Real-Time PCR ADIAVET PARATB REAL TIME Kit (Biomerieux)
- **PCR B** DNA-Extraktion MagMax™ Total Nucleic Acid Isolation Kit /
MagMax™ Express 96 Instrument (Thermo)
Real-Time PCR VetMAX™ MAP Real-Time PCR Screening Kit (Thermo)

Inner-Herden-Prävalenz



Sensitivität und Spezifität auf Herdenebene (95% KI)

PCR A		Sensitivität (HSe)	Spezifität (HSe)
Sockentupfer	Kotkultur	66% (54-78%)	100%
	qPCR	66% (54-78%)	95% (85-100%)
Gülle	Kotkultur	64% (52-77%)	100%
	qPCR	68% (56-80%)	95% (85-100%)

Donat et al., Epidem. Infect., 2015, im Druck



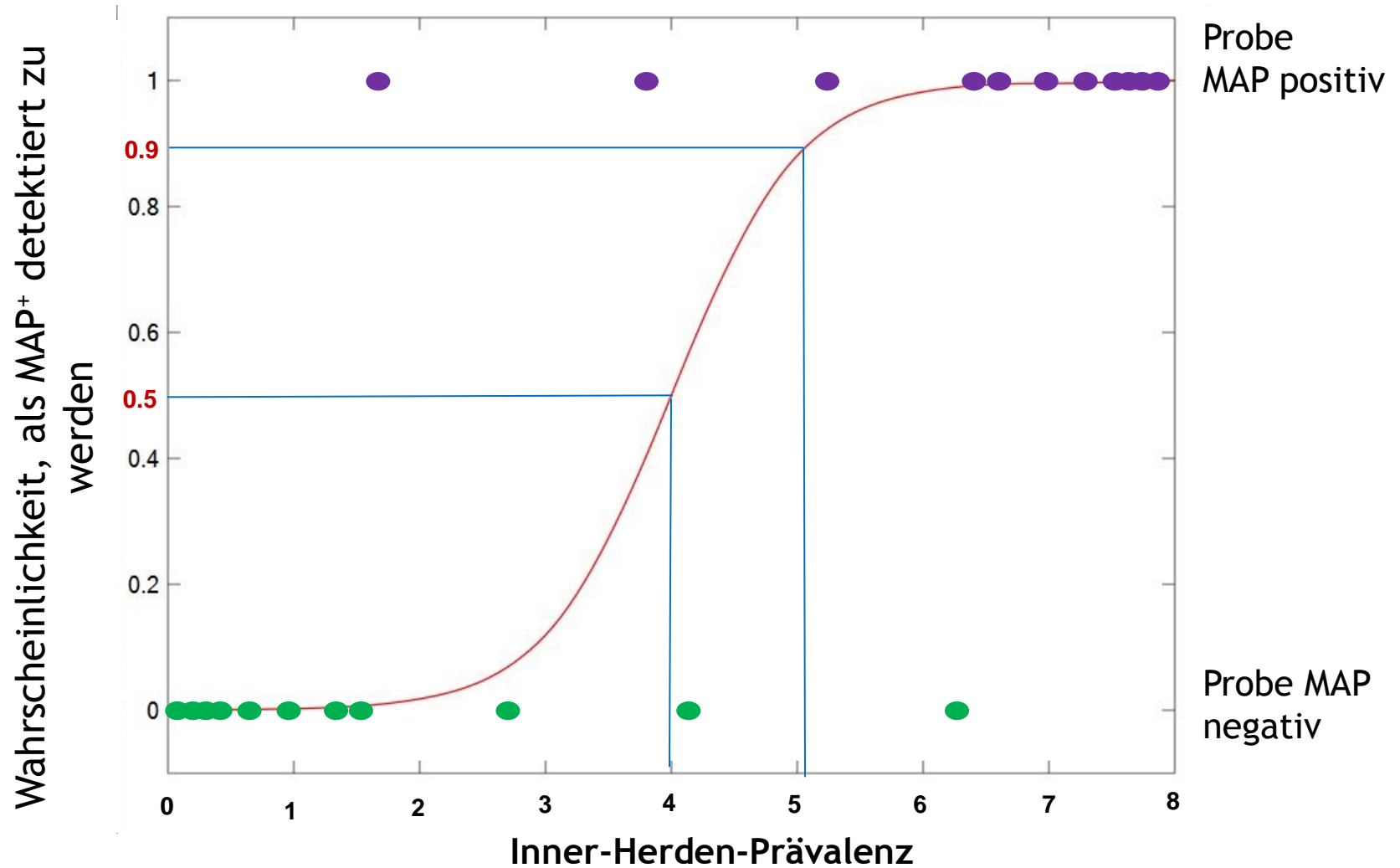
FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

seit 1910

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Asymptotisches logistisches Regressionsmodell



Donat et al., *Epidem. Infect.*, 2015, im Druck



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

seit 1910

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Geschätzte IHP-Schwellenwerte für die Detektion als MAP⁺

	WS [%]	Sockentupfer		Gülle		Sockentupfer und Gülle	
		qPCR	KK + qPCR	qPCR	KK + qPCR	qPCR	KK + qPCR
		IHP ± SF	IHP ± SF	IHP ± SF	IHP ± SF	IHP ± SF	IHP ± SF
PCR A	50	4.09 ± 0.94	2.39 ± 0.54	3.12 ± 0.72	1.75 ± 0.50	1.96 ± 0.56	1.30 ± 0.34
	90	10.73 ± 2.26	5.85 ± 1.24	7.73 ± 1.66	7.10 ± 1.51	5.86 ± 1.35	3.99 ± 0.90
PCR B	50	4.53 ± 0.79	3.55 ± 0.71	3.72 ± 0.73	2.57 ± 0.56	4.43 ± 0.79	2.36 ± 0.53
	90	9.01 ± 1.60	8.05 ± 1.57	7.55 ± 1.52	6.08 ± 1.28	9.01 ± 1.60	5.70 ± 1.20

(Schätzung des Schwellenwertes der IHP ± asymptotischer Standardfehler (SF) für die Erkennung einer MAP positiven Herde bei Nutzung von Sockentupfern oder Gülleproben oder einer Kombination beider und bei Verwendung von qPCR oder einer Kombination aus PCR und Kultur)

Donat et al., Epidem. Infect., 2015, im Druck



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

seit 1910

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

- **Nachweis von MAP in Sockentupfern und Gülle**
 - ✓ Kultur und Direkt-PCR haben vergleichbare Testcharakteristika
 - ✓ Erhöhte Nachweisrate bei Kombination aus Kultur und PCR

- **Nachweis von MAP-positiven Herden (MAP⁺H) unter Verwendung von Sockentupfern und Gülle**
 - ✓ Sichert eine adäquate Sensitivität und Spezifität auf Herdenebene
 - ✓ Bei einer einmaligen Probenahme werden mit 90% Wahrscheinlichkeit Herden erkannt mit einer Inner-Herden-Prävalenz von
 - 3,9 - 5,7% bei Verwendung beider Matrices (Kultur und qPCR)
 - 5,9 - 8,1% wenn nur Sockentupfer verwendet werden (Kultur und qPCR)

 **Erkennung von Herden mit niedriger ParaTB-Prävalenz möglich**

Schlussfolgerungen

- Stellenwert des Direktnachweises von MAP-Genom mittels qPCR in der Paratuberkulose-Bekämpfung:
 - ✓ Identifikation starker Ausscheider (höhere Se als Ak-NW)
 - ✓ Erhebung des ParaTB-Herdenstatus, insbesondere Erkennung von positiven Herden auch mit niedriger IHP



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

seit 1910

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Vielen Dank an

Wiss. Zusammenarbeit

- K. Donat, Thür. TSK
- K. Failing (Statistik), JLU Gießen
- M. Zschöck, T. Eisenberg, LHL

Tiergesundheitsdienste

- HE: Mirjam Lenz, Irene Noll, Bärbel Kloppert, W. Wolter
- SN: Mandy Schmidt, R. Pützschel,
- TH: Natalie Hahn, Katja Hruschka, W. Siebert, A. Ahrens

Labore/Mitarbeiter

- LHL: Karen Schlez
- Thür. TSK: Esra Einax, Natalie Hahn
- FLI: Sandy Werner, Beate Burkert

Kooperation und Unterstützung

- beteiligten Milchviehhalter
- Veterinärbehörden in HE, SN und TH
- M. Elschner, TMSFG
- C. Menge, FLI
- T.C. Mettenleiter, FLI

Finanzielle Unterstützung

HTSK



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Vielen Dank für Ihre
Aufmerksamkeit!



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

seit 1910

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health