

Was leisten *Coxiella burnetii*-phasen-spezifische und kommerzielle Antikörpertests?

Britta Janowetz, Benjamin Motsch, Vanessa Turowski,
Ursula Domes, Benjamin Bauer, Jens Böttcher

Gefördert aus Mitteln des Freistaates Bayern durch das Bayer. Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten sowie der Bayer. Tierseuchenkasse.

- ◆ Phasenmuster:
 - im akut infizierten Bestand
 - nach überstandener Infektion
 - im chronisch infizierten Bestand
 - nach Impfung
- ◆ Was leisten die kommerziellen Testsysteme?
- ◆ Bestandsprofile bei akut und chronisch infizierten Herden

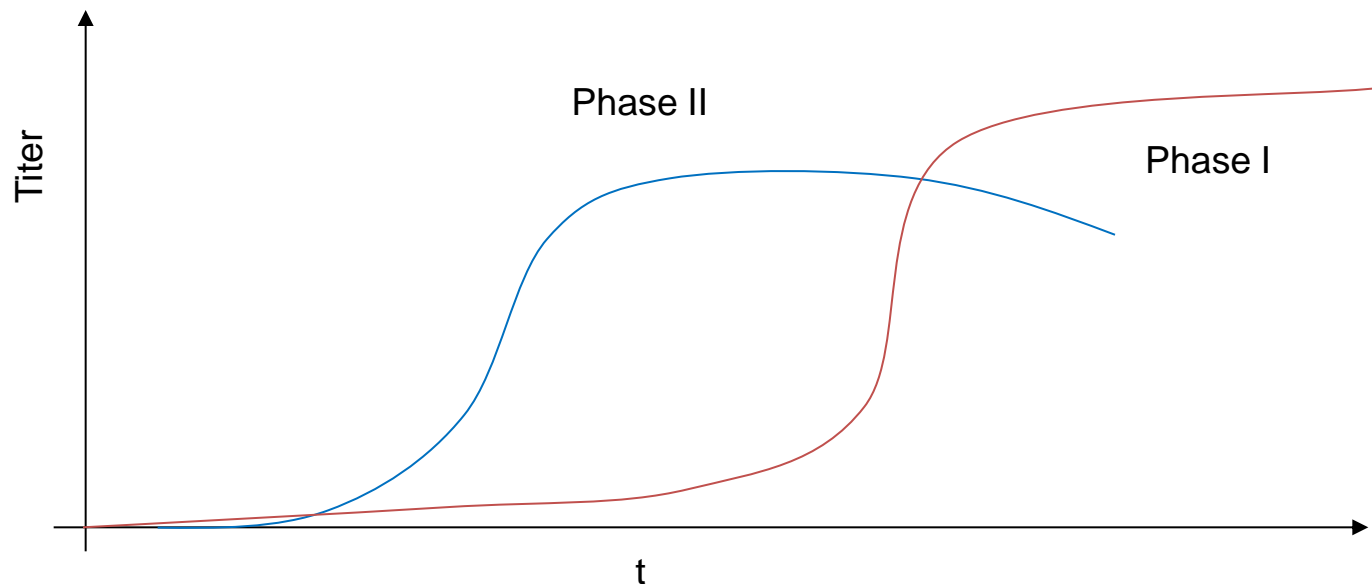


Phasenspezifischer ELISA - warum?

Humanmedizin:

Nachweis von Antikörpern gegen die Erregerantigene Phase I und Phase II

- Akute Infektion: Frühe Phase II und keine/ggrd. Phase I-Antikörper
- Chronische Infektion: Erhöhter Phase I-Antikörper-Titer ist ein Indikator!



- ◆ 3 kommerziell verfügbare ELISA
 - IDEXX Q Fever Ab Test (IDEXX)
 - LSIVet™ Ruminant Q Fever Serum/Milk ELISA Kit (Thermo Fisher)
 - ID Screen® Q Fever Indirect (IDVet)

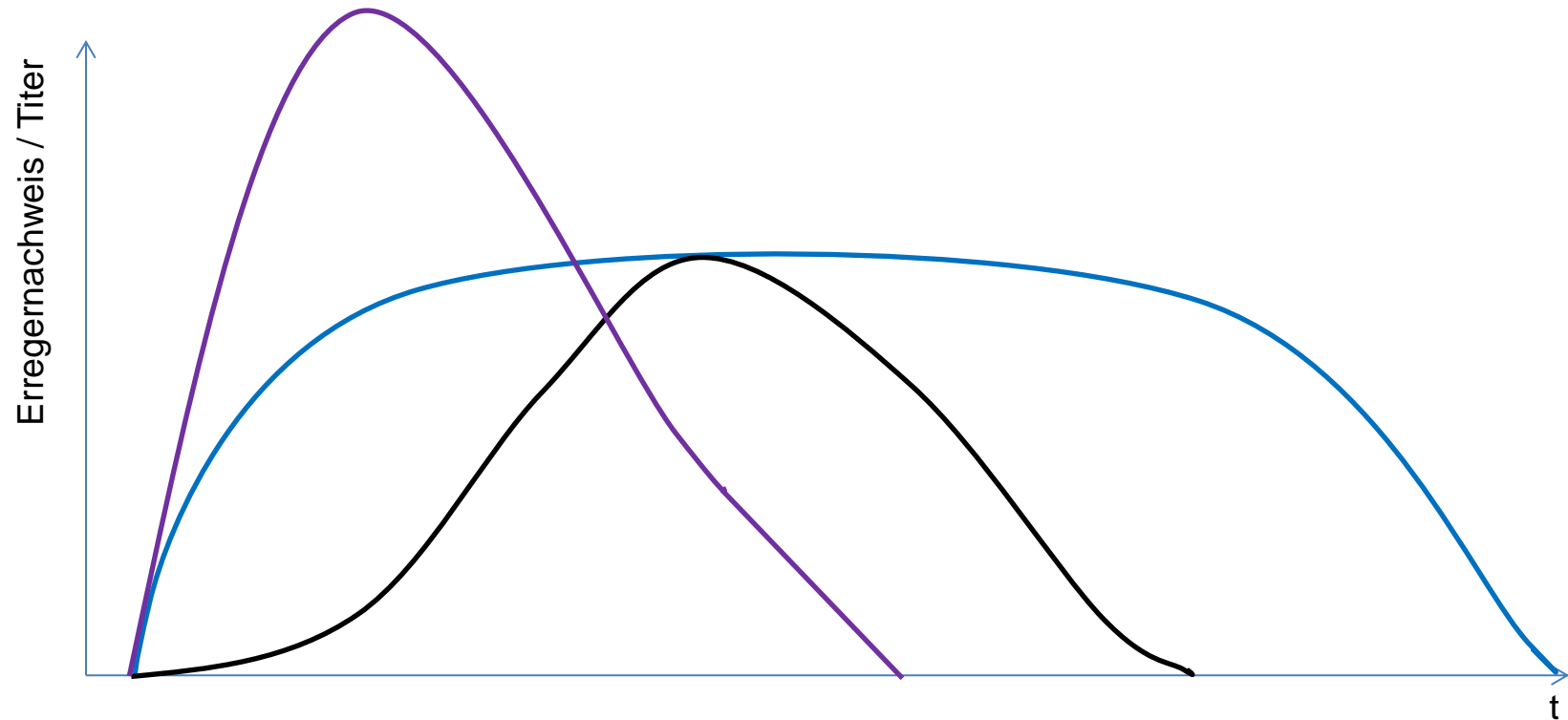
- ◆ Quantitative phasenspezifische Serologie (cut-off 20%)
 - Titration: Serum 1:100 bis 1:100000 (<100: negativ); Einzelmilch 1:5 bis 1:5000 (<5: negativ)

- ◆ IFN-γ-Test (cut-off 15%)
 - Lithium-Heparinproben; Stimulation mit Phase II Antigen; Kontrollantigen, PBS-Kontrolle; IL10-neutralisierende Antikörper bzw. Isotyp-Kontrolle; Stimulationskontrolle; 16 h Inkubation; IFN-γ-Test (ELISA für bovines / ovines IFN-γ (MABTECH))

- ◆ qPCR
 - LSI VetMAX™ *Coxiella burnetii* Real-Time PCR Kit, absolute quantification (Thermo Fisher)
 - Tupferproben: Puerperaltupfer, Vaginaltupfer, Nasentupfer
 - Einzelmilchproben

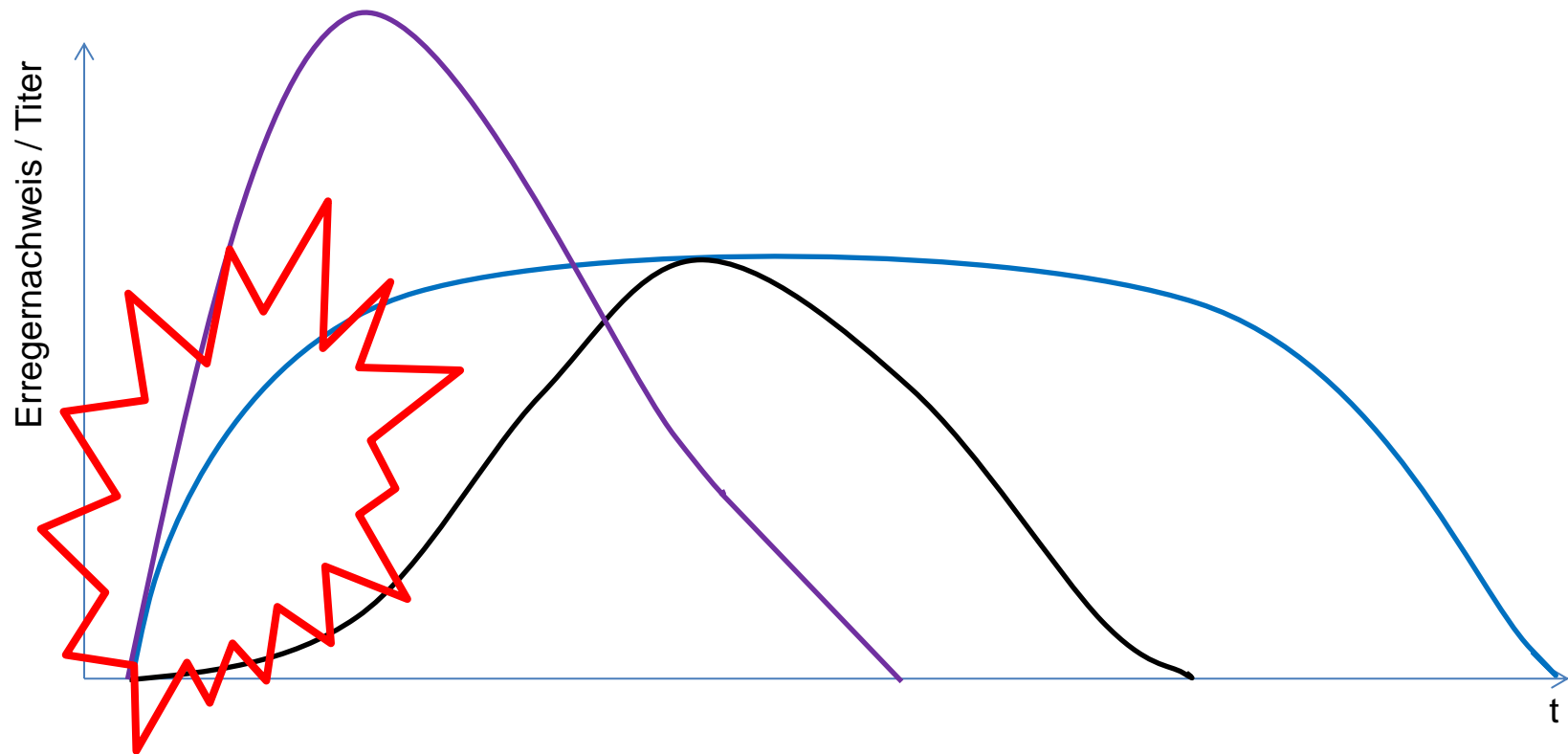
- ◆ KBR (Dr. Judith Tyczka, Abt. 7 CVUA Karlsruhe)

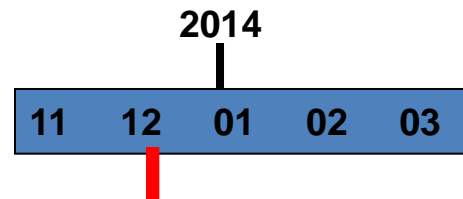
- Erregernachweis
- Phase II-Antikörper
- Phase I-Antikörper



Phasenspezifischer ELISA in der Tiermedizin

- Erregernachweis
- Phase II-Antikörper
- Phase I-Antikörper





1. Erregernachweis



- Schafherde (ca. 1100 Mutterschafe)
- Merino Landschaft
- Saisonale Lammung
- Wanderschafherde
- Aufstallung im Winter

Januar 2014

MONTAG	DIENSTAG	MITTWOCH	DONNERSTAG	FREITAG	SAMSTAG	SONNTAG
		1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31		

Februar 2014

MONTAG	DIENSTAG	MITTWOCH	DONNERSTAG	FREITAG	SAMSTAG	SONNTAG
					1	2
3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28		

März 2014

MONTAG	DIENSTAG	MITTWOCH	DONNERSTAG	FREITAG	SAMSTAG	SONNTAG
					1	2
3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28	29	30
31						

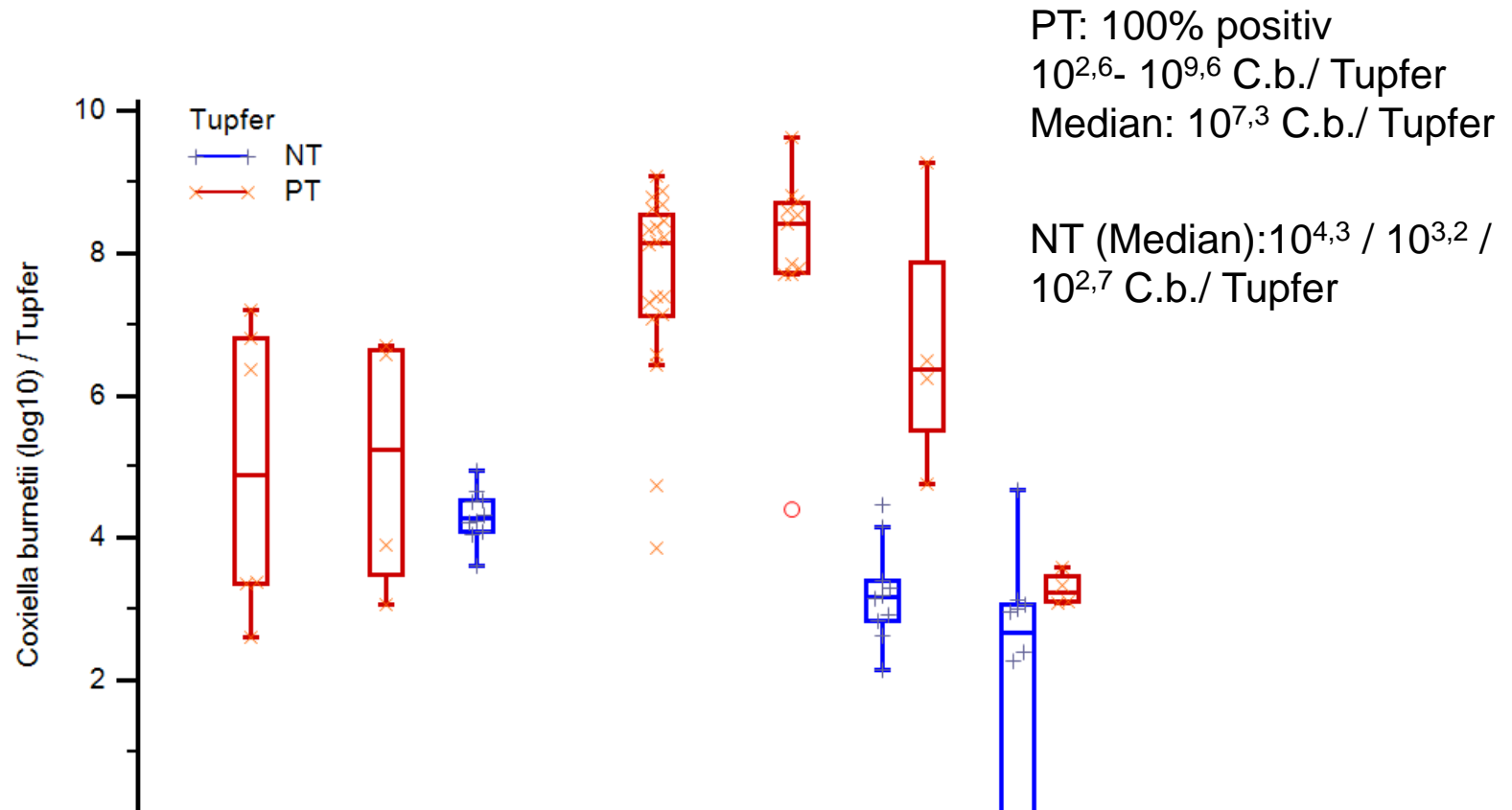


- Erster (zufälliger) Erregernachweis: 23.12.2013

★ 3 Blutentnahmen vor der Bestandsimpfung (21, 28 und 38 Tage nach erstem Nachweis)

🦋 Entnahme von Nasentupfern (n=30) und Puerperaltupfern (n=49)

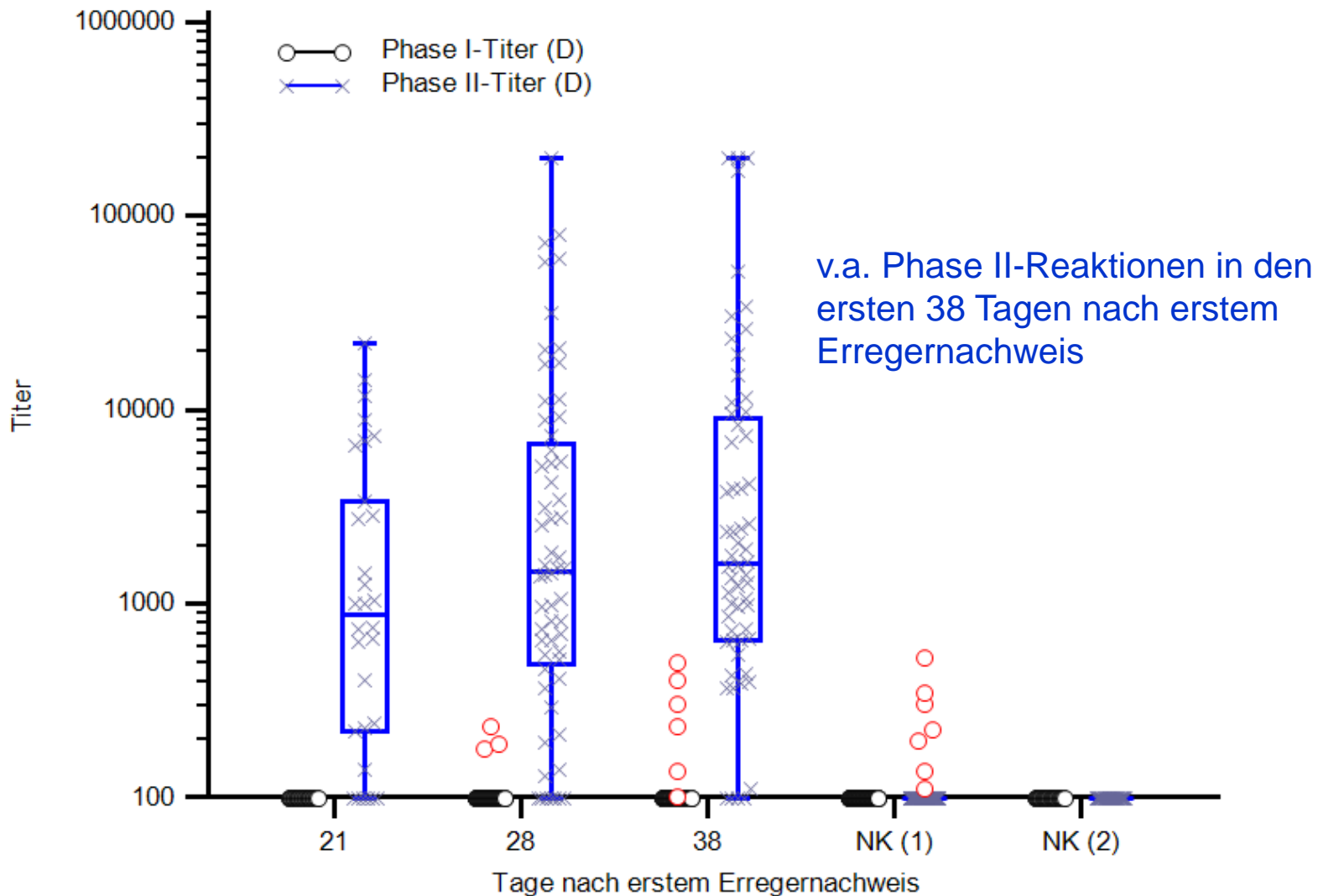
Erregerausscheidung in Puerperal- und Nasentupfern im infizierten Schafbestand



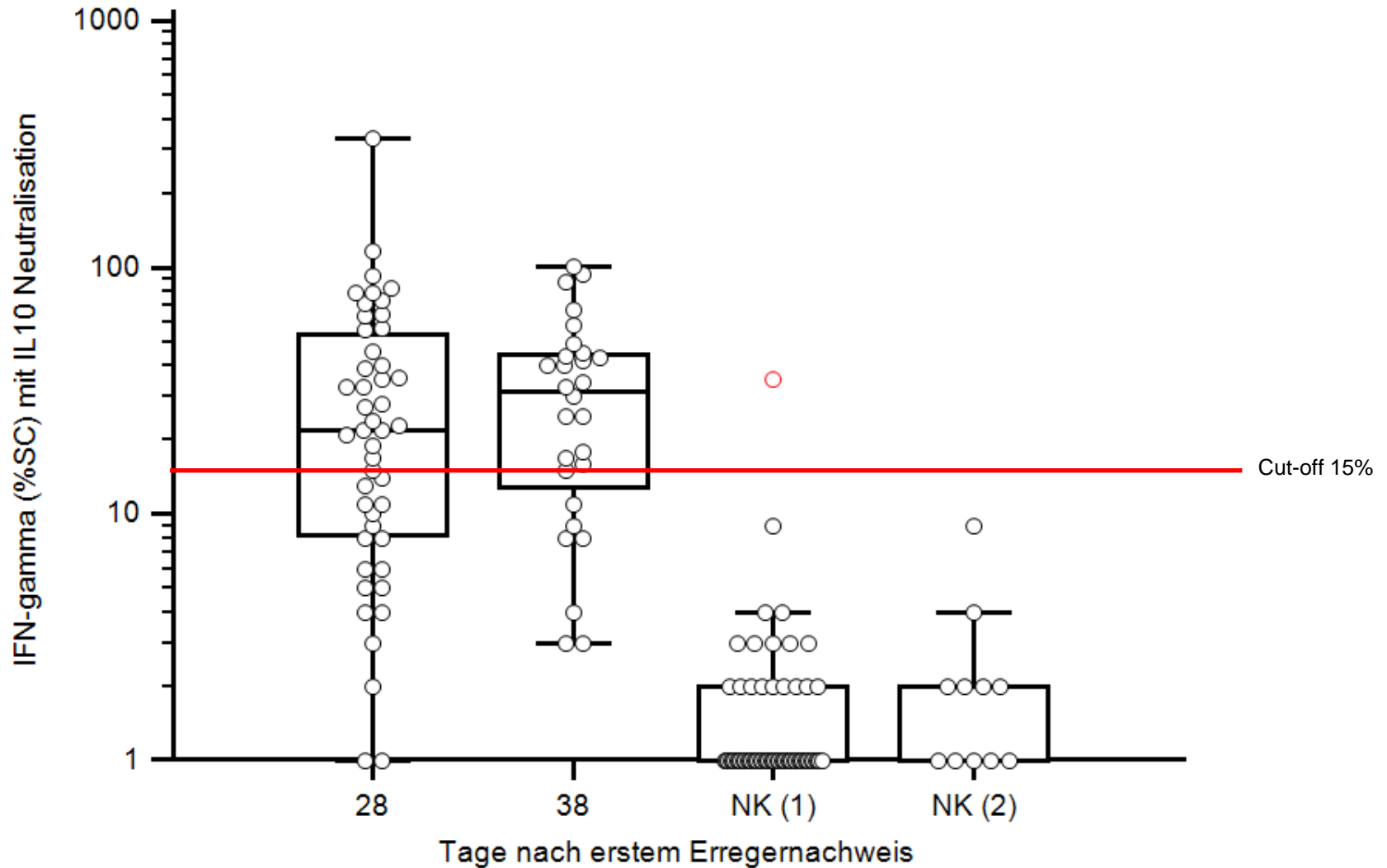
Notwendigkeit einer frühzeitigen Diagnostik!

➤ Ausscheidung erheblicher Erregermengen

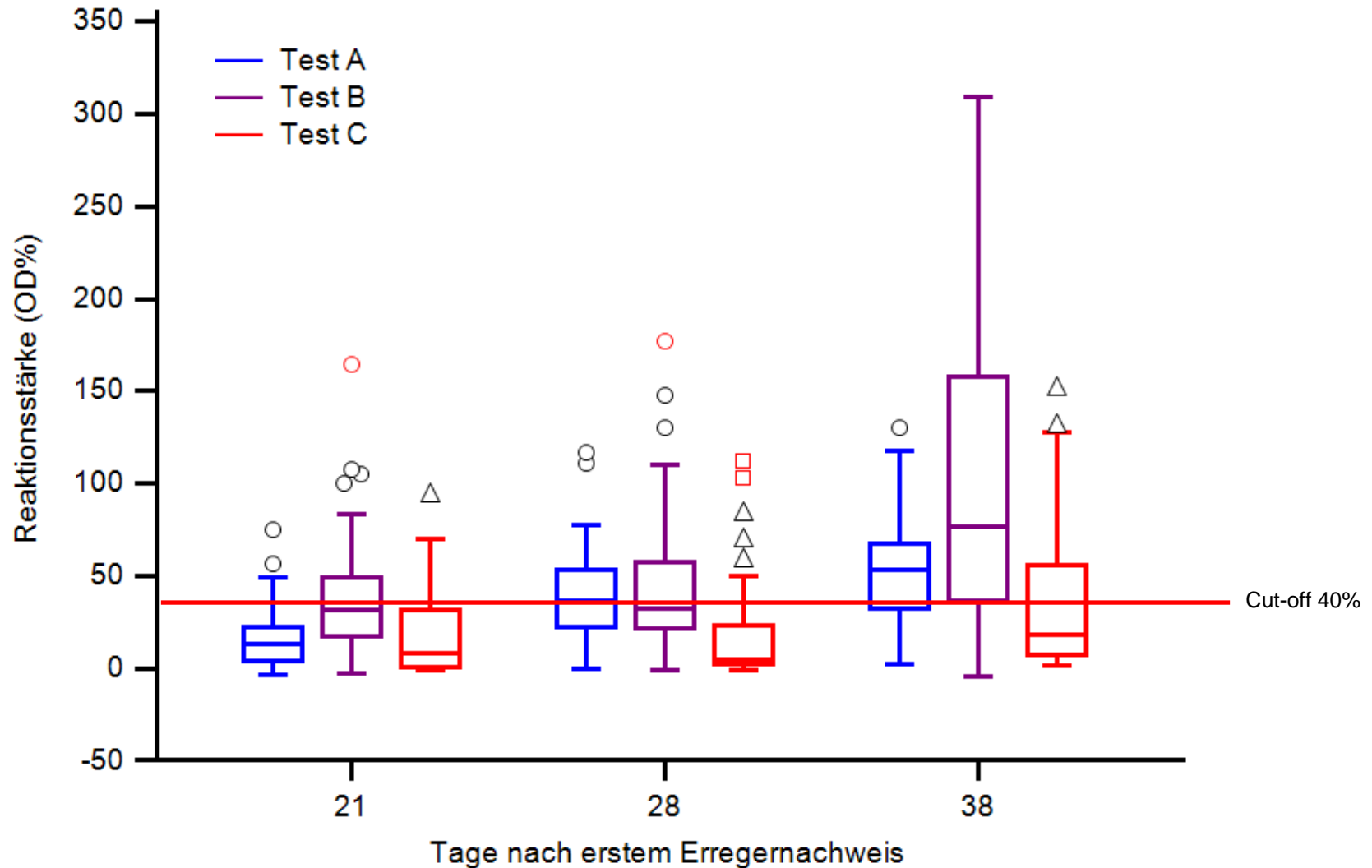
Phase I- und Phase II-Antikörpertiter akute Infektion frühe Phase

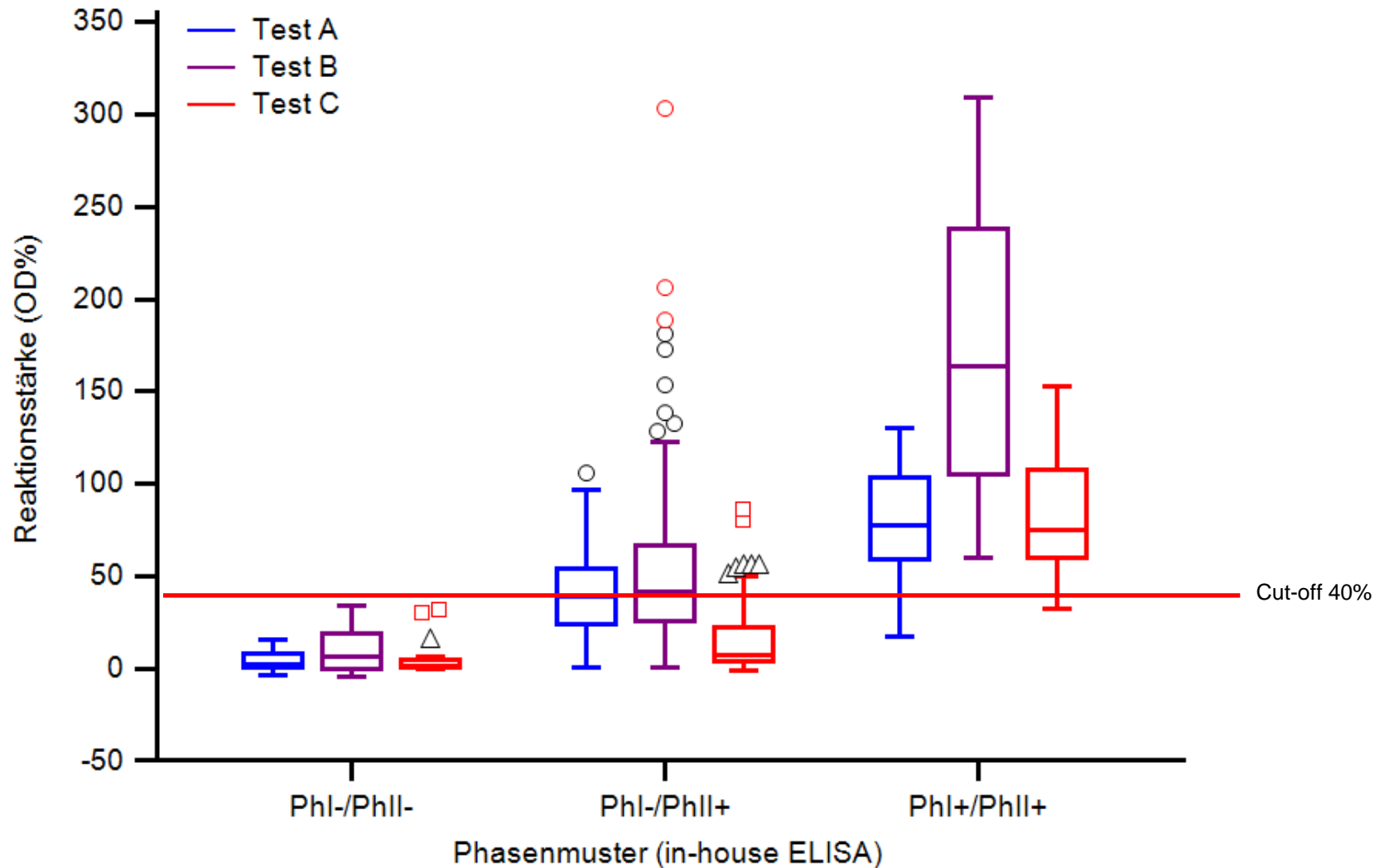


INF- γ Reaktionen akute Infektion frühe Phase



Kommerzielle Testsysteme akute Infektion frühe Phase





Prozentualer Anteil positiver Ergebnisse im akut infizierten Bestand

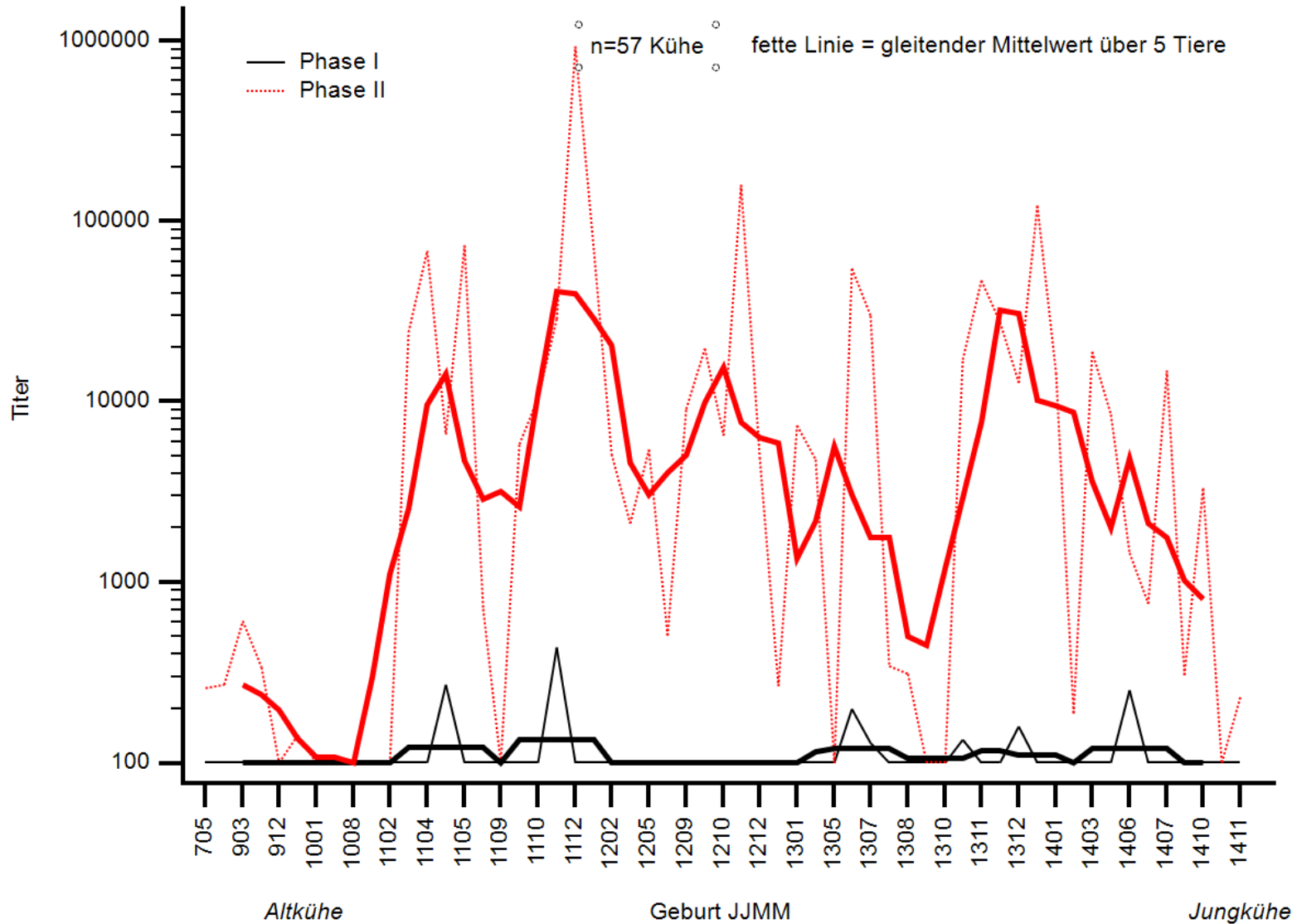


Testsystem	Tag 21 (n=30) positiv (%) (Median; Geomittel (Titer) bzw. Mittelwert (IFN-γ-Test))	Tag 28 (n=60) positiv (%) (Median; Geomittel (Titer) bzw. Mittelwert (IFN-γ-Test))	Tag 38 (n=60) positiv (%) (Median; Geomittel (Titer) bzw. Mittelwert (IFN-γ-Test))
Test A: IDEXX	20%	67%	78%
Test B: LSI	37%	38%	73%
Test C: IDVet	13%	13%	32%
Phase I-ELISA	0% (100;100)	5% (100; 104)	10% (100; 109)
Phase II-ELISA	80% (886; 927)	88% (1485; 1793)	93% (1624; 2433)

Phase II-Antikörper zeigen die frühe Infektion an

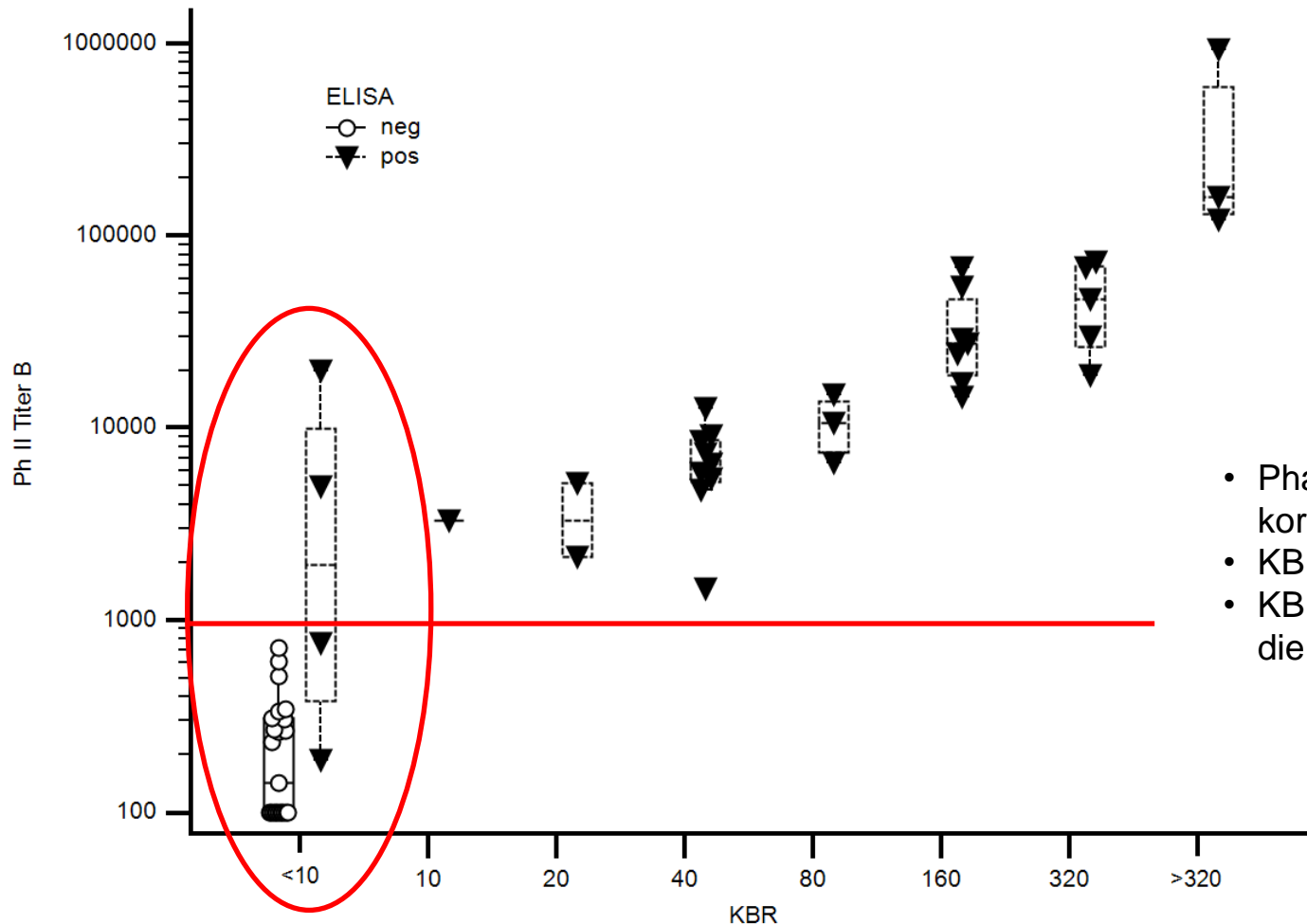
- Die Diagnostik mit kommerziell erhältlichen ELISA ist in dieser Infektionsphase unzureichend: deutlich geringere Nachweisraten in der akuten Phase

Profil akut infizierter Rinderbestand



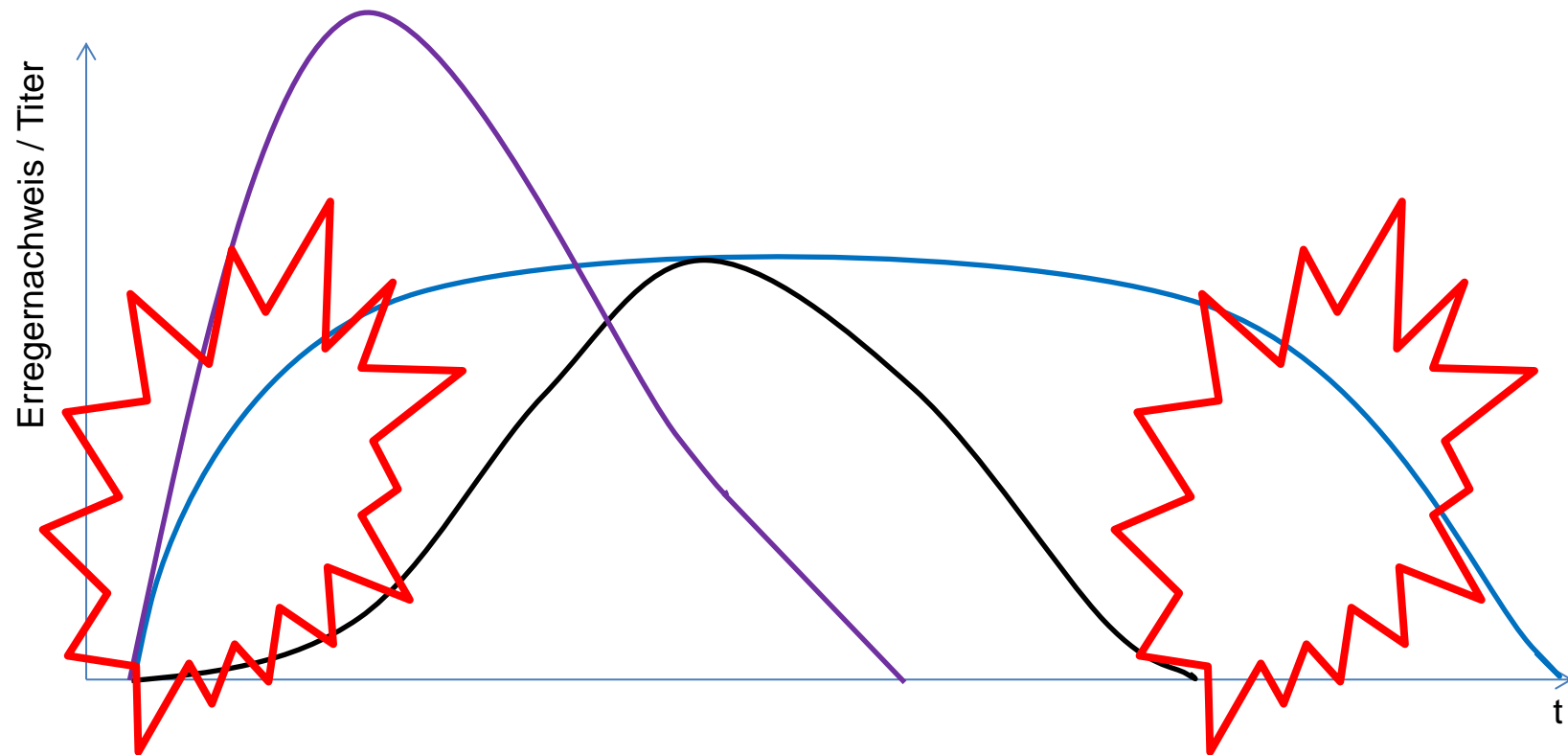
Akut infizierter Rinderbestand: KBR und Phase II-Titer

Phase II-ELISA in Abhängigkeit von ELISA und KBR

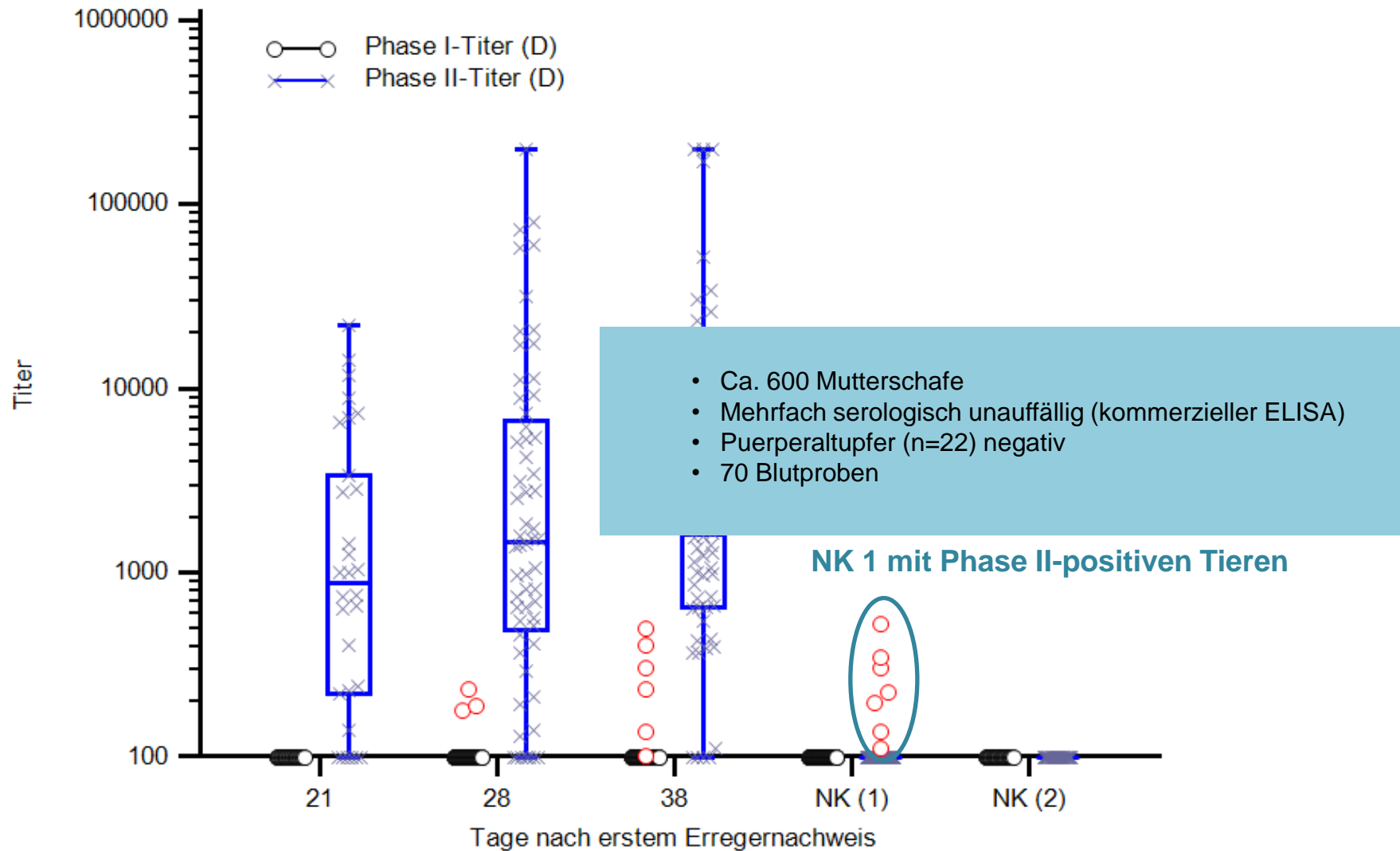


- Phase II-Titer >1000 korrelieren mit KBR
- KBR weniger sensitiv
- KBR ungeeignet für die Milchserologie

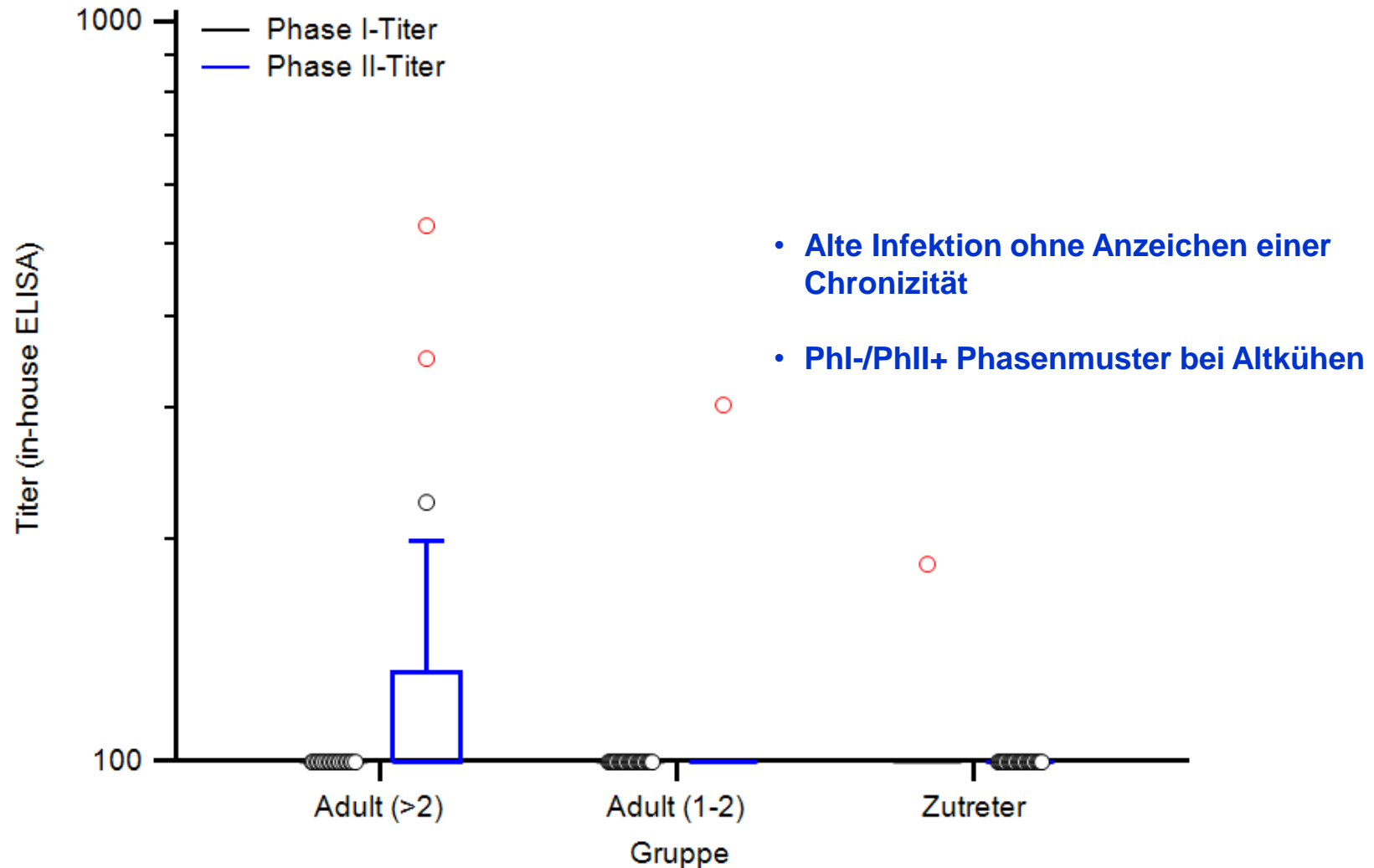
- Erregernachweis
- Phase II-Antikörper
- Phase I-Antikörper



Phase I- und Phase II-Antikörpertiter: Vergleich mit Negativkontrollbeständen



Negativkontrollbestand mit Phase II-Antikörpern bei den Alttieren



- ◆ Akute Infektion
- ◆ Immunität nach überstandener Infektion
- ◆ Gleiches Bild: Somit ist eine Unterscheidung nur möglich, wenn man die Infektionsdynamik beachtet:
 - Bestandsprofil (Altersgruppen; mindestens 10 Proben pro Altersgruppe)
 - Infektions-empfindliche Tiere werden remontriert und bilden bei Ansteckung Phase II-Antikörper: Sie dienen in der Diagnostik als „Sentineltiere“ für eine aktive Infektion

Poster: Motsch B, Alves-Nascimento C, Janowetz B, Werth S, Deckinger E, Böttcher J:
Folgt die Coxiellen-Infektion in Milchviehbeständen bestimmten Gesetzmäßigkeiten?

Verlauf der Phase II-Titer einzelner Tiere über die Zeit

2012 Coxiellrose diagnostiziert

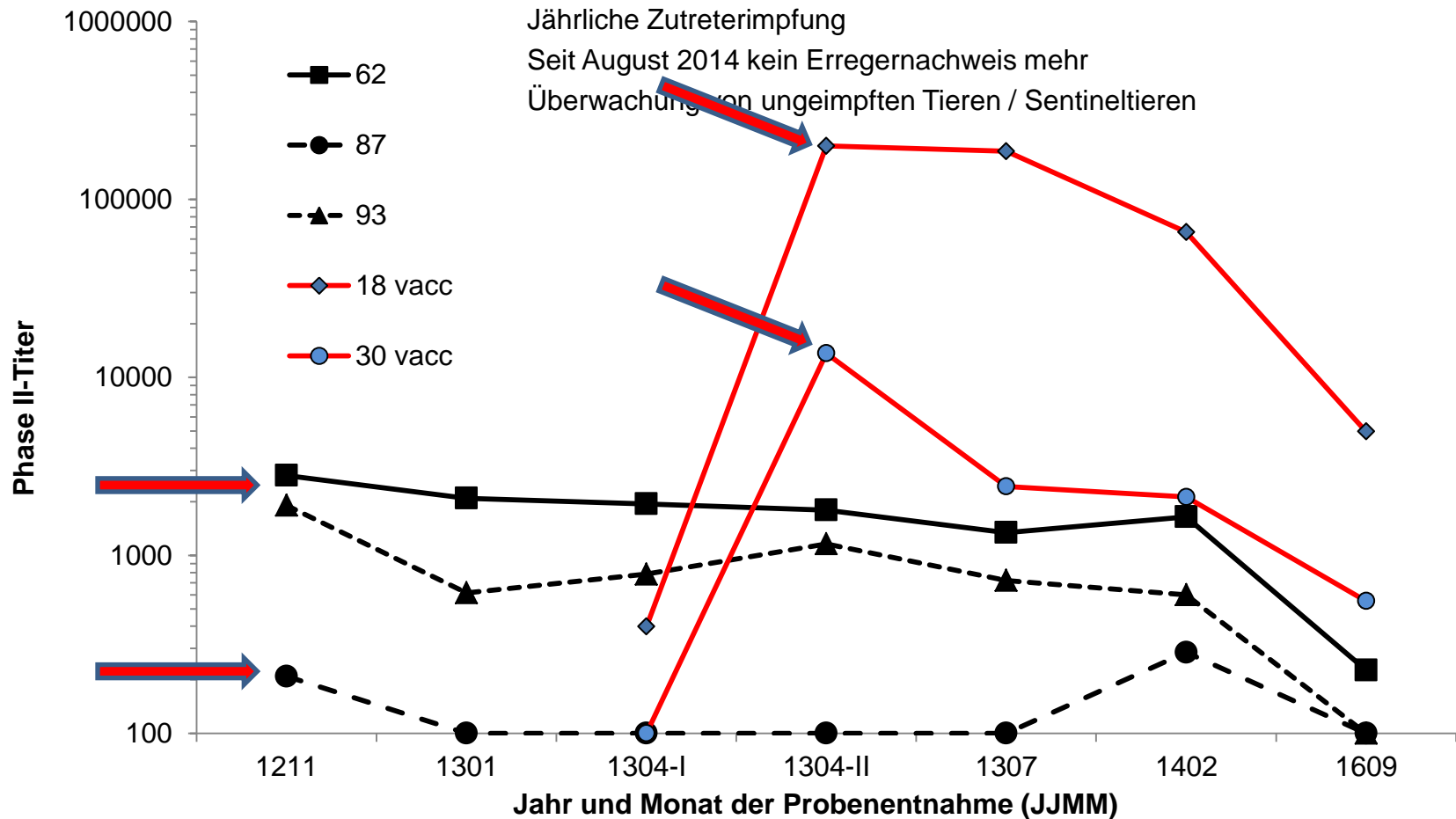
Ablamperperiode Winter 2012/2013: 9,9% der Puerperaltupfer (n= 171) positiv:

Mittlere Erregermenge: $10^{2,8}$ C.b./Tupfer (Max.: $10^{7,4}$ C.b./Tupfer)

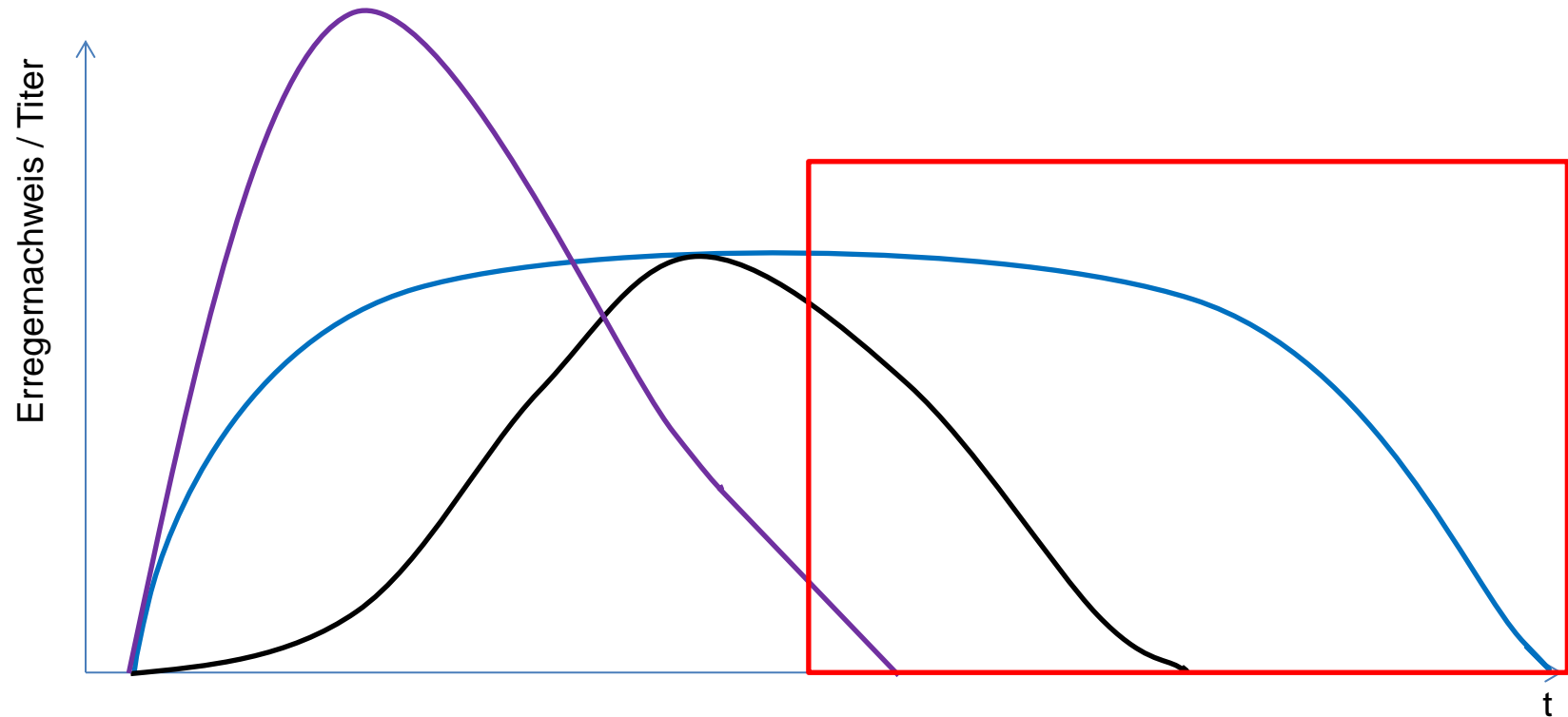
Jährliche Zutreterimpfung

Seit August 2014 kein Erregernachweis mehr

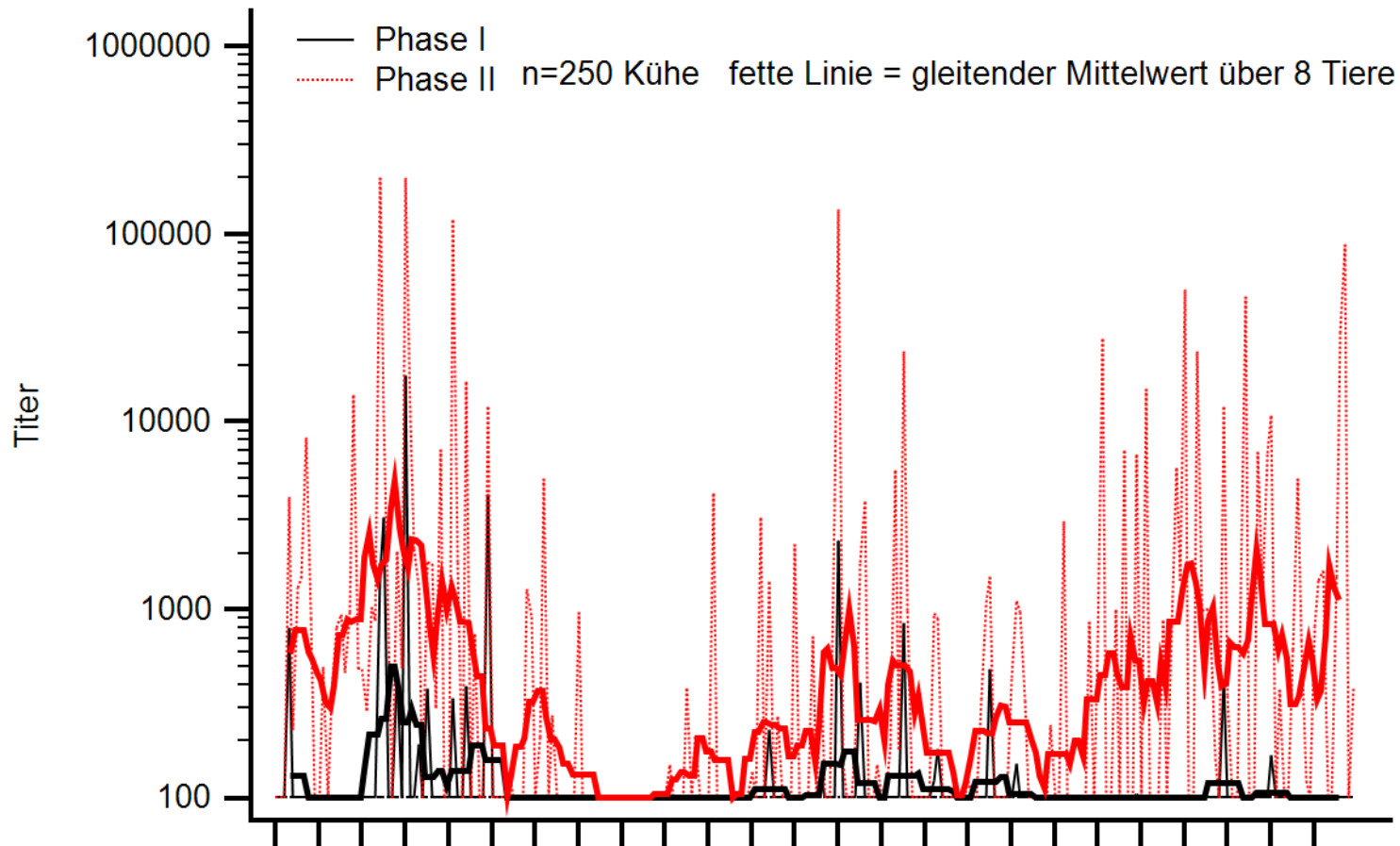
Überwachung von ungeimpften Tieren / Sentineltieren



- Erregernachweis
- Phase II Antikörper
- Phase I-Antikörper



Profil chronisch infizierter Rinderbestand



Phase I- und Phase II-Antikörper haben wellenförmiger Verlauf im Bestandsprofil

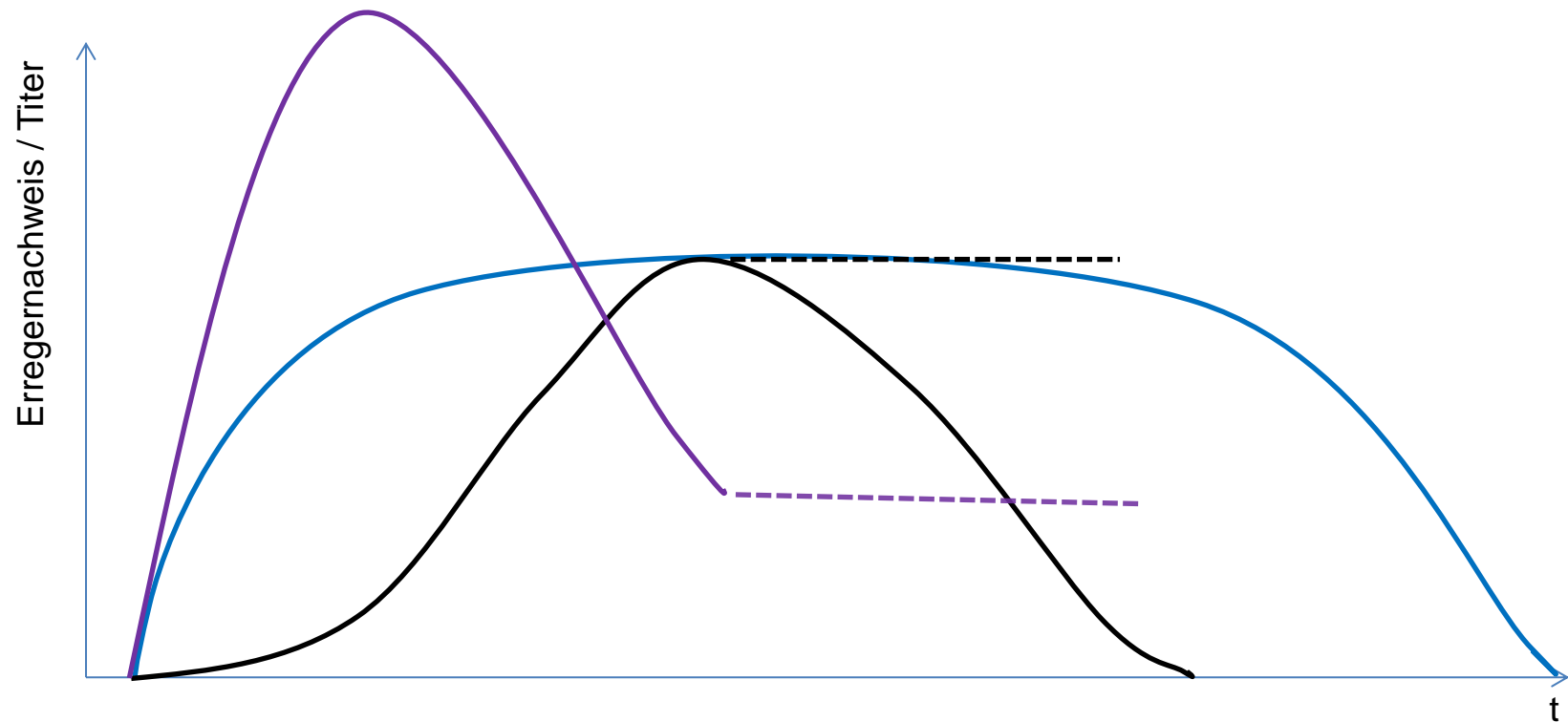
Chronische Coxiellen-Milchausscheider sind für die langfristige Aufrechterhaltung der Infektketten relevant

Prozentualer Anteil positiver Ergebnisse im chronisch infizierten Bestand

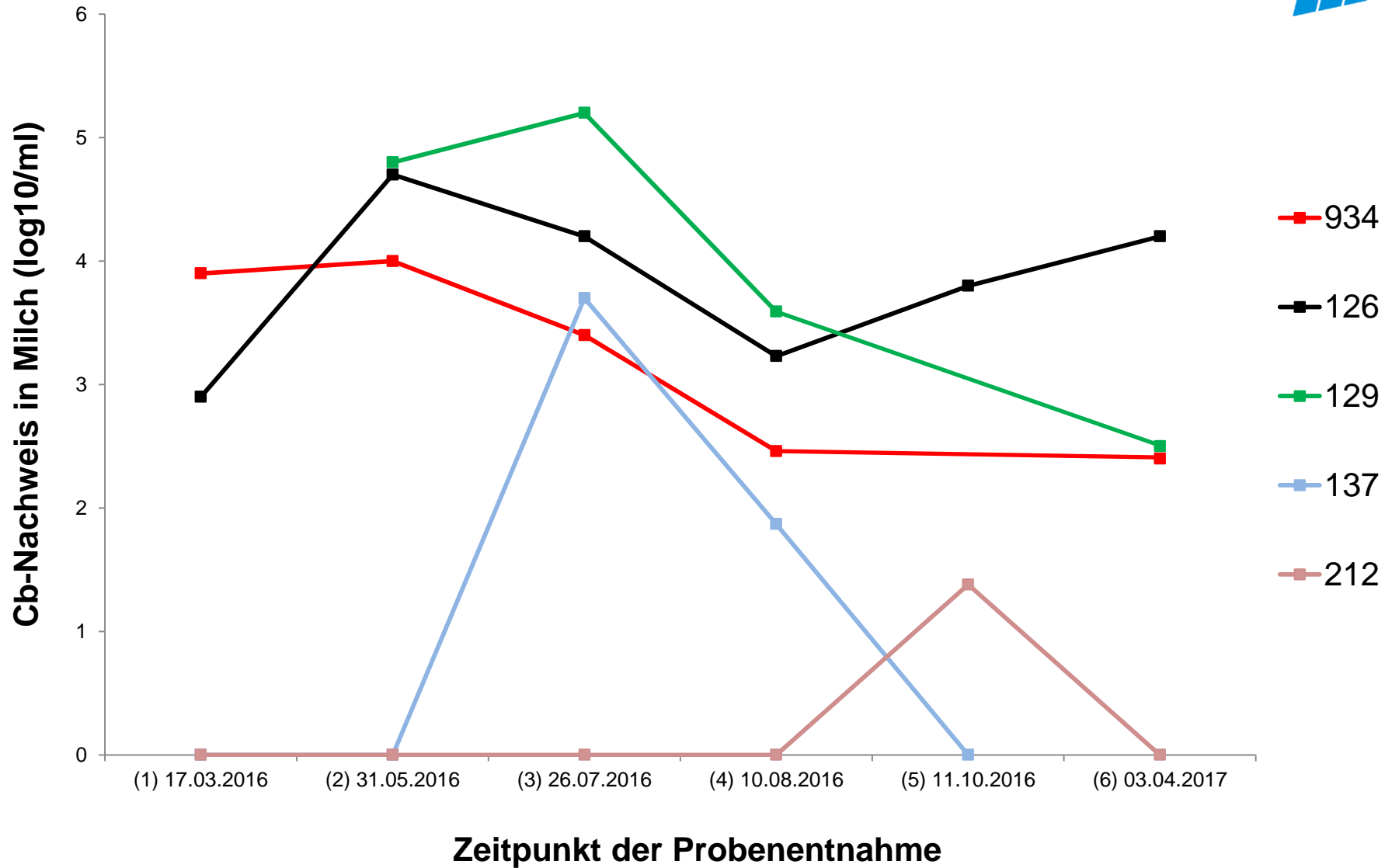
Phasenmuster (n=250)			
	PhI-/PhII- (n=134; 54%) positiv (%)	PhI-/PhII+ (n=93; 37%) positiv (%)	PhII+/PhII+ (n=23; 9%) positiv (%)
Test A: IDEXX	6%	72%	100%
Test B: LSI	2%	52%	100%
Test C: IDVet	12%	43%	100%
PhI-/PhII+: Unzureichende Detektion in kommerziellen Tests			
IFN-γ-Test (n=194) (ohne IL-10-Neutralisation)	50%	73%	44%

**Schwächere IFN-γ-Reaktion
bei chronisch-infizierten
Tieren**

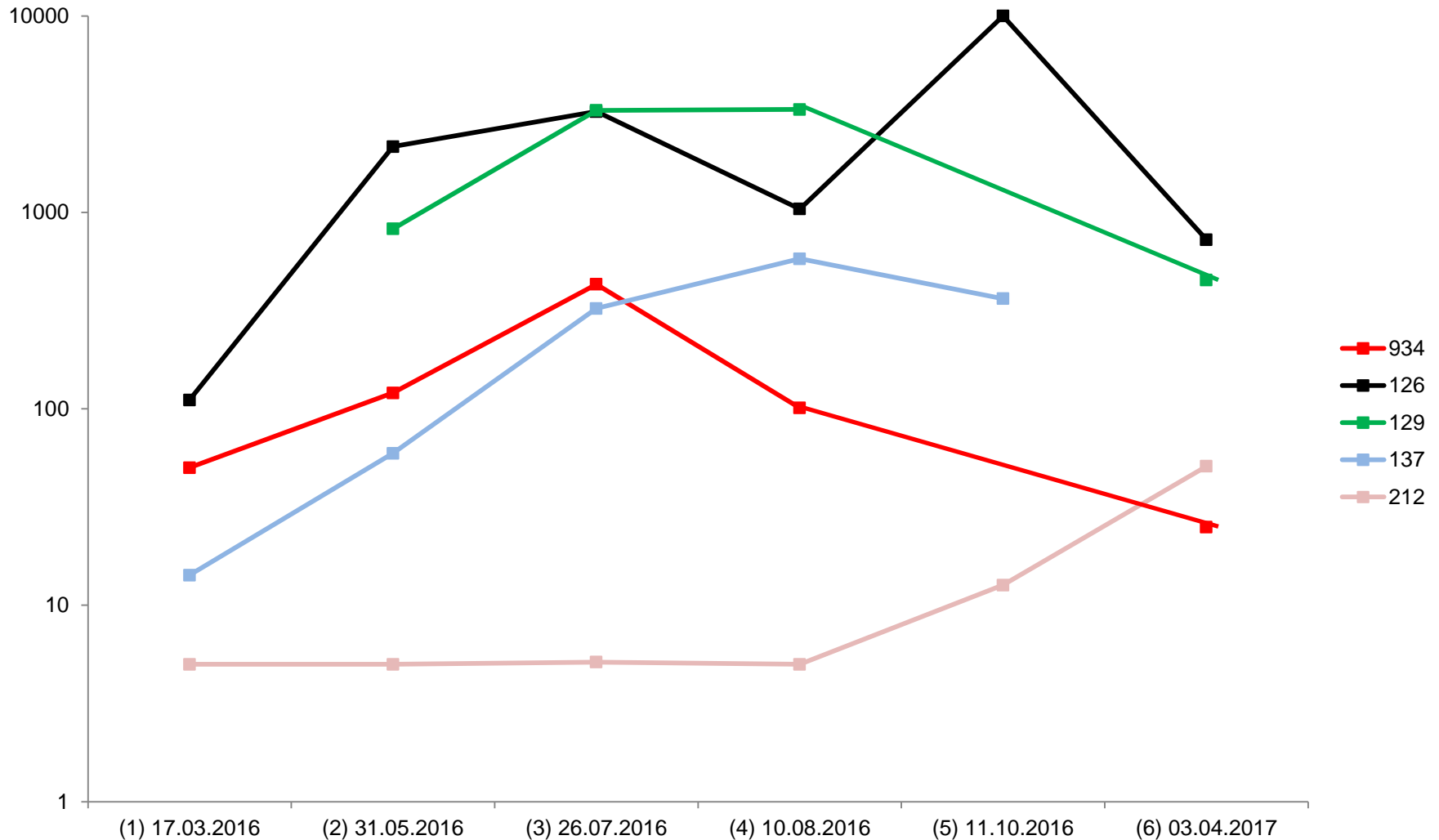
- Erregernachweis
- Phase II-Antikörper
- Phase I-Antikörper



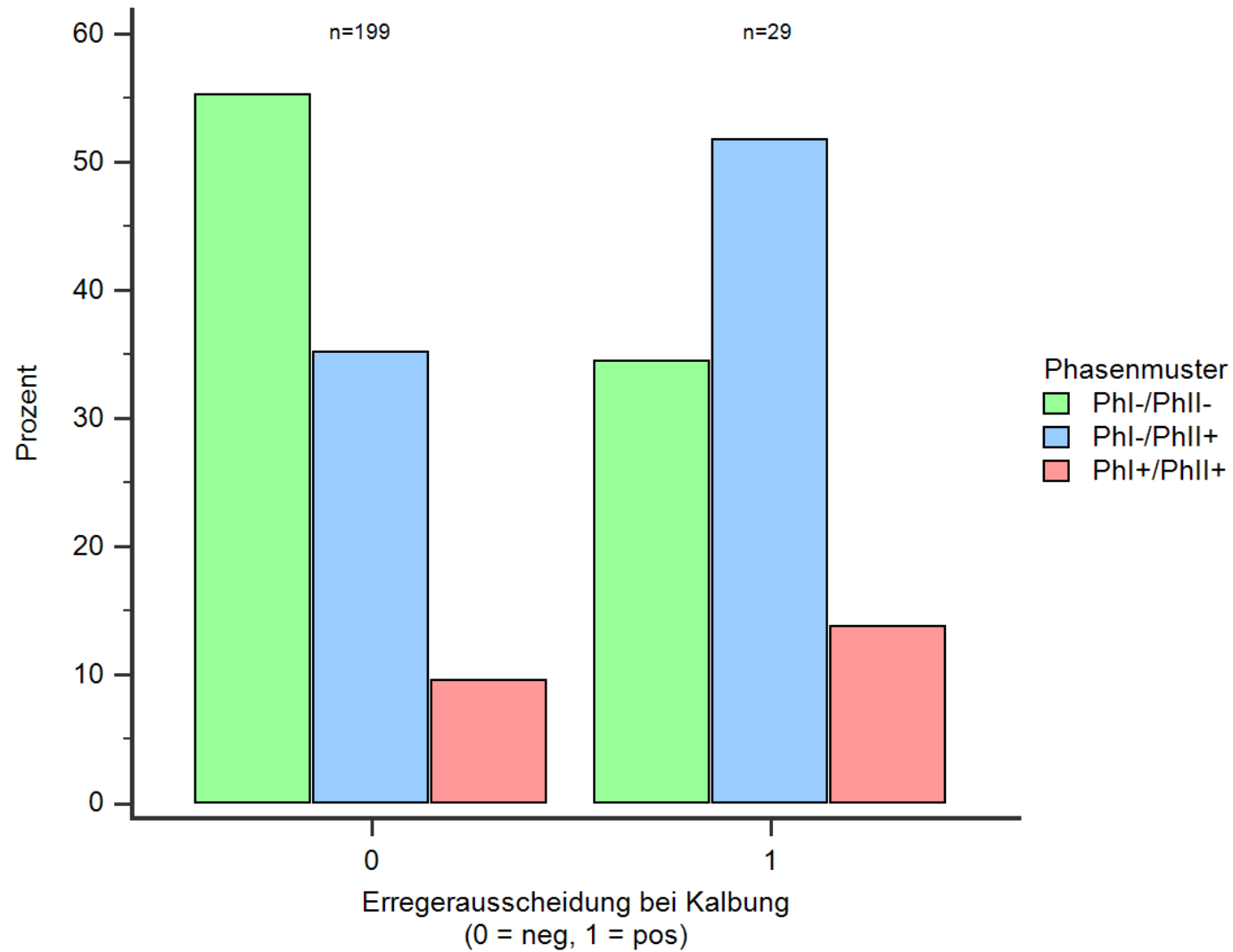
C.b.-Nachweis in Milchproben von Kühen über die Zeit



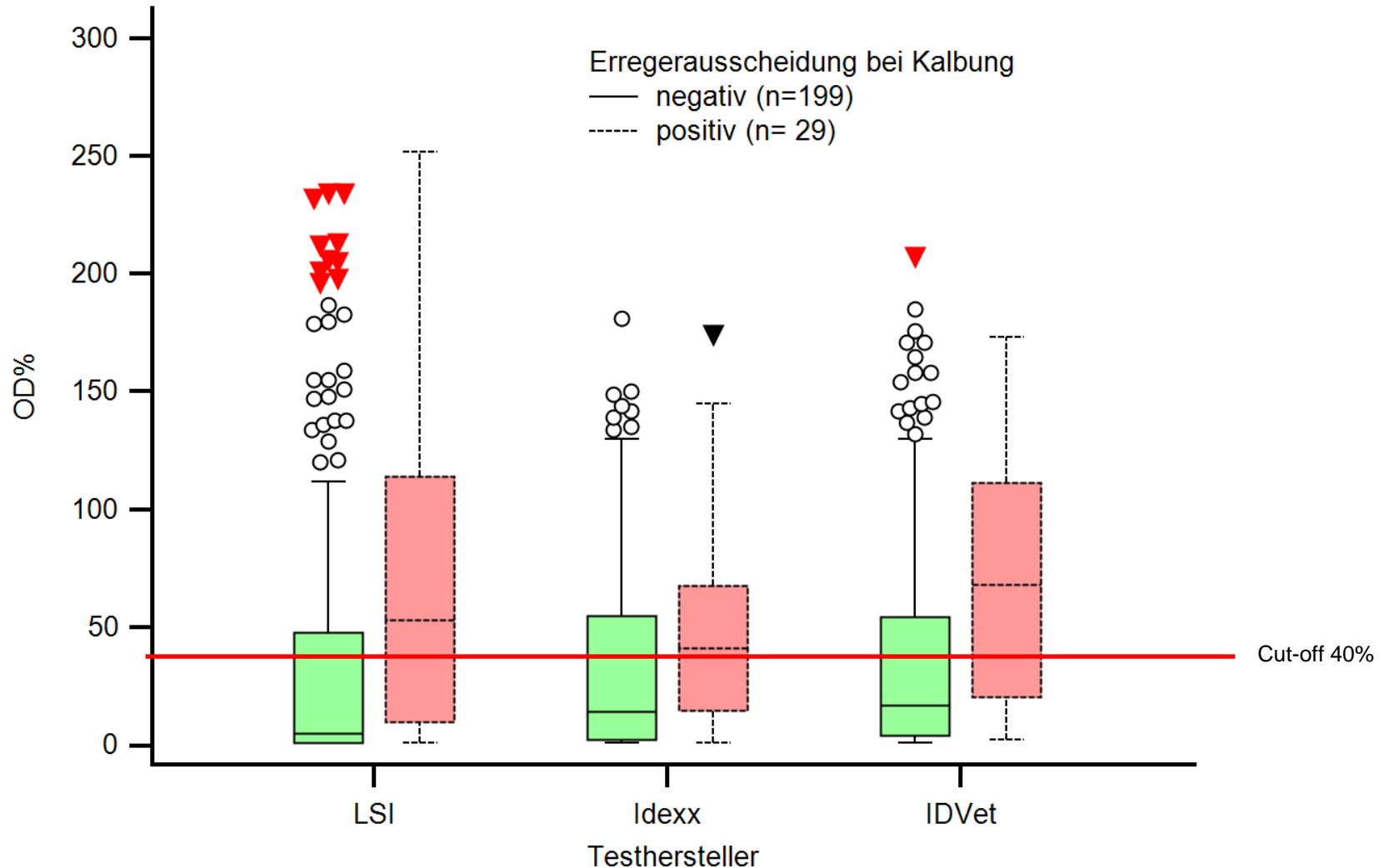
C.b.-Ausscheidung über die Milch: Phase I-Antikörper über die Zeit



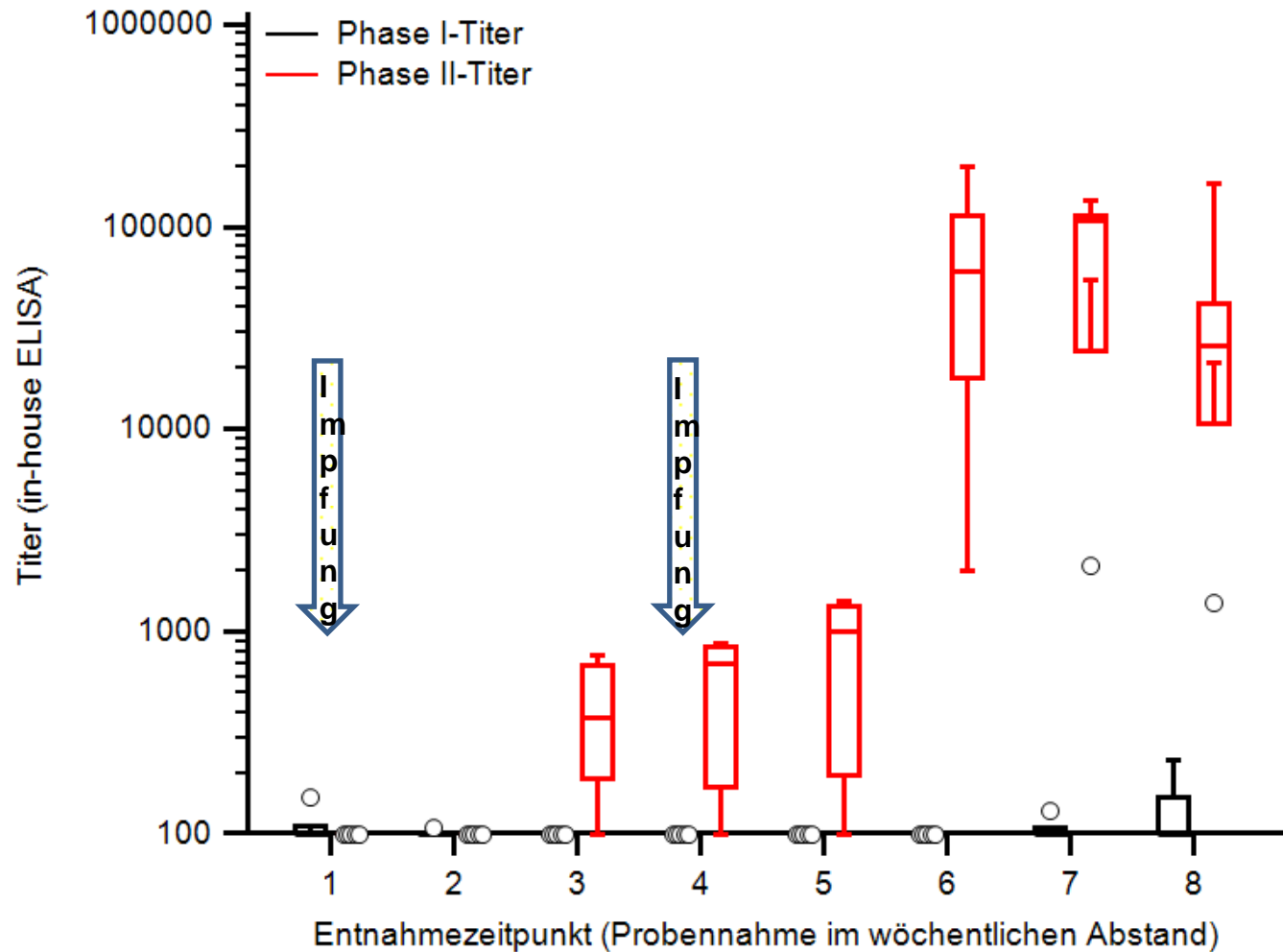
Phasenmuster und Puerperalausscheidung



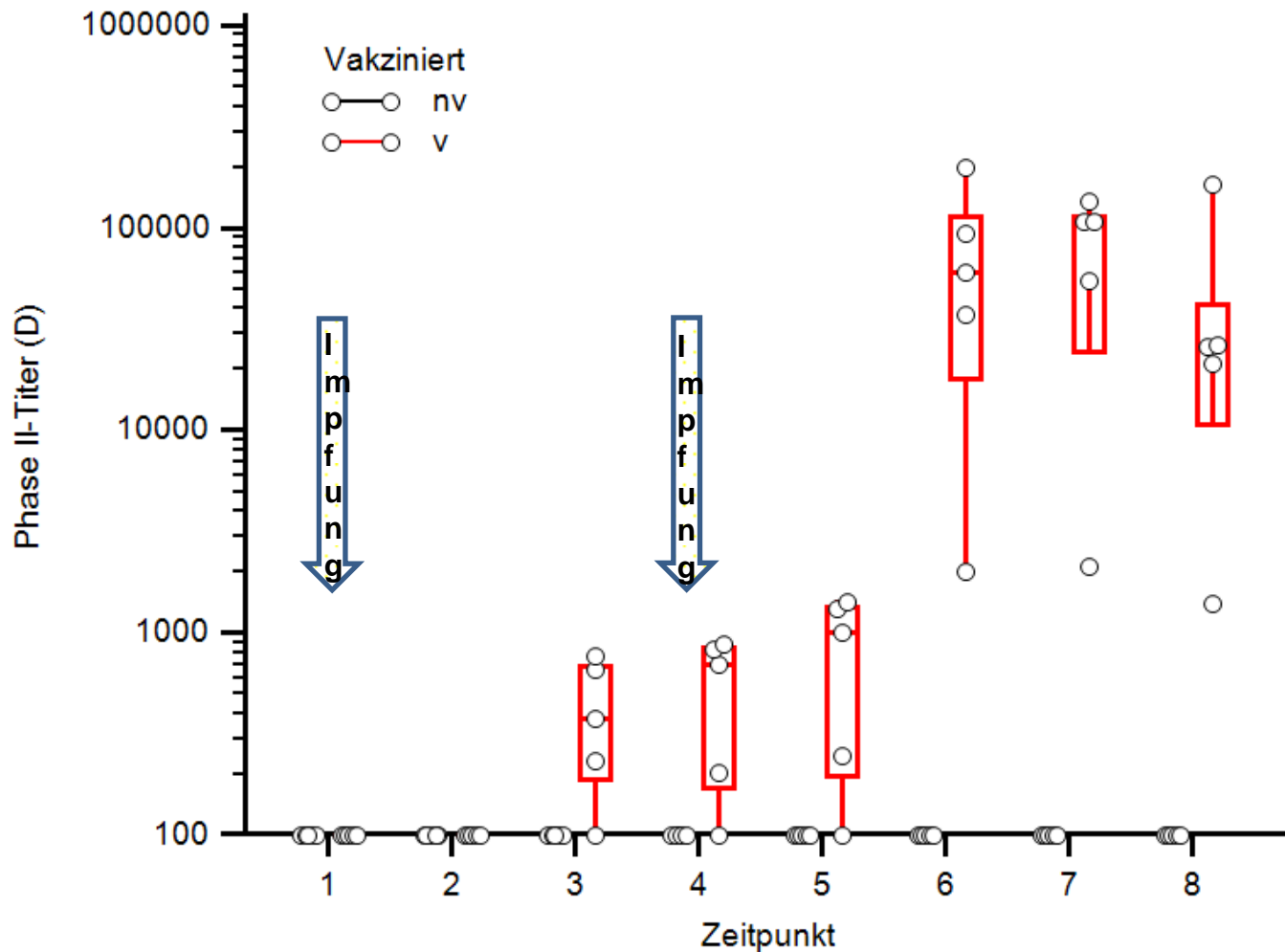
Kommerzielle ELISA / Erregerausscheidung Puerperaltupfer



Immunreaktionen nach der Impfung: Infektionsempfängliche Tiere



Immunreaktionen nach der Impfung: Phase II-Titer vakzinierter Zutreter versus nicht vakzinierter Kontrollgruppe



Phasenmuster Phase I-negativ / Phase II-positiv



- ◆ Akute Infektion
- ◆ Immunität nach überstandener Infektion
- ◆ Nach Impfung naiver Tiere (obwohl Coxevac® gereinigtes Phase I-LPS enthält)

Prozentualer Anteil positiver Ergebnisse des akut infizierten Schafbestandes nach der Impfung

Testsystem	Tag der 1. Impfung (t0) Tag 38 (n=60) positiv (%) (Median; Geomittel (Titer) bzw. Mittelwert (IFN-γ-Test))	Tag der 2. Impfung (t1) Tag 63 (n=60) positiv (%) (Median; Geomittel (Titer) bzw. Mittelwert (IFN-γ-Test))	t2 Tag 92 (n=57) positiv (%) (Median; Geomittel (Titer) bzw. Mittelwert (IFN-γ-Test))
IDEXX	78%	95%	98%
LSI	73%	79%	84%
IDVet	32%	56%	89%
Phase I-ELISA	10% (100; 109)	19% (100; 142)	61% (252; 343)
Phase II-ELISA	93% (1624; 2433)	98% (12211; 12681)	100% (13384; 12359)
IFN-γ-Test	75% (32; 35)	75% (41; 52)	91% (58; 75)

Kommerzielle ELISA

- ◆ Unterscheiden nicht die Phasenspezifität: sind mit Antigenen beider Phasen beschichtet
- ◆ Qualitative Aussage
- ◆ Deutlich geringere Nachweisraten vor und auch nach der Impfung
- ◆ Keine Unterscheidung der Infektionsstadien möglich
- ◆ Weisen v.a. Phase I-Antikörper nach
- ◆ Tiere mit ausschließlich Phase II-Titern liegen im fraglichen bis schwach-positiven Bereich und werden somit nur unzureichend detektiert
- ◆ Verwendung von ruminanten Coxiellen–Isolaten (LSI, IDVet): kein Vorteil erkennbar

Phasenspezifische ELISA:

- ◆ Quantitative Aussage bei Titration
- ◆ Bestandsprofile: Unterscheidung zwischen akutem, chronischem und ruhendem Geschehen
- ◆ Aktuelles *C.b.*-Geschehen in der Herde: Phase II-Antikörper bei Erstlaktierenden bzw. Zutretern

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!



Herzlichen Dank an die Tierhalter und Probennehmer!

Vielen Dank den Teams des CVUA Karlsruhe und des ZI!

Diese Arbeit wurde durch den Freistaat Bayern und die Bayerische Tierseuchenkasse gefördert.

