

VETResearch 2017 Retreat

Grußwort

In der vorliegenden VETResearch Online-Broschüre 2017 werden die Ergebnisse der erfolgreich durchgeführten studentischen Forschungsprojekte vorgestellt. Die präsentierten Projekte zeigen die Vielseitigkeit der Forschungsthemen und -möglichkeiten in der Tierärztlichen Fakultät der LMU München. VETResearch bietet auch ein großes Potential für Kooperationen zwischen verschiedenen Fachgebieten der Tierärztlichen Fakultät.

VETResearch ist eine hervorragende Gelegenheit für junge Studierende, eine wissenschaftliche Fragestellung zu bearbeiten. Es erweitert schon früh in ihrer Ausbildung deren Blickwinkel und ermöglicht es ihnen, sich selbst und ihr Forscherpotential auszuloten. Die Erfahrungen, die Studierende dabei sammeln, sind einerseits nützlich, um später nach dem Studium ihren weiteren beruflichen Werdegang zu planen, andererseits aber auch um zu lernen, dass Tiermedizin mehr ist als nur die kurative Praxis. Neben Prüfungen, Praktika und Vorlesungen bekommt das Studium der Tiermedizin eine neue Facette, die nur wenig mit Lernen, sondern mit Begreifen und Erfassen zu tun hat. Für alle jungen WissenschaftlerInnen ist es dabei genauso lehrreich, Studierende durch wissenschaftliche Projekte führen zu dürfen. Angefangen bei der Verwaltung von beantragten finanziellen Mitteln bis hin zur Erstellung von Verträgen und Projektplänen sind es prägende Erfahrungen, die zusammen mit den Studierenden gemacht werden. Wenn schließlich noch eine Publikation aus einem solchen Projekt hervorgeht, ist es umso mehr ein Gewinn für alle.

VETResearch ermöglicht Studierenden einen Einblick in die Tätigkeiten der Lehrstühle/ Institute und vermittelt erste Eindrücke über die Mechanismen in der Wissenschaftswelt. Das Retreat am Ende des Jahres ist dann eine gute Übung der soft skills für Studierende. Die Gespräche und Diskussionen wirken dabei aufgrund der Vielfalt der Tiermedizin befruchtend für jeden. So entstehen auch wertvolle Kontakte für Studierende, die ggf. auch in eine spannende Doktorarbeit münden können. Allen jungen WissenschaftlerInnen und jedem engagiertem Studierenden, der Lust auf neue Herausforderungen hat, kann ich als Autor dieses Vorworts die Teilnahme an VETResearch nur empfehlen.

Ein ganz besonderer Dank geht an das Studiendekanat mit Hr. Prof. Dr. Göbel, Fr. Dr. Stoll, Fr. Dr. Beitz-Radzio und Hr. Thielemann, die jederzeit bei Fragen helfend zur Seite standen und sich mit großem Engagement für VETResearch einsetzen.

Dr. Sebastian Ulrich

Projekte aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department

Immunhistochemischer Nachweis und Analyse von Hsp70i im epileptischen Hundehirn [Kerstin Ackermann, Lena Boldt](#)

- Vorkommen lebensmittelrelevanter Infektionserreger in Rotwildfaeces [Eunike Bahlinger](#)
- Identifizierung von psychophilen / psychrotoleranten Clostridium-Isolaten aus Faeces- und Fellproben von Wildschweinen mittels MALDI-TOF-MS [Leonard Barta](#)
- Verlauf der Antikörperantwort beim Huhn [Patricia Bär](#)
- Differenzierung von *Stachybotrys chartarum* Chemotyp A und Chemotyp S mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie [Philipp-Michael Beindorf](#)
- Detektion von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* via Kulturanzucht und PCR [Florian Diel](#)
- Tierartliche Besonderheiten in der Regulation des mu-Opioidrezeptors beim Pferd [Katharina Frey](#)
- PCR-basierter Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Rinderkot [Andrea Heubeck](#)
- Biomechanische Bedeutung des Schnappmechanismus im Ellbogengelenk (Articulatio cubiti) des Pferdes [Franziska Hofmann](#)
- Vorkommen hepatotoxischer Pyrrolizidinalkaloide in regionalen Imkerhonigen aus Bayern [Veronika Huber](#)
- Charakterisierung lebensmittel- und futtermittelrelevanter Schimmelpilzisolat mittels molekularbiologischer und bioanalytischer Methoden [Johannes Köck](#)
- Spezies-Identifizierung ausgewählter Isolate kälteliebender Clostridien mittels qPCR und DNA-Sequenzierung [Claudia Springer](#)
- Funktionelle Charakterisierung von CSF-1 induzierten Hühnermakrophagen [Johannes Voß](#)

Projekte aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin

Etablierung eines Modells zur ex-vivo Perfusion von Hengsthoden [Klement Albrecht](#)

- Rekonstruktion von simulierten digitalen Röntgenaufnahmen aus CT-Datensätzen. Ein Vergleich der radiologischen Beurteilung zwischen echten und simulierten digitalen Röntgenaufnahmen [Rosalie Fabian, Göta Wittkugel](#)
- Auswertung der lagerungsbedingten Änderung des Norbergwinkels [Sarah Hauser, Anne-Sophie Hoffmann](#)
- Nachweis des G-CSF-Rezeptors im Darm neugeborener Kälber [Anna Kneidl](#)
- Anpassung eines PMN basierten Zell-Migrationsassays für den Einsatz geringsvolumiger Proben [Elisabeth Pernpeintner](#)
- Antimikrobielle Wirksamkeit von S100-Proteinen bei der Mastitis des Rindes [Simone Schabmeyer, Julia Schneider](#)
- Lahmheitsscoring und Klauenbonitur beim Saugferkel [Hannah Scheit](#)
- Regionenbezogene Analyse der Körperzusammensetzung beim Schwein [Juliane Schrott](#)
- Gesundheitszustand von Sauen während eines Reproduktionszyklus [Sophie Wötzel](#)

Kombiprojekt

Die Überlebensfähigkeit von als sensibel getesteten Enterokokken nach Behandlung mit bakteriziden Antibiotika [Anja Wernecke](#)



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Dieses Vorhaben wird aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung von 2012 bis 2016 unter dem Förderkennzeichen 01PL12016 und von 2017 bis 2020 unter dem Förderkennzeichen 01PL17016 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt liegt beim Autor.

Herausgeber: Ludwig-Maximilians-Universität, Tierärztliche Fakultät,
Veterinärstr. 13, 80539 München, Tel.: +49 (0) 89 / 2180 - 2549

Stand: August 2018

Immunhistochemischer Nachweis und Analyse von Hsp70i im epileptischen Hundehirn

Kerstin Ackermann, Lena Boldt

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Betreuer: Michael Keck, Fabio Wolf, Prof. Dr. Heidrun Potschka

Immunhistochemischer Nachweis von Hsp70 in Paraffin eingebetteten Hundehirnen

Als erster Schritt fand die Entparaffinierung der Gehirnschnitte auf den Objektträgern statt. Dazu wurden die Schnitte nacheinander jeweils für drei Minuten erst zweimal in Xylol, dann in eine 1:1 Mischung aus Xylol und 100 % Ethanol (EtOH), dann zweimal in 100 % EtOH, dann in 95 % EtOH, dann in 70% und schließlich in 50 % EtOH gegeben. Danach wurden alle Schnitte unter fließendem Leitungswasser gespült und in destilliertem Wasser gewaschen.

Anschließend wurden die Schnitte für 20 Minuten in Natrium-Citrat-Puffer (pH 6) in der Mikrowelle bei 720W gekocht, um eine Demaskierung der Antigene zu bewirken. Nach zehnmütigem Abkühlen wurden die Schnitte dreimal in TBST (0,05 mol/l Tris, 0,15 mol/l NaCl, 0,05 % Tween 20) mit pH 7,6 gewaschen und in destilliertem Wasser gespült.

Daraufhin folgte eine 10-minütige Inkubation in 3 %igem H₂O₂, um die endogene Peroxidaseaktivität zu hemmen, dann erneutes Waschen in destilliertem Wasser und zweimaliges Waschen in TBST.

Im nächsten Schritt wurden auf jeden Schnitt 200 µl Protein-Block (0,25 % Casein in TBS) gegeben und 10 Minuten inkubieren lassen, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Danach wurde je Schnitt 200 µl AntiHsp70-Antikörper in einer 1:100 Verdünnung in Antikörper-Diluent (Protein-Block + 0,1 % Tween 20) aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

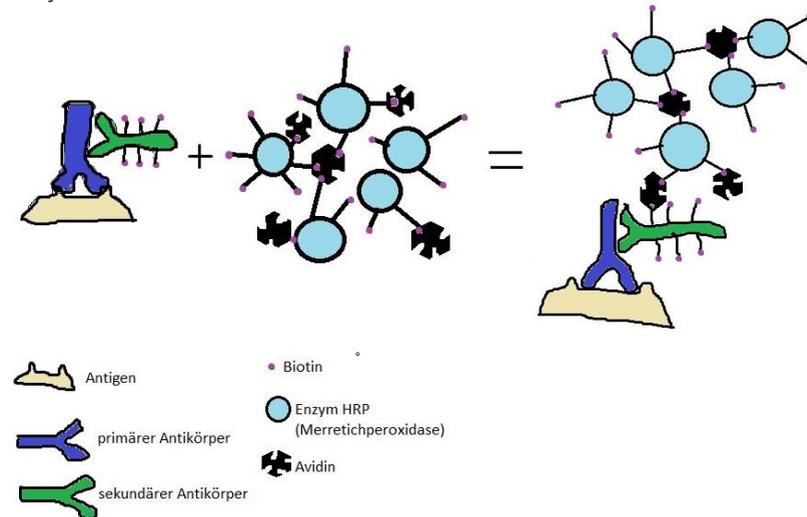
Am nächsten Tag wurden die Schnitte noch dreimal in TBST gewaschen, dann wurden pro Schnitt 200 µl des sekundären Antikörpers (biotinmarkierter goat anti-mouse Antikörper, 1:100) in Antikörper-Diluent aufgebracht und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurden die Schnitte erneut dreimal in TBST gewaschen, um ungebundenen sekundären Antikörper zu entfernen. Daraufhin wurden die Schnitte mit je 200 µl Streptavidin/HRP (Merretichperoxidase) 1:1400 in TBS für 30 Minuten inkubiert. Auch nach diesem Schritt erfolgte ein dreimaliges Waschen in TBST und anschließendes Spülen in bidestilliertem Wasser.

Danach wurden die Schnitte in einer DAB-Lösung (150 mg DAB = 3,3'-Diaminobenzidin in 15ml A.dest. gelöst+ 150 µl H₂O₂ 30 %+ 600 ml TBS) als passendes Substrat für das Streptavidin für 30 Minuten inkubiert, um die Antigen-Antikörper-Konjugate sichtbar zu machen, denn DAB ruft in Verbindung mit der Peroxidase eine braune Färbung hervor.

Prinzip der indirekten ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex)

Der sekundäre Antikörper ist mit Biotin markiert und kann sich somit mit Avidin verbinden, denn Avidin hat vier Bindungsstellen für Biotin.

Avidin verknüpft sich außerdem mit der biotinylierten Peroxidase, wobei ein paar Biotin-Bindungsstellen am Avidin unbesetzt bleiben. Mit diesen lagert sich der Avidin-Peroxidase-Komplex an den biotinylierten Sekundärantikörper. Somit findet eine Verstärkung der Enzymreaktion statt.



Persönliche Eindrücke und Erfahrungen

Das VETResearch Programm am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München bietet angehenden Tierärzten und Tierärztinnen eine gute Möglichkeit, einen Einblick in einen der vielen Bereiche, die einem als Tierarzt offen stehen, zu bekommen. Hier hatten wir die Möglichkeit im Bereich der Forschung, speziell der Epilepsieforschung, mitzuwirken.

Während des Studiums liegt der Schwerpunkt der Lehre auf der Ausbildung zum Praktischen Tierarzt, wobei man außer in Wahlpflichtfächern, in denen man einen kleinen Einblick von Forschungstätigkeiten bekommen kann, sehr wenig Möglichkeiten hat, andere Bereiche des Berufes kennenzulernen. Mit selbstständigem wissenschaftlichen Arbeiten ist das natürlich nicht zu vergleichen.

Umso mehr hat es uns gefreut, dass das Institut für Pharmakologie und Toxikologie am Vet-Research Projekt teilnimmt und uns die Chance gab, den Beruf des Labortierarztes näher kennenzulernen und diese Erfahrung auch als Entscheidungshilfe für die Zukunft nutzen zu können.

Es hat uns sehr gefallen, den Ablauf des wissenschaftlichen Arbeitens mit allen Höhen und Tiefen mitzerleben und bei unvorhergesehenen Hindernissen selbstständig problemorientierte Lösungen zu finden.

Zusätzlich zu den vielen verschiedenen Tätigkeiten im Labor mussten wir uns auch mit uns bis dahin unbekanntem Computerprogrammen auseinandersetzen, wobei wir bei allen auftretenden Fragen in allen Bereichen immer Ansprechpartner hatten.

Ein herzliches Dankeschön gilt in diesem Falle allen Technischen Assistentinnen, Doktoranden und Postdocs, die uns mit Rat und Tat zur Seite standen und uns tatkräftig unterstützt haben, und natürlich Frau Prof. Dr. Potschka für die Möglichkeit, an Ihrem Lehrstuhl zu arbeiten.



**LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN**

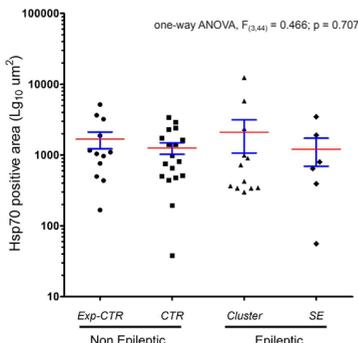
Immunhistochemischer Nachweis und Analyse von Hsp70i im epileptischen Hundegehirn

Lena Boldt, Kerstin Ackermann, Fabio Gualtieri, Fabio Wolf, Michael Keck und Heidrun Potschka
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität, München

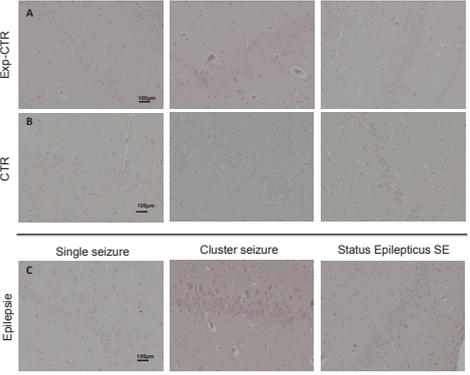
Einleitung	Material und Methoden
<p>Epilepsien sind mit ca. 1 % erkrankter Menschen, sowie bei den Haustieren mit 5 % aller Hunde und 2 % aller Katzen die häufigste chronische neurologische Erkrankung. Ca. 30 % der Patienten, die an einer Epilepsie leiden, können nicht zufriedenstellend therapiert werden. In diesem Zusammenhang wird von einer pharmakoresistenten Epilepsie gesprochen. Deshalb ist es wünschenswert, schon vor Entstehung der Epilepsie (Epileptogenese) eingreifen zu können. Um entsprechende Behandlungsstrategien entwickeln zu können, ist eine umfassende Kenntnis über proinflammatorische Proteine von großer Bedeutung. Die Dysregulation dieser Proteine, wie z.B. Hsp70, könnte pathophysiologische Mechanismen beeinflussen und zu der Epileptogenese beitragen.</p>	<p>Immunhistochemische Färbemethoden: Die immunhistochemische Färbung zum Nachweis des inflammatorischen Proteins Hsp70 wurde anhand eines modifizierten Standardprotokolls durchgeführt. Hierfür wurden Schnitte von Hundegehirnen der folgenden vier Gruppen verwendet: A: Exp-Ctr: Hunde, aus einer experimentellen Labortierhaltung. B: CTR: Hunde, die an einer nicht neurologischen Erkrankung verstorben sind. C: Epilepsie: Hunde, die an einer Epilepsie verstorben sind. Auswertung: Das Auftreten von Hsp70 wurde im dorsalen Hippocampus (CA3 und CA1-Region) beurteilt. Statistik: Für die Quantifizierung der positiven Zellen wurde das Programm Image J für Windows verwendet.</p>

Ergebnisse

Hintergrund Hsp70:
Das Hitzeschockprotein Hsp70 hat sowohl intrazellulär als auch extrazellulär Funktionen. Intrazellulär ist es für die korrekte Faltung von Proteinen zuständig. Weiterhin verhindert es die Akkumulation ungefalteter Proteine. Außerdem hat das intrazelluläre Hsp70 anti-apoptische und zytoprotektive Effekte.
Es gibt Hinweise darauf, dass Hsp70 extrazellulär als Ligand des Toll-like-Rezeptors-4 (TLR4) eine Rolle spielt und somit eher eine proinflammatorische Wirkung hat.
Abschließend ist die endgültige Wirkung noch nicht geklärt und wird in der Literatur kontrovers beschrieben.



one-way ANOVA, $F_{(3,44)} = 0.466$; $p = 0.707$



Ergebnisse:
Im Rahmen des vorliegenden Projekts konnte eine Hsp70-Expression in allen vier Tiergruppen nachgewiesen werden. Zwischen allen Tiergruppen konnte kein signifikanter Unterschied ($p\text{-value} < 0,05$) in der Hsp70-Expression festgestellt werden. Innerhalb der epileptischen Tiere gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Hunden mit Cluster Anfällen und Hunden mit einem Status Epilepticus (ein Vergleich mit Tieren mit einzelnen Anfällen war nicht möglich, da es sich hier nur um ein Einzeltier handelte). Zusammenfassend konnte in diesem Projekt keine erhöhte Hsp70-Expression festgestellt werden.

Wir danken Claudia Siegl, Sabine Sass, Sieglinde Fischlein und Sarah Driebusch für ihre exzellente technische Unterstützung. Die Autoren sind dankbar für die Unterstützung durch das Förderprogramm VETResearch.

Email: Lena993@googlemail.com, kerstinackermann1@gmx.de

Vorkommen lebensmittelrelevanter Infektionserreger in Rotwildfaeces

Eunike Bahlinger

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit der LMU München

Betreuer: Dr. Karin Schwaiger, Dr. Susanne Schex

Einleitung

Wildbret erfreut sich in den letzten Jahren zunehmender Beliebtheit. So nimmt die Anzahl der Jagdscheininhaber nach Angabe Deutscher Jagdverband (Handbuch 2017) in Deutschland stetig zu.

Die Wildbrethygiene ist ein wichtiger Bestandteil der Jagdausbildung, jedoch gibt es wenige Informationen zum Vorkommen von Lebensmittelinfektionserregern in erlegtem Wild. Aus diesem Grund wurden 50 bzw. 100 Faecesproben von Rotwild auf *Salmonella* spp. und *Listeria monocytogenes* untersucht. Diese Proben stammen aus einem früheren Projekt am Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit und wurden in diesem Rahmen bereits im Jahr 2015 - 2016 auf Bakterien des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes (MTC) untersucht. Alle Proben waren negativ für MTC und wurden daher für die Untersuchungen auf Salmonellen und Listerien erweitert.

Salmonellen gehören zu den bedeutendsten Lebensmittelinfektionserregern weltweit. Listerien zählen zwar zu den selteneren Lebensmittelinfektionserregern, jedoch stellt *Listeria monocytogenes* insbesondere für Schwangere, Immunsupprimierte und Kinder eine große Gefahr dar.

Material und Methoden (stark vereinfacht)

Qualitative Untersuchung von 50 Kotproben auf *Salmonella* spp.

Insgesamt 50 Faecesproben wurden qualitativ auf Salmonellen untersucht. Die Probe wurde zuerst in gepuffertem Peptonwasser, dann in Rappaport Vassiliadis Bouillon angereichert. Danach wurde die Suspension einer Selektivanreicherung, M-Bouillon, unterzogen. Aus der Anreicherung wurden die Salmonellen mittels des automatisierten Nachweissystems VIDAS (BioMérieux) untersucht.

Qualitative Untersuchung von 100 Kotproben auf *Listeria* spp.

Listerien wurden in 100 Faecesproben ebenfalls qualitativ untersucht. Die Probe wurde zuerst in 1/2-Fraser-Bouillon und danach in normaler Fraser-Bouillon angereichert. Aus der Anreicherung erfolgte ein 3-Ösen-Ausstrich auf 2 Selektiv-Festmedien: Oxford-Agar und Listeria-Agar nach Ottaviani und Agosti (ALOA-Agar). Die verdächtigen Kolonien wurden mittels MALDI-TOF MS auf Gattung bzw. Spezies bestätigt.

Ergebnisse

Salmonellen wurden in allen 50 untersuchten Proben nicht nachgewiesen. Von 100 Faecesproben konnte in 21 Proben *Listeria* spp. nachgewiesen werden. Mittels MALDI-TOF MS wurden die folgenden Spezies identifiziert: *Listeria monocytogenes* (n = 13), *L. seeligeri* (n = 5), *L. welshimeri* (n = 2) und *L. ivanovii* (n = 1).

Diskussion und Zusammenfassung

In den untersuchten Proben konnten keine Salmonellen nachgewiesen werden.

Aus 13% der Faecesproben konnte *Listeria monocytogenes* angezüchtet und nachgewiesen werden. *L. monocytogenes* ist in der Lage, bei immunkompetenten Menschen Gastroenteritiden hervorzurufen sowie schwere gesundheitliche Schäden bei ungeborenen Kindern, Kleinkindern und immunsupprimierten Menschen zu verursachen. *Listeria ivanovii* wurde auch in einer Probe nachgewiesen und kann ebenfalls Gastroenteritiden beim Menschen hervorrufen. Um solche Lebensmittelinfektionen zu vermeiden, muss beim Aufbrechen und Weiterverarbeiten des Wildbrets die gute Hygienepaxis eingehalten und das Fleisch ausreichend durcherhitzt werden. Zudem ist es wichtig, Jäger für diese Thematik zu sensibilisieren.

Persönliche Erfahrung während des VETResearch Projekts

Während des Projektes hatte ich die Möglichkeit, verschiedene Methoden des mikrobiologischen Arbeitens kennen zu lernen, was sehr interessant und aufschlussreich war. Die Realisierung eines eigenen Projekts mit Planung der Untersuchungen, Auswählen und Bestellung der Materialien, Durchführung der Arbeit im Labor sowie Literaturrecherche hat mir eine gute Vorstellung darüber gegeben, wie eine Doktorarbeit anzugehen ist. Ich kann daher jedem Studenten ein VETResearch Projekt empfehlen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. M. Gareis für die Möglichkeit bedanken, das Projekt durchzuführen. Auch bei Dr. S. Schex, Dr. B. Biermaier, Dr. S. Dorn-In und vor allem Dr. S. Ulrich möchte ich mich für die große Unterstützung bedanken.

Identifizierung von psychrophilen / psychrotoleranten Clostridium-Isolaten aus Faeces- und Fellproben von Wildschweinen mittels MALDI-TOF-MS

Leonard Barta

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit der LMU München
Betreuer: Dr. Samart Dorn-In

Persönliche Eindrücke

Das VETResearch Projekt war für mich die ideale Möglichkeit, einen Einblick in die tiermedizinische Arbeitswelt außerhalb einer Klinik zu erlangen. Obwohl ich keinerlei laborspezifische Vorkenntnisse hatte, durfte ich nach einer kurzen Einweisung gleich mit meinem Projekt starten. Das selbstständige Arbeiten sowie die freie Zeiteinteilung, ganz orientiert und angepasst an die Projektziele, waren genau das Richtige für mich.

Abschließend möchte ich mich recht herzlich bei dem Team des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit und insbesondere bei meinem Betreuer, Herrn Dr. Samart Dorn-In, für die freundliche Unterstützung bedanken.



Identifizierung von psychrophilen / psychrotoleranten Clostridium-Isolaten aus Faeces- und Fellproben von Wildschweinen mittels MALDI-TOF-MS

Leonard Barta, Samart Dorn-In, Manfred Gareis

Einleitung

Psychrophile Clostridien wie z. B. *C. estertheticum* sind als Verderbserreger bei vakuumverpacktem Fleisch für das sogenannte „Blown Pack Spoilage (BPS)“ verantwortlich, bei der sich die Verpackung durch Gasbildung aufbläht (Abb. 1). BPS kann zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten für die Fleischindustrie führen. Die verantwortlichen kälteliebenden Clostridien wurden aber nicht nur im Fleisch, sondern auch in Erdbodenproben (Brightwell & Clemens, 2012), Faeces und Fell von Tieren (Broda et al., 2009) nachgewiesen. 2015 wurden 75 psychrophile-/tolerante Clostridien-Stämme aus Faeces- und Fellproben von insgesamt 53 Wildschweinen aus Polen isoliert. Die Bestimmung der Clostridien erfolgte mittels mikroskopischer und biochemischer Verfahren und blieb damit auf die Gattungsebene beschränkt. Im Rahmen dieser Studie werden die aus den Wildschweinen gewonnenen Isolate mittels MALDI-TOF MS analysiert und so die Arten näher bestimmt.



Abbildung 1: „Blown Pack Spoilage“ von vakuumierten Fleischproben

Material und Methodik

Alle 75 der bei -80 °C gelagerten Isolate wurden in 10 ml Peptone Yeast Glucose Starch (PYGS) Bouillon subkultiviert (Abb. 2, A). Drei Aliquote wurden anaerob jeweils bei 4 °C, 10 °C und 22 °C für 4-6 Wochen bebrütet. Die Trübung der PYGS Bouillon zeigte das Wachstum der Isolate an. Danach wurden die wachsenden Isolate aus PYGS Bouillon auf Blutagar subkultiviert, und wieder anaerob bei 10 °C für weitere 1-2 Wochen bebrütet (Abb. 2, B).

Kolonien der Clostridien-Isolate (Abb. 2, C & D; exemplarisch) wurden mit Ameisensäure nach Angabe des Herstellers (Bruker Daltonics GmbH) extrahiert. Die gewonnenen Proteine wurden auf die Target-Platte übertragen und mittels MALDI-TOF MS gemessen. Anschließend wurden die Protein-Spektren mit Referenz-Spektren aus der Datenbank verglichen und somit die Spezies identifiziert.

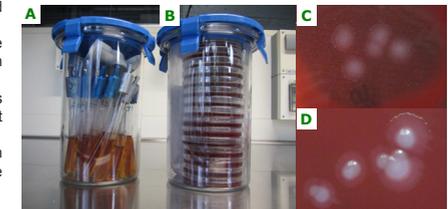


Abbildung 2: A: Anaerobierpotp mit PYGS Bouillon und B: mit Blutagar; C & D: Exemplare der Kolonien von zwei Clostridien-Isolaten auf Blutagar

Ergebnisse und Diskussion

Insgesamt wurden 75 Clostridien-Isolate aus Wildschweinen subkultiviert. Davon konnten 60 Isolate bei 4 °C und bei 10 °C rekultiviert werden. Bei einer Bebrütungstemperatur von 22 °C wurde kein Wachstum festgestellt. Abb. 3 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung mittels MALDI-TOF MS. 33 von 60 Isolaten wurden folgenden Spezies zugeordnet: *C. estertheticum*, *C. frigidicarnis*, *C. bowmanii*, *C. algoriphilum* und *C. tagluense*. Für die restlichen 27 Clostridien-Isolate konnte keine Zuordnung auf Spezies-Ebene erfolgen, da es sich offensichtlich um Spezies handelt, deren Referenzspektren bislang in der Datenbank fehlen. Diese Ergänzung der Datenbank ist ein nächstes Ziel. Dazu sind die bislang nicht identifizierten Isolate parallel molekularbiologisch (PCR und Sequenz-Analyse) zu untersuchen.

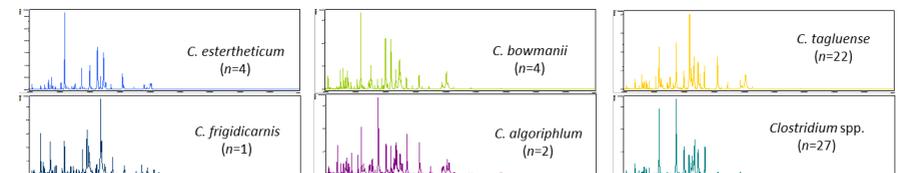


Abbildung 3: Repräsentative MALDI-TOF MS-Protein-Spektren der Clostridien-Isolate

Referenz:

Brightwell, G., Clemens, R. (2012). Development and validation of a real-time PCR assay specific for *Clostridium estertheticum* and *C. estertheticum*-like psychrotolerant bacteria. *Meat science* 92(4), 697-703.
Broda, D. M., Boerema, J. A., Brightwell, G. (2009). Sources of psychrophilic and psychrotolerant clostridia causing spoilage of vacuum-packed chilled meats, as determined by PCR amplification procedure. *Journal of Applied Microbiology* 107(1), 178-186.

VETResearch 2017. München, Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit, Schönleutnerstr. 8, D-85764 Oberschleißheim. Kontakt: Dr. Samart Dorn-In, S.dorn-in@is.vetmed.uni-muenchen.de

Verlauf der Antikörperantwort beim Huhn

Patricia Bär
Lehrstuhl für Physiologie
Betreuerin: PD Dr. Sonja Härtle

Hintergrund und Ziel des Projekts

Die Bildung von Antikörpern stellt einen essentiellen Teil der Immunantwort dar und ist die Grundlage vieler erfolgreicher Impfungen. Beim Säuger wurde gezeigt, dass es nach dem ersten Kontakt mit einem Antigen (Prime) zunächst zu einer vorübergehenden Produktion von IgM und nur geringen Mengen IgG kommt und erst ein weiterer Antigenkontakt (Boost) zum Klassenwechsel hin zu anderen Antikörper-Isotypen (IgG, IgA) und einem raschen, starken Titeranstieg und länger dauernder Antikörperproduktion führt. In Hühnerbeständen sind Impfungen eine der wichtigsten Maßnahmen zur Gesunderhaltung der Tiere, weshalb Hühner innerhalb kürzester Zeit eine Vielzahl an Vakzinierungen und Wiederholungsimpfungen erfahren. Eigene Beobachtungen und Hinweise in der Literatur deuten darauf hin, dass es beim Huhn im Gegensatz zum Säuger auch durch mehrfache Booster-Immunsierungen nicht zur Bildung kontinuierlich hoher Antikörperspiegel kommt, sondern diese relativ rasch wieder abfallen. Und obwohl eine bessere Kenntnis über die Kinetik der Antikörperantwort wichtig wäre, um Impfintervalle besser festlegen zu können, liegen hierzu bislang keine fundierten Daten vor.

Ziel des Projekts war es daher, den zeitlichen Verlauf der Antikörperantwort beim Huhn detailliert zu untersuchen. Hierzu wurden Legehennen mehrfach mit dem Modellantigen KLH-DNP immunisiert. Die Verwendung von KLH-DNP erlaubt es, gleichzeitig die T-Zellabhängige Hapten (DNP)-spezifische Antikörperantwort und die Antwort gegen die Trägersubstanz (KLH) zu untersuchen.

Versuchstiere und Methoden

Bestimmung des Antikörper-Spiegels im quantitativen ELISA

Zur Bestimmung der Antikörperantwort wurden vor und nach den vier Immunisierungen Plasmaproben der Hennen gewonnen und jeweils in einem quantitativen ELISA für KLH und DNP untersucht. Für die Proben wurden dabei zwei verschiedene Verdünnungsstufen gewählt, die jeweils als Duplikat gegen eine Standardkurve inklusive Qualitätskontrollen aufgetragen wurden.

Bestimmung der Affinitätsreifung der Antikörper beim Huhn

Beim Säuger erfolgt im Verlauf der humoralen Immunantwort während der Germinalen Zentrumsreaktion eine Affinitätsreifung der produzierten Antikörper von zunächst niedrig affinen IgM Antikörpern hin zu hoch affinen Antikörpern der Isotypen IgG, IgA oder IgE. Um zu prüfen, ob auch die Antikörperantwort des Huhns einer Affinitätsreifung unterliegt, wurde BSA in verschiedenen Verhältnissen mit DNP gekoppelt und die aus der KLH-DNP

Immunisierung erhaltenen Seren in zwei verschiedenen ELISA-Systemen für DNP (DNP(2) und DNP(15)) untersucht und der jeweilige Endpunkttiter (höchste Verdünnung über Hintergrund) bestimmt. Erfolgt im Verlauf der Antikörperantwort eine Affinitätsreifung, ändert sich das Verhältnis von hochaffinen zu Gesamt-Antikörpern, d.h. der Quotient Endpunkttiter DNP(2)/DNP(15) nimmt zu.

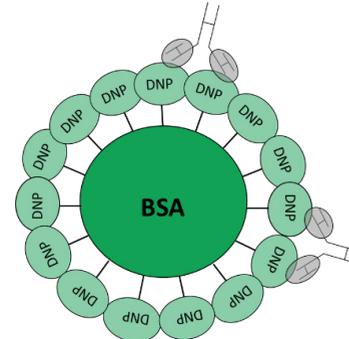


Abbildung 1: Anti-DNP ELISA mit BSA-DNP(15): Bindung von hoch und niedrig affinen anti-DNP Antikörpern, da an ein BSA-Molekül jeweils ca. 15 Moleküle DNP gekoppelt wurden, liegen diese sehr eng zusammen und ein IgY Antikörper kann über beide variablen Anteile an sein Antigen binden.

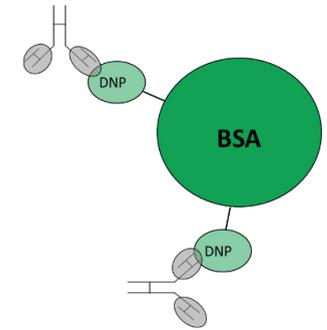
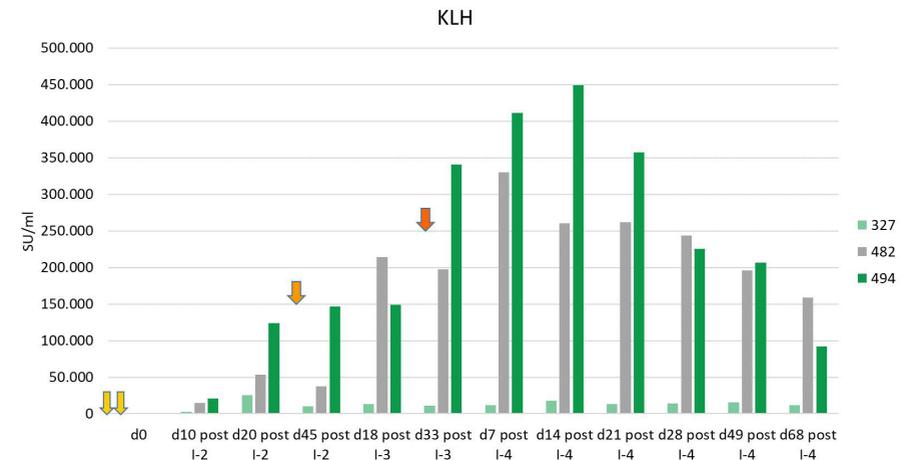
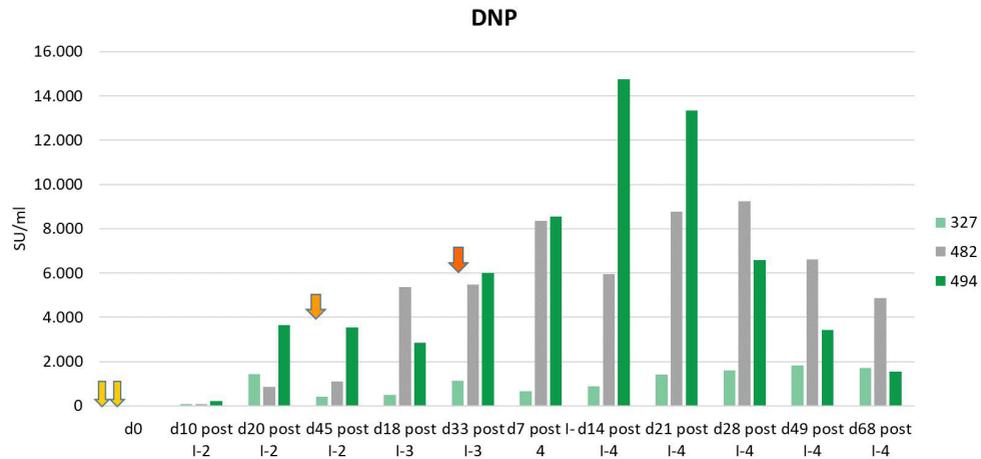


Abbildung 2: Anti-DNP ELISA mit BSA-DNP(2): lediglich Bindung von hochaffinen Antikörpern, da die zwei gekoppelten DNP-Moleküle sehr weit auseinander liegen.

Ergebnisse

Rasch abfallende Antikörperspiegel auch nach wiederholter Immunisierung

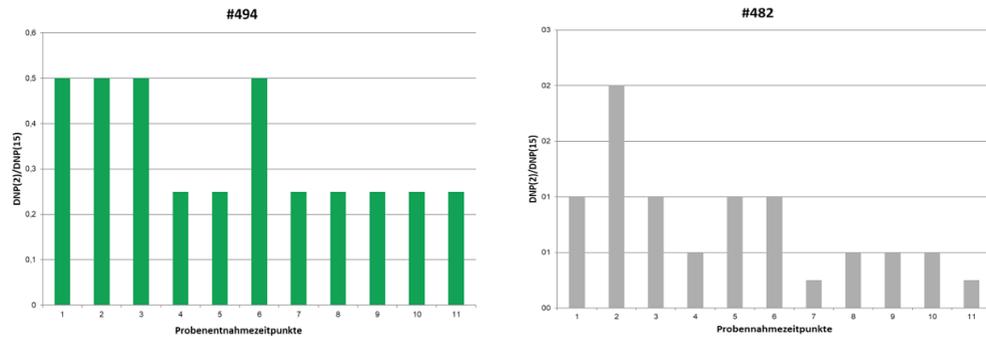




Die Pfeile in den Diagrammen markieren die Immunisierungszeitpunkte

Bei einem Tier (#327) konnte trotz vierfacher Immunisierung keine deutliche Antikörperantwort induziert werden. Die Tiere #482 und #494 zeigen beide nach der zweiten, dritten und vierten Immunisierung eine mehr oder weniger kontinuierliche Zunahme der Antikörperspiegel. Die höchsten Mengen an spezifischem IgY wurden eine (#482) bzw. zwei (#494) Wochen nach der letzten Immunisierung gemessen. Nach einer kurzen Plateau-Phase (drei Wochen) im Anschluss an die letzte Immunisierung fallen die Antikörperspiegel kontinuierlich ab. Die Antikörperantwort gegen DNP ist schwächer als gegen KLH, der Kurvenverlauf ist aber parallel.

Kein Nachweis einer Affinitätsreifung



Bei keinem der Tiere ist eine Affinitätsreifung, d.h. eine Zunahme des Quotienten im Verlauf der Immunisierungen zu erkennen.

Ausblick

Der zeitliche Verlauf der Antikörperspiegel soll ergänzend mit einer größeren Tierzahl, weiteren Antigenen (z.B. NDV Lebendimpfstoff) und für IgA untersucht werden.

Um Fehler im System auszuschließen, werden die Versuche zur Affinitätsreifung mit Mäusen wiederholt, bei denen sich eine deutliche Quotientenzunahme ergeben muss.

Persönliche Meinung/Erfahrung

Durch die VET Research Projekte gibt es bereits während des Studiums die Möglichkeit, erste Erfahrungen im Bereich der Forschung zu gewinnen. Ich sehe dies als eine echte Bereicherung für das Studium, denn es hat Spaß gemacht, sich von Grund auf mit einer wissenschaftlichen Fragestellung auseinander zu setzen, in die erforderlichen Methoden eingearbeitet zu werden und dabei Erfolge aber auch kleine Rückschläge erleben zu dürfen. Gerade durch Letztere war ich froh, dass ich jederzeit durch ein tolles Team am Lehrstuhl für Physiologie und besonders durch meine Betreuerin Sonja Härtle unterstützt wurde, wofür ich mich noch einmal herzlich bedanken möchte.

Differenzierung von *Stachybotrys chartarum* Chemotyp A und Chemotyp S mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Philipp-Michael Beindorf

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit der LMU München
Betreuer: Dr. Sebastian Ulrich, Dr. Christoph Gottschalk

Hintergrund

Der Schimmelpilz *Stachybotrys (S.) chartarum* ist ein ubiquitär vorkommender Schwärzepilz, der eine Reihe hochtoxischer Mykotoxine bilden kann. Aufgrund seines zellulolytischen Potenzials ist er zu saprobioischem Wachstum auf zellulosehaltigen Materialien wie feucht gelagertem Heu oder Stroh fähig, welches bei der Verfütterung an Tiere das Krankheitsbild der Stachybotryotoxikose auslösen kann. In wassergeschädigten Innenräumen können *S. chartarum* und dessen Sekundärmetabolite sowohl auf Tapeten, Gipskartonplatten als auch in Stäuben und Luftfiltern nachgewiesen werden. Damit stellt dieser Schimmelpilz auch eine Gefahr für den Menschen infolge einer inhalativen Toxinexposition dar. Für *S. chartarum* sind bislang die zwei Chemotypen A und S bekannt, von denen nur Chemotyp S hochgradig zytotoxische Mykotoxine aus der Gruppe der makrozyklischen Trichothecene produzieren kann. Die Unterscheidung der beiden Chemotypen erfolgt bisher molekularbiologisch und mittels LC-MS/MS-Toxinanalytik. Im Rahmen dieses VETResearch-Projekts sollte eine MALDI-TOF Massenspektrometrie-basierte Methode zur Differenzierung von *S. chartarum* Chemotyp A und S entwickelt werden.

Material und Methodik

Die Untersuchungen wurden mit Isolatensammlungen des Lehrstuhls durchgeführt, wobei je Chemotyp zwölf molekularbiologisch eindeutig identifizierte Isolate (*tri5*-PCR, Cruse et al. 2002) verwendet wurden. Die Proben wurden in Dreipunktulturen auf Malzextraktagar angezüchtet und im Brutschrank für 7 Tage bei + 25 °C und anschließend 14 Tage bei Raumtemperatur in einem mit Aqua bidest. gefüllten Exsikkator kultiviert. Von den Kulturen wurde Pilzmaterial mittels eines sterilen Tupfers in mit 50 ml Malzextrakt-Bouillon befüllte Erlenmeyerkolben (100 ml) überführt und für 24 h bei 25 °C erneut inkubiert. Die Proteinextraktion für die MALDI-TOF MS Messungen wurde nach einem etablierten Standardprotokoll (Ulrich et al. 2016) durchgeführt. Ein Mikroliter des gewonnenen Extrakts wurde auf ein poliertes Stahl-Target aufgetragen und mit 1 µl alpha-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (CHCA)-Matrix überschichtet. Die MALDI-TOF MS Messung erfolgte im linearen positiven Modus im Massenbereich von 2-20 kDa. Das Gerät wurde vor jeder Messung anhand eines Bakterien-Test-Standards (Massenbereich: 3637,8 Da – 16952,3 Da) kalibriert. Zur Auswertung der Ergebnisse diente die FlexAnalysis und ClinProTools-Software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen).

Ergebnisse

Bei 18 der 24 untersuchten Isolate stimmten die Ergebnisse der MALDI-TOF MS mit denen der PCR überein. Sechs Isolate konnte allerdings weder Chemotyp A noch Chemotyp S zugeordnet werden (Abbildung 1). Dieses Ergebnis lässt die Hypothese zu, dass es möglicherweise einen weiteren *S. chartarum*-Chemotyp, einen S/A-Typ, geben könnte. Um dies zu überprüfen, sind weitere Untersuchungen der Stämme, bei denen auch das Mykotoxinprofil mit LC-MS/MS zu bestimmen ist, erforderlich. Nur so lässt sich dann zeigen, ob die MALDI-TOF MS mit einem Erfassungsbereich von m/z 2 – 20 kDa tatsächlich als zuverlässige Differenzierungsmethode für die *S. chartarum* - Chemotypen geeignet ist.

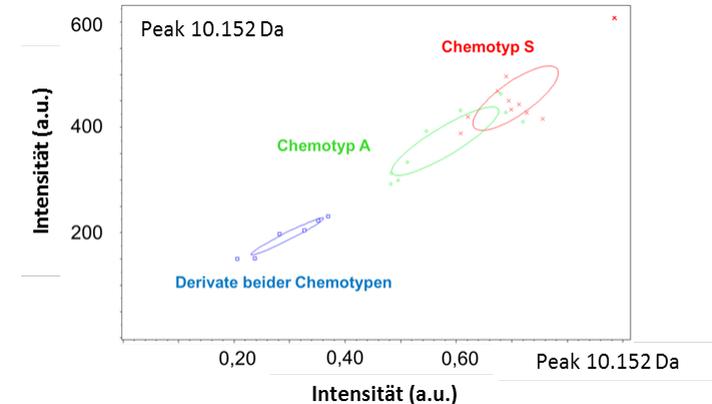


Abbildung 1: Principal component analysis (PCA) von Massenspektren von 24 Isolatensammlungen *S. chartarum*. Die Cluster zeigen Chemotyp A und S sowie einen möglichen Hybridtyp

Persönliche Einschätzung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis und seinen Mitarbeitern, vor allem Dr. S. Ulrich und Dr. C. Gottschalk, für die erneute Möglichkeit eines VETResearch-Projektes am Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit. Ich konnte meine Kenntnisse mit der MALDI-TOF MS Technologie weiter vertiefen, sowie mir neue Grundlagen im Bereich des wissenschaftlichen Arbeitens aneignen. Wie schon im letzten Jahr kann ich auch diesmal nur lobende Worte für dieses auf Studenten ausgerichtete Konzept finden und würde jedem empfehlen, es einfach mal in einem Bereich seines Interesses auszuprobieren.

Referenzen

- CRUSE, M., et al. (2002) Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. Mycologia 94, 814-822
ULRICH, S. et al. (2016) Identification of *Stachybotrys* spp. by MALDI-TOF mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 408, 7565-7581

Detektion von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* via Kulturanzucht und PCR

Florian Diel

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Betreuerin: Prof. Dr. Christina Hölzel, mitbetreut durch PD Dr. Andrea Didier

Hintergrund und Ziel des Projekts

Die veterinärmedizinische und wirtschaftliche Relevanz von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (im Folgenden MAP genannt) erklärt sich durch die Aussichtslosigkeit von Therapieversuchen bei der weit verbreiteten Paratuberkulose – eine durch MAP verursachten meldepflichtigen Erkrankung bei Wiederkäuern, auch Johne'sche Krankheit genannt. Zudem wird ein zoonotisches Potential von MAP im Zusammenhang mit Morbus Crohn des Menschen diskutiert. Beim Rind folgt auf die Infektion im Jungtieralter eine mehrjährige Inkubationszeit. Erste Symptome werden erst bei über zwei Jahre alten Tieren beobachtet. Der chronische Krankheitsverlauf ist daraufhin gezeichnet durch intermittierende wässrige Durchfälle und Abmagerung bis zum Verenden der Tiere. Die Therapie kann nur symptomatisch erfolgen, eine Heilung ist ausgeschlossen. Einzige Möglichkeit der Erregerbekämpfung ist eine Herdensanierung durch Abschaffung erkrankter bzw. infizierter Tiere. Die Ausscheidung der säurefesten Stäbchen erfolgt intermittierend bereits vor dem Auftreten der Symptomatik, generell ist der Erreger jedoch schwer zu detektieren, unter anderem aufgrund des sehr langsamen Wachstums. Daher sind verlässliche Nachweismethoden in der Bekämpfung dieser meldepflichtigen Krankheit essentiell, diese können grundsätzlich serologisch, molekularbiologisch oder via Kulturanzucht erfolgen. Mein Projekt hatte das Ziel, einen Milchviehbetrieb mittels Kulturanzucht aus Kotproben auf Mykobakterien zu untersuchen und im Fall des Nachweises zwischen apathogenen Umweltmykobakterien und MAP zu differenzieren. Des Weiteren sollten ein Protokoll zur DNA Extraktion angepasst sowie Nachweisgrenzen der PCR bestimmt werden.

Versuchsablauf

Probennahme und Kulturanzucht

Für die Untersuchung wurden 50 Kotproben von 50 Rindern des Versuchsbetriebes gesammelt. Von jeder Probe wurden, entsprechend der Methodensammlung des Friedrich Löffler Instituts (FLI), 3 g abgewogen und mit 30 ml 0,75 %iger HPC Lösung versetzt und über 24 Stunden inkubiert, um die Begleitflora abzutöten. Der Überstand der dekontaminierten Proben wurde in neue Behälter dekantiert, um sedimentierte Grobpartikel zu entfernen. Folgend wurden HEYM (Herold's Egg Yolk Medium)-Schrägagar-Röhrchen mit 200 µl der so vorbereiteten Proben inokuliert und über 12 Wochen bebrütet.

DNA-Extraktion:

Für die DNA-Extraktion wurde versucht, ein für *Mycobacterium smegmatis* bewährtes Protokoll über mehrere Schritte anzupassen. Hierbei wurde mit einem Milliliter PBS eine gut bewachsene, ca. dreiwöchige MAP Kultur von HEYM-Agar abgeschwemmt, die Suspension aufgezogen und zentrifugiert. Das Sediment wurde nach Dekantieren des Überstands in 600

µl TE Puffer resuspendiert und mittels Vortex-Gerät vermischt. Daraufhin wurde Lysozym für die Lyse der Bakterienzellen sowie RNAase A Lösung zum RNA Abbau hinzugegeben und für 90 Minuten bei 37 °C und ständigem Schütteln inkubiert. Folgend wurde SDS und Proteinase K Lösung zum Protein Abbau hinzugefügt und erneut für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde eine CTAB Lösung hinzugefügt, um die DNA in Komplexen in einer Phase zu binden. Über mehrere Phasentrennungen mit Phenol-Chlorophorm-Isoamyl Alkohol wurde die DNA schließlich in Isopropanol präzipitiert. An diesem Schritt wurde im Erfolgsfall ein DNA-Präzipitat fadenförmig sichtbar. Nach Überführen in Ethanol und abschließendem Suspendieren in DNA-freiem Wasser wurde die DNA Konzentration im Photometer gemessen.

PCR-Protokoll

Das PCR Protokoll mit den MAP gerichteten IS900 Primern wurde mit unterschiedlichen Annealing Temperaturen und MgCl Cofaktor Konzentrationen im Mastermix mit dotierten Ansätzen mit definierter MAP DNA Konzentration wiederholt. Zudem wurde eine Kontrolle auf Inhibitoren durchgeführt mit Ansätzen aus verdünntem Kotextrakt, um die Möglichkeit einer direkten PCR zu prüfen.

Ergebnisse

Bei der Kulturanzucht aus den Proben des Versuchsbetriebes konnte kein Mykobakterien Wachstum nachgewiesen werden. Die DNA Extraktion wurde über mehrere Schritte angepasst (siehe Tabelle 1). Dabei wurden zum Einen die Volumina aller eingesetzten Lösungen im gleichen Verhältnis reduziert sowie die Inkubation mit der Proteinase K angepasst, jedoch ohne dass in der nachfolgenden PCR ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden konnte. Die Nachweisgrenze der PCR bei 58 °C Annealing Temperatur und 6 µM MgCl Konzentration lag bei 10.000 Genomen im PCR-Ansatz. Waren Inhibitoren im Ansatz konnte keine MAP DNA mehr nachgewiesen werden.

Tabelle 1: Optimierung der DNA-Extraktion

Versuchsnummer	Anpassung des Volumens	Proteinase K Anpassung von Volumen und Temperatur	Photometrisch ermittelte DNA Menge im Extrakt
1	x 1	x 1, Inkubation bei 37 °C	20 ng/µl
2	x 0,1	x 1, Inkubation bei 56 °C	30 ng/µl
3	x 0,2	x 2, Inkubation bei 56 °C	35 ng/µl

Diskussion

Die negativen Ergebnisse in der Beprobung der Kotproben sind nicht beweisend für eine MAP-Freiheit des Versuchsbetriebes. Da die Erregerausscheidung intermittierend verläuft, sollten solche Beprobungen stets mehrfach durchgeführt werden. Bei der DNA Extraktion hätte man noch weitere Versuche anschließen können, um die Extraktionsausbeute zu verbessern. Ein Versuch mit Glykogen als Fällungshilfe war angedacht, wurde dann aber nicht mehr durchgeführt, da alternativ gut geeignete kommerzielle Verfahren (z.B. Power Soil Kit, Qiagen) zur Verfügung stehen, wenn auch verbunden mit höheren Kosten. Die hier erzielte Nachweisgrenze mit der PCR ist für eine Diagnostik zur Herdensanierung in der Praxis ungenügend. Hierfür müsste ein anderes Protokoll gewählt werden.

Persönliche Meinung

Ich bin sehr froh, die Gelegenheit bekommen zu haben, im Rahmen eines VETResearch Projekts Eindrücke in die wissenschaftliche Arbeit bekommen zu haben. Neben dem sehr motivierenden Aspekt an einem eigenen Projekt zu arbeiten, gehören dazu sicherlich auch frustrierende Faktoren. Dazu zählt das Gefühl, nur sehr langsam Fortschritte zu machen, beziehungsweise auch Tage im Labor zu haben, an deren Ende ein Misserfolg stand. Die Durchführung des DNA Extraktionsprotokolls dauerte etwa 6,5 h, wenn dabei ein Fehler gemacht wurde, war der Frust groß. Dazu nehme ich einige wichtige Lehren aus dem Praktikum mit, wie die Bedeutung des ständigen Protokollierens oder dass es oft anders kommt, als man es sich vorstellt. Ursprünglich war das Projekt betitelt „Differenzierung von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* und Umweltmykobakterien“ und hatte den Fokus auf die Kreuzreaktionen in den Nachweisverfahren sowie auf der jeweiligen Prävalenz in den Tieren im Zusammenhang mit den Leistungsdaten. Sehr positiv empfand ich dagegen die Einarbeitung in das sterile Arbeiten sowie in den bis dahin im Studium nur theoretisch kennen gelernten Einsatz molekularbiologischer Techniken wie die PCR. Insgesamt hat mir die Arbeit im Institut sehr dabei geholfen, besser einschätzen zu können, ob und in welchem Rahmen ich mich nach dem Studium wissenschaftlich engagieren möchte. Ich bedanke mich beim Team des Instituts für die Unterstützung. Bei Christina Hölzel für die Betreuung und die Ermöglichung des Projekts, bei Elena Feltl und Ricarda Mayer für die gewährte tägliche Hilfe trotz ihrer jeweiligen Doktorarbeiten und insbesondere bei Andrea Didier, von der ich sehr viel lernen durfte.

Tierartliche Besonderheiten in der Regulation des μ -Opioidrezeptors beim Pferd

Katharina Frey

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Betreuer: Prof. Dr. Hermann Ammer, Maximilian Muehlhaupt

Einleitung

“Currently, approaches to pain control in horses are a mixture of art and science” (Sanchez LC, Robertson SA., Equine Vet J. 2014, 46(4):517).

Aus der klinischen Erfahrung ergeben sich einige bedeutende Unterschiede in der Wirkung von Opioidanalgetika beim Pferd. Während Morphin sowohl beim viszeralen als auch traumatischen Schmerz sehr gut wirksam ist, wird es aufgrund seiner exzitatorischen Wirkung (Erregung, Laufdrang) nur noch sporadisch eingesetzt. Fentanyl dagegen besitzt im Vergleich zu anderen Spezies nur eine geringe analgetische Wirkung, wodurch es aktuell zur Narkoseprämedikation eingesetzt wird. Butorphanol schließlich stellt beim Pferd das Mittel der Wahl bei Kolikschmerzen dar.

In den vorangegangenen Studien wurden die kappa-(*eOPRK1*) und μ -Opioidrezeptoren (*eOPRM1*) des Pferdes kloniert und die entsprechenden Genprodukte pharmakologisch charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass Butorphanol eKOR einen vollen Agonisten darstellt, was die ausgeprägte Wirkung beim viszeralen Schmerz (durch kappa-Opioidrezeptoren vermittelt!) erklärt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Morphin im Vergleich zu anderen Spezies am eMOR einen vollen Agonisten darstellt. Im Gegensatz dazu weist Fentanyl am eMOR eine um den Faktor 50 niedrigere Affinität auf. Dies erklärt die vergleichsweise geringe analgetische Wirkung von Fentanyl beim Pferd.

Ziel des Projektes war es, in Pilotstudien erste Hinweise über mögliche Unterschiede in der Regulation des eMOR durch Morphin und Fentanyl *in vitro* zu erhalten. Mit den gleichzeitig im Rahmen des Projektes generierten Antikörpern kann in nachfolgenden Studien die Rezeptorregulation und intrazelluläre Verteilung der Rezeptoren *in vivo* untersucht werden.

Um dieses Ziel zu erreichen, haben wir den eMOR am N-terminalen Ende mit einem cMyc-Tag versehen, um die Internalisierung der Rezeptoren nach kurzfristiger Behandlung mit Opioiden im Zell-ELISA zu bestimmen.

Experimentelles Vorgehen und Ergebnisse

Die Fusion des cMyc-Tags an den N-Terminus des eMOR wurde mittels PCR vorgenommen. Der hierfür verwendete 5' Primer enthielt eine Restriktionsstelle für *NotI*, das Startcodon und die codierende Sequenz für cMyc. Der 3' Primer enthielt ein Stopcodon und eine Restriktionsstelle für *XbaI* (Abbildung 1a). Als Template wurde die klonierte cDNA des *eOPRM1* in pCDNA3.1 (Fa. Invitrogen) verwendet (GenBank accession number: KX721505.1). Nach

der erfolgreichen PCR wurde mithilfe der eingefügten Restriktionsstellen die getaggte *eOPRM1* cDNA verdaut und in den Expressionsvektor *pcDNA3.1* der Fa. Invitrogen ligiert. Anschließend wurden damit kompetente *E. coli* des Stammes *JM109* transformiert. Mittels einer PCR wurde die Länge des Inserts der gewachsenen Klone überprüft. Aus einem positiven Klon wurde das Plasmid präpariert, das nun für die Expression des Fusionsproteins in eukaryonten Zellen zur Verfügung stand.

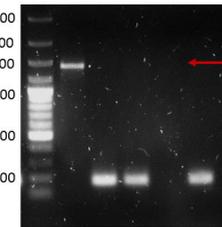
Forward Primer:

5' TCT GCGGCCGC ATG GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG GAC AGC AGC ACC GTC C.....
 NotI start c-Myc-Tag eOPRM1

Reverse Primer:

5' ... TT TGA CGA GGC AAC GGG ATT AGATCT GAT
 stop XbaI

DNA Ladder



Selektion positiver Bakterienklone mittels Kolonie-PCR

Abbildung 1: Anbringen des cMyc-Tags an den *eOPRM1* mittels PCR. a) Verwendete PCR-Primer, b) Darstellung der getagten cDNA des equinen μ -Opioidrezeptors im Agarosegel.

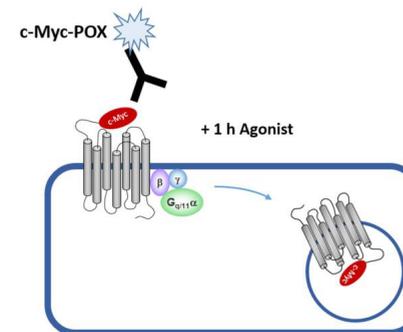


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bestimmung von Oberflächenrezeptoren im Zell-ELISA. Nach der Behandlung für 1 Stunde mit maximal effektiven Konzentrationen von Opioiden wurden die Zellen fixiert und die an der Zelloberfläche verbliebenen Rezeptoren mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper gegen cMyc markiert.

Die Regulation von Zelloberflächenrezeptoren durch verschiedene therapeutisch eingesetzte Opioidanalgetika wurde im Zell-ELISA untersucht. Hierfür wurden HEK293 Zellen transient mit Hilfe des Transfektionsvermittlers Lipofectamine 2000 (Fa. Thermo Fischer) mit dem cMyc-getaggten eMOR transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in eine mit poly-L-Lysin behandelte Zellkulturplatte (24 Vertiefungen; 2 x 10⁵ Zellen/Vertiefung) umgesetzt und für einen weiteren Tag kultiviert. Am Tag des Experimentes wurden die Zellen 3 x gewaschen und für 1 h mit Wachstumsmedium, dem 0,1 % bovinem Serumalbumin (BSA) zugesetzt war, equilibriert. In dieser Zeit stellte sich ein Gleichgewicht zwischen Opioidrezeptoren an der Zelloberfläche und dem Zellinneren ein. Anschließend wurden dem Wachstumsmedium die folgenden Opioidanalgetika in den angegebenen Konzentrationen zugegeben und die Zellen für 1 weitere Stunde inkubiert (Fentanyl, 1 µM; Morphin, 10 µM; Levomethadon, 1 µM; Butorphanol, 1 µM; Buprenorphin, 1 µM). In dieser Zeit induzieren die Opioidagonisten in Abhängigkeit ihrer intrinsischen Aktivität eine Internalisierung der Rezeptoren, so dass am Ende der Inkubationszeit weniger Opioidanalgetika an der Zelloberfläche verbleiben. Die Regulation der Opioidrezeptoren wurde durch Abkühlen auf 4 °C auf dem Eisbad gestoppt und die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) fixiert. Nach gründlichem Waschen der Zellen wurden die Oberflächenrezeptoren durch Inkubation der Zellen mit einem an Peroxidase gekoppelten anti-cMyc-Antikörper in einer Verdünnung von 1 / 5.000 in PBS mit 0,01 % bovinem Serumalbumin markiert und durch Zugabe von Substrat angefärbt. Die unspezifische Bindung des Antikörpers an die Zellen wurde durch Zugabe eines 100-fach molaren Überschusses an cMyc-Peptid (Fa. Intavis) bestimmt. Alle Experimente wurde im Vergleich zum MOR der Ratte durchgeführt.

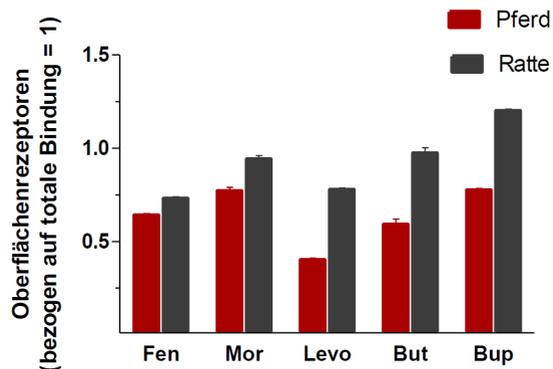


Abbildung 3: Bestimmung der Oberflächenrezeptoren mittels Zell-ELISA. Die Abbildung zeigt die nach einer Inkubation der Zellen für 1 h an der Zelloberfläche verbliebenen Rezeptoren. Die Daten wurden auf unbehandelte Kontrollen (= 1) normalisiert.

Aus Abbildung 3 ist ersichtlich, dass nach einer einstündigen Behandlung der Zellen mit Fentanyl sowohl beim Pferd als auch bei der Ratte etwa 25 - 30 % der Rezeptoren von der Zelloberfläche verschwinden. Dies wird als Maß für die schnelle Entwicklung von Toleranz gewertet, da für nur noch eine verminderte Anzahl an Rezeptoren für die Wirkung zur Verfügung steht. Morphin als partieller Agonist besitzt keine Auswirkung auf die Anzahl von Oberflächenrezeptoren bei der Ratte, vermag aber ca. 20 % der Rezeptoren des Pferdes zu internalisieren. Levomethadon, das als stark wirksames Opioidanalgetikum beim Pferd vor allem für die Neuroleptanalgesie eingesetzt wird, bedingt nach einer einstündigen Behandlung der Zellen eine tierartlich besonders starke Herabregulation der Oberflächenrezeptoren von ca. 60 %. Butorphanol und Buprenorphin vermögen den Rezeptor des Pferdes ebenfalls stärker zu internalisieren. Am Rezeptor der Ratte besitzen sie keinen Effekt. Die Ergebnisse zeigen, dass Opioidanalgetika generell eine stärkere Regulation des µ-Opioidrezeptors des Pferdes im Vergleich zur Ratte auslösen.

Zusammenfassung und Ausblick

Aus den durchgeführten Untersuchungen können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Die therapeutisch eingesetzten Opiode induzieren deutliche Unterschiede in der Internalisierung von µ-Opioidrezeptoren des Pferdes im Vergleich zur Ratte.
- Die Unterschiede im Internalisierungsverhalten tragen zum Verständnis der klinisch zu beobachtenden speziesspezifischen Besonderheiten in der Opioidwirkung beim Pferd bei.
- Morphin und Levomethadon können beim Pferd nach kurzfristiger Behandlung schnell eine Toleranz auslösen.

Weitergehende Untersuchungen sollen sowohl die molekularen Ursachen für die Unterschiede in der Rezeptorregulation als auch die Auswirkungen der Rezeptorinternalisierung auf die Wirksamkeit einer wiederholten Verabreichung von Opioidanalgetika z.B. im Rahmen der Narkoseprämedikation und postoperativen Analgesie aufklären.

Danksagung

Wir danken Frau Sarah Koutnik für die technische Anleitung und dem Förderprogramm Lehre@VETResearch für die finanzielle Unterstützung und die wiederholte Möglichkeit, während des Studiums an Forschungsvorhaben an der Fakultät teilzunehmen.

PCR-basierter Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Rinderkot

Andrea Heubeck

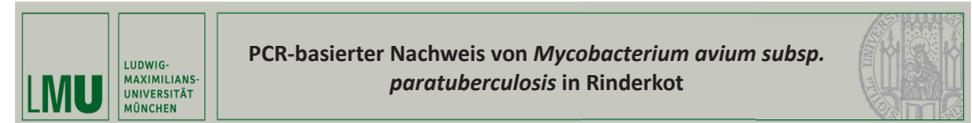
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
Betreuer: Prof. Dr. Hölzel

Persönliche Erfahrungen und Danksagung

Das VETResearch Projekt trat ich in der Erwartung an, dass ich eine grobe Ahnung davon bekommen würde, ob ich mir eine spätere Tätigkeit im Labor überhaupt vorstellen könnte. Diese Erwartung erfüllte sich und ich muss sagen, dass mir die Aufgaben inklusive deren Planung sehr viel Spaß gemacht haben und ich mir durchaus vorstellen kann, nach meinem Abschluss im Forschungsbereich tätig zu werden. Vor allem das selbstständige Arbeiten und Engagement waren gefordert, was mich in meiner beruflichen Laufbahn auf jeden Fall weiterbringen wird, da diese Eigenschaften in wissenschaftlichen Berufen essentiell sind.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Christina Hölzel, die mir die Teilnahme am Projekt überhaupt erst ermöglichte. Vor allem möchte ich mich bei den beiden Doktorandinnen am Lehrstuhl für Milchhygiene, Ricarda Mayer und Elena Feltl, bedanken, die sich ständig um mich gekümmert haben trotz deren eigener Projekte und durch deren Vorausdenken und Hilfe bei der Planung mein Projekt erst gelungen ist. Außerdem noch einen herzlichen Dank an das technische Team am Milchhygiene Lehrstuhl, das mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Es war eine schöne Zeit, die ich auf jeden Fall in guter Erinnerung behalten werde.

Des Weiteren werde ich VETResearch jederzeit anderen StudentInnen weiterempfehlen, die Einblicke hinter die Kulissen der Forschungsinstitute unserer Fakultät bekommen möchten!



A. Heubeck, C. Hölzel

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schönleutnerstraße 8, 85764 Oberschleißheim

Hintergrund

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) kann bei Wiederkäuern die Paratuberkulose, auch genannt Johne'sche Krankheit, hervorrufen. Hierbei handelt es sich um eine chronische Durchfallerkrankung, bei der die Bakterien in großen Mengen ausgeschieden werden. In der Humanmedizin steht MAP in Verdacht an der Entstehung von Morbus Crohn – einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung des Menschen – beteiligt zu sein. Diese Vermutung besteht seit der Erstpublikation im Jahre 1923, konnte jedoch bis heute weder bewiesen noch widerlegt werden. MAP besitzt eine hohe Tenazität. Der kulturelle Erregernachweis ist jedoch anspruchsvoll und zeitaufwendig, da bis zu drei Monate vergehen können, bis ein Koloniewachstum sichtbar wird. Derzeit wird intensiv an der Etablierung zeitsparender Alternativmethoden geforscht.

Zielsetzung

Im Rahmen des VetResearch Projektes sollte ein PCR-basierter Nachweis von MAP aus Rinderkot nach einer Kit-basierten Probenextraktion etabliert werden.

Kotprobengewinnung

Die Gewinnung der Kotproben erfolgte per Rektalierung von 10 Kühen ab der 2. Laktation auf einem Milchviehbetrieb. Die Proben verblieben direkt in den verschlossenen Rektalhandschuhen. Der Kot wurde unter sterilen Bedingungen durch Abtrennen eines „Fingergliedes“ vom Handschuh in 25 ml Gefäße überführt und bis zur Weiterverarbeitung auf -20 °C gelagert.



DNA Extraktion

Die DNA Extraktion wurde vergleichend mit zwei kommerziell erhältlichen Kits entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Es handelte sich hierbei um den Blood & Tissue Kit bzw. den Power Soil Kit (Qiagen). Dabei wurde zunächst mit MAP aus Reinkultur gearbeitet, die im Rahmen einer dekadischen Verdünnungsreihe auf definierte Zellzahlen eingestellt wurde.

DNA-Extraktion aus Reinkultur

MAP aus Reinkultur wurde mit Hilfe einer Zählkammer und anschließender dekadischer Verdünnung auf eine definierte Bakterienzahl von 10^8 bis 10^1 eingestellt. Anschließend erfolgte die DNA Extraktion über die o. g. Kits. In der folgenden PCR wurde die MAP spezifische Zielsequenz f57 mittels spezifischer Primer amplifiziert. Primersequenzen F57 for: 5'TTG GAC GAT CCG AAT ATG T, f57 rev: 5' AGT GGG AGG CGT ACC A. Die Amplifikation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die finale Primerkonzentration betrug 300 nM, als Mastermix wurde der KAPA SYBR®FAST verwendet, als Template wurden 2 µl eingesetzt. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 5 min, gefolgt von 40 Zyklen mit 95 °C für 10 s, 58 °C für 15 s, 72 °C für 11 s, und 82 °C für 5 s. Nach erfolgter qPCR wurden die Amplifikate über Gelelektrophorese analysiert.

Die Nachweisgrenze lag für beide Kits bei 10^3 Kopien.



Abb. 1A:
M = Marker; 1 = pos. Kontrolle; 2 = neg. Kontrolle; 3 = 10^8 ; 4 = 10^7 ; 5 = 10^6 ; 6 = 10^5 ; 7 = 10^4 ; 8 = 10^3 ; 9 = 10^2 ; 10 = 10^1

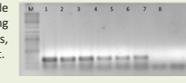


Abb. 1B:
M = Marker; 1 = 10^8 ; 2 = 10^7 ; 3 = 10^6 ; 4 = 10^5 ; 5 = 10^4 ; 6 = 10^3 ; 7 = 10^2 ; 8 = 10^1

Elimination von PCR-Hemmstoffen während der Extraktion

Der Power Soil Kit wird als besonders geeignet beschrieben, potentiell in den Proben vorhandene PCR-Hemmstoffe bei der Extraktion zu eliminieren. Um dies zu verifizieren wurden je 0,25 g der undotierten Kotproben extrahiert und die Kotextrakte mit MAP-DNA in unterschiedlicher Kopienzahl versetzt. Die Kotextrakte wurden unverdünnt, 1:10 und 1:100 verdünnt eingesetzt, um zu erfassen, ob die Extrakte Inhibitoren enthalten – wäre dies der Fall, erfolgte die Amplifikation mit geringerer Effizienz, gleiche MAP-Konzentrationen würden dann höhere CP-Werte zeigen. Die quantitative PCR fand im Lightcycler 480 mit SYBR Green-Mastermix und den o. g. MAP-spezifischen f57 Primern statt.

Keine Hemmung der Amplifikation durch die Kotmatrix (s. Tab.1)

MAP input	CP Kotextrakt unverdünnt	CP Kotextrakt 1:10 verd.	CP Kotextrakt 1:100 verd.
10^8	21,09	20,40	20,87
10^4	24,26	23,29	23,53
10^1	27,58	25,84	26,06
10^0	30,59	29,07	29,23

Table 1: CP-Werte dotierter Kotextrakte und Kotextrakt-Verdünnungen. Gleiche Konzentrationen an MAP zeigen vergleichbare CP-Werte trotz unterschiedlicher Konzentration der Kotmatrix (also möglicher Inhibitoren).

Erfassung der Nachweisgrenze beim PCR-basierten Nachweis von MAP in Kotproben

Kotproben wurden in Zehnerschritten von 10^8 bis 10^1 MAP dotiert und mittels Power Soil Kit extrahiert. Anschließend erfolgte der Nachweis mittels PCR. Das MAP-spezifische Amplikon f57 konnte nur bis zu einer Nachweisgrenze von 10^1 MAP nachgewiesen werden (Abb. 2).

Unbefriedigende Nachweisgrenze bei der direkten Aufarbeitung von Kot.



Abb. 2:
M = Marker; 1 = 10^8 ; 2 = 10^7 ; 3 = 10^6 ; 4 = 10^5 ; 5 = 10^4 ; 6 = 10^3 ; 7 = 10^2 ; 8 = 10^1 ; 9 = neg. Kontrolle; 10 = pos. Kontrolle

Untersuchung von Feldproben

Kotproben eines Rinderbestandes wurden mithilfe des Power Soil Kits extrahiert. Die DNA wurde in eine MAP-spezifische real-time PCR eingesetzt.

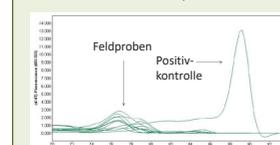


Abb. 3:
Die Positivkontrolle zeigt einen für das f57 Amplikon spezifischen Schmelzpeak bei +89 °C; die Schmelzpeaks in den Feldproben sind unspezifisch und auf die Bildung von Primer-Dimeren zurückzuführen.

Keine der Feldproben zeigte einen spezifischen Schmelzpunkt.

Fazit:

- Nach der Kit-basierten Aufarbeitung enthalten die Kotextrakte keine PCR-Hemmstoffe
- Erhebliche DNA Verluste bei der Kit-basierten DNA Extraktion führen dennoch zu einer unbefriedigenden Nachweisgrenze
- Alle Feldproben waren negativ in der real-time PCR
- Aufgrund der hohen Nachweisgrenze haben die negativen Ergebnisse der Feldproben keine Aussagekraft

Biomechanische Bedeutung des Schnappmechanismus im Ellbogengelenk (Articulatio cubiti) des Pferdes

Franziska Hofmann

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie
Betreuer: Prof. Dr. Johann Maierl

LMU

LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Tierärztliche Fakultät
Veterinärwissenschaftliches Department
Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie



Biomechanische Bedeutung des Schnappmechanismus im Ellbogengelenk (Articulatio cubiti) des Pferdes

Franziska Hofmann und Johann Maierl

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie –
Tierärztliche Fakultät, Veterinärwissenschaftliches Department

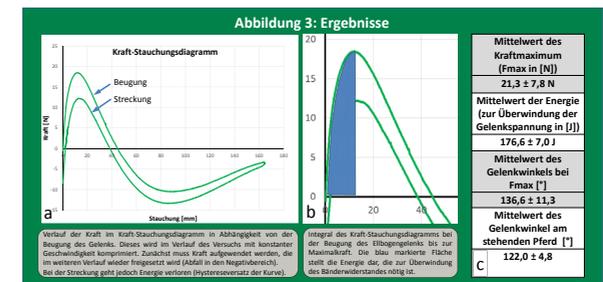
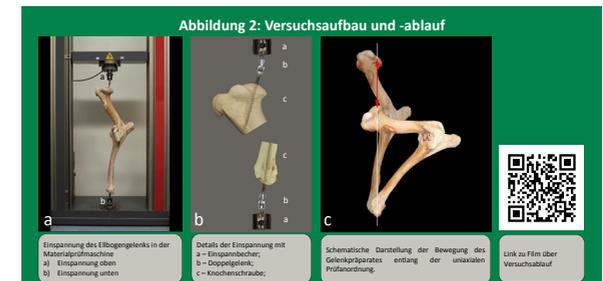
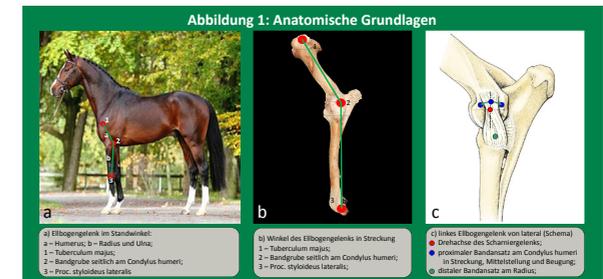
Einleitung: Am Ellbogengelenk des Pferdes sind die Seitenbänder exzentrisch angeordnet, der humerale Ansatzpunkt der Bänder liegt proximal der Drehachse des Gelenks (Abb. 1). Dadurch entsteht beim Übergang von der Streck- in die Beugstellung eine immer stärkere Dehnungsspannung der Bänder. Diese ist am größten kurz vor dem Übergang in die Beugstellung (Abb. 1c). Bei weiterer Beugung entlädt sich die gespeicherte Energie in einer erleichterten Beugebewegung des Gelenks, es schnappt in die Beugstellung. Dies wird in der Literatur als „Schnappgelenk“ bezeichnet. Beim umgekehrten Übergang von der Beuge- in die Streckstellung passiert der gleiche Vorgang in der umgekehrten Richtung. Ungeklärt ist bisher der biologische Sinn dieser Einrichtung. Ziel der Untersuchung war es, den Standwinkel am lebenden Pferd mit dem Winkel des Gelenks beim Kraftmaximum zu vergleichen.

Material und Methoden: Drei Ellbogengelenke von euthanasierten Pferden (Hannoveraner (2), Haflinger) wurden untersucht. Die Ursachen für die Euthanasie beeinflussten die Untersuchung nicht. Zunächst musste eine Fixierung der Gelenke in der Materialprüfmaschine erarbeitet werden (Abb. 2), die sowohl für Druck- als auch Zugbelastung geeignet war. Die Befestigung musste alle nötigen Freiheitsgrade aufweisen, um Zwangskräfte zu vermeiden, die das Messergebnis verfälschen.

Ergebnisse: In Abb. 3c sind die Mittelwerte
- des Kraftmaximums zum Zeitpunkt der größten Spannung der Seitenbänder
- der Energie, die nötig ist, um die Spannung im Gelenk zu überwinden
- der Winkel bei der Maximalkraft sowie
- der Standwinkel am lebenden Tier aufgeführt.

Schlussfolgerungen: Der Versuchsaufbau in der vorliegenden Form hat sich bewährt und wird als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. Die Maximalkraft ist relativ gering für die große Körpermasse des Pferdes, könnte jedoch beim stehenden Tier die passiven Mechanismen der Stabilisierung des Ellbogengelenks unterstützen. Weitere Präparate müssen noch untersucht werden im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen dem Standwinkel am lebenden Tier und dem Winkel am Präparat bei Maximalkraft.

Danksagung: Herrn Kevin Wurzberger danken wir für seine Hilfe bei der Entwicklung der Präparateinspannung, Herrn Hecher für die Unterstützung bei der Präparatelogistik. Unser besonderer Dank gilt jedoch der LMU (Hochschulpark Lehre) und dem Studiendekanat (VetResearch) für die finanzielle Unterstützung des Vorhabens.



Vorkommen hepatotoxischer Pyrrolizidinalkaloide in regionalen Imkerhonigen aus Bayern

Veronika Huber

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Betreuer: Dr. Christoph Gottschalk, Florian Kaltner

Hintergrund

1,2-Dehydropyrrolizidinalkaloide (PA) und ihre N-Oxide (PANO) sind eine Gruppe toxischer sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, die weltweit in ca. 6000 Arten vorkommen und zum Schutz vor Fraßfeinden gebildet werden. Sie wirken hepatotoxisch, kanzerogen und mutagen (Edgar et al. 2011).

Honig gilt neben Kräutertees als eine der Haupteintragsquellen für PA bei der europäischen Bevölkerung, wobei die Biene als Vektor fungiert und Pollen und Nektar PA-haltiger Pflanzen in den Honig einträgt (EFSA 2011, BfR 2016). Die starke Ausbreitung PA-haltiger Pflanzen wie z.B. Wasserkreuzkraut im Allgäu könnte zu teils hohen PA-Gehalten in regional erzeugten Imkerhonigen führen.

Das Projekt verfolgte das Ziel, eine Stuserhebung zum Vorkommen von insgesamt 49 PA und PANO in bayerischen Imkerhonigen durchzuführen, um das Risiko für den Verbraucher einschätzen zu können. Für diese Studie wurden 70 Honigproben aus Bayern von den Sommern 2016 und 2017 auf PA und PANO untersucht.

Methodik

PA und PANO wurden in mehreren Schritten aus dem Honig extrahiert und aufgereinigt, sodass sie anschließend mittel Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) gemessen werden konnten. Danach folgte die Auswertung der Chromatogramme und die Quantifizierung der einzelnen Analyten. Abbildung 1 zeigt einen schematischen Ablauf der Methodik.

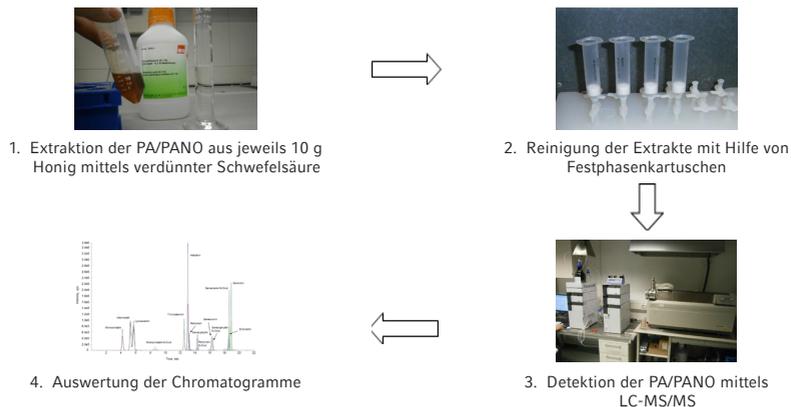


Abbildung 1: Schematische Darstellung der LC-MS/MS Analyse von Honig

Ergebnisse und Schlussfolgerung

In 43 von 70 Honigproben konnten PA/PANO nachgewiesen werden (Tabelle 1). Proben des Sommers 2017 waren mit einem Maximalgehalt von 5,8 µg/kg nur geringfügig belastet, ebenso Proben von 2016, mit Ausnahme einer Probe mit einem Gehalt von 58,3 µg/kg. Der Medianwert der PA/PANO-Gehalte aller Proben lag mit 0,13 µg/kg in einem sehr niedrigen Bereich.

Tabelle 1: Ergebnisse der PA/PANO Untersuchungen von n=70 bayerischen Honigproben

	n	positiv	Min [µg/kg]	Max [µg/kg]	Median [µg/kg]	Mittelwert [µg/kg]	90 %-Perz. [µg/kg]
Sommer 2016	18	12	<LOD*	58,3	0,14	5,6	42,2
Sommer 2017	52	31	<LOD*	5,8	0,13	0,58	1,4
Gesamt	70	43	<LOD*	58,3	0,13	2,0	3,3

* LOD, limit of detection (Nachweisgrenze)

Insgesamt wiesen die positiven Proben nur sehr geringe bis tolerierbare Gehalte auf. Selbst im Falle eines Kleinkindes mit durchschnittlichem täglichem Honigverzehr stellten die untersuchten Honige kein Risiko dar, da in keinem der Fälle der Margin of Exposure von 10 000 (wenig bedenkliche Dosis in Bezug auf Krebsrisiken, EFSA 2017) unterschritten wurde (Tabelle 2). Die Situation der PA/PANO-Belastung bei den untersuchten bayerischen Imkerhonigen ist somit als unbedenklich einzustufen.

Tabelle 2: Expositionsschätzung und Risikobewertung für ein Kleinkind (2-5 Jahre; 16 kg Körpergewicht (KG)), mean/worst case Szenario (Median/90 % Perzentil der PA/PANO-Summe)

	Honigverzehr	Szenario	tägl. Ø Aufnahme [ng]	tägl. PA/PANO-Aufnahme [ng/kg KG]	MOE*
Sommer 2016	0,4 g/kg KG/d	mean	0,90	0,06	3 950 000
		worst	272,6	16,9	14 040
Sommer 2017		mean	0,84	0,05	4 740 000
		worst	8,7	0,54	438 888
Gesamt		mean	0,84	0,05	4 740 000
		worst	21,3	1,4	174 264

*MOE, margin of exposure; MOE-Werte > 10 000 gelten als weitgehend unbedenklich hinsichtlich Krebsrisiken (EFSA 2017)

Persönliche Meinung

Dieses Projekt lieferte mir einen sehr guten Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten am Lehrstuhl. Es gibt einem die Möglichkeit, sich schon während des Studiums mit der Forschung zu beschäftigen und viele Erfahrungen zu sammeln, die einem zum Beispiel für eine spätere Doktorarbeit sehr nützlich sein können. Während des gesamten Projekts konnte ich sehr selbstständig und zu flexiblen Zeiten arbeiten. Trotzdem haben mir alle Mitarbeiter vom Institut jederzeit geholfen als es nötig war und vor allem meine Betreuer haben mich während der ganzen Zeit mit Hilfe und gutem Rat unterstützt. Allen Studenten, die Interesse an der Forschung haben, kann ich die VETResearch-Projekte auf jedem Fall empfehlen.

Literatur

EFSA (2017): Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. The EFSA Journal 15(7), 4908

EFSA (2011): Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. The EFSA Journal 9, 2406

BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung Pyrrolizidinalkaloide: Gehalte in Lebensmitteln sollen nach wie vor so weit wie möglich gesenkt werden. Stellungnahme des BfR Nr. 030/2016

Edgar JA, Colegate SM, Boppré M, Molyneux RJ. Pyrrolizidine Alkaloids in food: a spectrum of potential health consequences. Food Add Contam 2011,28, 308-324.

Charakterisierung lebensmittel- und futtermittel-relevanter Schimmelpilzisolat mittels molekularbiologischer und bioanalytischer Methoden

Johannes Köck

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Betreuer: Dr. Sebastian Ulrich, Dr. Barbara Biermaier, Dr. Christoph Gottschalk

Hintergrund

Schimmelpilze besitzen eine breite Relevanz für die Lebensmittel- und Futtermittelsicherheit, da manche Mikromyzeten in der Lage sind, hochtoxische Sekundärmetaboliten zu bilden, die die Gesundheit von Mensch und Tier schädigen können. Diese Mykotoxine können bereits auf dem Feld bzw. bei unsachgemäßer Lagerung gebildet und so in die Lebensmittelkette eingetragen werden. *Aspergillen* und *Penicillien* zählen aufgrund ihres toxinogenen Potenzials und ihres ubiquitären Vorkommens zu den besonders wichtigen Schimmelpilzgattungen. Da nur bestimmte Isolate in der Lage sind, Toxine zu bilden, ist eine eindeutige Bestimmung auf Speziesebene unerlässlich. Ziel dieses Folgeprojektes war es, bisher rein phänotypisch differenzierte Spezies aus der Stammsammlung des Lehrstuhls durch molekularmikrobiologische und bioanalytische Verfahren weitgehend zu charakterisieren und in Folge die Pilz-Datenbank des am Lehrstuhl etablierten MALDI-TOF MS Systems zu erweitern und somit die Arbeit des vorangegangenen VETResearch-Projekts fortzuführen.

Material und Methoden

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 100 *Penicillium*- und *Aspergillus*-Isolate aus Lebensmittel- und Futtermittelproben ausgewählt. Nach Re-Suspension der gefriergetrockneten Isolate wurden diese auf Malzextraktagar angezüchtet und Dreipunkt-Reinkulturen angelegt (Tabelle 1). Diese wurden zunächst anhand kultureller und mikroskopischer Verfahren (Licht-, Stereomikroskop) phänotypisch charakterisiert. Zur Durchführung einer Universal-PCR für Schimmelpilze wurde deren DNA unter Verwendung geeigneter Testkits extrahiert und gereinigt. Nach Kontrolle des Amplifikats mittels Gelelektrophorese wurden die Proben zur Sequenzierung geschickt. Gleichzeitig erfolgte eine Anzucht der Schimmelpilze in Flüssignährmedium zur Untersuchung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

Ausgehend von den Ergebnissen der Sequenzierung wurden die erhaltenen Massenspektren der lehrstuhleigenen Referenzdatenbank hinzugefügt.

Ergebnisse

Wie schon im vorangegangenen VETResearch-Projekt zeigte sich, dass eine Charakterisierung nur anhand von morphologischen Gesichtspunkten zu ungenau ist. Es konnten insgesamt 60 Referenzspektren für die MALDI-TOF Messung erstellt und erfolgreich in die Referenzdatenbank eingepflegt werden (Beispielspektren für *Penicillium*- und *Aspergillus*-Isolate

siehe Abbildung 1 und 2). Diese können nun zur Diagnostik von potenziell schädlichen Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium* verwendet werden, wodurch diese erheblich beschleunigt werden kann. Durch die MALDI-TOF MS Methodik, unter Verwendung der Datenbank, lassen sich die gesamten Arbeitsschritte der DNA-Extraktion und PCR/Sequenzierung einsparen. Diese Zeitersparnis ist besonders wertvoll für die Diagnostik von toxischen Mikromyzeten im Bereich Lebensmittelsicherheit, da etwaige Maßnahmen im Rahmen der Lebensmittel- oder Futtermittelsicherheit schneller eingeleitet werden und Kosten gegenüber molekularbiologischer Diagnostik gespart werden können.

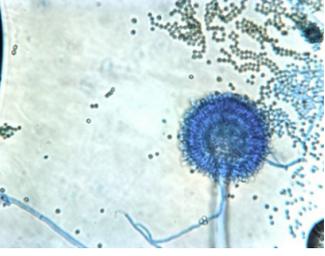
Persönliche Meinung

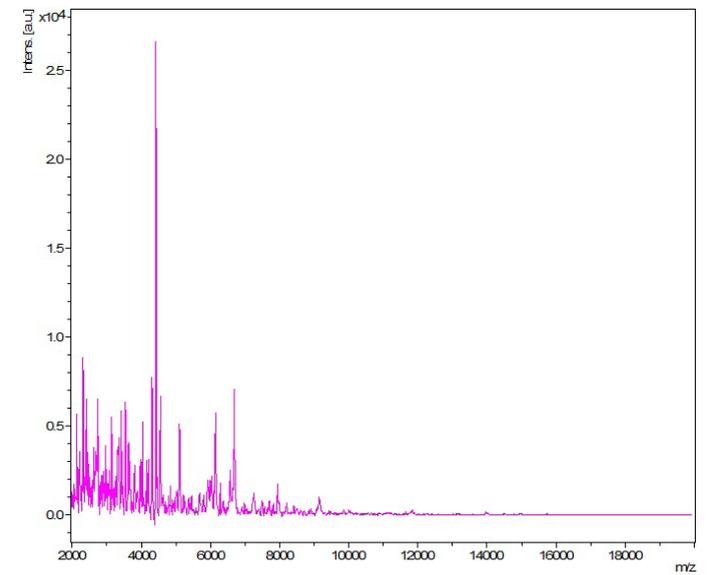
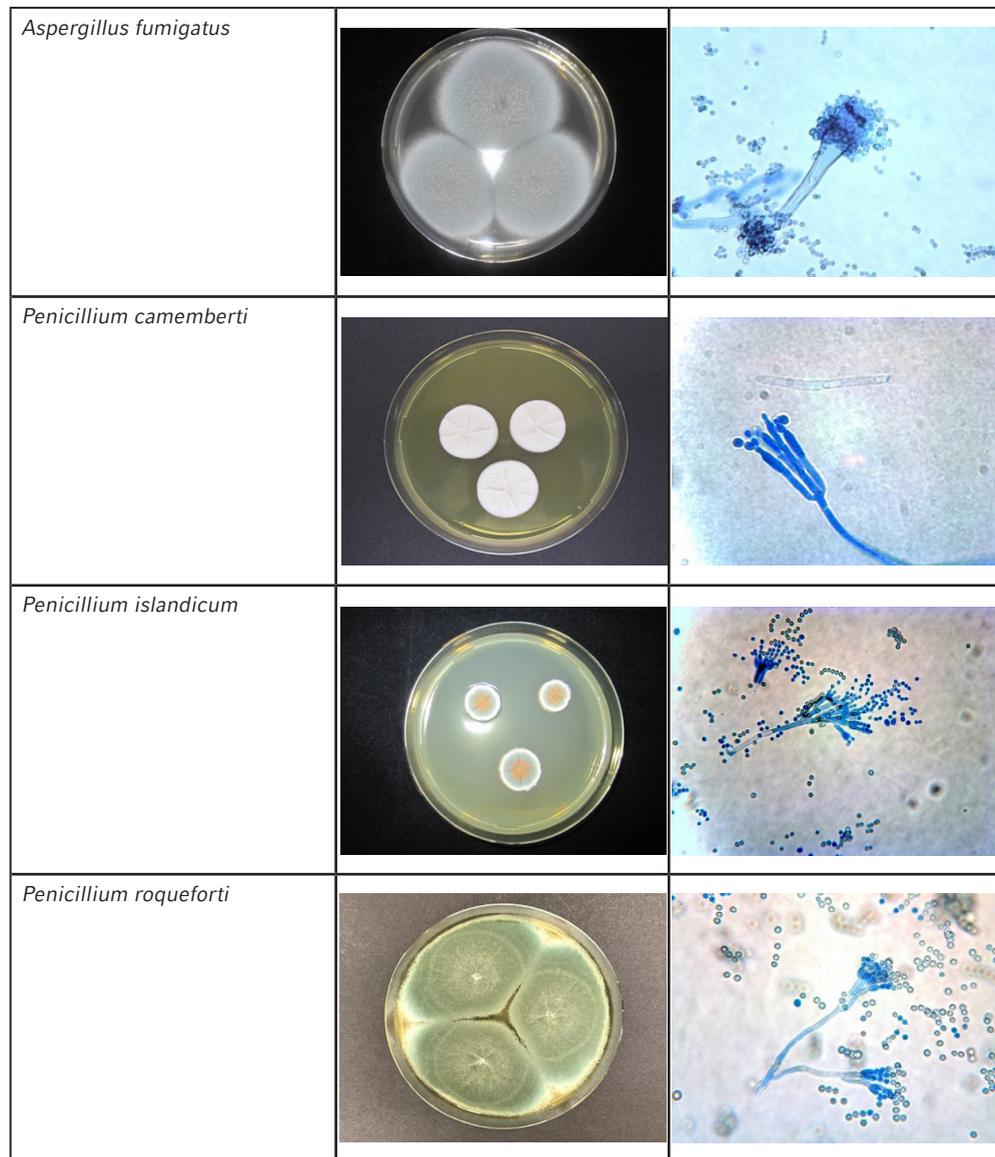
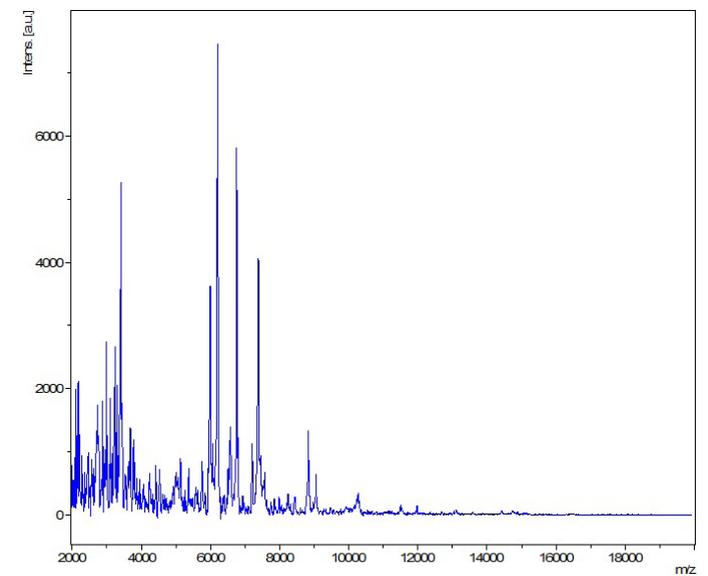
Dieses Projekt stellte für mich eine wertvolle Möglichkeit dar, meine Fähigkeiten im mikrobiologischen Arbeiten weiter zu verbessern und Erfahrungen für eine mögliche Dissertation im Bereich Lebensmittelsicherheit zu sammeln.

Dass ich weitestgehend selbstständig am Lehrstuhl arbeiten durfte und trotzdem immer einen kompetenten Ansprechpartner hatte, empfand ich als besonders wertvoll.

Mein Dank geht an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit für die gute Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima.

Tabelle 1: Beispiele für ausgewählte Isolate: Dreipunktkultur und lichtmikroskopisches Bild in 400-facher Vergrößerung

Isolat	Makromorphologie (Dreipunktkultur)	Mikromorphologie (Lichtmikroskop, 400-fach)
<i>Aspergillus candidus</i>		
<i>Aspergillus flavus</i>		

Abbildung 1: MALDI-TOF Massenspektrum von *Aspergillus flavus*Abbildung 2: MALDI-TOF Massenspektrum von *Penicillium chrysogenum*

Spezies-Identifizierung ausgewählter Isolate kälteliebender Clostridien mittels qPCR und DNA-Sequenzierung

Claudia Springer
Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit
Betreuer: Dr. Samart Dorn-In

Hintergrund und Zielsetzung

Psychrophile und psychrotolerante Clostridien sind grampositive, ubiquitär vorkommende, obligat anaerobe Sporenbilder, zu denen zum Beispiel *Clostridium estertheticum* gehört. Sie sind hauptsächlich als Verderbserreger von Fleisch bekannt. Bestimmte Spezies haben zudem das Vermögen, das so genannte „Blown-Pack Spoilage“ (BPS) zu verursachen, wobei sich die Hüllen von vakuumverpackten Fleisch durch Gasbildung aufblähen (Abbildung 1). Dies führt zu immensen Verlusten in der Fleischindustrie im Wert von geschätzt mehreren Millionen Euro im Jahr.

Für die eigenen Untersuchungen mit dieser Gruppe von kälteliebenden Clostridien wurden insgesamt 75 Isolate des Lehrstuhls verwendet. Im Jahr 2015 wurden 75 Isolate der psychrophilen Clostridien aus Kot- und Fellproben von 53 Wildschweinen aus Polen isoliert und mittels mikroskopischer und biochemischer Verfahren auf Gattungsebene identifiziert.

Ziel des Projektes war die genauere Spezies-Bestimmung dieser 75 Feldisolate. Mit Hilfe einer quantitativen Sonden-PCR (qPCR), der Sequenzierung der PCR-Produkte und anschließender phylogenetischer Analyse wurden diese Stämme bis auf Spezies-Ebene untersucht. Dabei war besonders die Frage interessant, ob es sich bei den Isolaten um bereits bekannte oder neue Spezies handelt.



Abbildung 1: „Blown-Pack Spoilage“ eines Rindfleisch-Filets Quelle: Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit, LMU

Darstellung der Methodik

Zunächst wurden die 75 kryokonservierten Clostridien-Isolate in Pepton Yeast Glucose Starch-Bouillon (PYGS) belebt und angereichert. Die Isolate wurden in 3 Aliquote unterteilt und jeweils anaerob bei 4 °C, 10 °C und 22 °C bebrütet. Nachdem das Wachstum der Isolate in der PYGS-Bouillon sichtbar war, wurde die DNA mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Scientific) extrahiert. Anschließend wurde die PCR-Amplifikation der DNA mit fünf verschiedenen qPCR Verfahren mit Sonden durchgeführt (Abbildung 2). Das qPCR-Verfahren 1 ist spezifisch für die Gruppe von psychrophilen Clostridien (Brightwell et al., 2012). Im Rahmen dieser Studie wurden aber vier Clostridien-Spezies-spezifische Sonden für zusätzliche qPCR Verfahren (Verfahren 2 – 5, siehe Abbildung 2) entwickelt.

Dabei wurden die 16S rRNA-Gene aller Isolate mittels PCR mit SYBR (PCR 6, Abbildung 2) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit dem Kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) aufgereinigt. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde mithilfe eines Photometers bestimmt und anschließend zur Sequenzierung an die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Bayern) geschickt. Zudem wurde zur Veranschaulichung der Verwandtschaftsgrade eine Phylogenie-Analyse des 16S rRNA Gen-Abschnitts aller Isolate durchgeführt.

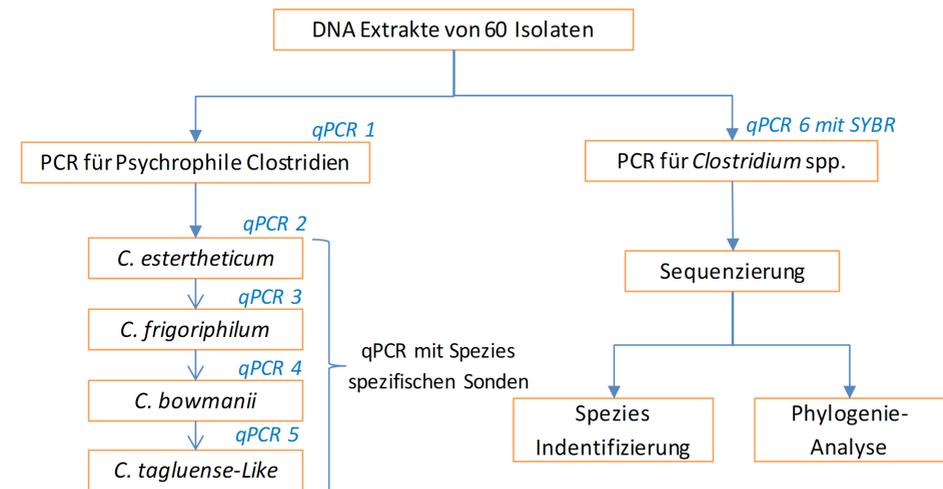


Abbildung 2: Arbeitsschema für qPCR mit Spezies-spezifischen Sonden

Ergebnisse und Diskussion

Die Bebrütung der psychrophilen Clostridien erstreckte sich immer bis zu einem sichtbaren Wachstum der Isolate in PYGS-Bouillon, wofür zwischen 3 bis 8 Wochen erforderlich waren. Insgesamt 60 von 75 Isolate konnten sich bei der Bebrütung sowohl bei 4 °C als auch bei 10 °C vermehren, was einer Erfolgsrate der Wiederbelebung von 80 % entspricht. Bei der Bebrütung von 22 °C fand kein Wachstum der kälteliebenden Clostridien statt.

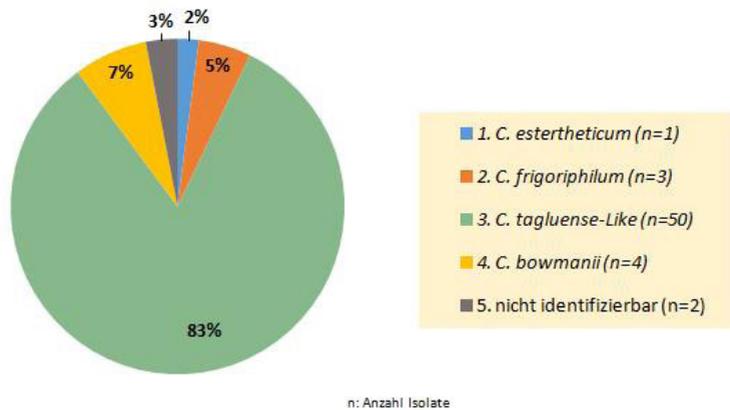


Abbildung 3: Ergebnisse der qPCR mit Spezies-spezifischen Sonden (siehe PCR Verfahren 2-5, Abbildung 2)

Die quantitative Real-Time PCR mit Spezies-spezifischen Sonden (Abbildung 3) identifizierte eine Probe als *C. estertheticum*, welche nachweislich Blown-Pack Spoilage (BPS) verursachen können (Adam et al., 2010). Drei Isolate wurden als Spezies *C. frigoriphilum* identifiziert, die relativ wenig bekannt ist. Vier Isolate wurden als *C. bowmanii* identifiziert, welche als Verderbserreger von Fleisch gelten, allerdings keine erhebliche Gasbildung hervorrufen können (Moschonas et al., 2010). Der Großteil (n = 50) der Isolate wurde den *C. tagluense*-Like zugeordnet, über die bislang nicht bekannt ist, ob sie BPS verursachen können. Zwei Isolate wurden mit den Sonden nicht identifiziert.

In Abbildung 4 sind die Resultate der Sequenzierung im Vergleich zu sehen. Die Ergebnisse der Sequenzierung von *C. estertheticum*, *C. frigoriphilum* und *C. bowmanii* zeigten eine Übereinstimmung von 100 % mit den Ergebnissen der qPCR mit Spezies-spezifischen Sonden (Abbildung 3). Eines der zwei zuvor nicht identifizierten Isolate konnte als Fleischverderbserreger *C. frigidicarnis* spezifiziert werden (Broda et al., 1999), wofür es nach dem angewendeten Arbeitsschema keine passende Spezies-spezifische Sonde gab und somit nicht detektiert werden konnte. Die zweite nicht identifizierte Probe wurde auch den vorherrschenden *C. tagluense*-Like zugeordnet. Die phylogenetische Analyse der *C. tagluense*-Like zeigte teils eine unterschiedliche Nukleotid-Abfolge, weshalb sie in eine Gruppe 1 und Gruppe 2 eingeteilt wurden (Abbildung 4).

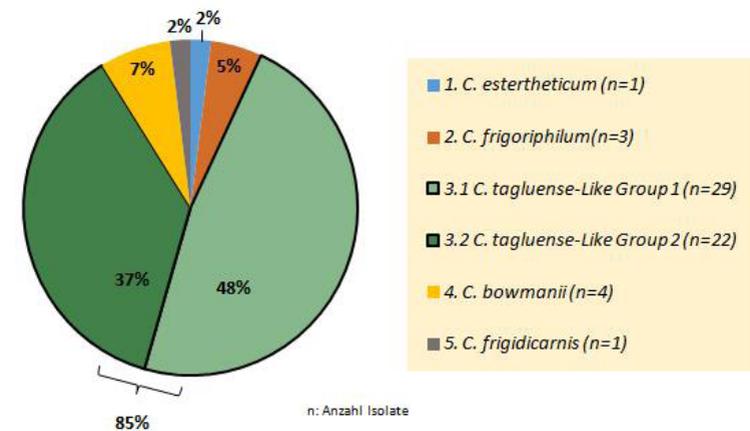


Abbildung 4: Ergebnisse der Sequenzierung der 16S rRNA Gene und Phylogenie-Analyse

Die angewendete PCR-Methode mit speziellen Primern und Spezies-spezifischen Sonden konnte mit einer Sicherheit von 98,3 % die Isolate genauer differenzieren (Abbildung 5). Somit kann man Isolate auch ohne Sequenzierung der Spezies *C. estertheticum*, *C. frigoriphilum*, *C. bowmanii* und *C. tagluense*-Like genauer identifizieren.

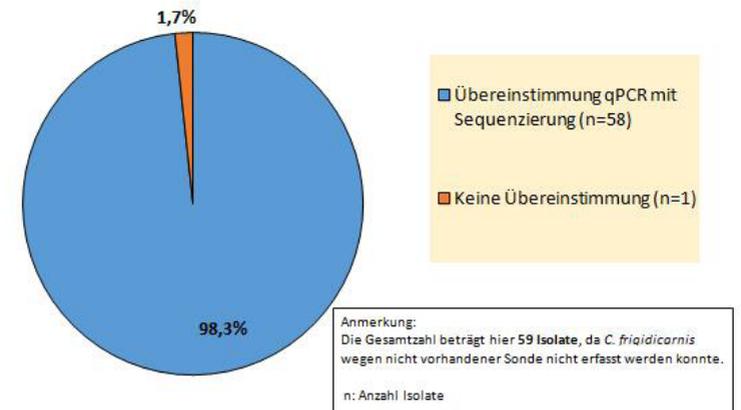


Abbildung 5: Ergebnisse qPCR mit Spezies-spezifischen Sonden im Vergleich mit Sequenzierung

Zusammenfassung und Ausblick

Insgesamt 9 Isolate konnten bis zur Spezies-Ebene deutlich identifiziert werden, 51 Isolate wurden zwei Untergruppen der *C. tagluense*-Like zugeordnet. Als aufbauendes Projekt bestünde nun die Möglichkeit, diese Gruppen 1 und 2 noch genauer zu identifizieren und ihr potentielles BPS-Vermögen zu untersuchen.

Referenz

Adam, K. H., Flint, S. H. und Brightwell, G. (2010). Psychrophilic and psychrotrophic clostridia: sporulation and germination processes and their role in the spoilage of chilled, vacuum-packaged beef, lamb and venison. *International Journal of Food Science and Technology* 45(8), 1539-1544.

Brightwell, G. und Clemens, R. (2012). Development and validation of a real-time PCR assay specific for *Clostridium estertheticum* and *C. estertheticum*-like psychrotolerant bacteria. *Meat science* 92(4), 697-703.

Broda, D.M., Lawson, P.A., Bell, R.G., Musgrave, D.R. (1999) *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 1539 – 50.

Moschonas, G., Bolton, D. J., Sheridan, J. J., & McDowell, D. A. (2010). The effect of storage temperature and inoculum level on the time of onset of "blown pack" spoilage. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 532–539.

Persönliche Erfahrung und Danksagung

Da ich den Hauptteil meines Projektes im mikrobiologischen und molekularbiologischen Labor verbracht habe, erhielt ich die Möglichkeit, zahlreiche relevante Labormethoden zu erlernen, die man im Rahmen des üblichen Tiermedizinstudiums nicht in dem Umfang und selbstständig anwenden konnte. Vor allem die Kultivierung und Anzucht von anaeroben Keimen, das exakte Arbeiten bei DNA-Extraktionen und Real-Time-PCR, die PCR Aufreinigung für die Sequenzierung, die Durchführung von Photometrie zur Dichtebestimmung und Gelelektrophoresen sind nur ein Ausschnitt des umfangreichen Repertoires, das ich mir mit Hilfe der sehr guten Einarbeitung durch die Mitarbeiter des Lehrstuhls aneignen konnte. Auch die Auswertung der Ergebnisse der quantitativen PCR, der Sequenzierung und einer Phylogenie-Analyse gehörten zu der Arbeit dazu und vertieften mein Verständnis, wie man die erlangten Resultate nun korrekt einordnen kann.

Ich kann jedem, der Interesse hat einmal eine Doktorarbeit zu schreiben nur ans Herz legen, ein solches Projekt im Rahmen von VETResearch durchzuführen. Mir hat es deutlich gemacht, wie viel Spaß Forschung machen kann und mich in meinem Vorhaben bestärkt. Zudem kann man auch Kontakte knüpfen und einen guten Einblick in die Arbeitsbereiche der Lehrstühle erhalten.

Mein besonderer Dank gilt dabei Verena Hohenester, die mir mit viel Freude im Labor bei Unklarheiten zur Seite stand und ganz besonders meinem Betreuer, Dr. Samart Dorn-In, der äußerst kompetent und mit viel Unterstützung mein Projekt ausgezeichnet begleitet hat. Auch möchte ich mich bei Herrn Professor Manfred Gareis ganz herzlich bedanken, ohne den das Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Funktionelle Charakterisierung von CSF-1 induzierten Hühnermakrophagen

Johannes Voß
Lehrstuhl für Physiologie
Betreuer: Prof. Dr. Bernd Kaspers

Ziel des Forschungsprojektes

Im Rahmen des VETResarch-Projektes sollte mit Hilfe eines bereits klonierten Konstruktes der Colony-Stimulating Factor-1 (CSF-1) des Huhns transient in HEK-293T-Zellen exprimiert werden, um das Protein in rekombinanter Form für funktionelle Studien zu gewinnen. Das rekombinante CSF-1 sollte nachfolgend zur Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zu Makrophagen genutzt werden. Die Methode soll die Basis für zukünftige *in vitro* Studien an Makrophagen legen und im Rahmen dieser Arbeit für erste Genexpressionsanalysen genutzt werden.

Material und Methoden

Transiente Transfektion

Die HEK-293T wurden transient transfiziert. Dazu wurden die Zellen ausgesät und 24 Stunden später mit 1 µg des CSF-1 Konstrukts mittels Xtreme Gene in OptiMEM Zellkulturmedium transfiziert. Um den Transfektionserfolg zu überprüfen, besitzt das Konstrukt ein His- und ein V5-Tag, welche die Identifizierung des Proteins ermöglichen. Die Detektion von CSF-1 aus dem Überstand der so transfizierten Zellen erfolgte mittels ELISA.

ELISA

Eine Maxisorb-ELISA-Platte wurde über Nacht mit binär logarithmisch absteigender Konzentration (Startkonzentration 10 µg/ml) anti-HIS-Antikörper (Dianova DIA910) beschichtet. Am Versuchstag erfolgte nach Waschung der Platte eine einstündige Inkubation mit 4 % Magermilchpulver, gelöst in PBS, als Blockade. Nach erneutem Waschen wurde Zellkulturüberstand der transient mit CSF-1-Konstrukt transfizierten und untransfizierter HEK-293T-Zellen in einer Verdünnung von 1:2 aufgetragen. Zur Detektion erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem POD-markierten anti-V5-Antikörper (Sigma, 1:4000) und anschließende Entwicklung für 10 min mittels TMB-Lösung (Applichem). Durch Zugabe von Schwefelsäure wurde ein Farbumschlag erreicht, der im ELISA-Reader quantifiziert wurde.

Titration anti-His

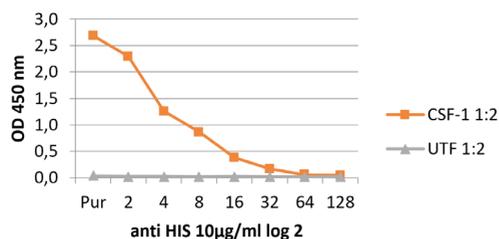


Abbildung 1 ELISA der transienten CSF-1 Transfektion (UTF = untransfizierte Kontrolle)

Präparation von Makrophagen

Knochenmarkszellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Dazu wurde unter einer sterilen Arbeitsbank Knochenmark aus frisch entnommenen Oberschenkelknochen eines Huhnes mit PBS herausgespült und die Zellen vereinzelt. Nach einer 10-minütigen Sedimentationsphase wurden jeweils 10 ml der Zellsuspension auf 10 ml Biocoll (Biochrom) geschichtet und bei Raumtemperatur 20 min bei 200xg ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen der Interphase gewonnen, gewaschen, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in eine Petrischale (ø 9cm) (2×10^7 Zellen/Petrischale, RPMI-Medium) ausgesät. Anschließend wurden 100 µl CSF-1 zellkulturüberstand pro Petrischale dazugegeben. Die Zellen wurden dann bei 40 °C für sieben Tage kultiviert. Im Anschluss erfolgte eine Stimulation mit 100 ng/ml Lipopolysaccharid für verschiedene Zeiträume (1h, 4h, 8h, 24h, 48h).

RNA-Präparation, c-DNA-Synthese und PCR

Die RNA wurde mit Hilfe des Qiazolkit mRNeasy (Qiagen) isoliert. Anschließend erfolgte die cDNA Synthese nach herstellervorschrift (Thermo Scientific). Die PCR wurde für das Housekeeping-Gen GAPDH 5'-CACGGACACTTCAAGGGCACTG; 5'-CTCCACAATGCCAAAGTTGTC und den TNF-Rezeptor 1 5'-AACACCACCATCTGTTCTC; 5' GCATACTCTGCTGCTGTTTC durchgeführt. Die entsprechenden Proben wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

GAPDH:

360 bp -

TNFRI:

512 bp -

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
1h LPS 1h NS 4h LPS 4h NS 8h LPS 8h NS 24h LPS 24h NS 48h LPS 48h NS

Abbildung 2: PCR der Knochenmarksmakrophagen. Die Knochenmarksmakrophagen wurden über unterschiedliche Zeiträume mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert und als Negativkontrolle (NS) nicht stimuliert.

Ergebnisse und Diskussion

Der Zellkulturüberstand der transfizierten Zellen zeigt eine hohe und proportional zur abnehmenden Konzentration des Beschichtungsantikörpers, der das V5-getaggte CSF-1 spezifisch bindet, sinkende optische Dichte (OD) des Reaktionsproduktes. Der Überstand der nicht transfizierten Zellen hingegen ist gleichbleibend negativ. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die transient transfizierten HEK293T-Zellen CSF-1 exprimieren und als lösliches Protein in den Überstand abgeben.

Das rekombinante CSF-1 ist biologisch aktiv, da es zur Differenzierung von Knochenmarksvorläuferzellen zu Makrophagen genutzt werden konnte. Es ist damit möglich, Makrophagenzellkulturen für funktionelle Studien zu gewinnen. Eine erste solche Untersuchung konnte im Rahmen dieses Projekts durchgeführt werden. Hier konnte gezeigt werden, dass die gewonnenen Zellen den TNF-Rezeptor 1 exprimieren und somit für zukünftige Untersuchungen zur Biologie des Tumor-Nekrosefaktors beim Huhn genutzt werden können.

Etablierung eines Modells zur ex-vivo Perfusion von Hengsthoden

Klement Albrecht

Klinik für Pferde – Innere Medizin und Reproduktion
Betreuer: Prof. Dr. Lutz Göhring, Dr. Christiane Otdorff

Projektziel

Ziel des Projektes ist die Erstellung eines Perfusionsmodells für Hengsthoden. Mit Hilfe dieses Modells sollen die Auswirkungen verschiedener Noxen (z.B. Infektionen, Wirkung von Medikamenten) auf die Hodenfunktion untersucht werden. Ein solches Modell könnte wichtige Hinweise für die Entstehung einer Infertilität beim Hengst liefern.

Hintergrund

Die Perfusion von isolierten Organen (z.B. Leber, Niere, Lunge) von verschiedenen Tierarten ist eine in der medizinischen Grundlagenforschung etablierte Methode. Der Vorteil der ex-vivo Organperfusion besteht darin, vollständige Organe isoliert betrachten zu können. Die Ausweitung der Nutzung solcher Organmodelle kann langfristig dazu beitragen, die Anzahl an notwendigen Tierversuchen zu reduzieren. Dies wäre insbesondere in der Erforschung der Infektion mit equiden Herpesvirus-1 (EHV-1) von Vorteil, da für diese Untersuchungen bisher weiterhin Infektionsexperimente notwendig sind. Solche Experimente haben bereits Hinweise geliefert, dass es während einer EHV-1-Infektion zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Hodenfunktion kommt. Da auch andere immunprivilegierte Organe (z.B. ZNS, Uterus) als Zielorgane im Fokus der Infektion stehen, stellt der Hoden hier ein sehr interessantes Organmodell dar, welches zudem durch elektive Kastration leicht und tierschonend zugänglich ist. Die ex vivo Perfusion von Hengsthoden ist bisher nicht beschrieben und die Parameter hierfür müssen daher noch untersucht und etabliert werden.

Material und Methode

Als Probenmaterial dienen Hengsthoden, welche bei routinemäßigen Kastrationen in Kliniken anfallen.

Vorbereitung

Unmittelbar nach Entnahme des Hodens wird die A. spermatica mit einer Metallkanüle kanalisiert und mit heparinisierter Lösung (150 IU Heparin in phosphatgepufferter Salzlösung) gespült (Abbildung 1), um das Gefäßsystem des Hodens von Blut zu befreien. Anschließend erfolgt der Transport des Hodens ins Labor unter Kühlung, um ischämische Prozesse zu vermindern.

Über die A. spermatica wird der Hoden an das Perfusionssystem angeschlossen.



Abbildung 1: Spülung eines Hodens mit heparinisierter Lösung
Bild: Klinik für Pferde - Innere Medizin und Reproduktion, LMU

Prinzip der Perfusionskammer

- Es wurde ein offenes System gewählt. Die Perfusionslösung aus dem Reservoir (1) wird einmalig verwendet.
- Angetrieben wird der Durchfluss mit Hilfe einer Zentrifugalpumpe (2). Diese wird über den Widerstand im Organ in ihrer Drehzahl gesteuert. Die Regulierung erfolgt über eine Messeinrichtung (3) zur Erfassung des Perfusionsdrucks (eingestellt auf 60 mmHg) und einem separaten Steuerungsmodul (4).
- Mittels eines Dialysators (5) wird die Perfusionslösung mit einer Carbogen-Gasmischung (95 % O₂ und 5 % CO₂) oxygeniert.
- Ein Wärmetauscher (6) erwärmt die Perfusionslösung auf 33 °C vor Eintritt in die Kammer.
- Zusätzlich wird die Perfusionskammer (7) auf 33 °C temperiert.
- Verbrauchte venös austretende Perfusionslösung sammelt sich in einem Auffangbehälter.
- Als Perfusionslösung dient modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (enthält Elektrolyte, Glucose, Na-Pyruvat sowie bovines Serumalbumin).

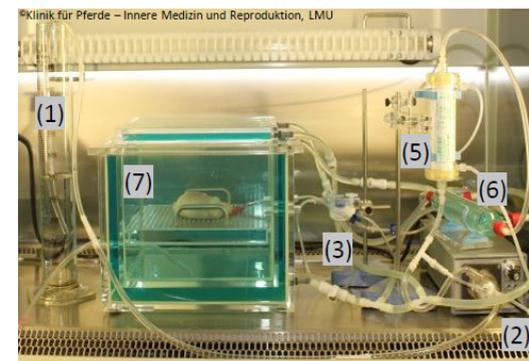


Abbildung 2a: Perfusionskammer und Leitungssystem
Bild: Klinik für Pferde - Innere Medizin und Reproduktion, LMU

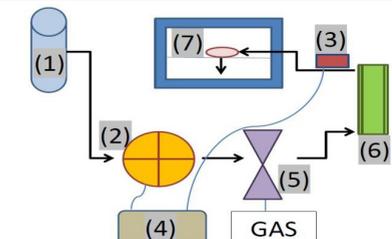


Abbildung 2b: Schema des Versuchsaufbaus

Monitoring

Um zu überprüfen, ob eine vollständige Perfusion über das gesamte Gefäßsystem des Organs stattfindet, wurden zwei Techniken getestet: Einerseits der Einsatz einer Patentblau-Farbstofflösung (Abbildung 3) sowie die Durchführung von Computertomographie-Aufnahmen mit Kontrastmittel (Abbildung 4).

Auch können während der Perfusion Biopsien aus dem Organ für eine histologische Untersuchung entnommen werden.

Durch eine regelmäßige Gewichtskontrolle der Hoden wird die Erfassung einer möglichen Ödembildung während der Perfusion gewährleistet.



Abbildung 3: Mit Farbstofflösung perfundierter Hoden
Bild: Klinik für Pferde - Innere Medizin und Reproduktion, LMU

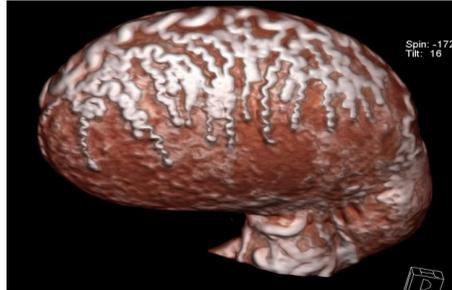


Abbildung 4: CT-Angiografie
Bild: Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik, LMU

Vorläufige Ergebnisse

Bisher haben sich die Arbeiten auf folgende Punkte konzentriert:

- Standardisierung der Spülung der Hoden direkt post-OP
- Ermittlung des notwendigen Perfusionsdrucks und der Durchflussrate
- störungsfreies An- und Abfluten des Schlauchsystems
- Testung verschiedener Monitoring-Techniken

Fazit

Eine Perfusion von Hengsthodens ist unter physikalischen Gesichtspunkten mit der vorliegenden Perfusionskammer möglich. Weiterführende Untersuchungen im Hinblick auf eine längere Perfusionsdauer sowie die Untersuchung verschiedener Parameter (pH-Wert, Laktat, Glucose) zur Beurteilung der Organvitalität stehen noch aus.

Persönliche Erfahrung

Die Arbeit an meinem VETResearch-Projekt hat mir große Freude bereitet. Es ermöglichte mir einen äußerst interessanten und abwechslungsreichen Einblick in die Abläufe einer wissenschaftlichen Einrichtung. Unter engagierter Betreuung durfte ich viele Tätigkeiten selbstständig durchführen und eigene Vorschläge in das Projekt mit einbringen. Durch die Tatsache, dass jeder Perfusion eine Kastration voranstand, hatte ich zudem die Gelegenheit bei den entsprechenden Operationen dabei zu sein.

Ein herzlicher Dank gilt an dieser Stelle allen Beteiligten an der Klinik für Pferde, den zuständigen Tierärzten bei den Kastrationen sowie den Verantwortlichen des VETResearch-Programms.

Rekonstruktion von simulierten digitalen Röntgenaufnahmen aus CT-Datensätzen. Ein Vergleich der radiologischen Beurteilung zwischen echten und simulierten digitalen Röntgenaufnahmen.

Rosalie Fabian, Göta Wittkugel

Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik
Betreuer: Dr. Andreas Brühshwein, Julius Klever

Einleitung

Die bildgebende Diagnostik in der Kleintiermedizin beginnt oft mit der Röntgenuntersuchung, die bei Bedarf in unklaren Fällen um eine computertomographische Untersuchung (CT) ergänzt werden kann. Die Röntgendiagnostik hat in der Kleintierpraxis eine hohe Verfügbarkeit, kann meist am wachen Patienten durchgeführt werden und ist relativ preisgünstig. Die Computertomographie steht oft nur in größeren Kliniken zur Verfügung, kann in der Regel nur in Allgemeinanästhesie oder tiefer Sedation durchgeführt werden und ist deutlich kostenintensiver. Bei radiologischen Kontrolluntersuchungen wird der Verlauf einer Erkrankung beurteilt. Dabei werden die aktuellen Bilder mit den Voraufnahmen verglichen. Manchmal müssen Röntgen- und CT-Bilder zu diesem Zweck verglichen werden, was zu Schwierigkeiten führen kann. Die Darstellung der Strukturen in beiden bildgebenden Verfahren ist sehr unterschiedlich und somit ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Mittels spezieller Software können aus CT-Datensätzen digitale Röntgenaufnahmen simuliert werden [1]. Ziel unserer Untersuchung war es, herauszufinden, ob und wie ohne zusätzliche Software an einem CT-Tomographen Röntgenbilder aus CT-Datensätzen simuliert werden können. Weiterhin sollte ein Vergleich der Beurteilung zwischen echten und simulierten digitalen Röntgenaufnahmen im Hinblick auf eine praxisrelevante radiologische Fragestellung durchgeführt werden.

Material und Methoden

Recherche und Einschlusskriterien

Im digitalen Röntgenarchiv (PACS = Picture Archiving and Communication System) der Chirurgischen Kleintierklinik wurde in einem ersten Durchgang retrospektiv nach Patienten gesucht, bei welchen von der gleichen Untersuchungsregion in einem sehr engen Zeitfenster parallel sowohl eine CT-Untersuchung als auch eine Röntgenuntersuchung durchgeführt wurden. Ellbogengelenke stellten dabei die einzig homogene Gruppe von untersuchten Patienten dar, die die Einschlusskriterien erfüllten. In einem zweiten Durchgang wurden im PACS mit den Filtern Modalität „CT“ und der Volltextsuche „Ellbogen“ im Zeitraum vom 01.01.2015 bis zum 20.06.2017 nach geeigneten Studien gesucht. Die Kriterien für eine Aufnahme in die Studie waren bei den CTs ein hochfrequenter 70er Rückfaltungskern (Bone-Kernel), eine Schichtdicke von 0,6mm, ein Inkrement (Rekonstruktionsintervall) von 0,6mm sowie ein kleines Field-Of-View (FOV, Bildfeld) mit jeweils nur einem einzelnen Ellbogen. Die Röntgenaufnahmen waren alle ohne Raster und ausschließlich in der Chirurgischen Kleintierklinik mit dem Gerät Siemens Axiom Luminos dRF aufgenommen. Zwischen

Röntgen und CT durften nicht mehr als vier Wochen und keine OP liegen. Es wurden sowohl gesunde als auch kranke Hunde aus verschiedenen Altersklassen und Rassen in die Studie aufgenommen.

Bildrekonstruktion

Die CT-Bilder wurden vom PACS zurück zum Computertomographen (Siemens SOMATOM Definition AS) geschickt. Auf der 3D-Konsole des CTs wurden aus den dünnenschichtigen CT-Transversalschnitten dickschichtige multiplanare Rekonstruktionen (MPR) erstellt. Die Schichtdicke wurde so gewählt, dass der gesamte Ellbogen in einer Schicht abgebildet war und so ein digitales Röntgenbild simuliert wurde. Von jedem Ellbogen wurde so eine kranio-kaudale und medio-laterale Darstellung erzeugt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Lagerung des jeweiligen Ellbogens im rekonstruierten Bild mit der zu vergleichenden Röntgenaufnahme möglichst identisch ist. Um Anwendungen wie Anpassungen des Kontrastes und Messung von Strukturen vornehmen zu können, wurden die aus CT-Daten mittels MPR simulierten Röntgenbilder als neue DICOM-Bilder abgespeichert und zurück ins PACS geschickt.

Auswertung der Röntgenbilder

Röntgenaufnahmen und simulierte Röntgenaufnahmen wurden zu einem späteren Zeitpunkt im PACS unabhängig voneinander zu verschiedenen Zeitpunkten und verblindet einer radiologischen Beurteilung unterzogen. Als ungeübte Auswerter von Röntgenaufnahmen wurden die Projektstudenten initial durch einen erfahrenen Radiologen in die Beurteilung von Ellbogenaufnahmen eingeführt. Dabei wurden an einer kleinen Fallserie die relevanten anatomischen Punkte und deren Bewertung demonstriert und erklärt. Danach wurden zuerst die Röntgenbilder, dann die rekonstruierten Bilder in einer Agreement-Sitzung der zwei (unerfahrenen) Projektstudenten bewertet. Diese Beurteilung wurde nach einigen Wochen wiederholt, um die Intraobservervariabilität berechnen zu können. Abschließend wurden alle Bilder von einem erfahrenen Radiologen beurteilt.

Zusätzlich zu einer globalen subjektiven Einschätzung der Bildqualität wurde für die Auswertung der Röntgenaufnahmen ein eigenes Beurteilungssystem (Punkte-Score, siehe Anhang) erstellt, das zum Teil auf den Empfehlungen der International Elbow Working Group (IEWG) und zum Teil auf einem ED-Punktesystem nach Johann Lang beruht (welches wiederum dem HD-Punktesystem nach Flückiger ähnlich ist), die normalerweise zur Einstufung von Ellbogen in ED-Grade verwendet werden. In unserem Beurteilungsschema wurden einige Beurteilungspunkte ergänzt oder, wie z.B. der Processus coronoideus, in Dichte und Kontur unterteilt. Am Ende wurden bei jedem Ellbogen 17 Kriterien bewertet, worin die Grade 0 = unverändert, 1 = fraglich, 2 = geringgradig, 3 = mittelgradig und 4 = hochgradig vergeben werden konnten (siehe Anhang).

Statistische Analyse

Die Daten wurden mit dem Programm MedCalc ausgewertet. Folgende Werte wurden hierfür berechnet.

- Variationskoeffizient (VK)** aus den Summenscores der einzelnen Ellbogen. Der Summenscore ist die Summe aller Scores, die einem Ellbogen für jedes Kriterium gegeben wurde. Je kleiner der Variationskoeffizient, desto höher ist die Übereinstimmung zwischen den Werten.
- Bias:** zwischen und mit den Summenscores: die so genannte Verzerrung gibt an, ob und wenn ja wie sehr etwas systematisch schlechter oder besser bewertet wurde.
- Intraobservervariabilität** der unerfahrenen Projektstudenten: ein Maß dafür, wie sehr sich ein und derselbe Bewerter von einem zum nächsten Scoring treu geblieben ist.
- Cohen's Kappa (κ):** Die Übereinstimmung einzelner Beurteilungspunkte zwischen den Modalitäten sowie zwischen unterschiedlichen Bewertern (Interobservervariabilität) Landis und Koch (1977) schlagen folgende Bewertung von Kappa vor: $\kappa < 0$ = „schlecht Übereinstimmung“ (poor agreement), 0,21–0,40 = „ausreichende (fair) Übereinstimmung“, 0,41–0,60 = „mittelmäßige (moderate) Übereinstimmung“, 0,61–0,80 = „beachtliche (substantial) Übereinstimmung“, 0,81–1,00 = „(fast) vollkommene ((almost) perfect) Übereinstimmung“.

Ergebnisse

Bildrekonstruktion und subjektive Bildqualität

Nach nur kurzer Einarbeitung konnten direkt am Computertomographen mit der MPR-Funktion aus allen CT-Datensätzen brauchbare simulierte Röntgenaufnahmen erstellt werden, die den normalen Röntgenaufnahmen hinsichtlich der „Lagerungs“- bzw. Projektionsqualität subjektiv sehr ähnlich waren. Hinsichtlich der Bildgüte zeigten die simulierten Röntgenaufnahmen eine leichte Unschärfe bzw. den subjektiven Eindruck einer leicht reduzierten Ortsauflösung im Vergleich zu den wahren Röntgenaufnahmen (Abbildung 1).



Abbildung 1: Links das simulierte Röntgenbild (Dickschicht-MPR aus CT-Datensatz) und rechts das korrespondierende echte Röntgenbild desselben Ellbogens (ID 28488, Ellbogen rechts).

Auswertung der Röntgenbilder

Insgesamt wurden 34 Ellbogengelenke rekonstruiert und ausgewertet. Auflagerungen bzw. Osteophyten und ggf. Inkongruenzen konnten gemessen und in die entsprechenden Grade eingeteilt werden. Einige Punkte waren vorwiegend in den rekonstruierten Bildern nicht eindeutig messbar und wurden dann subjektiv geschätzt. Wenn etwas nicht deutlich zu erkennen war, wurde automatisch der Grad 0 vergeben. Die Crista supracondylaris lateralis war auf der Mehrzahl der mediolateralen Aufnahmen schwer zu erkennen, weshalb bei jedem Bild, auf dem die Kontur nicht vollständig zu verfolgen war, der Score 1 vergeben wurde. Ähnlich verhielt es sich bei der radio- und humeroulnären Kongruenz, die oftmals nicht genau nachvollziehbar war. Hier wurde jedoch bei einer nicht eindeutigen Inkongruenz oder Stufe der Score 0 vergeben, um in der Statistik nicht den Eindruck zu erwecken, man würde eine Inkongruenz erkennen, obwohl keine vorhanden war.

Statistische Analyse

Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Die K-Werte zwischen Röntgen (DX) und Rekonstruktion (CT) lagen zwischen 0,39 (ausreichende Übereinstimmung) und 0,78 (beachtliche Übereinstimmung), überwiegend jedoch im Bereich mittelmäßiger Übereinstimmung. Die VKs zwischen Röntgen (DX) und Rekonstruktion (CT) waren alle relativ groß. Der VK zwischen den Scorings der Unerfahrenen liegt bei 44,1% (DX1-DX2) bzw. 27,3% (CT1-CT2) (=Intraobservervariabilität), während die Werte des VK zwischen den unterschiedlichen Modalitäten sogar teilweise niedriger und somit besser waren. Die Bewertung der einzelnen Punkte variierte stark, wie man dem Wert der Bias entnehmen kann. Die Bewertung der Ellbogen durch den Radiologen fiel wesentlich strenger aus als durch die Projektstudenten (siehe negative Werte in der Spalte „Bias“). Die Bewertung der Ellbogen in der Modalität DX im Vergleich zum CT fiel bei dem Experten ebenfalls schlechter aus.

Tabelle 1: Ergebnisse der Auswertungen

Untersuchung	Aussage	VK SS	Bias	K Proc. anconaeus	K Proc. coronoideus	K Epicondylus
DX1 – CT1	Methode	39	4,6	0,59	0,51	0,67
DX2 – CT2	Methode	43,9	10,5	0,58	0,39	0,78
DX3 – CT3	Methode	35,9	8,1	0,47	0,55	0,62
DX1 – DX2	INTRA	44,1	-1,8	0,75	0,59	0,68
DX1 – DX3	INTER	88,1	-88,2	0,45	0,46	0,52
DX2 – DX3	INTER	95,1	-99,2	0,47	0,54	0,65
CT1 – CT2	INTRA	27,3	8,4	0,64	0,54	0,78
CT1 – CT3	INTER	57,3	-79	0,64	0,6	0,51
CT2 – CT3	INTER	70,3	-106,2	0,63	0,5	0,54

Diskussion

Die mittelmäßige (moderate) Übereinstimmung beim Vergleich zweier Methoden, nämlich zwischen Röntgenaufnahmen und simulierten Röntgenaufnahmen, liegt im ähnlichen Bereich, wie die Übereinstimmung der Ergebnisse innerhalb einer Methode und ist somit ein durchaus akzeptables Ergebnis. Die strengere Bewertung der Ellbogen in der Modalität DX im Vergleich zum CT ist darauf zurückzuführen, dass man auf den Rekonstruktionen nicht alle Auflagerungen erkennen konnte und der Ellbogen automatisch besser bewertet wurde.

Die großen VAs zwischen Röntgen und CT-Rekonstruktion sind zum einen dadurch zu erklären, dass bei 17 zu beurteilenden Punkten mit jeweils fünf verschiedenen möglichen Scores die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Bewerter genau denselben Summenscore (SS) vergeben, relativ gering ist. Darüber hinaus sind die Werte im Vergleich zu betrachten: Der VK zwischen den Scorings der Unerfahrenen liegt bei 44,1 % (DX1-DX2) bzw. 27,3 % (CT1-CT2) (=Intraobservervariability), während die Werte des VK zwischen den unterschiedlichen Modalitäten sogar teilweise niedriger und somit besser sind. Bei der Beurteilung der Übereinstimmung zwischen Röntgen und Rekonstruktion muss man in Relation dazu auch die „Intraobservervariability“ innerhalb eines Verfahrens beachten. Die Bewertung der einzelnen Punkte variierte stark, wie man dem Wert der Bias entnehmen kann.

Bei dieser Studie wurde die aus CT-Daten simulierte Projektion möglichst genau der Projektion des Röntgenbildes angepasst, um projektionsbedingte Unterschiede in der Beurteilung zwischen beiden Verfahren zu minimieren. Lagerungsfehler wie sie beim Röntgen vorkommen, können also beim Rekonstruieren von Bildern aus CT-Aufnahmen ausgeglichen werden, da man sich hier den Ellbogen „am Bildschirm“ optimal drehen kann. Das Ausmaß der projektionsbedingten Unterschiede in der Beurteilung von Ellbogengelenken könnte in weiteren Studien untersucht werden, in denen die simulierten Röntgenbilder in unterschiedlichen Projektionen rekonstruiert werden. Leider können der Beugewinkel des Ellbogens und die Rotation von Radius, Ulna und Humerus gegeneinander nachträglich nicht mehr virtuell verändert werden, somit kann dieser Einfluss auf die Beurteilung nicht weiter evaluiert werden. Für weitere Vergleiche mit dem Röntgen könnten neben der MPR auch dreidimensionale rekonstruierte CT-Bilder (volume rendering (VR)) oder maximale Intensitätsprojektionen (MIP) genutzt werden. Darüber hinaus könnte man diese dreidimensionalen Aufnahmen für Lehrzwecke nutzen, da sich hier sehr gut die Auswirkung der Lagerung auf die Sichtbarkeit der unterschiedlichen Knochenpunkte darstellt.

Schlussfolgerung

Auch ohne zusätzliche Software können Röntgenaufnahmen aus CT-Daten mittels Dick-schicht-MPR mit am Scanner routinemäßig verfügbarer CT-Technik simuliert werden, die durchaus gut beurteilt werden können. Schon beim ersten Hinsehen kann man zwar erkennen, dass die Rekonstruktionen viel weniger scharf sind als hochwertige Röntgenbilder und man somit Rekonstruktionen aus CT-Aufnahmen nicht als Ersatz für Röntgenaufnahmen ansehen sollte. Dennoch sprechen die Werte des VK dafür, dass die Bewertungen gar nicht so schlecht gegenüber dem originalen Röntgen ausfallen, vor allem nicht vor dem Hintergrund, dass die Bewertung eines Röntgenbildes stets sehr subjektiv und somit immer mit einer gewissen Fehlerquelle ausfällt. Auch wenn die statistisch geringeren Summenscores simulierter Röntgenbilder im Vergleich zu echten Röntgenaufnahmen eine geringere Sensitivität für ED-relevante Befunde erwarten lässt, scheint die Methode der simulierten Röntgenaufnahmen durchaus Potential zu haben.

Persönliches Fazit

Das Projekt hat uns beiden sehr viel Spaß gemacht. Wir konnten sehr selbstständig arbeiten, und haben gemerkt, wie wichtig eine detaillierte Planung im Vorfeld ist. Durch die Arbeit wurde das Interesse an der Forschung definitiv gesteigert und uns wurde ein neues Berufsfeld eröffnet. Speziell die Radiologie ist sehr spannend. Ein großer Dank geht an Herrn Dr. Reese für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung unserer Daten. Wir würden auf jeden Fall wieder ein Projekt dieser Art mitmachen und sind VETResearch und unserem wunderbarem Team der Radiologie sehr dankbar für die Erfahrung!

Literatur

[1] Mendoza P, d'Anjou MA, Carmel EN, Fournier E, Mai W, Alexander K, Winter MD, Zwingenberger AL, Thrall DE, Theoret C. Validation of a novel technique for creating simulated radiographs using computed tomography datasets. *Vet Radiol Ultrasound*. 2014 May-Jun;55(3):251-62. doi: 0.1111/vru.12117. Epub 2013 Nov 13. PubMed PMID: 24219133.

Anhang

Tabelle 2: Beurteilungsschema der Röntgenaufnahmen (Punkte-Score)

	Proj	Anatomie	Lokalisation	NORMAL - 0	FRAGLICH - 1	2	3	4
a1	ml	Processus anconaeus	Ossifikation (IPA)	normal & vollständig ossifiziert	fragliche Aufhellungen im Fugenbereich durch residuelle Knorpelinseln	Aufhellungen im Fugenbereich durch residuelle Knorpelinseln	isoliert mit offener knorpeliger Wachstumsfuge	isoliert & disloziert
a2	ml	Anconaeusdach	kranioproximo(laterale) Kontur des Proc. anconaeus	scharf, glatt, keine Zubildungen, keine Doppelkontur, keine Rauigkeiten, keine Deformation/Abrundung	Konturunschärfe, minimale Rauigkeit, fragliche Zubildung/Auflagerung	Auflagerungen/Osteophyten <2mm	Auflagerungen/Osteophyten 2mm bis <5mm	Auflagerungen/Osteophyten >5mm
b	ml	Radiuskopf	kranioproximale (mediale) Radius-kopfkontur und -form (ml)	normal, glatt, scharf, normale Form	Konturunschärfe, minimale Rauigkeit, fragliche Zubildung/Auflagerung	Auflagerungen/Osteophyten <2mm	Auflagerungen/Osteophyten 2mm bis <5mm	Auflagerungen/Osteophyten >5mm
c.1	ml		Processus coronoideus medialis ulnae (PCM) bzw. Coronoidspitze: kranioproximale Kontur	scharf konturiert	minimal unscharf	unscharf	deutlich unscharf	Kontur nicht sichtbar, Defekt (STC) oder Fragment
c.2	ml		Processus coronoideus medialis ulnae (PCM) bzw. Coronoidspitze: kranioproximal: Dichte	gleichmäßig hyperdens	minimal hypodens	hypodens	deutlich hypodens	hgrd hypodens
d	ml	Crista supra-condylaris lateralis	kaudale Kontur	scharf, glatt, keine Zubildungen, keine Doppelkontur, keine Rauigkeiten, keine Wülste	Konturunschärfe, minimale Rauigkeit, fragliche Zubildung/Auflagerung	Auflagerungen/Osteophyten <2mm	Auflagerungen/Osteophyten 2mm bis <5mm	Auflagerungen/Osteophyten >5mm
e1	ml		Subtrochleare Region, Coronoidbasis Größe	normal, keine Sklerose	fraglich, akzentuierte Trabekelzeichnung	ggrd Sklerose	mgrd Sklerose	hgrd Sklerose
e2	ml		Subtrochleare Region, Coronoid-basis Dichte	normal, keine Sklerose	fraglich, akzentuierte Trabekelzeichnung	ggrd Sklerose	mgrd Sklerose	hgrd Sklerose
f	ml		Trochlea humeri subchondraler Knochen Gelenkfläche	normal: konvex, nicht abgeflacht, glatt, scharf, keine Aufhellungen, Osteolysen oder Defekte, keine Sklerosen	leichte subchondrale Sklerose	leichte Abflachung und Sklerose	leichte Abflachung und V.a. Knochendefekt	subchondraler Knochendefekt, Osteolyse, deutliche Abflachung
g	ml/cc	Gelenkspalten	radioulnäre Kongruenz (Stufe) Gelenkspalt	Keine Stufe	fragliche/minimale Stufe	Stufe <2mm	2-5 mm Stufe	Stufe >5mm
h	ml/cc	Gelenkspalten	humero-ulnare Kongruenz	Gelenkspalt gleichmäßig breit	fragliche/minimale Inkongruenz	ggrd Inkongr.	mgrd Inkongr.	hgrd Inkongr.
i	cc		Epicondylus medialis humeri	keine Zubildungen/Verkalkungen	Flexorenthesiopathie/Metaplasie	Fast knochendichte Verschattung/ Knochendicht <2mm	Knochendicht, 2-5mm	Knochendicht, >5mm
j	cc		mediale ulnare Gelenkkontur abaxial am Proc. coronoideus medialis	normal: glatt, scharf, keine Rauigkeiten, keine osteophytären Zubildungen	Konturunschärfe, minimale Rauigkeit, fragliche Zubildung/Auflagerung	Auflagerungen/Osteophyten <2mm	Auflagerungen/Osteophyten 2mm bis <5mm	Auflagerungen/Osteophyten >5mm
k	cc		mediale humerale epikondyläre (Gelenk-)Kontur	normal: glatt, scharf, keine Rauigkeiten, keine osteophytären Zubildungen	Konturunschärfe, minimale Rauigkeit, fragliche Zubildung/Auflagerung	Auflagerungen/Osteophyten <2mm	Auflagerungen/Osteophyten 2mm bis <5mm	Auflagerungen/Osteophyten >5mm
l	cc		Epikondylus lateralis humeri	normal: glatt, scharf, keine Rauigkeiten, keine osteophytären Zubildungen	Konturunschärfe, minimale Rauigkeit, fragliche Zubildung/Auflagerung	Auflagerungen/Osteophyten <2mm	Auflagerungen/Osteophyten 2mm bis <5mm	Auflagerungen/Osteophyten >5mm

m	cc	Condylus humeri	interkondyläre Fuge zwischen Trochlea und Capitulum humeri	<i>keine Aufhellungszonen oder -linien</i>	<i>fraglich/verdächtig</i>	<i>minimaler Spalt</i>	<i>schmäler durchgehender Spalt</i>	<i>breiter durchgehender Spalt</i>
Bemerkungen	ml/cc		Osteophyten an anderen Lokalisationen	<i>keine</i>	<i>Konturunschärfe, minimale Rauigkeit, fragliche Zubildung/Auflagerung</i>	<i>Auflagerungen/Osteophyten <2mm</i>	<i>Auflagerungen/Osteophyten 2mm bis <5mm</i>	<i>Auflagerungen/Osteophyten >5mm</i>
s	m/l, c/c	Supinatorsehnenbein		<i>keine</i>	<i>fraglich</i>	<i>deutlich sichtbar, < 2mm</i>	<i>deutlich sichtbar 2-5mm</i>	<i>deutlich sichtbar >5mm</i>

Auswertung der lagerungsbedingten Änderung des Norbergwinkels

Sarah Hauser, Anne-Sophie Hoffmann

Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik

Betreuer: Prof. Andrea Meyer-Lindenberg, Dr. Andreas Brüschwein, Julius Klever

Quellenangaben

Jerrold A. Bausman, DVM, and Kirk L. Wendelburg, DVM. Evaluation of the effect of pelvic tilt in the coronal plane on the Norberg angle measured in ventrodorsal radiographic views of a canine hip joint bone model, AJVR, Vol 71, No.11, November 2010; 1348-1353

Joao Martins; Bruno J. Colaco, Antonio J. Ferreira, Mario M. Ginja. Analysis of pelvic rotation on the standard hip ventrodorsal extended radiographic view; Vet Comp Orthop Traumatol 2016; 01: 68-74

Kerstin Amort et al. Röntgendiagnostik der Hüftgelenksdysplasie- Anfertigung der Röntgenaufnahmen, Befunde und Besonderheiten, Kleintiermedizin 2013; 05: 212-226

Geert E. C. Verhoeven et Al. Interobserver agreement on the assessability of standard ventrodorsal hip-extended radiographs and its effect on agreement in the diagnosis of canine hip dysplasia and on routine FCI scoring; Veterinary: Radiology & Ultrasound, Vol. 50, No. 3, 2009: 259-263

G. Verhoeven et Al. Interobserver agreement in the diagnosis of canine hip dysplasia using the standard ventrodorsal hip-extended radiographic method; Journal of small animal practice 2007; 48, 387-393

J.-P. Genevois et Al.; Canine hip dysplasia radiographic screening. Prevalence of rotation of the pelvis along its length axis in 7,012 conventional hip extended radiographs; Vet Comp Orthop Traumatol 2007; 04, 296-298



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

TIERÄRZTLICHE FAKULTÄT
ZENTRUM FÜR KLINISCHE TIERMEDIZIN
CHIRURGISCHE UND GYNÄKOLOGISCHE KLEINTIERKLINIK
VORSTAND: PROF.DR. ANDREA MEYER-LINDBERG



Auswertung der lagerungsbedingten Änderung des Norbergwinkels

Vergleich verschiedener Lagerungen des Beckens und der Femora und deren Einfluss auf die Befunderhebung bei der HD-Auswertung

A.-S. Hoffmann, S. Hauser, J. Klever, A. Brüschwein, S. Reese, A. Meyer-Lindenberg

Einführung

Um den Hüftdysplasie (HD)- Grad eines Hüftgelenks von adulten Hunden beurteilen zu können, werden in Deutschland offizielle Gutachten mittels FCI-Schema erstellt und die Hüftgelenke in Grade von A (kein Hinweis auf HD) bis E (schwere HD) eingeteilt. Diese Beurteilung beinhaltet als zentrales Kriterium die Winkelmessung nach Norberg sowie die Interpretation weiterer Parameter, wie die Kongruenz zwischen Femurkopf und Azetabulum. Dafür ist eine ventrodorsale Röntgenaufnahme vom Becken in Narkose (Position 1) (Abb.1) vorgeschrieben. Obwohl die Technik der Aufnahme genau beschrieben ist, werden immer wieder Bilder eingereicht, die verkippt sind (nach kranial/kaudal oder nach links/rechts) bzw. in denen die Femora zu weit nach innen oder außen rotiert sind (Abb.2).

Ziel der Untersuchung war es, herauszufinden, welchen Einfluss eine verkippte oder einer dorsoventralen Lagerung auf die Norbergwinkelmessung hat und wie subjektiv visuell erkannte verkippte Aufnahmen objektiv zu bewerten sind.



Material und Methoden

Von 10 Hunden zwischen 20 und 40 kg wurden HD-Aufnahmen in verschiedenen Lagerungen (Tab. 1) angefertigt. Der Patient wurde hierzu mithilfe von Sandsäcken in Rückenlage fixiert, und die Hinterbeine mittels Klebeband in korrekte Position gebracht. Für die verkippten Aufnahmen wurde die Röntgenröhre jeweils um die angegebene Gradzahl verkippt.

Bei jeder Aufnahme wurde von zwei Personen der linke und der rechte Norbergwinkel zwei mal anonymisiert gemessen, und eine subjektive Beurteilung der Verkippfung vorgenommen.

Die statistische Auswertung wurde in MedCalc (Version 17.9.7) durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mittels Methodenvergleich nach Bland-Altman bestimmt, als signifikant wurde ein Niveau von $p \leq 0,05$ angenommen.

Tabelle 1: angefertigte Röntgenaufnahmen

manuell	mit Lagerungshilfen		
	senkrechter Strahlengang	Strahlengang von kranioventral nach kaudodorsal	Strahlengang von kraniodorsal nach rechts dorsal
• Position 1 (Kontrolle)	• 0° (Kontrolle)	• 0° (Kontrolle)	• 0° (Kontrolle)
• Innenrotation der Femora	• 3°	• 3°	• 1°
• Außenrotation der Femora	• 5°	• 5°	• 2°
• Außenrotation der Femora mit Abduktion (45°)	• 10°	• 10°	• 3°
• dorsoventral	• 15°	• 15°	• 4°
	• 20°	• 20°	• 5°
			• 7°
			• 10°

Diskussion

Der Norbergwinkel wird durch eine Veränderung der Lagerung des Beckens und der Femora signifikant beeinflusst. Der Effekt ist besonders deutlich bei seitlich verkippten Aufnahmen. Da ab einer Verkippfung von 5° die Aufnahmen zu einer deutlichen Veränderung des Norbergwinkels ($\geq 2\%$) führen, sollten diese von der Auswertung ausgeschlossen werden. Dorsoventrale Aufnahmen führen zu einer deutlichen Verbesserung des wahren Norbergwinkels und sind somit ebenfalls ungeeignet. Zudem wird eine seitliche Verkippfung von über 5° vom Auswerter subjektiv visuell als unauswertbar wahrgenommen, was sich auch in den jeweiligen Messungen zeigt.

Schlussfolgerung

Die Studie zeigt, dass verkippte Aufnahmen, die subjektiv visuell noch als auswertbar eingestuft werden, eine relativ geringe Auswirkung auf die Norbergwinkelmessung haben. Der gemessene Wert liegt nahe am wahren Wert und ist somit akzeptabel. Im Gegensatz hierzu stehen dorsoventrale Aufnahmen, durch die der wahre Norbergwinkel deutlich geschönt wird. Diese, sowie subjektiv visuell eindeutig verkippte Aufnahmen, sind für die Norbergwinkelmessung ungeeignet.

Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Aufnahme ab einem seitlichen Verkipfungsgrad von 2° subjektiv visuell als verkippt wahrgenommen wird. Eine Rotation der Hüfte nach links führt zu einer statistisch signifikanten Änderung des Norbergwinkels in der linken Hüfte ab 2° und der rechten Hüfte ab 3° (Abb.3).



Abb. 3: Änderung des Norbergwinkels in Bezug auf den Grad der Verkipfung

Das Einwärtsdrehen der Femora führt zu einer nicht signifikanten Vergrößerung des Norbergwinkels auf beiden Seiten (Abb.4).

Ein dorsoventraler Strahlengang führt zu einer statistischen Vergrößerung des Norbergwinkels um 5,8% im linken und 3,2% im rechten Hüftgelenk (Abb.4).

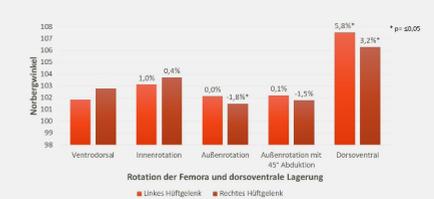


Abb. 4: Änderung des Norbergwinkels in Bezug auf verschiedene manuelle Lageveränderungen

Eine Rotation des Strahlengangs von kaudoventral nach kraniodorsal führt zu einer leichten ($\leq 1\%$) Vergrößerung des Norbergwinkels, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb.5). Eine Rotation des Strahlengangs von kranioventral nach kaudodorsal führt zu einer leichten ($\leq 2\%$) Verkleinerung des Norbergwinkels, wobei nur die rechte Seite statistisch signifikant ist (Abb.5).



Abb. 5: Änderung des Norbergwinkels in Bezug auf den Grad der Verkipfung

Nachweis des G-CSF-Rezeptors im Darm neugeborener Kälber

Anna Kneidl

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Betreuer: Dr. Frank Weber

Hintergrund

Der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) wird bei Entzündungen ausgeschüttet und stimuliert als Zytokin die Bildung von neutrophilen Granulozyten im Knochenmark. Unter seinem Einfluss verkürzt sich die Entwicklungszeit dieser wichtigen Immunzellen deutlich und auch ihre Effektivität wird durch die Wirkung von G-CSF positiv beeinflusst, beispielsweise durch die Erhöhung der Produktion bakterizider Granula in den neutrophilen Granulozyten, was ihre Wirkung am Entzündungsherd steigert. Somit hat dieser Faktor und damit auch sein Rezeptor eine große Bedeutung für die angeborene Immunantwort und die Infektionsresistenz eines Tieres. Zu diesem Zweck kann er inzwischen auch in der Rindermedizin therapeutisch genutzt werden, bislang jedoch ausschließlich zur peripartalen Mastitisprophylaxe bei Milchkühen.

Der G-CSF-Rezeptor wurde bereits in vielen unterschiedlichen Geweben nachgewiesen. Die Fragestellung des Projektes war nun, ob dieser Rezeptor auch im Darm neugeborener Kälber bereits vor der ersten Kolostrumaufnahme vorhanden ist.

Material und Methoden

Für die Untersuchungen standen Proben aus der Darmschleimhaut von drei verschiedenen Kälbern zur Verfügung. Davon wurde ein Tier bereits tot aus dem Mutterleib entwickelt, wobei der Zeitpunkt des Absterbens der Frucht unbekannt ist, ein weiteres kam lebend zur Welt, musste aber kurz nach der Geburt euthanasiert werden. Das dritte Kalb wurde ebenfalls aufgrund einer schwerwiegenden Erkrankung eingeschläfert, jedoch erst im Alter von 4,6 Wochen. Von allen drei Tieren wurden Proben aus der Wand von Labmagen, Caecum und Jejunum entnommen und untersucht.

Nach einer Homogenisierung der Proben wurde aus dem gewonnenen Material mithilfe von Kits total-RNA isoliert, die auf die mRNA-Sequenz des gesuchten G-CSF-Rezeptors untersucht werden sollte. Dies würde zwar noch keinen Beweis für ein tatsächliches Vorhandensein des Rezeptors darstellen, wohl aber ein starkes Indiz, da es eine Aktivität und Expression des entsprechenden Gens bedeuten würde.

Zunächst erfolgte jedoch eine Überprüfung der Integrität des gewonnenen RNA-Materials, da die Qualität der Darmschleimhautproben nicht durchgehend bekannt war, insbesondere bei den Proben, die von dem ante partum verstorbenen Kalb stammten. Der dafür verwendete Experion von Biorad untersucht eine kleine Menge des total-RNA-Isolats mittels Kapillarelektrophorese und Fluoreszenzmessung auf die Erhaltung zweier charakteristische Regionen der rRNA. Das Ergebnis wird graphisch dargestellt und außerdem zur Berechnung eines RNA quality indicators zwischen 1 (RNA stark degradiert) und 10 (RNA intakt) verwendet.

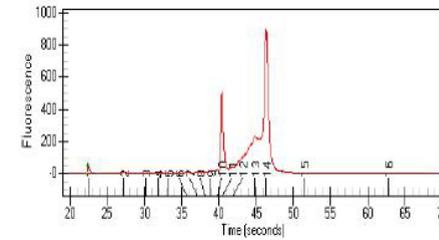


Abbildung 1: Eine Probe aus dem Labmagen des Kalbes, das kurz nach der Geburt euthanasiert wurde. Die beiden Peaks der Fluoreszenzmessung stellen die zur Bewertung herangezogenen Regionen der rRNA in einer intakten Form dar. Der berechnete RNA quality indicator beträgt 10, die isolierte RNA weist eine sehr gute Qualität

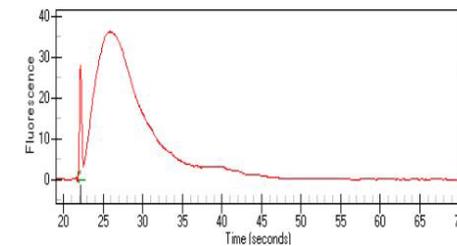


Abbildung 2: Eine Probe aus dem Labmagen des schon im Mutterleib verstorbenen Kalbes. Die RNA ist bereits stark degradiert und eignet sich nicht mehr für die geplanten Untersuchungen.

Nach wiederholt sehr guten Ergebnissen der RNA-Qualitätsmessung bei allen Proben der beiden euthanasierten Kälber wurde von beiden Tieren die isolierte RNA aus jeweils allen drei Lokalisationen für eine cDNA-Synthese eingesetzt und damit im Anschluss eine Real-Time PCR durchgeführt. Dafür wurden drei verschiedene Primerpaare verwendet, die für die bereits bekannte DNA-Sequenz des gesuchten G-CSF-Rezeptors kodieren und die von am Projekt beteiligten Mitarbeitern selbst designt wurden.

Ergebnisse, Diskussion und Ausblick

Von den drei eingesetzten Primerpaaren stellte sich eines als geeignet heraus, bei den anderen beiden bildeten sich jeweils Primerdimere. Das funktionierende Primerpaar konnte an einen Liganden in der Probe binden und die PCR ergab ein positives Ergebnis.

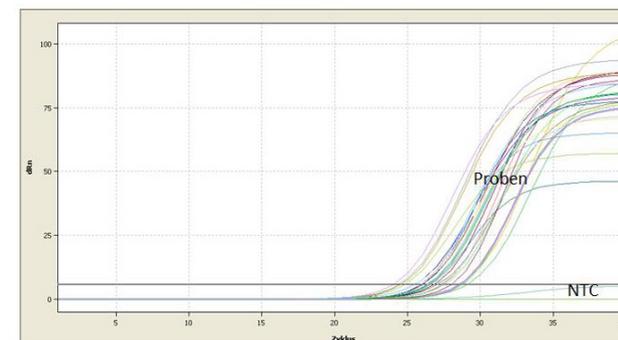


Abbildung 3: Ergebnis der Real-Time PCR

Am Ende meines dreiwöchigen Projektes konnte also folgendes Fazit ziehen:

1. Die Art des verwendeten Probenmaterials aus der Darmschleimhaut eignet sich gut zur Gewinnung von intakter RNA, sofern die Proben zeitnah nach dem Todes des Tieres entnommen werden.
2. Eines der drei designten Primerpaare funktioniert gut.
3. Im eingesetzten Material ist ein Ligand des Primers, es gibt ein PCR-Produkt.

Trotz dieser sehr erfreulichen Ergebnisse, muss zur endgültigen Bestätigung, dass es sich bei dem PCR-Produkt um die Sequenz des gesuchten G-CSF-Rezeptors handelt, eine Sequenzierung durchgeführt werden, zum einen da das eingesetzte Primerpaar auch für ein weiteres im bovinen Gastrointestinaltrakt vorkommendes Gen kodiert, zum anderen um Kreuzreaktivitäten bei der PCR sicher auszuschließen. Diese wurde nach Abschluss meines VETResearch-Projektes durchgeführt und ergab eine Übereinstimmung von über 99 % zwischen der Sequenz des PCR-Produktes und der Sequenz des bovinen G-CSF-Rezeptors. Aktuell werden weitere Proben gesammelt, um die Zahl der beprobten Tiere zu erhöhen, sowie ein Assay zur Untersuchung von Kolostrum auf das Vorhandensein des Liganden, also des bovinen G-CSF, geplant.

Persönliche Erfahrung

Mein VETResearch-Projekt war für mich nicht nur ein großer Gewinn hinsichtlich der Erweiterung meines tiermedizinischen Fachwissens und des Erlernens labordiagnostischer Methoden, sondern auch eine wunderbare Möglichkeit, die Arbeit in der Wissenschaft kennen zu lernen. Auch vor dem Hintergrund, dass ich mein Studium 2018 abschließen werde, bin ich sehr dankbar für die Chance, damit meinen Blick auf die möglichen Tätigkeitsfelder nach dem Studium erweitert zu haben und um die Entscheidungshilfen, die mir die Erfahrungen durch die Teilnahme bei meinen Überlegungen dafür geben. Ich bin mir nun sicher, eine Doktorarbeit anfertigen zu wollen und weiß dank des Projektes auch, dass mir die Arbeit in einem tiermedizinischem Labor gut gefällt. Deshalb kann ich die Teilnahme an VETResearch jedem Studenten empfehlen, der sich für Forschung und Labormethoden interessiert und sich vorstellen könnte, nach dem Studium in diesen Bereichen zum Beispiel im Rahmen einer Doktorarbeit tätig zu sein.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch herzlichst bei meinen Betreuern Dr. Frank Weber und Sandra Kirsch bedanken, die mich als damaliger „Laborneuling“ schnell für diese Arbeit begeistern konnten, mich hervorragend eingearbeitet und während des gesamten Projektes kompetent, engagiert und geduldig betreut haben. Auch den nach wie vor bestehenden Kontakt, der mittlerweile mehr als ein Jahr über die eigentliche Projektzeit hinausgeht und der es mir ermöglicht, den weiteren Verlauf der Untersuchungen zu diesem Thema noch mit zu verfolgen, schätze ich sehr.

Anpassung eines PMN basierten Zell-Migrationsassays für den Einsatz geringsvolumiger Proben

Elisabeth Pernpeintner

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Betreuer: Dr. Frank Weber

Ziel und Hintergrund des Projekts

Subklinische Endometritiden sorgen für große wirtschaftliche Schäden in der Milchviehhaltung und stellen deswegen ein wichtiges Thema der gegenwärtigen Forschung in der Rindermedizin dar. Die Diagnose subklinischer Endometritiden beim Rind soll nun ermöglicht werden, indem sein Uterussekret auf Stoffe untersucht wird, die Entzündungszellen chemotaktisch anlocken. So wandern isolierte periphere neutrophile polymorphkernige Granulozyten (=PMN) durch eine semipermeable Membran, wenn sie durch den chemotaktischen Reiz von IL-8 stimuliert werden.

Das System der Chemotaxis abhängigen Wanderung von PMN ist für die Boyden-Kammer (10-Well, 400 µl) bereits etabliert und seit Längerem im Laboreinsatz.

Da das zu beprobende Uterussekret nur in sehr begrenzten Mengen verfügbar ist, soll ein Downscaling des Migrationsassays erfolgen, wozu zwei weitere Kammer-Varianten mit geringerem Probenvolumen und größerer Probenanzahl (48-Well, 25 µl und 96-Well, 30 µl) mit der 10-Well Boyden-Kammer verglichen werden. Dabei ist zu prüfen, ob unter den neuen Gegebenheiten ausreichende und reproduzierbare Migrationsraten erzielt werden können.

Vorteile der 96-Well-Kammer bzw. der 48-Well-Kammer im Gegensatz zur 10-Well-Kammer sind somit bei gleicher Probenanzahl verringerte Probenvolumina, eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wegen der verringerten Zahl der Probenansätze und daher auch Arbeits- und Zeitersparnis.

Tabelle 1: Vergleich der drei verschiedenen Kammern mittels relevanter Parametern

	10-Well-Kammer	96-Well-Kammer	48-Well-Kammer
Anzahl der Wells	10	96	48
Volumen im oberen Well	200 µl	50 µl	50 µl
Volumen im unteren Well	400 µl	30 µl	25 µl
Durchmesser eines Wells	8,0 mm	4,8 mm	3,2 mm
Durchtrittsfläche	50 mm ²	18 mm ²	8 mm ²

Durchführung

Zuerst werden PMN aus frischem Rinderblut nach Standardprotokoll mittels Dichtegradientenzentrifugation und anschließender hypotoner Lyse isoliert. Zur Reinheitsbestimmung wird eine PMN-Messung im Durchflusszytometer durchgeführt.

Dann werden die unteren Wells der Migrationskammer mit standardisierter IL-8-Lösung (100 ng/ml) befüllt mit Silikonmatte und Membran bedeckt. In den oberen Wells wird eine definierte Anzahl an PMN in einem definierten Flüssigkeitsvolumen eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden wird die Flüssigkeit aus den oberen Wells abpipettiert und verworfen und die Zahl der durch die Membran (Porengröße: 3 µm, Porendichte: 20.000/mm²) gewanderten PMN mit dem Flowzytometer (Accuri C6) gemessen.

Ergebnisse

96-Well-Platte

Da die Anzahl der ins obere Well eingesetzten PMN das Wanderungsverhalten beeinflussen kann, wurden am 1. Testtag je vier identische Proben für 125.000, 250.000 und 500.000 Zellen sowohl als Positiv- und als Negativkontrolle angelegt. Dabei konnte man erkennen, dass mit 500.000 eingesetzten PMN auch bei den Negativkontrollen hohe Migrationsraten vorkamen, woraus man schließen kann, dass die eingesetzte Zellzahl zu hoch ist. Deswegen wurden an den folgenden Testtagen nur noch die Reihen mit 125.000 und 250.000 Zellen angelegt.

Tabelle 2: Errechnete Werte von Positiv- (PK) und Negativkontrollen (NK) in der 96-Well-Kammer

	125.000		250.000		500.000	
	PK	NK	PK	NK	PK	NK
Mittelwert x	1.243	59,63	3.857	6,5	5.242	207,5
Anzahl n	8	8	8	8	4	4
Standardabweichung	3.321	90,82	5.375	60,41	10.058	141,79
Variationskoeffizient CV (%)	267,19	152,32	139,36	98,22	191,89	68,34

Insgesamt lässt sich erkennen, dass sowohl bei Positiv- als auch bei Negativkontrolle extrem inhomogene Werte gemessen wurden, was man am Variationskoeffizient CV nachvollziehen kann, der sich beispielsweise bei den Positivkontrollen bei allen Versuchsreihen deutlich über 100 % befindet.

Kombiniert mit der schwierigen Handhabung der 96-Well-Platte, die auch nach mehreren Versuchstagen nicht zuverlässig funktionierte, wurde die Platte verworfen.

48-Well-Platte

Das bauliche System ist bei der 48-Well-Kammer das Gleiche wie bei der etablierten 10-Well-Kammer, wodurch die Handhabung keine Probleme bereitete. Die Durchtrittsfläche durch die semipermeable Membran beträgt jedoch nur 8 mm², was im Gegensatz zu den bisherigen Kammern sehr klein ist und wodurch man Schwierigkeiten bei der Zellwanderung erwarten hätte können, die sich jedoch nicht bestätigt haben.

Es wurden an 3 Testtagen Messungen durchgeführt und je 250.000 PMN ins obere Well eingesetzt, wobei je 24 Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt wurden.

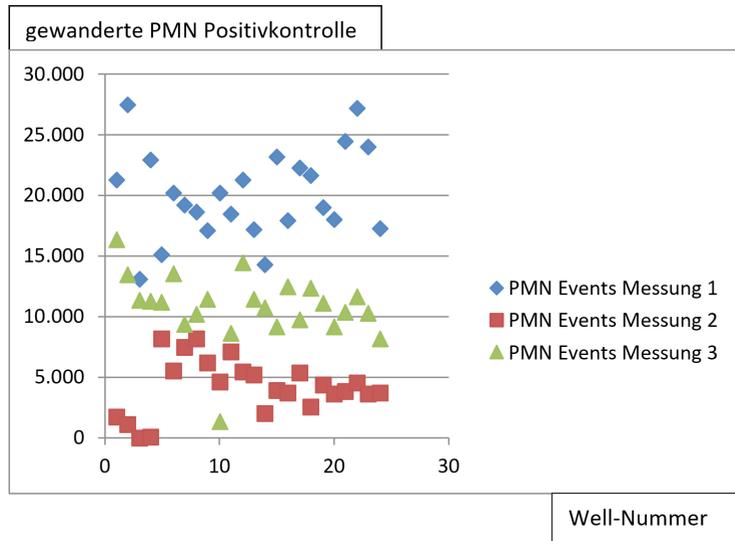


Abbildung 1: Darstellung der PMN Events der Positivkontrollen an drei Testtagen

Vor allem bei Messung 1 und 3 sieht man die zuverlässig hohen PMN Zahlen im unteren Well.

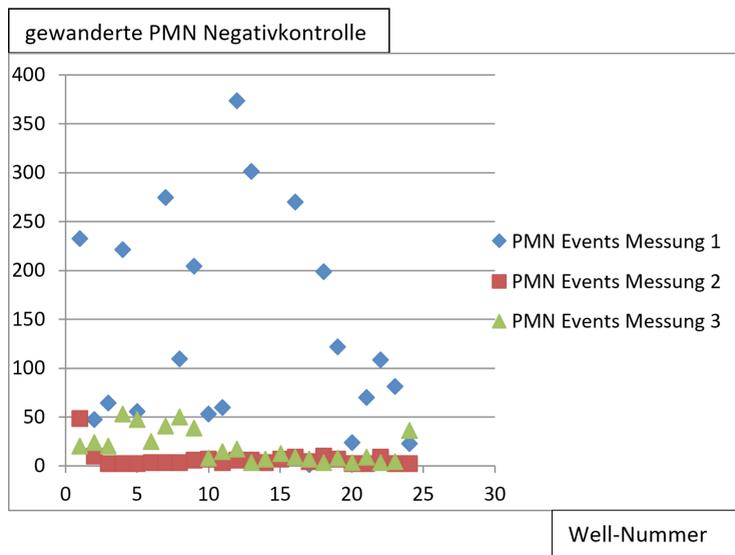


Abbildung 2: Darstellung der PMN Events der Negativkontrollen an drei Testtagen

Bei den Negativkontrollen sind die Werte unter Beachtung der y-Achsen-Skalierung sogar bei Messung 1 noch relativ und bei Messung 2 und 3 sehr homogen niedrig. Daraus ergibt sich wieder die Übersicht mit folgenden Parametern:

Tabelle 3: Errechnete Werte von Positiv (PK)- und Negativkontrollen (NK) in der 48-Well-Kammer

	Messung 1		Messung 2		Messung 3	
	PK	NK	PK	NK	PK	NK
Mittelwert x	20.048	138	4.947	6,7	11.208	19
Anzahl n	24	21	21	24	23	24
Standardabweichung	3708,8	107,4	1758	9,4	1945	16
Variationskoeffizient CV (%)	18,5	77,86	35,5	140	17,4	84

Während bei den Positivkontrollen der deutlich kleinere Variationskoeffizient für in sich homogene PMN Events spricht, ist bei den Negativkontrollen der CV nicht so aussagekräftig, da bei an sich schon kleinen Werten Schwankungen deutlicher auffallen.

Fazit und Ausblick

Mit der 96-Well-Platte konnten keine wiederholbaren und schlüssigen Ergebnisse erzielt werden und ihre Handhabung blieb schwierig, weswegen ihre Anwendung im Labor bei uns verworfen wurde.

Bei der 48-Well-Platte hingegen konnten reproduzierbare Werte gemessen werden, die gut zueinander passten. Deswegen wurde die 48-Well-Platte dann innerhalb einer Dissertationsarbeit weiter ausprobiert und auch schon für die Messung von IL-8 im Uterussekret angewandt.

Persönliche Erfahrung

Das bei mir 3-wöchige Projekt hat mir einen kurzen, aber intensiven Einblick in den Labo-ralltag verschafft. Es waren völlig neue Arbeitsweisen, Erfahrungen und Erkenntnisse und es hat mir sehr viel Spaß gemacht, meiner eigenen Projektarbeit nachzugehen und dadurch irgendwie Teil des Klinikalltags zu sein. Ich musste mit einigen Enttäuschungen und Rückschlägen umgehen, was mich aber dann noch näher mit meinem Projekt verbunden hat und wodurch man die Spontanität und den Mut zum Ausprobieren erlernt, den man beim Forschen braucht. Gleichzeitig erfährt man aber auch, wie wichtig es ist, exakt zu arbeiten, um die gewünschten Ergebnisse erzielen zu können und welche Folgen eine kleine Ungenauigkeit für die Messungen des gesamten Arbeitstages haben kann.

Bei alledem standen Herr Dr. Weber und Frau Kirsch immer mit Rat und Tat zur Seite und nahmen sich sowohl bei der Forschung als auch beim Zusammentragen der Ergebnisse immer Zeit für eine hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Dabei durfte ich selber kreativ sein, aber wurde auch zuverlässig an die Hand genommen, wenn ich nicht mehr weiter wusste. So hat mich das VETResearch-Projekt auf jeden Fall darin bestärkt, nach dem Studium eine Doktorarbeit zu schreiben.

Antimikrobielle Wirksamkeit von S100-Proteinen bei der Mastitis des Rindes

Simone Schabmeyer, Julia Schneider

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Betreuer: PD Dr. habil. Wolfram Petzl

Hintergrund unserer Forschungsarbeit

In der heutigen Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten ist der Einsatz von Antibiotika nicht nur das Mittel der Wahl, sondern in der effektiven Bekämpfung der Erreger auch das einzige. Wie auch bei der Behandlung der Mastitis des Rindes. Um dem Verbraucherschutz gerecht zu werden, dürfen allerdings keinerlei Antibiotikarückstände in tierischen Lebensmitteln, wie z.B. in der Milch oder in Milchprodukten nachweisbar sein. Für den Landwirt können durch die deshalb vorgeschriebene Wartezeit erhebliche Gewinneinbußen entstehen.

Das größte Problem ist jedoch die zunehmende Resistenzbildung gegenüber bekannten Antibiotika, die auf lange Sicht zu einer Behandlungsunfähigkeit bakterieller Erkrankungen führt. Die Forderung nach Alternativen für den routinemäßigen Antibiotikaeinsatz wird somit immer dringlicher.

Unsere Arbeit bestand deshalb darin, das antimikrobielle Potential des bovinen S100A9 Proteins und des humanen Heterodimers S100A8/9 auf häufige Mastitiserreger zu untersuchen.

Bisherige Forschungserkenntnisse

Die Milchdrüse erkennt über Toll-like-Rezeptoren PAMPs (Pathogen associated molecular patterns), wie z.B. Lipopolysaccharide, einen Hauptbestandteil von Gram negativen Bakterienzellwänden. Das Immunsystem reagiert darauf mit der Expression von DAMPs (Damage associated molecular patterns) in Form von löslichen Faktoren durch Epithelzellen der Milchdrüse und eingewanderte Zellen des angeborenen Immunsystems. Die von uns untersuchte Gruppe der S100 Proteine sind ein Teil dieser Faktoren. Sie werden durch myeloide Zellen exprimiert und wirken extrazellulär unter anderem antimikrobiell und als endogene Gefahrensignale, die eine angeborene Immunantwort auslösen/verstärken.

Bei Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass es bei einer Behandlung des Euters mit Lipopolysacchariden 24 Stunden vor der tatsächlichen/eigentlichen Infektion mit *Escherichia coli* zu einer 1000-fachen Expressionssteigerung der S100-Proteine kommt.

In unseren Versuchen untersuchten wir die antimikrobielle Wirksamkeit der S100-Proteine in vitro.

Darstellung Material & Methodik

Um das antibakterielle Potential der beiden Proteine zu untersuchen, wurde die Methode des TIME KILL ASSAYS gewählt. Es handelt sich dabei um ein Verfahren, das die antimikrobielle Wirksamkeit einer Lösung auf bestimmte Keime in Abhängigkeit der Zeit darstellt.

Unsere antimikrobielle Lösung stellten verschiedene Verdünnungsstufen der beiden S100 Proteine dar. Die zu untersuchten Keime sind 3 der häufigsten Mastitiserreger beim Rind: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* und *Escherichia coli*. Das Wachstum der verschiedenen Bakterienstämme wurde durch die Messung der Optischen Dichte in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Eine höhere optische Dichte bedeutete dabei eine höhere Keimkonzentration. Die Messung der Optischen Dichte derselben Lösung zu verschiedenen Zeitpunkten ermöglichte somit eine Aussage über das Wachstumsverhalten der Bakterien innerhalb dieses Zeitraums.

Der Zeitraum der Messung betrug insgesamt 6 Stunden, wobei die erste Messung bei Stunde 0 begann und in einem stündlichen Intervall erfolgte.

Für die Bestimmung der Optischen Dichte im Photometer wurde eine 96-Well-Platte verwendet, mit der jeweils ein Dreifachansatz einer Positivkontrolle, einer Negativkontrolle und einer Testlösung beprobt wurde. Außerdem wurde ein Blindwert bestehend aus Lysogeny-Broth Medium angelegt.

Positivkontrolle: Bakterium + Lysogeny-Broth Medium (LB)

Negativkontrolle: Bakterium + Lysogeny-Broth Medium + Antimycin/Penicillin/Streptomycin (APS)

Testlösung: Bakterium + verschiedene Verdünnungsstufen der S100 Proteine

Anhand der Positivkontrolle konnte der Wachstumsverlauf der Bakterien nachvollzogen werden und mit der Wachstumskurve der Testlösung (Bakterium versetzt mit S100 Protein) verglichen werden. Die Negativkontrolle diente der Bestätigung, dass das Bakterienwachstum durch gängige Antimykotika/Antibiotika hemmbar war.

Beispiellayout: *rbS100A9* mit *S. aureus* (*S.a*), Inhalt der Wells jeweils 300 µl

S. a pur	1 : 200 (LB + 5 ng/µl rb-S100A9) + S.a	1 : 100 (LB + 10 ng/ µl rb-S100A9) + S.a	1 : 75(LB + 13,3 ng/µl rb-S100A9) + S.a	1 : 50(LB + 20 ng/µl rb-S100A9) + S.a	APS + S.a + LB
S.a pur	1 : 200 (LB + 5 ng/µl rb-S100A9) + S.a	1 : 100 (LB + 10 ng/ µl rb-S100A9) + S.a	1 : 75(LB + 13,3 ng/ µl rb-S100A9) + S.a	1 : 50(LB + 20 ng/µl rb-S100A9) + S.a	APS + S.a + LB
S.a pur	1 : 200 (LB + 5 ng/µl rb-S100A9) + S.a	1 : 100 (LB + 10 ng/µl rb-S100A9) + S.a	1 : 75(LB + 13,3 ng/µl rb-S100A9) + S.a	1 : 50(LB + 20 ng/µl rb-S100A9) + S.a	APS + S.a + LB
	1 : 400 rb-S100A9 pur	1 : 300 rb-S100A9 pur	1 : 200 rb-S100A pur	1 :100 rb-S100A9 pur	LB pur

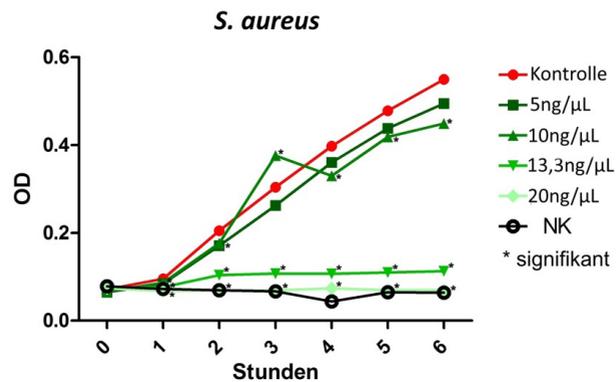
Überblick der Verdünnungsstufen der beiden S100 Proteine

rbS100A9		rhS100A8/A9
Ausgangskonzentration: 1000 ng/μl		Ausgangskonzentration: 200 ng/μl
1:200	5 ng/μl	
1:100	10 ng/μl	1:20
1:75	13,3 ng/μl	
1:50	20 ng/μl	1:10
	40 ng/μl	1:5

Mit dem Programm „R“ wurden die gemessenen Daten ausgewertet und errechnet, ob ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Bakterienwachstum der Kontrolle besteht.

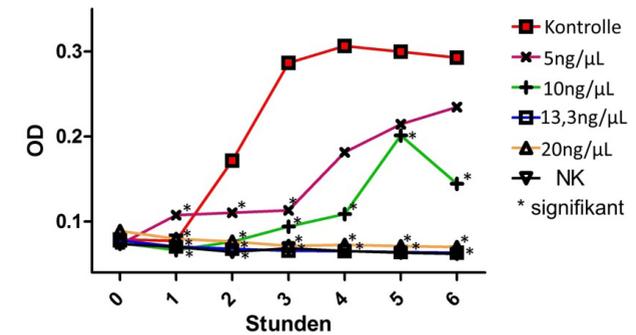
Ergebnisse

rbS100A9



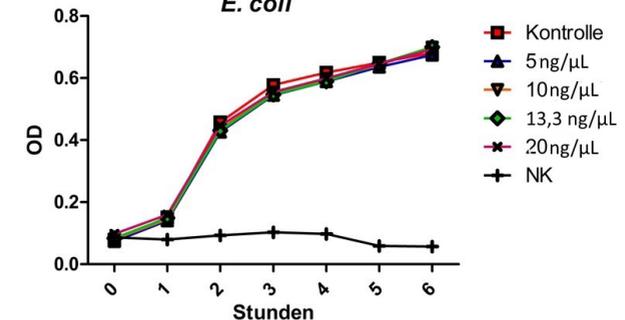
Bei *Staphylococcus aureus* ist ein deutlicher und zum Großteil signifikanter Wachstumsunterschied im Vergleich zur Kontrolle (Bakteriensuspension) sichtbar. Die Wachstumshemmung ist stark konzentrationsabhängig. Während die rbS100A9-Konzentrationen 5 ng/μl und 10 ng/μl nur einen geringen Unterschied zur Kontrolle aufweisen, ist bei der Konzentration von 13,3 ng/μl kaum ein Bakterienwachstum darstellbar. Bei 20 ng/μl hat die Wachstumskurve sogar ähnliche Werte wie die Negativkontrolle.

Sc. uberis



Das Wachstum von *Streptococcus uberis* ist über die gemessenen 6 Stunden insgesamt niedriger (Höchste OD 0,3) als das Wachstum von *Staphylococcus aureus* (Höchste OD 0,5), wodurch die Wachstumshemmung auf dem Graphen größer erscheint, als es tatsächlich der Fall ist. Bei den Konzentrationen von 5 und 10 ng/μl kann bereits eine mittelgradige Hemmung dargestellt werden. Vor allem bei den Proteinkonzentration 13,3 und 20 ng/μl aber tritt ebenfalls eine deutliche und signifikante Wachstumshemmung auf.

E. coli

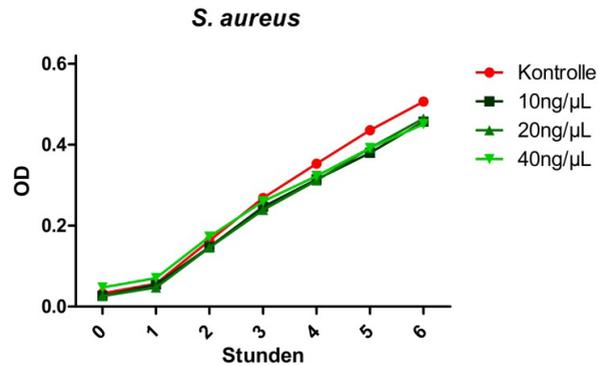


Im Gegensatz zu den vielversprechenden Ergebnissen der Auswertung der Wachstumshemmung der Gram positiven Bakterien ist bei *Escherichia coli* kein signifikanter Einfluss des rbS100A9 auf das Wachstum erkennbar.

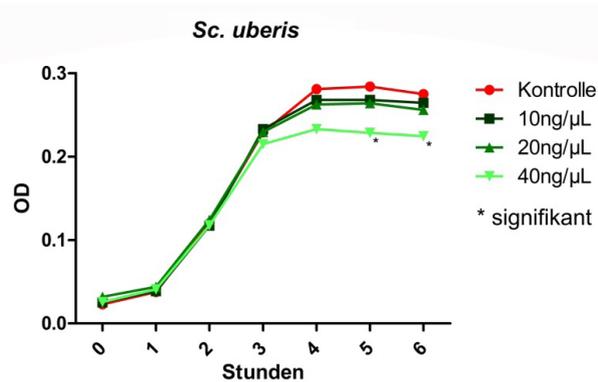
Fazit

Das rbS100A9 hat einen deutlich konzentrationsabhängigen hemmenden Effekt auf das Wachstum der Grampositiven Keime *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus uberis*, während das Wachstum des Gramnegativen Bakteriums *Escherichia coli* von diesem Protein nicht beeinflusst wird.

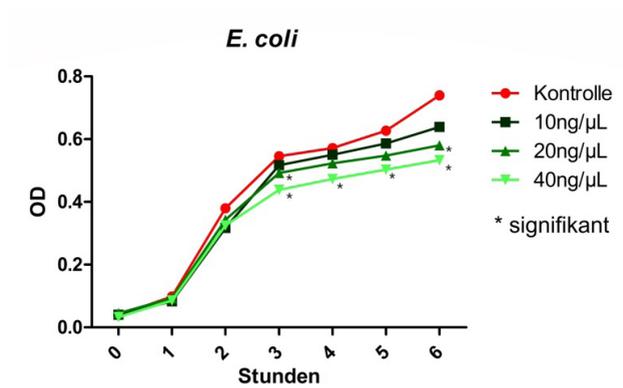
rhS100A8/A9



Die Wachstumskurve des Bakteriums *Staphylococcus aureus* zeigt nur sehr geringe konzentrationsunabhängige Abweichungen zur Positivkontrolle. Keiner der Werte weist dabei eine Signifikanz auf.



Dagegen lässt sich bei *Streptococcus uberis* eine konzentrationsabhängige Hemmung bei einer Verdünnung von 40 ng/µl erkennen. Auch sind bei dieser Verdünnungsstufe des Heterodimers rhS100A8/A9 die Werte zu Stunde 5 und 6 signifikant. Die Verdünnungen mit jeweils 10 ng/µl und 20 ng/µl weisen nur eine sehr geringe Wachstumshemmung auf und verlaufen konzentrationsunabhängig.



Die deutlichste Wachstumshemmung weist das Protein rhS100A8/A9 bei dem Erreger *Escherichia coli* auf. Das Protein hemmt den Erreger dabei konzentrationsabhängig. Signifikante Werte bei einer Konzentration von 20 ng/µl wurden zu Stunde 3 und 6 gemessen. Bei einer Konzentration von 40 ng/µl ist die Wachstumshemmung von *Escherichia coli* am größten. Die Werte sind dabei ab Stunde 3 als signifikant anzusehen.

Fazit

Das Heterodimer rhS100A8/A9 besitzt die größte wachstumshemmende Wirkung auf das gramnegative Bakterium *Escherichia coli*. Das Wachstum des grampositiven Bakteriums *Streptococcus uberis* wird nur leicht gehemmt. Dabei werden *Escherichia coli* und teilweise auch *Streptococcus uberis* konzentrationsabhängig gehemmt. Die Wirkung auf das grampositive Bakterium *Staphylococcus aureus* fällt hingegen am geringsten aus und ist völlig konzentrationsunabhängig.

Persönliche Meinung & Danksagung

Wir beide hatten das Ziel, im Rahmen dieses VETResearch Projekts einen Eindruck über das wissenschaftliche Arbeiten zu bekommen und uns intensiver mit relevanten Themen aus der Tiermedizin zu beschäftigen.

Nach unserer jeweils 4-wöchigen Forschungsarbeit jedoch haben wir weit mehr Erfahrungen gesammelt, als wir zu Anfang erwartet hatten.

Neben der eigenständigen Hintergrundrecherche und dem vertraut machen mit Standardabläufen im Labor, gab man uns die Möglichkeit, selbstständig an einem eigenen Projekt zu arbeiten.

Dabei konnten wir in kleinen Diskussionsrunden unsere eigenen Ideen einbringen und wurden gleichzeitig mit konstruktiven Vorschlägen unterstützt.

Auch das mehrmalige Vortragen unserer Zwischenergebnisse und unserer Abschlusspräsentation stellte dabei eine sehr gute Übung dar.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das VETResearch Projekt eine sehr gute Erfahrung für interessierte Tiermedizinstudenten darstellt, da es die im Studium seltene Möglichkeit bietet, ein spezielles Thema im Detail zu untersuchen.

Bedanken möchten wir uns bei unserem Betreuer Herrn Dr. Wolfram Petzl für die konstruktiven Ideen und Anregungen, sowie bei Herrn Dr. Frank Weber für die immer motivierenden Worte und Anregungen, außerdem bei Frau Sandra Kirsch und Frau Laura Macías für alle Tipps, Hilfestellungen und Statistik-Sitzungen.

Lahmheitssoring und Klauenbonitur beim Saugferkel

Hannah Scheit

Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim

Betreuer: Dr. Maren Bernau

Hintergrund und Ziel der Studie

Veränderungen an den Klauen werden bereits bei wenige Tage alten Saugferkeln beschrieben. Bislang gibt es noch keine befriedigenden Forschungsergebnisse bezüglich der Ursache für diese Klauenveränderungen, diskutiert wird insbesondere der Einfluss der Haltungsbedingungen. Ziel dieses VETResearch Projektes war es, Klauenveränderungen bei Ferkeln von der Geburt bis zum Ende der Aufzucht zu dokumentieren, um Zeitpunkte vermehrter Belastung auszumachen und Unterschiede zwischen verschiedenen Rassen/Kreuzungen zu erfassen.

Versuchstiere und Methoden

In der Studie wurden 75 Ferkel aus 8 Würfen untersucht. Die Gruppen unterschieden sich in ihrer Genetik (siehe Tabelle 1). Verwendet wurden Ferkel der Rassen/Kreuzungen Deutsche Landrasse x Deutsches Edelschwein (DL-DE), Deutsche Landrasse (DL), sowie Piétrain x Piétrain-Duroc (Pi-PiDu). Alle Tiere durchliefen den gleichen Versuchsablauf (siehe Abbildung 1) und wurden unter denselben Bedingungen gehalten und zur selben Zeit vom Abferkelstall in das Flat-Deck umgestallt (Ferkelalter 4 Wochen).

Tabelle 1: Übersicht über die Versuchstiere, unterteilt in die verschiedenen Rassen/Kreuzungen.

Genetik	Ferkelanzahl	Wurfanzahl	Ferkel pro Wurf
Deutsche Landrasse x Deutsches Edelschwein (DL-DE)	30	2	15,3 ± 2,0
Deutsche Landrasse (DL)	20	3	7,9 ± 2,5
Piétrain x Piétrain-Duroc (Pi-PiDu)	24	3	8,6 ± 2,3
Summe	74	8	11,1 ± 4,1

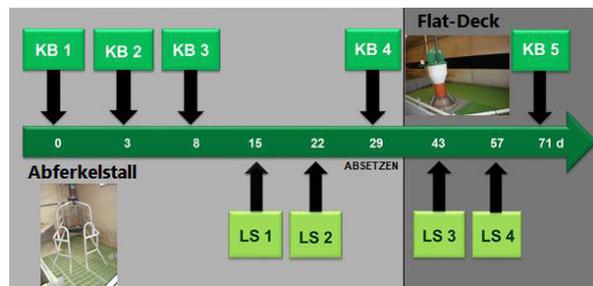


Abbildung 1: Ablauf der Untersuchungen. KB = Klauenbonitur. LS = Lahmheitssoring.

Am Tag 0 (Geburt der Ferkel), 3, 8, 29 (Absetzen) und 71 (Ende Aufzucht) wurde eine Klauenbonitur (KB) durchgeführt. Am Tag 15, 22, 43 und 57 erfolgte jeweils ein Lahmheitssoring (LS). Am 29. Lebenstag der Ferkel wurden sie abgesetzt und am 32. Lebenstag vom Abferkelstall ins Flat-Deck umgestallt, wo sie bis zum Ende der Aufzucht blieben. Die Studie endete mit dem Ende der Aufzucht an Tag 71.

Bei der Klauenbonitur wurden 4 Merkmale (Blutungen, Risse, Verletzungen und Rötungen) bewertet. Es wurde die seitliche Klauenwand, die Klauenober- und die -unterseite mittels Scoring (0-5) beurteilt. Da in vorherigen Studien festgestellt wurde, dass Klauenveränderungen beim Schwein meistens symmetrisch auftreten, wurden in dieser Studie nur die linke Vorder- und Hintergliedmaße beurteilt. Zusätzlich wurde die Klauenlänge mittels Lineal gemessen. Beim Lahmheitssoring wurden die Ferkel in langsamer und schneller Gangart beurteilt und das Gangbild mit Scores von 0 bis 3 bewertet, wobei 0 keine Lahmheit und 3 hochgradige Lahmheit bedeutet.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SAS Software. Es wurde der Fishers Exact Test zur Erfassung signifikanter Unterschiede für die Merkmale Blutungen, Risse, Verletzungen, Rötungen angewandt. Die Grenze für signifikante Unterschiede betrug $p \leq 0,05$.

Ergebnisse

Die statistische Auswertung zeigte signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) bezogen auf die Genetik und die Untersuchungstage für die Merkmale Blutungen, Risse, Verletzungen, Rötungen und Klauenlänge. Das Lahmheitssoring wies keine signifikanten Rasseunterscheide auf. Vereinzelt gab es jedoch lahme Ferkel.



Abbildung 2: Darstellung der erfassten Veränderungen: (a) = Verletzungen; (b) = Blutungen; (c) = Rötungen; (d) = Risse.

Verletzungen

Das Merkmal Verletzungen trat bei DL und DL-DE nur an der Klauenoberseite auf (Abbildung 2a). In KB 2, KB 3 und KB 4 war vor allem die Außenklaue betroffen. Bei Pi-PiDu war KB 2 ohne Befund. In KB 3 war auch die Klauenunterseite betroffen. KB 4 wies den höchsten Score auf. Veränderungen auf der Klauenoberseite waren bei allen Rassen/Kreuzungen immer höchst/hoch signifikant ($p \leq 0,0001$ / $p \leq 0,009$).

Blutungen

Blutungen traten bei allen Rassen/Kreuzungen an der Klauenunterseite auf (Abbildung 2b). In KB 3 trat bei allen Rassen/Kreuzungen der höchste Score und die größte Anzahl an

betroffenen Tieren auf. Bei DL, sowie DL-DE blieb der Score nach KB 3 weiterhin hoch. Bei Pi-PiDu traten bei KB 2 und KB 4 ebenfalls hohe Scores auf, die bei KB 5 leicht zurückgingen. Bei Pi-PiDu wurde kein Score 5 vergeben.

Rötungen

Das Merkmal Rötungen trat nur vereinzelt auf (Abbildung 2c). Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,0001$ - höchst signifikant) traten in KB 1 auf, jeweils an der Klauenunterseite der Vorder- und der Hintergliedmaße. Dabei hatte Pi-PiDu die stärkste Belastung und DL die geringste.

Risse

Für das Merkmal Risse wurde kein Score 5 vergeben. Bei DL stieg die Anzahl an betroffenen Tieren bis KB 4 an. Die Klauenober- sowie die -unterseite waren dabei gleichermaßen betroffen (Abbildung 2d). Bei DL-DE wiesen KB 1 und KB 5 die stärkste Belastung auf, wobei vor allem die Klauenunterseite betroffen war. Pi-PiDu hatte das stärkste Auftreten des Merkmals Risse in KB 5, vor allem auf der Klauenunterseite.

Klauenlänge

Bis KB 3 traten an Vordergliedmaße und Hintergliedmaße signifikante Rasseunterschiede auf (DL mit den längsten Klauen). In KB 4 nur noch an der Hintergliedmaße. Ab KB 5 traten keine signifikanten Rasseunterschiede mehr auf. Bei allen Rassen/Kreuzungen sind die Hinterklauen ab KB 5 signifikant länger als die Vorderklauen.

Schlussfolgerung und Diskussion

Es zeigen sich bereits am Tag der Geburt Veränderungen an den Klauen sowie signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Rassen/Kreuzungen. Demnach kann die Haltungform nicht die alleinige Ursache der Klauenveränderungen sein. Dies zeigt sich ebenfalls bei der Verlaufsbeobachtung, da sich die beobachteten Veränderungen je nach Rasse/Kreuzung unterschiedlich ausprägten, obwohl die Haltungsbedingungen für alle Tiere gleich waren. Um die Ergebnisse des Scorings vergleichen zu können, wurden die Klauenbonitur immer von derselben Person durchgeführt. Weitere Studien mit größerer Tierzahl und konventionellen Rassen sind wünschenswert. Zudem könnte für eine objektivere Auswertung eine Fotodokumentation verwendet werden, bei dem jede Klaue in einem zuvor angepassten Raster dokumentiert wird.

Persönliche Meinung

Die Studie war für mich sehr spannend durchzuführen. Wissenschaftliches Arbeiten im Rahmen einer kleinen Studie Schritt für Schritt zu erlernen war für mich eine große Chance und ich habe mit sehr viel Engagement und Spaß die Daten gesammelt und ausgewertet. Ich bin sehr gespannt darauf, die weiteren Ergebnisse dieser Forschung zu verfolgen und eventuell sogar daran mitzuarbeiten. Die Arbeit hat mir sehr viel Spaß gemacht und mich persönlich wachsen lassen. Ich bin sehr dankbar, dass ich die Möglichkeit hatte, dieses Projekt durchzuführen, denn ich habe wissenschaftliches Arbeiten kennengelernt und meinen Spaß daran gefunden – sicherlich werde ich diese Motivation weiterverfolgen.

Regionenbezogene Analyse der Körperzusammensetzung beim Schwein

Juliane Schrott

Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim

Betreuer: Dr. Maren Bernau

Hintergrund und Ziel der Untersuchung

Als Folgeprojekt der VETResearch-Untersuchung von 2016 zur Knochenmineralisierung sollte die regionenbezogene Analyse der Körperzusammensetzung, zusätzlich zu den Parametern Knochenmineraldichte (BMD) und Knochenmineralgehalt (BMC), auf Magerweichgewebe und Fettgewebe (gesamt und Fettanteil in %) ausgedehnt werden. Derartige Untersuchungen können als Grundlage zur Definition geeigneter Auswahlkriterien für Zuchttiere dienen, um zukünftig die Tiergesundheit, etwa in Bezug auf Lahmheit, und die Wirtschaftlichkeit zu verbessern. Ziel der Untersuchung war es, beim Schwein mittels Dualenergie-Röntgenabsorptiometrie (DXA) geeignete Regionen zu ermitteln, in denen Unterschiede in der Körperzusammensetzung deutlich erkennbar, einfach festzustellen und repräsentativ für den Gesamtkörper sind. Es stellte sich die Frage, inwieweit die unterschiedlichen Parameter zusammenhängen und inwiefern die Entwicklung der Körperzusammensetzung vorhersehbar wäre. Weiter sollte festgestellt werden, ob es Unterschiede in der Körperzusammensetzung zwischen den Geschlechtern abhängig vom Alter oder von Umweltfaktoren (Jahreszeit, Fütterung und Haltung) gibt.

Versuchstiere & Methoden

Die Daten der Versuchstiere wurden im Rahmen einer Doktorarbeit erhoben. Alle 127 Tiere waren vom Genotyp Piétrain x Deutsche Landrasse. Die 63 männlichen, chirurgisch kastrierten Tiere und 64 Jungsauen wurden in drei ungefähr gleich großen Gruppen (Gruppe 1 geboren im April, Gruppe 2 geboren im Juni und Gruppe 3 geboren im Juli) gemästet, wobei jede Gruppe zu gleichen Teilen aus beiden Geschlechtern zusammengesetzt war und jeweils 50 % im Maststall auf Vollspaltenboden und 50 % im Außenklimastall auf Stroh gehalten wurden. Während der Mastperiode wurde jeweils mit durchschnittlich 30 kg (Lebenstag 75), 70 kg (Lebenstag 137) und mit 100 kg Körpermasse (Lebenstag 165) ein DXA-Scan durchgeführt. Für die Untersuchung wurden eine intramuskuläre Injektionsnarkose aus Ketamin (Ursotamin®; 15 mg/kg) und Azaperon (Stresnil®; 2 mg/kg) verwendet und im Bedarfsfall Ketamin (7 mg/kg i.v.) nachdosiert. Die Tiere wurden in Bauchlage mit angewinkelten Vorder- und nach hinten gestreckten Hintergliedmaßen auf dem Tisch positioniert und von *rostral* nach *caudal* mäanderförmig gescannt, was einen Zeitraum von ca. 13 Minuten beanspruchte. Verwendet wurde ein „GE Lunar iDXA“ (siehe Abbildung 1a). In der Literatur finden sich zahlreiche Publikationen über die Eignung der DXA zur nicht invasiven Messung der Körperzusammensetzung beim Schwein. Die Röntgenröhre erzeugt Strahlung, welche über einen Filter in zwei unterschiedliche Energieniveaus (35 und 70 keV) gespalten wird. Die Photonen durchdringen den zu untersuchenden Körper und werden abhängig vom Gewebe aufgrund des Foto- und Compton-Effekts unterschiedlich stark abgeschwächt, was vom Detektor erfasst wird. Für die Berechnung wird von einem 3-Komponenten-Modell ausgegangen: Die Körpermasse besteht im Modell aus Fett-, Magerweich- und Knochenmi-

neralgewebe.

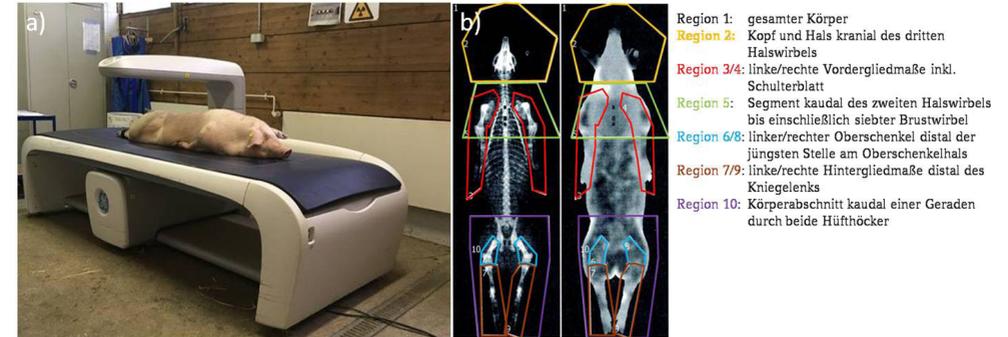


Abbildung 1: a) GE Lunar iDXA bei der Untersuchung eines Mastschweines; b) DXA-Bild mit Beschreibung der 10 definierten Regionen.

Für das weitere Vorgehen war es entscheidend, geeignete Körperregionen zu definieren; Kriterien hierfür waren die Abgrenzbarkeit gegenüber benachbarten Strukturen und die Vergleichbarkeit der Altersstufen. Es wurden 10 Regionen definiert, wobei die Gliedmaßen im Seitenvergleich berücksichtigt wurden (Abbildung 1b) und sich einige Regionen ausschließlich zur Bestimmung der Knochenmineralisierung eignen, während andere auch für Magerweich- und Fettgewebe auswertbare Werte liefern.

Die statistische Analyse der Parameter erfolgte mit SAS Software. In der Mischmodellanalyse (Proc mixed) waren Geschlecht und Gruppe fixe Effekte. Die Signifikanzgrenze lag bei $p < 0,05$.

Ergebnisse & Diskussion

Geschlechtsunterschiede

Ab dem zweiten Scantermin mit 70 kg sind Kastraten schwerer als Jungsauen, jedoch zeigen sich zwischen den Geschlechtern bereits ab 30 kg signifikante Unterschiede in der Kopfregion: Die männlich kastrierten Tiere weisen ein erhöhtes Fett- & Magerweichgewebe [g] auf. Ab 60 kg gibt es sowohl signifikante Unterschiede im Gesamtkörper und in der Schulter- und Hintergliedmaßen-Region (Fett [% und absolut]) als auch eine signifikant höhere BMD, mehr Magerweichgewebe und mehr Fett [% & absolut] bei Kastraten in der Kopfregion. Ab 100 kg treten signifikante Unterschiede in den Unterschenkeln bezüglich BMC [g] auf. Es kann eine eventuell positive Beziehung zwischen Fettgewebe und BMC ab 100 kg in Erwägung gezogen werden. Weiter lassen es die Ergebnisse zu, die Kopfregion repräsentativ für den Gesamtkörper zu betrachten, was in Zukunft eine Zeitreduktion während der Untersuchung bedeuten könnte. Jedoch gibt es keine Unterschiede in BMD/BMC in der Kopfregion bei 30 kg, für diese Parameter müsste eine andere passende Region definiert werden. Insbesondere die Unterschenkel sind eine interessante Region für Geschlechtervergleich.

Tabelle 1: Ausgewählte Ergebnisse des 100kg Scans für die Geschlechtsunterschiede (nur signifikante Unterschiede dargestellt; Fett [kg] gleiche Regionen signifikant wie Fett [%]).

Merkmal	Region	Kastraten	Jungsauen	p-Wert
Gewicht [kg]	Gesamtkörper	104,28 ± 1,49	95,69 ± 1,42	< 0,0001
BMC [g]	Kopf	432,34 ± 5,74	431,94 ± 5,49	0,0222
	Unterschenkel links	144,72 ± 2,37	137,71 ± 2,32	0,0361
	Unterschenkel rechts	144,77 ± 2,49	136,84 ± 2,49	0,0254
Fett [%]	Gesamtkörper	18,59 ± 0,31	14,98 ± 0,30	< 0,0001
	Kopf	24,48 ± 0,21	22,40 ± 0,20	< 0,0001
	Schulter	20,04 ± 0,45	16,11 ± 0,43	< 0,0001
	Hintergliedmaßen	16,54 ± 0,28	13,48 ± 0,27	< 0,0001
Mager [g]	Gesamtkörper	82923 ± 1052,62	79465 ± 1006,95	0,0192
	Kopf	5797,82 ± 71,59	5458,49 ± 68,48	0,0009
	Schulter	21043 ± 314,27	20092 ± 302,17	0,0313

Mastgruppenunterschiede

Beim ersten Scantermine mit 30 kg zeigen die Tiere der Gruppe 2 im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen in allen Regionen deutliche Unterschiede bezüglich BMD, obwohl es zu diesem Zeitpunkt noch keine Gewichtsunterschiede gibt – der Trend setzt sich in den Folgeuntersuchungen fort. Es zeigen sich auch Unterschiede für weitere Parameter in einigen Regionen: ein signifikant höheres Magerweichgewebe in der Schulterregion bei Tieren der Gruppe 1 und 2 sowie Unterschiede zwischen dem Gesamtkörper und den einzelnen Regionen bezüglich Fett- und Magerweichgewebe. Der Teilkörper *caudal* der Hüfthöcker ist repräsentativ für den Gesamtkörper für die Parameter BMD, BMC, Magerweichgewebe und Fettgewebe ab 60 kg anzusehen, was für zukünftige Untersuchungen eine Zeitreduktion während der Untersuchung bedeuten könnte.

Interessant ist die Tatsache, dass bei den Tieren in Gruppe 2 ab einer Körpermasse von ca. 70 kg Schwanzbeißen auftrat. Es wäre wünschenswert, in einer Folgeuntersuchung BMD als „Schwanzbeißenindikator“ sowie den Effekt des Vaters zu überprüfen, da in jeder Gruppe ein anderer Eber eingesetzt wurde.

Tabelle 2: Ausgewählte Ergebnisse des 30kg Scans für die Mastgruppenunterschiede (nur signifikante Unterschiede dargestellt; Ausnahme Gewicht).

Merkmal	Region	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	p-Wert
Gewicht [kg]	Gesamtkörper	30,20 ± 0,67	29,19 ± 0,68	29,05 ± 0,69	0,4224
BMD [g/cm ²]	Gesamtkörper	0,57 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,58 ± 0,01	< 0,0001
	Kopf	1,03 ± 0,01	0,93 ± 0,01	1,01 ± 0,01	< 0,0001
	Vordergliedmaßen rechts	0,54 ± 0,01	0,47 ± 0,02	0,54 ± 0,01	0,0053
	Oberschenkel links	0,69 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,71 ± 0,01	< 0,0001
	Oberschenkel rechts	0,69 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,70 ± 0,01	< 0,0001
	Unterschenkel links	0,49 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,0002
	Unterschenkel rechts	0,49 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,0069
Hintergliedmaßen	0,52 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,52 ± 0,01	< 0,0001	

Persönliche Meinung

Ich hatte das große Glück, das VETResearch-Projekt, an dem ich bereits letztes Jahr gearbeitet habe, weiterzuführen und zu vertiefen. Daher konnte ich weitgehend selbständig und unter freier Zeiteinteilung tätig sein. Ich empfinde es als großartig, dass die Fakultät interessierten Studierenden die Möglichkeit bietet, bereits während des Studiums einen Einblick in die Vielfalt des wissenschaftlichen Arbeitens, in verschiedene Methoden und die Statistik zu erhalten. Hervorheben möchte ich die besonders engagierte und geduldige Betreuung durch Frau Dr. Bernau und die herzliche Atmosphäre am Lehr- und Versuchsgut.

Gesundheitszustand von Sauen während eines Reproduktionszyklus

Sophie Wötzel
Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim
Betreuer: Dr. Maren Bernau

Hintergrund und Ziel der Untersuchung

Der Stoffwechsel der Sau im Reproduktionszyklus ist starken Belastungen unterworfen. Wie sich einzelne Parameter während eines Reproduktionszyklus verändern und welchen Einfluss diese auf Milchleistung, Aufzuchtleistung und Körperkondition der Sau haben, sollte im Rahmen dieser Studie erfasst werden. Das Projekt stellt ein Folgeprojekt aus dem letztjährigen Projekt „Ernährungszustand von Sauen durch Body Condition Scoring und Messung der Rückenspeckdicke“ (Frau Ulrike Gerster) dar. Um die vorangegangenen Ergebnisse in einen komplexeren Zusammenhang zu bringen, wurde die Studie, neben der Erfassung der Rückenspeckdicke, um die Erhebung von Stoffwechselfparametern erweitert. Das Ziel der Studie bestand darin, einflussnehmende Faktoren auf den Gesundheitszustand der Sau zu erfassen und mögliche Auswirkungen auf den Verlauf eines Reproduktionszyklus zu erkennen.

Versuchstiere & Methoden

Es wurden insgesamt 52 Sauen in 4 Abferkelgruppen betreut. Die Rassenverteilung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Versuchstiere, unterteilt in die verschiedenen Rassen und Kreuzungen.

Rasse	Anzahl
Deutsche Landrasse (DL)	26
Duroc (Du)	5
Deutsches Edelschwein (DE)	4
Deutsche Landrasse x Deutsches Edelschwein (DL-DE) & Deutsches Edelschwein x Deutsche Landrasse (DE-DL)	12
Piètrain x Duroc (Pi-Du)	5

Der Untersuchungszeitraum einer Sau erstreckte sich insgesamt über 22 Wochen. 1 Woche *ante partum* wurden die Sauen einer Abferkelgruppe vom Laufstall in den Abferkelstall umgestallt. Danach erfolgte das 1. untersuchte Abferkeln. Nach 4 weiteren Wochen wurden die Ferkel abgesetzt und die Sauen ins Deckzentrum gebracht. Dort wurden sie in der Regel 3-5 Tage später besamt. 25 Tage *post inseminationem* erfolgte eine Trächtigkeitsuntersuchung mit anschließender Umstallung in den Wartestall. Nach bestehender Trächtigkeit wurden 12 Wochen später die Sauen wieder vom Wartestall zurück in den Abferkelstall gebracht und 1 Woche später erfolgte das 2. untersuchte Abferkeln. Die Zeitpunkte der Probennahmeterminen sind in Abbildung 1 dargestellt.

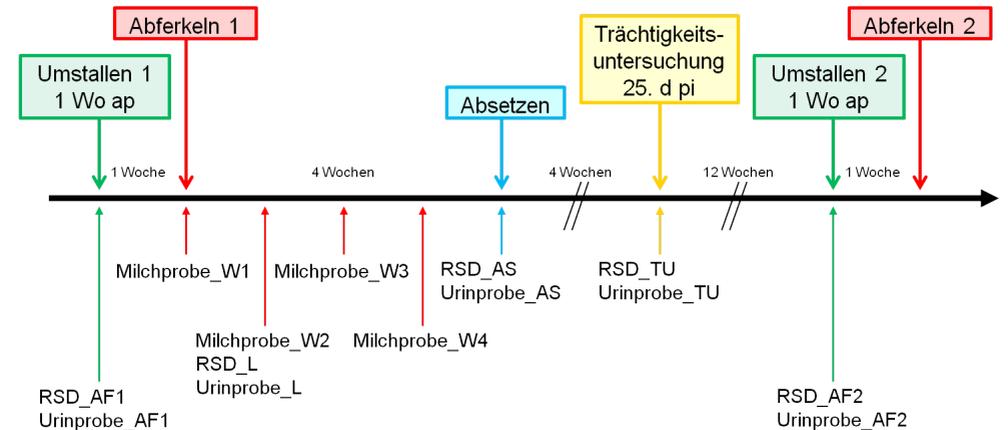


Abbildung 1: Ablauf der Untersuchungen: RSD = Rückenspeckdicke; AF1 = 1. Abferkeln der Sau im Rahmen des Projektes; W1-W4 = Laktationswoche 1-4; AS = Absetzen der Sau von den Ferkeln; TU = Trächtigkeitsuntersuchung; AF2 = 2. Abferkeln der Sau im Rahmen des Projektes.

Die Rückenspeckdicke (RSD) wurde an der Messstelle auf Höhe der Kniefalte ermittelt. Verwendet wurde dabei ein Mircomaxx Ultraschallsystems mit linearer Schallsonde und einer gewählten Eindringtiefe von 4,9 cm. Die RSD wurde eine Woche *ante partum*, in der zweiten Laktationswoche, beim Absetzen, 15 Tage *post inseminationem* und eine Woche vor dem nächsten Abferkeln erhoben. Zusätzlich zur Messung der RSD wurde an diesen Terminen Spontanurin gewonnen. Mittels Refraktometer wurde das spezifische Gewicht und mit Hilfe eines Medi-Test Combi 11 Teststreifens 11 verschiedene Parameter (Blut, Urobilinogen, Bilirubin, Protein, Nitrit, Keton, Ascorbinsäure, Glucose, pH-Wert, Dichte und Leukozytengehalt) im Urin bestimmt. Während der Laktation wurden im wöchentlichen Abstand Milchproben entnommen und mittels zweierlei pH-Indikatorstreifen der pH-Wert und mit entsprechenden Teststreifen der Gehalt an Beta-Hydroxybutyrat bestimmt. Die Ferkel wurden am Tag der Geburt und beim Absetzen gewogen und damit die Wurfgröße erfasst.

Die erfassten Daten wurden anhand einer Mischmodellanalyse mittels SAS 9.3 Software ausgewertet, wobei die Wurfnummer und die Rasse der Sau als fixer Effekt angenommen wurden. Die Signifikanzgrenze lag bei $p \leq 0,05$. Zudem wurden lineare Regressionen eingesetzt.

Ergebnisse

Aufzuchtleistung

Die Wurfnummer zeigt einen signifikanten Einfluss auf die aufgezogene Ferkelanzahl und das Absetzgewicht. Je größer die Wurfnummer, desto mehr aufgezogene Ferkel und desto größer sind die Absetzgewichte der Ferkel (Tabelle 2).

Tabelle 2: Ergebnisse der Mischmodellanalyse bezogen auf den Wurfefekt und die Aufzuchtleistung.

Wurf-Nr.	gesamt geboren [Ferkel]	lebend geboren [Ferkel]	aufgezogen* [Ferkel]	Geburtsgewicht [kg]	Absetzgewicht* [kg]
1	9,80 ± 0,81	9,37 ± 0,79	7,87 ± 0,71	1,46 ± 0,06	8,01 ± 0,36
2	9,84 ± 1,26	9,57 ± 1,22	8,90 ± 1,10	1,69 ± 0,18	9,76 ± 0,99
3	9,82 ± 1,24	8,84 ± 1,20	7,38 ± 1,08	1,71 ± 0,10	10,30 ± 0,58
≥ 4	12,57 ± 1,36	12,42 ± 1,32	11,57 ± 1,18	1,60 ± 0,16	8,79 ± 0,87

* p ≤ 0,05

Rückenspeckdicke

Die Ultraschallmessungen der RSD ergaben einen signifikanten Rasseeffekt zum Zeitpunkt des 1. AF, L, AS und TU. Der Verlauf zeigt eine Abnahme bei allen Rassen vom Abferkeln bis zum Absetzen, gefolgt von einem Aufbau nach dem Absetzen. Fast alle Rassen/Kreuzungen erreichen ihren Ausgangswert zum nächsten Abferkeln oder übertreffen diesen sogar. Unterschiede zwischen den Rassen/Kreuzungen werden deutlich (Abbildung 2).

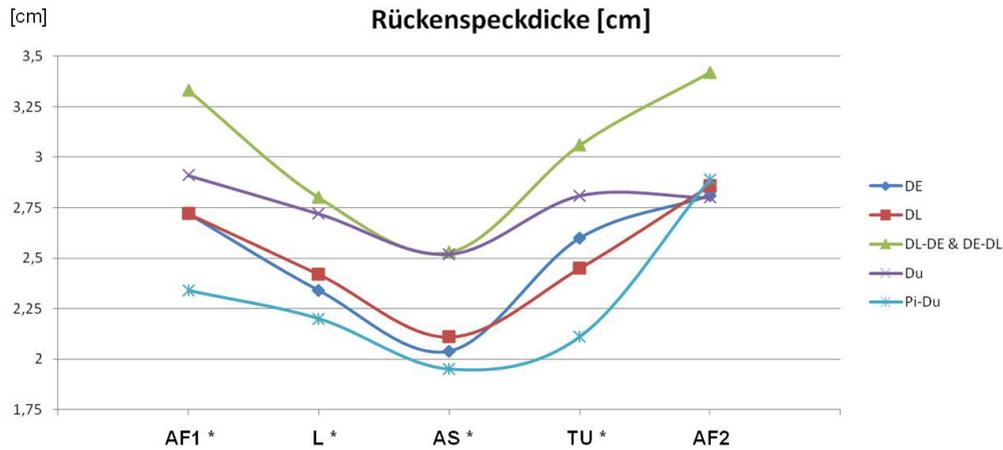


Abbildung 2: Darstellung des Verlaufs der Rückenspeckdicke [cm] über die verschiedenen Untersuchungstermine und Rassen/Kreuzungen. AF1 = 1. Abferkeln der Sau im Rahmen des Projektes; L = Laktation; AS = Absetzen der Sau von den Ferkeln; TU = Trächtigkeitsuntersuchung; AF2 = 2. Abferkeln der Sau im Rahmen des Projektes. * p ≤ 0,05.

Urinuntersuchung

Die Untersuchung der spezifischen Dichte im Urin zeigte einen signifikanten Wurfnummern-Effekt beim 1. AF und der L: Tiere im 1./2. Wurf steigen mit deutlich höheren spezifischen Gewichten ein und sinken dann ab, wohingegen Tiere ab dem 3. Wurf mit deutlich niedrigeren Anfangswerten beginnen, diese dann ansteigen und erst mit dem AS wieder abfallen (Abbildung 3).

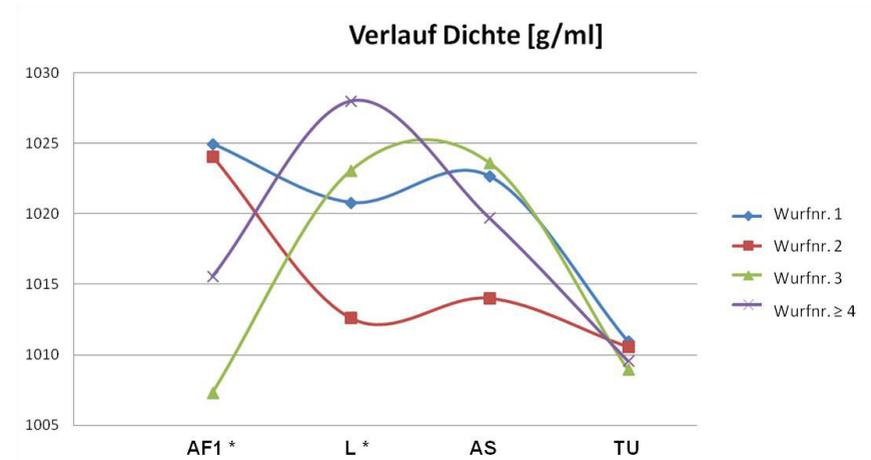
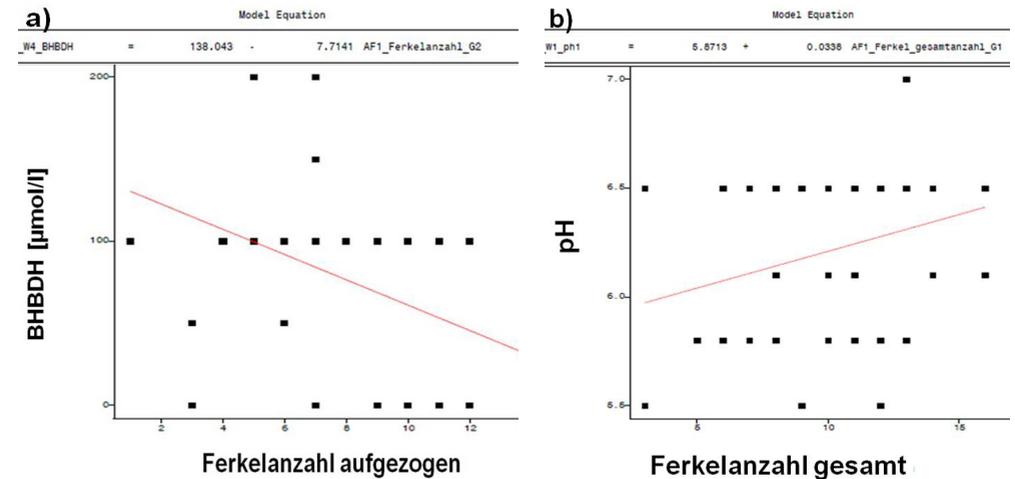


Abbildung 3: Darstellung des Verlaufs der spezifischen Dichte [g/ml] im Urin über die verschiedenen Untersuchungstermine und Rassen/Kreuzungen. AF1 = 1. Abferkeln der Sau im Rahmen des Projektes; L = Laktation; AS = Absetzen der Sau von den Ferkeln; TU = Trächtigkeitsuntersuchung. * p ≤ 0,05.

Milchprobenuntersuchung

Die Ergebnisse der Messung des beta-Hydroxybutyrat-Gehaltes in der Milch zeigen einen Wurfnummerneffekt in der ersten Laktationswoche. Die Tiere im ersten Wurf zeigen signifikant niedrigere Werte als die Tiere mit mehr als einem Wurf. Zudem ließ sich eine Beziehung zwischen der Anzahl an aufgezogenen Ferkeln und dem Gehalt an BHBDH beim Absetzen darstellen (p=0,006; Abbildung 4a).

Abbildung 4: Lineare Regression zwischen a) dem β -Hydroxybutyrat-Gehaltes in der Milchprobe und der Zahl an aufgezogenen Ferkeln (p=0,006) bzw. b) dem pH-Wert in der Milchprobe und der Gesamtzahl an geborenen Ferkeln (p=0,0574).

Des Weiteren existiert eine lineare Regression zwischen der Gesamtferkelanzahl und dem Milch-pH beim Abferkeln – eine steigende Tendenz des Milch-pH-Wertes mit zunehmender Gesamtferkelanzahl (Abbildung 4b). Zudem lassen sich rassespezifische Unterschiede im Milch-pH-Wert erkennen (nicht signifikant), sowie eine pH-Wert-Änderung von der ersten Laktationswoche zu den restlichen.

Diskussion & Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Studie (mit geringer Tierzahl und unterschiedlicher Genetik) zeigen sich Beziehungen zwischen der Wurfnummer, der Anzahl an aufgezogenen Ferkeln, deren Absetzgewichten, dem spezifischen Gewicht im Urin, dem Beta-Hydroxybutyrat-Gehalt und dem pH-Wert in der Milch. Ebenfalls zeigten sich nachweisbare Rasseeffekte in Bezug auf die RSD. Eine Beziehung zwischen den Beta-Hydroxybutyrat-Werten und der Anzahl der aufgezogenen Ferkel sowie zwischen dem Milch-pH und der Gesamtferkelanzahl ließ sich darstellen.

Weitere Studien sind notwendig um die Ergebnisse zu verifizieren und den Zusammenhang zwischen Milch-, Urin-, sonstigen Stoffwechselwerten und der Rückenspeckdicke näher zu beleuchten. Dafür werden weitere Studien mit entsprechend großer Versuchstierzahl nötig sein, sodass mehr Tiere pro Rasse beurteilt werden können.

Eventuell ist weitere Diagnostik (Blutuntersuchung) zielführend und auch eine längere Studiendauer, um mögliche jahreszeitliche Unterschiede zu erkennen.

Persönliche Meinung

Ich bedanke mich recht herzlich bei Frau Dr. Maren Bernau für die gute Betreuung und dem gesamten Team des Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei diesem Projekt.

Es hat mir sehr viel Spaß und Freude bereitet, neben dem Studienalltag direkt am Tier arbeiten zu dürfen. So konnte ich das mir entgegen gebrachte Vertrauen nutzen um mein Wissen zu erweitern, etwas in die wissenschaftliche Arbeit zu schnuppern und die Spezies Schwein näher kennenzulernen. Durch diese lehrreiche Erfahrung kann ich es mir gut vorstellen, mich zukünftig mehr in diesem Bereich zu beweisen.

Die Überlebensfähigkeit von als sensibel getesteten Enterokokken nach Behandlung mit bakteriziden Antibiotika

Anja Wernecke

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Betreuer: PD Dr. Karin Schwaiger, Ulrike Kühn

Hintergrund

Enterococcus spp. wurden früher als harmlose bakterielle Besiedler von Mensch und Tier angesehen, gelten heutzutage allerdings als dritthäufigste Verursacher nosokomialer Infektionen. Diese Entwicklung ist besonders alarmierend, da Enterokokken in der Lage sind, außerordentlich schnell und effektiv Resistenzgene zu akquirieren. Daher ist eine stetige Überwachung der aktuellen Resistenzsituation unumgänglich. Die Überprüfung der phänotypischen antimikrobiellen Resistenz erfolgt dabei nach genau festgelegten Standards z. B. *in vitro* antimicrobial susceptibility testing mittels Mikrodilutionsmethode nach EUCAST.

Eine interne Überprüfung unter Anwendung zusätzlicher Methoden (Rekultivierungsversuche; Mikroskopie; MALDI-TOF MS) ergab jedoch, dass viele Enterokokkenstämme in der Lage waren, die *in vitro* Behandlung mit verschiedenen bakteriziden Antibiotika (Rifampicin und Vancomycin) zu überleben, obwohl sie nach Überprüfung mittels anerkannter Methoden als im Wachstum gehemmt und demnach als „sensibel“ beurteilt wurden. Daher besteht die Gefahr, dass die tatsächliche Resistenzlage bei Enterokokken unter Anwendung o. g. Methoden falsch eingeschätzt wird, da die Bakterien bestenfalls subletal geschädigt und nicht, wie ursprünglich angenommen, abgetötet werden. Nach einer gewissen Adaptationsphase scheinen sich diese Mikroorganismen jedoch wieder zu erholen, um sich im Anschluss weiter zu vermehren – häufig mit neu akquirierten Resistenzeigenschaften.

Rifampicin ist ein bakterizides Ansamycin, welches die Transkription hemmt. Es unterscheidet sich chemisch signifikant von anderen Antibiotikagruppen, sodass hier wenig Kreuzresistenzen beschrieben sind. Vancomycin ist ein bakterizides Glykopeptid, das die Mureinbiosynthese stört. Es gilt als Reserveantibiotikum für Menschen. *In vivo* gibt es nur einen geringen Prozentsatz (5 %) Vancomycin-resistenter Enterokokken.

Ziel des Projektes

Die Überlebensfähigkeit angeblich sensibler Enterokokken nach Behandlung mit Rifampicin und Vancomycin (mittels MHK-Testung) mit Hilfe folgender Untersuchungen ausführlicher zu untersuchen: Rekultivierungsversuche, Mikroskopie und MALDI-TOF MS. Die Ergebnisse können dabei helfen, die verfügbaren Methoden zu verbessern und tragen zu einer zuverlässigeren Risikoeinschätzung bei.

Material und Methodik

Zunächst wurden 5 Targetkeime ausgewählt. Ein Targetkeim war ein *Enterococcus faecalis* (DSM 2570), weitere vier stammten aus Hühnerfleisch, die freundlicherweise vom Kooperationspartner, dem Lehrstuhl für Tierhygiene der TUM in Weihenstephan, zur Verfügung gestellt wurden. Jeder Keim wurde im Dreifachansatz einer Mikrodilution mit Rifampicin und Vancomycin unterzogen. Abbildung 1 zeigt exemplarisch eine Mikrodilutionsplatte.

Die Mikrodilutionsplatten wurden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und nach 24h wurde die Minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) abgelesen. Die Nährbouillon aus dem Napf des MHK-Ansatzes und dem Napf mit der doppelten Antibiotikakonzentration des MHK wurden erneut auf Müller-Hinton-Agar (MHA) ausgestrichen und bei 37 °C für 24 Stunden bebrütet. Die gewachsenen Keime wurden abschließend mittels Gramfärbung und MALDI-TOF Massenspektrometrie überprüft.

Ergebnisse und Diskussion

Die Enterokokken wurden in der Mikrodilution durch Vancomycin und Rifampicin im Wachstum gehemmt. Nach der Antibiotikabehandlung kam es zum erneuten Wachstum. Im Ausstrich des MHK-Ansatzes zeigten sich gehäuft kleine und große Kolonien, bei zwei von vier Feldisolaten kam es zum Wachstum eines Bakterienrasens. Bei den Ausstrichen der Ansätze mit der doppelten MHK kam es zum Wachstum großer Einzelkolonien.

Daraus lässt sich folgern, dass keine vollständig bakterizide Wirkung der Antibiotika auf das Keimwachstum stattgefunden hat. Die Gramfärbung und die Mikroskopie ermöglichen visuell keine Differenzierung der unbehandelten von den antibiotikabehandelten Enterokokken. Die Untersuchung mittels MALDI-TOF MS bietet allerdings einen Hinweis auf einen relativen Intensitätsunterschied eines Peaks bei 4425 Dalton zwischen den antibiotikabehandelten und den unbehandelten Keimen (Abbildung 2).

Persönliche Einschätzung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Gareis und allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit für die Möglichkeit, an diesem Projekt teilzunehmen. In meinem Projekt war es mir möglich, Grundkenntnisse zum wissenschaftlichen Arbeiten im mikrobiologischen Labor anzueignen und ich konnte Erfahrungen mit der MALDI-TOF MS Technologie sammeln. VETResearch-Projekte sind eine interessante Gelegenheit für Studenten, um sowohl Einblicke in die Forschungsarbeit zu erhalten als auch das jeweilige Institut mit seinen Tätigkeiten besser kennen zu lernen.

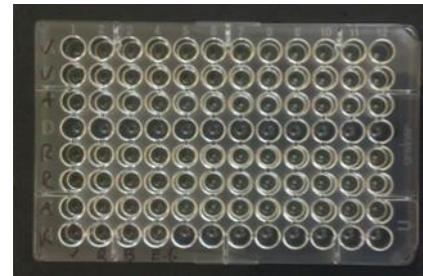


Abbildung 1: Mikrodilutionsplatte

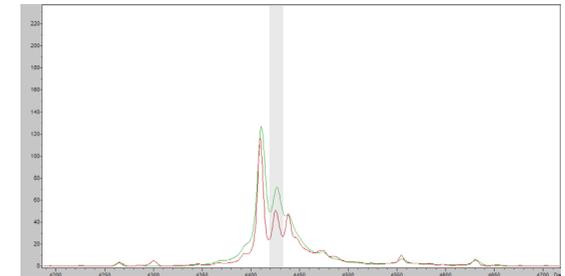


Abbildung 2: MALDI-TOF Spektrum mit markiertem Peak