

VETResearch 2019 Retreat

Grußwort

Auch im Jahr 2019 wurden im Rahmen von VETResearch an der Tierärztlichen Fakultät der LMU München zahlreiche spannende Forschungsprojekte von Studierenden bearbeitet. In diesem Jahr haben sich 8 Lehrstühle aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department und 4 Einrichtungen aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin mit insgesamt 21 Projekten beteiligt. Bei der Abschlussveranstaltung Ende November 2019 hatten die Studierenden die Gelegenheit, ihre Projekte Vertretern der Fakultät sowie Kommilitonen in Form eines Vortrags oder einer Posterpräsentation vorzustellen.

Das Programm wird seit 2012 jährlich angeboten und erfreut sich seither bei den Studierenden großer Beliebtheit. Schon während des Studiums haben die Studierenden so die Möglichkeit, einen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten zu bekommen und sich eigenverantwortlich mit einer Forschungsfrage auseinanderzusetzen. Neben den praktischen Arbeiten am Tier bzw. im Labor beinhaltet dies auch die Recherche, Dokumentation, Datenauswertung, Interpretation und schlussendlich die Präsentation der Ergebnisse vor Publikum. Hierbei werden nicht nur wichtige fachliche Kenntnisse und Fähigkeiten erworben, sondern es können darüber hinaus auch Kontakte geknüpft werden, die möglicherweise zu einer Doktorarbeit oder späteren Kooperationen führen.

Für mich als Betreuerin von mehreren Projekten ist VETResearch eine tolle Gelegenheit, Projekte mit Studierenden bearbeiten zu können. Dieses Konzept eignet sich beispielsweise für Pilotstudien, die zur Durchführung größer angelegter Versuche beitragen, oder auch für kleinere, in sich abgeschlossene Fragestellungen. Als Betreuer ist man hierbei gefragt, eine optimale Betreuung mit guter Anleitung und gleichzeitig der Überlassung von Eigenverantwortung zu entwickeln. Es macht Spaß, wenn man den Studierenden die Faszination für die eigene Forschung vermitteln kann und merkt, wie „der Funke überspringt“.

Im Namen der BetreuerInnen möchte ich mich bei den Studierenden für Ihr Engagement bei der Durchführung der Projekte bedanken. Ganz besonderer Dank gilt auch den MitarbeiterInnen des Studiendekanats unter Leitung von Herrn Prof. Göbel, insbesondere Frau Dr. Stoll und Frau Dr. Beitz-Radzio, die sich immer hervorragend um die Organisation und den reibungslosen Ablauf von VETResearch kümmern und die stets als Ansprechpartner zur Verfügung stehen.

Dr. Linda Böswald

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik

Projekte aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department

Nachweis von Salmonella spezifischen IgA-Antikörpern in Larynxstumpfenproben von immunisierten Hühnern **Leona Arps** • Meta-Analyse zum Calcium- und Phosphathaushalt beim Geflügel **Sophie Asanger** • Prävalenz von antibiotikaresistenten *Enterobacteriaceae* und *Enterococcaceae* auf Straußenfleisch und -kot **Hanna Julia Geißler** • Innervation der Gelenke an der Halswirbelsäule des Pferdes **Matilda Gromeier** • Charakterisierung der Wirkung von Buprenorphin am Rezeptor **Isabel Kersting** • Quantitative analysis of fish behaviour via video monitoring as health indicator in research systems **Dominik von La Roche** • Vorkommen von psychophilen Clostridien in vakuumverpacktem Rindfleisch aus dem deutschen Handel **Richard Lindner** • Food Fraud – falsche Deklaration von Lebensmitteln: Unterscheidung zwischen Lebergewebe von Kälbern und ausgewachsenen Rindern mittels MALDI-TOF MS **Michelle Müller** • Bewertung des toxischen Potentials von *Bacillus thuringiensis* Isolat **Janina Riegg** • *Listeria monocytogenes* im „Viable But Not Culturable“ (VBNC)-Stadium – Rekultivierungsversuche zur Verbesserung der risikoorientierten Diagnostik **Anna Sophia Stoll, Nadja Hillig** • Determination of particle size in different laboratory animal diets **Mara-Sophie Struck** • Entwicklung einer Multiplex-qPCR für den Nachweis von Verderbserregern in „Gammelfleisch“ **Judith Wiedemann**

Projekte aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin

Entwicklung des Körpergewichts, der Rückenfettdicke, der Widerristhöhe und des Body Condition Scores bei Kälbern der Rassen Deutsche Holsteins, Deutsches Fleckvieh sowie deren Kreuzungen bis zur 4. Lebenswoche unter Berücksichtigung der Milchaufnahme **Verena Büchler** • Antimikrobielle Aktivität von LAP (Lingual Antimicrobial Peptide) und SLPI (Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor) gegenüber bovinen Mastitis-Erregern **Elena Gerdes** • RNA-Gewinnung für die RT-qPCR aus bovinem Euterparenchym **Franziska Kienzle** • Verlässlichkeit der Diagnose einer Bakteriurie bei automatisierter Harnsedimentanalyse bei Katzen **Elisabeth Neubert** • Durchflusszytometrische Analyse des Milch-Differentialzellbildes *in-vivo* und *post mortem* **Lisa Oberberger** • IL10 Genexpression in bovinem Euterparenchym: Abweichung einer Kontrollprobe bei der Durchführung der RT-qPCR **Luise Schmiderer** • Einsatz von ovinen und bovinen ELISA zur genaueren Definition von PAG Verläufen sowie einer verlässlicheren Frühträchtigkeitsdiagnose beim Schaf **Anne Simoni** • Vergleichende Untersuchung der Kolostrumqualität beim Schwein mittels Refraktometer und ELISA **Sebastian Sterk** • Auswirkung eines Ergänzungsfuttermittels („Energiekapsel“, Fa. Alfavet) auf die Inzidenz der subklinischen Ketose bei Kühen in der Frühlaktation **Verena Weinberg**



GEFÖRDELT 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 2020

Nachweis von Salmonella spezifischen IgA-Antikörpern in Larynx tupferproben von immunisierten Hühnern

Leona Arps
Arbeitsgruppe Immunologie
Betreuer: Prof. Dr. Bernd Kaspers

Einleitung

Geflügel und Geflügelprodukte sind die wichtigste Quelle für Salmonellainfektionen beim Menschen. Um das Infektionsrisiko zu reduzieren, besteht in vielen Ländern der EU, darunter auch in Deutschland, eine Impfpflicht für Legehennen. Eingesetzt werden dabei sowohl Lebendimpfstoffe, als auch Inaktivimpfstoffe gegen *Salmonella enteritidis* und *Salmonella typhimurium*. Eine immer wiederkehrende Frage ist die nach dem Nachweis des Impferfolgs.

Inaktivimpfstoffe induzieren eine sehr gute humorale Immunantwort mit der Bildung hoher Titer an IgY (dem Äquivalent zum IgG der Säugetiere). Allerdings ist die Bedeutung von IgY-Antikörpern in der Kontrolle von Salmonelleninfektionen umstritten. Hühner ohne spezifische IgY-Antikörper zeigen keine höhere Belastung nach einer Infektion unter Laborbedingungen als Kontrolltiere. Da Salmonellen fakultativ intrazelluläre Parasiten sind, spielt die zellvermittelte Immunantwort bei der Infektion und Impfung die entscheidende Rolle. Allerdings ist der Nachweis Salmonella spezifischer T-Lymphozyten beim Huhn nur unter Laborbedingungen möglich. Eine Anwendung unter Produktionsbedingungen ist praktisch ausgeschlossen.

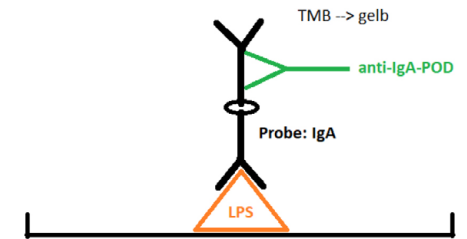
Da die Immunisierung mit Lebendimpfstoffen oral über das Trinkwasser erfolgt, induziert die Impfung auch die Bildung von IgA-Antikörpern auf mukosalen Oberflächen. Ziel dieser Arbeit war es, anhand bereits vorhandener Proben und mit Hilfe eines etablierten ELISA, Salmonella spezifische IgA-Antikörper, insbesondere in Larynx tupferproben, nachzuweisen, um eine einfache und kostengünstige Methode zur Untersuchung des Impferfolgs zu etablieren und anhand von Proben aus dem Feld zu validieren.

Material und Methoden

Legehennen wurden nach dem Schlupf, im Alter von 6 Wochen und in der 16. Lebenswoche (Impfschema des Herstellers), mit dem Salmonella Lebendimpfstoff VAC E immunisiert. Blutproben und Larynx tupferproben wurden 2 Wochen nach der letzten Immunisierung gewonnen. Blutproben wurden in EDTA entnommen und nach Zentrifugation das Plasma gewonnen und bei -20 °C bis zur Analyse gelagert. Tupfer wurden über Nacht in Eppendorfgefäßen in PBS gelagert und anschließend in eine blaue 1 ml Pipettenspitze überführt. Diese wurde in ein 5 ml Röhrchen gegeben und bei 1000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, um die Flüssigkeit aus dem Tupfer zu gewinnen.

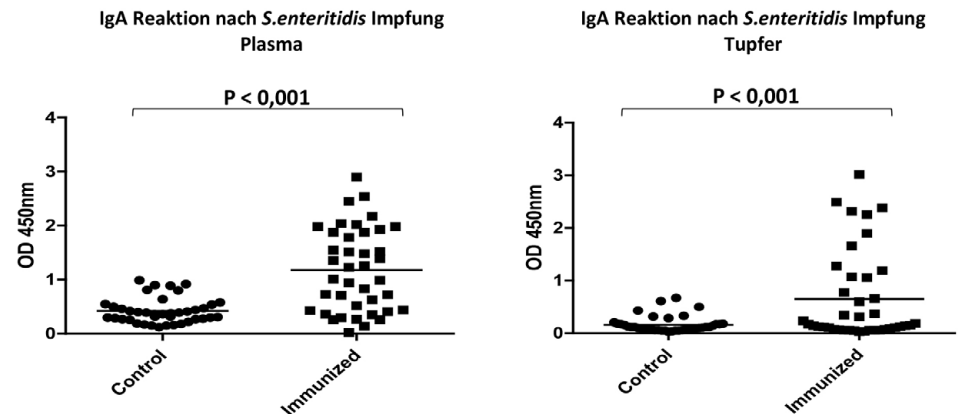
Diese wurde ebenfalls bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

Zur Quantifizierung der Salmonella spezifischen IgA-Antikörper wurde ein ELISA verwendet.



Dazu wurden 96-Loch Maxisorbplatten (Fa. Nunc) über Nacht mit 100 µl einer Beschichtungslösung mit 5 µg/ml *S. enteritidis* LPS (Sigma L7770) in Carbonatpuffer pH 9,6 beschichtet, anschließend gewaschen, mit Magermilchlösung (4 %-ig) blockiert und mit der Probe in einer 1:10 oder 1:50 Verdünnung für eine Stunde bei 25 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Platten mit einem Ziege anti-Huhn-IgA Peroxidasekonjugat (Bethyl #A30-103P) in einer 1:5000 Verdünnung für eine Stunde bei 25 °C inkubiert, erneut gewaschen und mit einer TMB-Lösung entwickelt. Die Farbreaktion wurde in einem ELISA-Reader quantifiziert.

Ergebnisse



Immunisierte Tiere zeigten zwei Wochen nach der dritten Impfung einen deutlichen Salmonella spezifischen IgA-Titer sowohl im Plasma, als auch in den Tupferproben. Allerdings reagierten nicht alle Tiere mit einem Titeranstieg. Vielmehr konnten zwei Gruppen, Responder und Non-Responder, deutlich unterschieden werden.

Zusätzliche Proben wurden im Rahmen von Routineuntersuchungen von Tieren in Produktion gewonnen. Auch hier konnten 7 und 15 Tage nach der dritten Immunisierung Salmonella LPS spezifische IgA-Titer nachgewiesen werden. Diese fielen aber über den nachfolgenden Zeitraum rasch ab.

Schlussfolgerung und Ausblick

Das verwendete ELISA-System eignet sich zum Nachweis Salmonella LPS-spezifischer IgA-Antikörper. Diese können sowohl im Plasma, als auch in Larynxtupferproben nachgewiesen werden. Unter experimentellen Bedingungen lassen sich zwei Gruppen von Tieren unterscheiden: Solche, die auf die Impfung mit einer IgA-Antwort reagieren und solche, die nur schwach oder gar nicht reagieren. Diese Beobachtung konnte auch mit Proben aus dem Feld bestätigt werden. Hier war der Stichprobenumfang allerdings noch zu gering, um eine Aussage über die Anwendbarkeit des Tests zum Nachweis einer erfolgreichen Vakzinierung unter Feldbedingungen machen zu können.

Wünschenswert wäre es daher, die Studie mit einer größeren Zahl an Proben aus unterschiedlichen Betrieben fortzusetzen.

Persönliche Erfahrung

In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Kaspers habe ich während des VETResearch Projektes einen guten Einblick in die Arbeitsweise im Labor gewinnen können. Am Anfang wurde ich in das Labor eingewiesen und mir wurde das Thema meines Projektes erklärt. Sein Team zeigte mir die verschiedenen Geräte und Materialien, die für mein Projekt notwendig sind und schon bald konnte ich mit meinem ersten Versuch beginnen. In den ersten Tagen habe ich das Durchführen eines ELISA gelernt. Anschließend habe ich ELISAs selbstständig mit den Tupferproben ausgeführt.

Während der Zeit im Labor habe ich gelernt, dass die Versuche nicht immer funktionieren und man oft nur Vermutungen über die Gründe aufstellen kann. Ich habe nicht nur ein gängiges immunologisches Verfahren von der praktischen Seite kennengelernt, sondern konnte mir Themen der Immunologie und Bakteriologie anschaulich erarbeiten, wovon ich auch in der Prüfung profitiert habe. Das abschließende Retreat war eine tolle Gelegenheit, die Thematik und meine Versuchsergebnisse vor einem Fachpublikum vorzustellen, was überaus motivierend war und mir Spaß gemacht hat.

Meta-Analyse zum Calcium- und Phosphathaushalt beim Geflügel

Sophie Asanger

Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik

Betreuerinnen: Dr. Linda Böswald, Prof. Dr. Ellen Kienzle

Wissenschaftlicher Hintergrund

Die Idee dieses VETResearch Projekts entstand aus einer, ebenfalls am Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik bearbeiteten, vorangegangenen Meta-Analyse des Calcium- (Ca) und Phosphorhaushalts (P) bei Säugetieren, deren Resultate eine besonders enge Korrelation der fäkalen Calcium- und Phosphorausscheidung bei Carnivoren aufweisen. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass bei Carnivoren eine bedeutendere Ca/P-Regulation über den sog. „Bone turnover“ als über die intestinale Absorption stattfindet. Diese Hypothese weist Ähnlichkeiten zum bereits bekannten Phänomen des Knochenstoffwechsels der Legehennen bei der kurzfristigen Bereitstellung von Ca aus den Röhrenknochen für die Eischalenbildung auf.

Neben den Ähnlichkeiten der Säugetiere und des Geflügels spielt auch die Annahme über einen positiven Einfluss auf den Ca/P Einbau in den Knochen als Hydroxylapatit bei einem ausgewogenen Ca:P Verhältnis von 2:1 während der intestinalen Absorption eine wichtige Rolle. Im Wachstum, wie es bei Masthühnern der Fall ist, ist der Knochenaufbau von noch größerer Bedeutung, da das Skelett erst aufgebaut und mineralisiert werden muss.

In der Geflügelfütterung spielen wirtschaftliche und ökologische Aspekte eine Rolle, da vor allem P nicht im Überschuss im Futter vorkommen sollte. Es existiert daher viel Forschung um den Ca- und P-Stoffwechsel bei Mastgeflügel und Legehennen, die sich mit der Verwertung dieser Elemente, der Effekte auf die Tiergesundheit sowie der optimalen Zufuhr im Futter beschäftigt.

Ziel dieser Studie war es, aus der Literatur möglichst viele Daten über Aufnahme, Retention und Ausscheidung von Ca und P zusammenzutragen und in einer Meta-Analyse mit speziellen statistischen Verfahren auszuwerten. Eine Arbeitshypothese war, dass beim Huhn grundsätzlich eine ähnliche lineare Korrelation zwischen Aufnahme und Ausscheidung von Ca und P sowie zwischen der Ca- und P-Ausscheidung wie bei Carnivoren zu finden sein müsste, da beim Geflügel der Knochenstoffwechsel einen großen Beitrag in der Regulation leistet.

Material und Methoden

Insgesamt 65 Studien zum Ca- und P-Haushalt von Mastgeflügel wurden für die Metaanalyse, hauptsächlich über die Suchmaschine „Google Scholar“, herausgesucht und ausgewertet.

Suchbegriffe waren hier u.a. broiler, laying hen, retention, digestibility, intake, excretion, calcium, phosphate. Alle Daten wurden zum Vergleichen und Selektieren in einer Microsoft Excel Tabelle gelistet und die Aufnahme sowie Exkretion der Tiere in die gemeinsame Bezugsgröße $\text{mg/kg}^{0,75}$ umgerechnet, sodass eine Gegenüberstellung der Tiere unabhängig vom Körpergewicht möglich war. Die nutzbaren Ergebnisse wurden in einem Diagramm mittels einer Regressionsberechnung in Form des modifizierten Lucas Test ausgewertet und im annähernden Vergleich zu den Carnivoren beurteilt. Dazu wurde eine lineare Regression mit der Ca-Aufnahme als unabhängige Variable (x-Achse) und der Ca-Ausscheidung als abhängige Variable (y-Achse) erstellt. Weiterhin wurde die Ca-Aufnahme (x) mit der Ca-Retention (y) sowie die Ca-Retention (x) mit der P-Retention (y) korreliert.

Ergebnisse

Die Resultate in den Diagrammen wurden mittels einer Regressionsanalyse, dem sog. modifizierten Lucas Test, betrachtet. Am Beispiel des Diagramm 1 „Calcium Aufnahme vs. Calcium Exkretion“ zeigt die x-Achse die Ca-Aufnahme, die y-Achse die Ca-Exkretion. Dabei zeigt die Steigung der Geradengleichung „ $y=0,56x-12,16$ “ die durchschnittliche Ca-Ausscheidung an. Somit betrug die Ca-Ausscheidung im Mittel 56 % der Ca-Aufnahme und die daraus resultierende Retention 44 % ($100 \% - 56 \% = 44 \%$).

Bei einer Ca-Aufnahme von $500 \text{ mg/kg}^{0,75}$ und einer mittleren Ca-Ausscheidung von 56 % betrug die Exkretion $280 \text{ mg/kg}^{0,75}$. Das $R^2=0,81$ wies einen engen Zusammenhang der Ca-Aufnahme und Ausscheidung über alle Alters- und Gewichtsgruppen der Broiler hinweg auf.

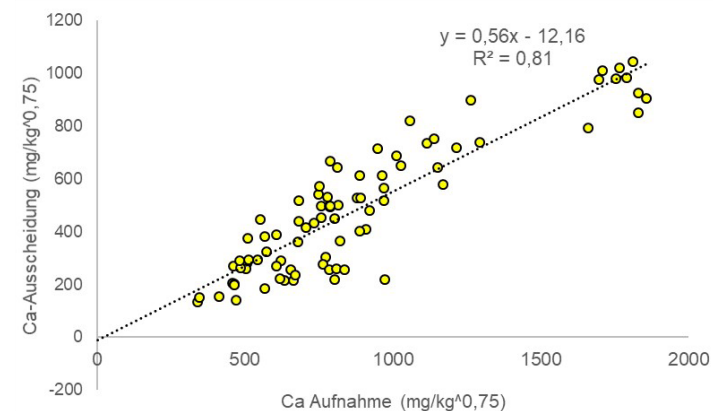


Diagramm 1: Ca-Aufnahme und Ca-Ausscheidung

Die Ca-Retention in Abhängigkeit von der Ca-Aufnahme (Diagramm 2) beschreibt eine durchschnittliche Retention von 42 % bei einem relativ strengen linearen Zusammenhang ($R^2 = 0,66$). Es ließ sich eine mit der Aufnahmemenge steigende Retentionsmenge erkennen, die auch über den Bedarf hinaus bestehen blieb.

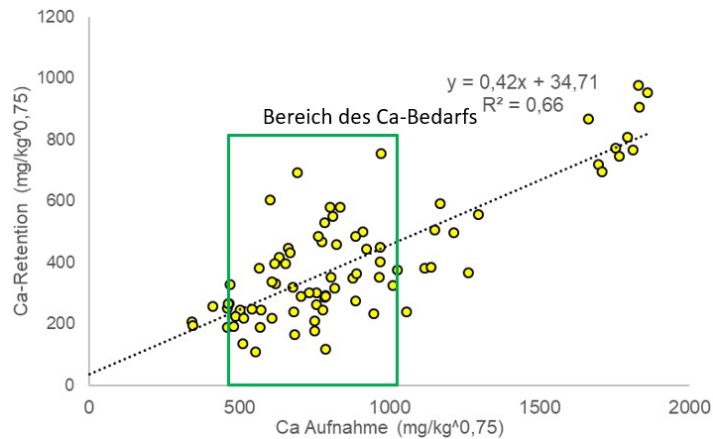


Diagramm 2: Ca-Aufnahme und Ca-Retention

Der enge Zusammenhang zwischen der Calciumretention auf die Phosphorretention lässt sich in Diagramm 3 bei einem hohen Bestimmtheitsmaß von 0,79 beschreiben.

Die Regressionsgleichung $y = 0,61x + 61,55$ zeigte eine P-Retention von durchschnittlich 61 % der Ca-Retention. Die Gleichung ergab ein Verhältnis der Ca-Retention zur P-Retention von annähernd 1,7:1. Dies ist ähnlich dem Ca:P-Verhältnis im Knochen mit ca. 2:1. Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis auf die begünstigte Verfügbarkeit und den Einbau in den Knochen der Mineralien im ausgewogenen Verhältnis.

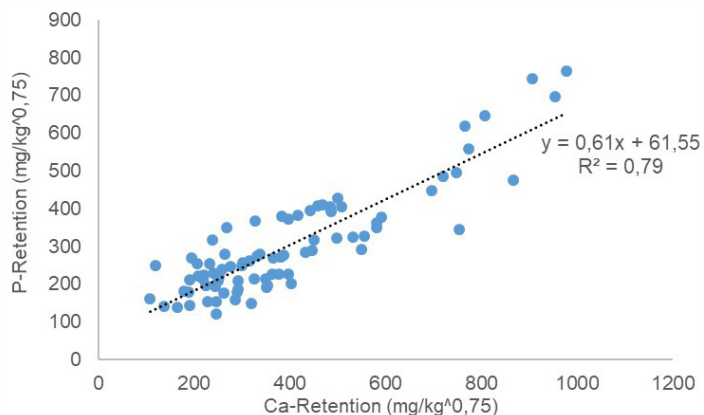


Diagramm 3: Ca-Retention und P-Retention

Diskussion

Die Ca-Exkretion sowie die Ca-Retention waren in den ausgewerteten Daten von Broilern stark von der Ca-Aufnahme abhängig. Für beide Beziehungen war die Regression eindeutig eine lineare Beziehung. Es scheint daher keine nennenswerte Regulation der Retentionsrate von Ca beim Broiler zu geben. Auch bei einer Ca-Zufuhr über dem Bedarf ist die Retention gleich hoch, was möglicherweise zu einem Auffüllen von Ca-Speichern im Körper führen könnte, wie es z.B. bei Legehennen bekannt ist (Knochen als Kurzzeitreservoir von Ca für die Eischalenbildung).

Bei den Säugetieren zeigten die Fleischfresser eine sehr enge lineare Korrelation zwischen Ca-Aufnahme und fäkaler Ca-Ausscheidung, was so interpretiert werden kann, dass die intestinale Ca-Absorption nur in geringem Maße nach oben oder unten reguliert wird. Die Vergleichbarkeit dieser Beobachtung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bei Broilern ist eingeschränkt, da bei den Säugetieren explizit die fäkale Ausscheidung betrachtet werden konnte und beim Geflügel nur die Exkretion (fäkal + renal gemeinsam) bekannt war. Dennoch kann über eine grundlegende Ähnlichkeit der Speziesgruppen spekuliert werden. Außerdem befinden sich die Broiler in ihrer kurzen Wachstumsphase, in welcher z.B. Phosphor noch andere Rollen im wachsenden Körper einnimmt, während die Daten der Fleischfresser von adulten Tieren im Erhaltungsstoffwechsel stammen.

Es bestand eine enge lineare Korrelation zwischen der Ca-Retention und der P-Retention beim Broiler. Die beiden Mengenelemente werden in einem relativ konstanten Verhältnis von 1,7/1 retiniert. Das Ca:P-Verhältnis im Knochen ist im Bereich von 2:1, ein recht hohes Ca:P-Verhältnis in der Retention ist also sinnvoll für den Einbau der beiden Elemente in den Knochen. Während der Mast (Ansatz von Protein und Fett) wird zusätzlich im Gewebe Phosphor angesetzt, was erklären könnte, warum das Ca:P-Verhältnis der Retention etwas geringer ist als das im Knochen (etwas mehr P in Relation zu Ca muss für den Gewebezunahme retiniert werden). Neben den bereits beschriebenen Annahmen stellen auch die rasant verlaufenden Skelettschäden bei chronischem Ca/P-Mangel ein wichtiges Kriterium dar, um die Hypothese einer starken Regulation durch den „Bone turnover“ beim Geflügel und Carnivoren als schnell verfügbares Speichermedium zu stärken.

Fazit

Zusammenfassend spiegeln sich die Ähnlichkeiten der Regulation der Calcium- und Phosphor-Homöostase des Geflügels und der Carnivoren auch durch die enge Korrelation in der Verwertung von Calcium und Phosphor wider.

Es besteht eine enge Korrelation zwischen der Aufnahme, Exkretion und Retention der beiden Mengenelemente. Auch zeichnet sich eine steigende Aufnahme selbst über den Bedarf ab, um vermutlich die Knochenspeicher wieder aufzufüllen. Das Ca:P-Verhältnis im Knochen und in der Retention liegt bei annähernd 2:1, was einen Hinweis auf den erleichterten Einbau in den Knochen bei einem ausgewogenen Ca:P-Verhältnis gibt.

Als Ergänzung zu dieser Meta-Analyse wäre es spannend, Daten von Legehennen sammeln und auswerten zu können, um die Besonderheit der Legehennen, z.B. deren Knochenspeicher und schnelle Mobilisation, für die Eibildung näher zu beleuchten.

Referenzen

Mack, J. K., Alexander, L. G., Morris, P. J., Dobenecker, B., & Kienzle, E. (2015). Demonstration of uniformity of calcium absorption in adult dogs and cats. *JAPAN*, 99(5), 801-809.

Böswald, L. F., Dobenecker, B., Clauss, M., & Kienzle, E. (2018). A comparative meta-analysis on the relationship of faecal calcium and phosphorus excretion in mammals. *JAPAN*, 102(2), 370-379.

Etches, R. J. (1987). Calcium logistics in the laying hen. *The Journal of Nutrition*, 117(3), 619-628.

Hurwitz, S., & Bar, A. (1971). Calcium and phosphorus interrelationships in the intestine of the fowl. *The Journal of Nutrition*, 101, 5, 677-685.

Proszkowiec-Weglarz, M., & Angel, R. (2013). Calcium and phosphorus metabolism in broilers: Effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility¹. *J Appl Poultry Res*, 22(3), 609-627.

Jeroch H., Simon A., Zentek J. (2019). Geflügelernährung: Ernährungsphysiologische Grundlagen, Futtermittel und Futterzusatzstoffe, Fütterung des Lege-, Reproduktions- und Mastgeflügels, Verlag Eugen Ulmer, 2. Auflage.

Persönliche Erfahrungen

Mein VETResearch Projekt hat mir nicht nur einen guten Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten, v.a. mit Fachliteratur und Statistik ermöglicht, sondern war auch durchgehend sehr interessant und hat mir große Freude bereitet. Ich habe die Arbeit von Anfang bis Ende begleiten dürfen und die guten Ergebnisse des Projekts haben mich sehr zufriedengestellt. Diese Erfahrung und das daraus gewonnene Wissen stellen auf jeden Fall eine große Bereicherung für meine studentische und berufliche Zukunft dar. Daher kann ich die Teilnahme an einem VETResearch nur weiterempfehlen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Ellen Kienzle und den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tierernährung und Diätetik nicht nur für viele Anregungen und Ideen bzgl. der Datenauswertung bedanken, sondern auch für das Zuhören bei der Generalprobe für das Retreat.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Linda Böswald, welche mich bei meinem Projekt von Anfang an betreut hat, mich zu jeder Zeit bei Fragen zu meinem VETResearch nach Kräften unterstützt hat und selbst Kollegen von Hannover bis nach Südamerika kontaktierte, um weitere Datensätze für meine Arbeit einzuholen.

Prävalenz von antibiotikaresistenten *Enterobacteriaceae* und *Enterococcaceae* auf Straußenfleisch und -kot

Hanna Julia Geißler

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Betreuer/innen: Dr. Irene Esteban Cuesta, Philipp-Michael Beindorf,
Univ.-Prof. Dr. Dr. Manfred Gareis, PD Dr. Karin Schwaiger

Hintergründe

Bislang gibt es begrenzte wissenschaftliche Erkenntnisse über die Lebensmittelsicherheitsparameter von Straußenfleisch, die Kontamination mit humanpathogenen Mikroorganismen und noch weniger bezüglich der Verbreitung von antibiotikaresistenten Keimen auf Straußenprodukten [1].

Im Zuge der BSE-Krise verzeichnete der Absatz von Straußenfleisch eine vorübergehende Erhöhung und machte es bekannter auf dem europäischen Markt [1, 2]. Seine Vermarktung wird bislang von einer kleinen Gruppe von Straußenzüchtern kontrolliert [2, 3].

Enterobacteriaceae und *Enterococcaceae* sind Kommensalen von Mensch und Tier, können jedoch, insbesondere bei immunsupprimierten Patienten, auch an nosokomialen Infektionen beteiligt sein. Insbesondere die Anzahl an Infektionen mit Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VRE) nimmt in Krankenhäusern in Deutschland zu [4]. Darüber hinaus verzeichnen deutsche Kliniken einen signifikanten Anstieg an Extended Spectrum Beta-Laktamase (ESBL) bildenden *Enterobacteriaceae*, bei denen kaum noch alternative Antibiotika eingesetzt werden können [5].

Ziel dieses Projekts war es, zu beurteilen, inwieweit Straußenfleisch bzw. Straußenprodukte ein Risiko für den Konsumenten darstellen können.

Material und Methoden

Wir haben 57 Straußenfleisch- und 31 Straußenkot-Proben untersucht. Die Untersuchungsschritte für diese Straußenproben sind in Abbildung 1 des Posters dargestellt.

Die *Enterobacteriaceae* haben wir zur Anreicherung 24 h in Tryptic-Soja-Bouillon inkubiert und anschließend auf MacConkey-Agar mit Cefotaxime (Mac+; 1 mg/L) selektiv angezüchtet. Die dort gewachsenen, 15 verdächtigen Kolonien wurden mittels MALDI-TOF MS identifiziert und einer weiterführenden Empfindlichkeitsbestimmung mittels Mikrodilutionsplatten (SENSITITRE™) unterzogen.

Die *Enterobacteriaceae*-Isolate wurden auf Brilliance™ ESBL-Agar subkultiviert und bei positivem Wachstum mittels Liofilchem® MIC Test-Strips getestet.

Für die Anzüchtung der *Enterococcaceae* wurden die Proben auf Slanetz-Bartely-Agar ausgestrichen und kultiviert. Daraus haben wir 4 Kolonien mittels MALDI-TOF MS identifizieren können - wobei es sich ausschließlich um *Enterococcus faecium* handelte. Auch diese Kolonien wurden dann auf MHK (minimale Hemmkonzentration)-Platten manuell pipettiert und auf Resistenzen gegenüber 30 verschiedenen Antibiotika getestet (siehe Tabelle 2).

Ergebnisse

Insgesamt wurden mittels Mac+ 15 *Enterobacteriaceae* aus Straußenfleisch (n = 57) isoliert. Darunter u.a. *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella aerogenes*, *Pantoea septica* und *Escherichia coli*. Im Straußenkot konnten keine *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden.

Vierzehn von den 15 isolierten *Enterobacteriaceae* wuchsen auf Brilliance™ ESBL-Agar. Keines dieser Isolate wurde mittels „MIC Test Strip“ als ESBL-Bildner bestätigt. Die Differenz der Empfindlichkeit der Isolate, zwischen dem Antibiotikum und der Kombination Antibiotikum mit Clavulansäure, zeigte nicht die erforderliche ≥ 3 Logstufen-Differenz oder sie erwies sich als nicht bestimmbar, da die MHK-Werte außerhalb der Referenz lagen.

Die unterschiedlichen Resistenzprofile sind in Tabelle 1 des Posters aufgeführt. Alle Isolate zeigten eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Cefoxitin (Cephalosporin 2. Generation) und eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Sulfisoxazol (Sulfonamide) und Tetracyclinen.

Ceftriaxon, Ceftiofur (nur für den Gebrauch in der Tierarztpraxis zugelassen), Ciprofloxacin und Nalidixinsäure sind laut der Einstufung der WHO Antibiotika „of highest priority“.

Enterococcaceae konnten aus Straußenkot-Proben (n = 31) angezüchtet werden. Vier der Isolate wurden auf Slanetz-Bartley-Agar kultiviert. Alle vier Isolate zeigten erhöhte MHK-Werte für Daptomycin und Erythromycin, die über den von der EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) gegebenen ECOFF (epidemiologische Cut-off)-Werten liegen. Dies spricht für eine mögliche Antibiotika-Resistenz. Daptomycin wurde von der WHO als Reserveantibiotikum identifiziert.

Schlussfolgerungen

Diese Ergebnisse zeigen, dass Straußenfleisch ein Vektor für antibiotikaresistente *Enterobacteriaceae* sein kann. Dagegen wurde der Kot der analysierten Proben als negativ für *Enterobacteriaceae* bewertet. In folgenden Projekten werden weitere genotypische Untersuchungen der analysierten Isolate durchgeführt, um die Charakterisierung zu vervollständigen.

Da *Enterococcus faecium* in Straußenkot-Proben gefunden wurde, ist beim Schlachtprozess darauf zu achten, dass es zu keiner Kreuzkontamination mit Kot kommen kann.

Persönliche Erfahrungen

Das VETResearch Projekt war für mich die erste Möglichkeit, während des Studiums wissenschaftlich zu arbeiten. Dabei hat mir vor allem die Laborarbeit viel Spaß gemacht.

Ich danke meiner Betreuerin Irene Esteban-Cuesta, die das ganze Projekt überhaupt möglich gemacht hat, sowie Philipp Beindorf für die Beschaffung des Rohmaterials. Für die tatkräftige Unterstützung, insbesondere bei der labordiagnostischen Arbeit an meinem Projekt, möchte ich mich sehr herzlich bei Verena Hohenester, Johanna Dietz, Barbara Fritz und Sebastian Schlef bedanken.

Ich habe alle Mitarbeiter des Lehrstuhls als jederzeit sehr hilfsbereit und unterstützend kennengelernt, so dass ich mich während des gesamten Projektes dort sehr wohl gefühlt habe.

Referenzen

[1] Korbel, R., Schubert, M., Erhard, M., Wöhr, C., Bergmann, S., Rückschloss, S., Thiel, S., Engelhardt, H. und Engelhardt, S (2015). „Betrachtungen und Empfehlungen zur Artgemäßen und Tierschutzgerechten Haltung von Straußenvögeln in Deutschland.“ Tierärztliche Praxis Ausgabe G 43, no. 04: 232-44.

[2] Medina, F. X., und Aguilar, A. (2014). „Ostrich Meat: Nutritional, Breeding, and Consumption Aspects. The Case of Spain.“ Journal of Food and Nutrition Research 2, no. 6: 301-05.

[3] Thiel, S. (2014). „Haltung und Erkrankungen von Straußenvögeln unter besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse in Deutschland“. Dissertation LMU München.

[4] Robert Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin 29. August 2019/ Nr. 35 „Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken in Deutschland“.

[5] Petra Gastmeier „ESBL-bildende Bakterien – eine Herausforderung für die Krankenhaushygiene“ aus BfR Tagungsband des Antibiotikaresistenz in der Lebensmittelkette 11/12.11.2013.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

TIERÄRZTLICHE FAKULTÄT
VETERINÄRWISSENSCHAFTLICHES DEPARTMENT

LEHRSTUHL FÜR LEBENSMITTELSICHERHEIT



Prävalenz von antibiotikaresistenten *Enterobacteriaceae* und *Enterococcaceae* auf Straußenfleisch und -kot

Hanna Geißler, Irene Esteban-Cuesta, Philipp-Michael Beindorf, Manfred Gareis und Karin Schwaiger

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schönleutnerstr. 8, 85764 Oberschleißheim

Einleitung

Bislang gibt es begrenzte wissenschaftliche Erkenntnisse über die Lebensmittelsicherheitsparameter von Straußenfleisch, die Kontamination mit humanpathogenen Mikroorganismen und noch weniger bezüglich der Verbreitung von antibiotikaresistenten Keimen auf Straußenprodukten [1].

Enterobacteriaceae und *Enterococcaceae* sind Kommensalen von Mensch und Tier, können jedoch auch an nosokomialen Infektionen beteiligt sein. Insbesondere die Anzahl an Infektionen mit Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VRE) nimmt in Krankenhäusern in Deutschland zu [2]. Darüber hinaus verzeichnen deutsche Kliniken einen signifikanten Anstieg an Extended Spectrum Beta-Laktamase (ESBL) bildenden *Enterobacteriaceae*, bei denen kaum noch alternative Antibiotika eingesetzt werden können [3].

Material und Methoden

Ziel dieser Studie war es, zu beurteilen, inwieweit Straußenfleisch bzw. Straußenprodukte ein Risiko für den Konsumenten darstellen können. Die Untersuchungsschritte für die Straußenproben (Fleisch und Kot) sind in Abbildung 1 dargestellt.

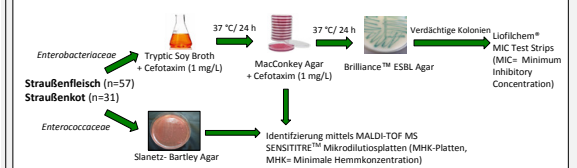


Abb. 1: Selektive Anreicherung für die Untersuchung auf antibiotikaresistente *Enterobacteriaceae* und *Enterococcaceae*

Ergebnisse

Insgesamt wurden mittels Mac+ 15 *Enterobacteriaceae* aus Straußenfleisch (n = 57), jedoch keine aus Straußenkot isoliert. Vierzehn davon wuchsen auf Brilliance™ ESBL Agar, aber keines dieser Isolate wurde mittels „MIC Test Strip“ als ESBL-Bildner bestätigt. Alle Isolate zeigten eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Cefotaxim (Cephalosporin 2. Generation) und eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Sulfisoxazol (Sulfonamide) und Tetracyclinen (Tabelle 1). Ceftriaxon, Ceftiofur (nur für den Gebrauch in der Tierarztpraxis zugelassen), Ciprofloxacin und Nalidixic Acid sind laut der Einstufung der WHO Antibiotika „of highest priority“.

Tab. 1: Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung der isolierten *Enterobacteriaceae* mittels SENSITITRE™ Mikrodilutionsplatten

Isolate Nr.	FOX	AZI	CHL	TET	AXO	AUG2	CIP	GEN	NAL	XXL	FIS	SXT	AMP	STR	
	[0.5-32]	[0.12-16]	[4-32]	[4-32]	[0.25-64]	[1/6.5-32/16]	[0.015-4]	[0.25-16]	[0.015-4]	[0.12-16]	[16-256]	[0.12-38-4/76]	[1-32]	[2-64]	5 Wachstum bis zu der nachgewiesenen Antibiotikakonzentration
5a1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	>32	0.5	32	5.4	8	4/2	0.06	≤ 0.25	2	>8	≤ 16	≤ 0.12/38	>8	4	2 Wachstum in Gegenwart der im Kit maximal angezeigten Antibiotika-konzentration
5a2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	>32	4	4	5.4	32	32/16	0.03	2	2	>8	≤ 16	≤ 0.12/38	>8	8	2 Wachstum in Gegenwart der im Kit maximal angezeigten Antibiotika-konzentration
5a3 <i>Acinetobacter baumannii</i>	>32	0.5	32	5.4	8	4/2	0.12	≤ 0.25	2	>8	≤ 16	≤ 0.12/38	>8	8	2 Wachstum in Gegenwart der im Kit maximal angezeigten Antibiotika-konzentration
5a4 <i>Enterobacter cloacae</i>	>32	16	4	5.4	>64	>32/16	0.03	≤ 0.25	2	>8	≤ 16	≤ 0.12/38	>8	2	2 Wachstum in Gegenwart der im Kit maximal angezeigten Antibiotika-konzentration
5a5 <i>Enterobacter cloacae</i>	>32	16	8	5.4	4	>32/16	≤ 0.015	0.5	2	4	≤ 16	≤ 0.12/38	>8	2	2 Wachstum in Gegenwart der im Kit maximal angezeigten Antibiotika-konzentration
5a6 <i>Enterobacter cloacae</i>	>32	16	8	5.4	>64	>32/16	0.03	0.5	2	>8	≤ 16	≤ 0.12/38	>8	2	2 Wachstum in Gegenwart der im Kit maximal angezeigten Antibiotika-konzentration
5a7 <i>Enterobacter cloacae</i>	>32	16	4	5.4	>64	>32/16	0.03	0.5	2	>8	≤ 16	≤ 0.12/38	>8	2	2 Wachstum in Gegenwart der im Kit maximal angezeigten Antibiotika-konzentration
5a8 <i>Enterobacter cloacae</i>	>32	>16	8	5.4	16	>32/16	0.03	0.5	4	8	≤ 16	≤ 0.12/38	>8	2	2 Wachstum in Gegenwart der im Kit maximal angezeigten Antibiotika-konzentration
5a9 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	>32	8	8	5.4	32	>32/16	0.06	2	4	>8	≤ 16	≤ 0.12/38	>8	2	2 Wachstum in Gegenwart der im Kit maximal angezeigten Antibiotika-konzentration
5a10 <i>Enterobacter cloacae</i>	>32	16	4	5.4	>64	>32/16	≤ 0.015	0.5	2	>8	≤ 16	≤ 0.12/38	>8	2	2 Wachstum in Gegenwart der im Kit maximal angezeigten Antibiotika-konzentration
5a11 <i>Enterobacter cloacae</i>	>32	8	4	5.4	>64	>32/16	0.03	≤ 0.25	2	>8	≤ 16	≤ 0.12/38	>8	2	2 Wachstum in Gegenwart der im Kit maximal angezeigten Antibiotika-konzentration
5a12 <i>Enterobacter cloacae</i>	>32	16	8	5.4	>64	>32/16	0.03	≤ 0.25	2	>8	≤ 16	≤ 0.12/38	>8	2	2 Wachstum in Gegenwart der im Kit maximal angezeigten Antibiotika-konzentration
5a13 <i>Escherichia coli</i>	32	8	8	5.4	1	32/16	0.03	0.5	2	2	≤ 16	≤ 0.12/38	>8	4	2 Wachstum in Gegenwart der im Kit maximal angezeigten Antibiotika-konzentration
5a14 <i>Enterobacter cloacae</i>	>32	16	8	5.4	>64	>32/16	0.03	≤ 0.25	4	>8	≤ 16	≤ 0.12/38	>8	2	2 Wachstum in Gegenwart der im Kit maximal angezeigten Antibiotika-konzentration
5a15 <i>Portia sp.</i>	>32	1	4	5.4	5.4	5.4	0.06	≤ 0.25	8	4	≤ 16	≤ 0.12/38	32	2	2 Wachstum in Gegenwart der im Kit maximal angezeigten Antibiotika-konzentration

Enterococcus (E.) faecium wurde aus vier Straußenkot-Proben (n = 31) nachgewiesen. Alle 4 Isolate zeigten erhöhte MHK-Werte (Tabelle 2) für Daptomycin und Erythromycin, die über den EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) gegebenen ECoff (epidemiologische cut-off)-Werten liegen. Dies spricht für eine mögliche Antibiotikaresistenz. Daptomycin wurde von der WHO zum Reserveantibiotikum erklärt.

Tab. 2: Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung der isolierten *Enterococcus faecium* mittels SENSITITRE™ Mikrodilutionsplatten

Isolate Nr.	CPT	AMP	CHL	AXO	DAP	CLI	GEN	LEVO	LZO	VAN	PEN	TLA	MXF	OXK	RIF	TGC	NIT	TET	ERY	CIP	CEP	FAZ	MAR	PRA	PEN	AMI	IMI	ENRO	POD	FOV
	[0.12-16]	[0.25-8]	[2-32]	[8-64]	[0.5-4]	[0.5-4]	[4-16]	[0.25-4]	[1-8]	[0.12-16]	[0.25-16]	[1-4]	[0.12-16]	[0.25-16]	[1-4]	[1-4]	[0.25-16]	[0.25-16]	[1-4]	[1-4]	[1-4]	[1-4]	[1-4]	[1-4]	[1-4]	[1-4]	[1-4]	[1-4]	[1-4]	[1-4]
17K.E. faecium	0.5	1	8	>64	>4	>4	16	4	2	0.5	4	0.03	2	>2	>2	≤ 0.03	64	50.25	>4	4	>4	>4	4	2	4	>2	2	4	>8	>8
18K.E. faecium	0.5	1	8	32	>4	>4	8	2	2	0.5	4	0.03	0.5	>2	>2	≤ 0.03	64	0.5	>4	51	>4	>4	2	50.25	4	32	2	1	>8	>8
21K.E. faecium	0.5	1	8	>64	>4	>4	16	2	2	0.5	8	0.03	0.5	>2	>2	≤ 0.06	64	50.25	>4	51	>4	>4	4	0.5	4	32	4	2	>8	>8
22K.E. faecium	0.5	1	8	>64	>4	>4	16	2	2	0.5	4	0.03	0.5	>2	>2	≤ 0.03	64	50.25	>4	51	>4	>4	4	0.5	4	32	4	2	>8	>8

Schlussfolgerungen

Diese Ergebnisse zeigen, dass Straußenfleisch ein Vektor für antibiotikaresistente *Enterobacteriaceae* sein kann. Dagegen wurde der Kot der analysierten Proben als negativ für die *Enterobacteriaceae* bewertet, während *Enterococcus faecium* lediglich aus Kot isoliert wurde. In folgenden Projekten werden weitere genotypische Untersuchungen der analysierten Isolate durchgeführt, um die Charakteristika zu vervollständigen.

Referenzen

- [1] Korbel, R., Schubert, M., Erhard, M., Wöhr, C., Bergmann, S., Rückschloss, S., Thiel, S., Engelhardt, H. und Engelhardt, S (2015). "Betrachtungen und Empfehlungen zur Artgemäßen und Tierschutzgerechten Haltung von Straußenvögeln in Deutschland." Tierärztliche Praxis Ausgabe G 43, no. 04: 232-44.
- [2] Robert Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin 29. August 2019/ Nr. 35 „Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken in Deutschland“
- [3] Petra Gastmeier „ESBL-bildende Bakterien – eine Herausforderung für die Krankenhaushygiene“ aus BfR Tagungsband des Antibiotikaresistenz in der Lebensmittelkette 11/12.11.2013

Innervation der Gelenke an der Halswirbelsäule des Pferdes

Matilda Gromeier

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Betreuer/in: PD Dr. Rebecca Kenngott, Prof. Dr. Johann Maierl

Einleitung

Häufig treten pathologische Veränderungen im Bereich der Facettengelenke der Halswirbelsäule von Pferden auf. Diese führen zu einer reduzierten Beweglichkeit der Halswirbelsäule, besonders an den kleinen Wirbelgelenken. Darüber hinaus kann es zu einer Kompression der Spinalnerven an den Austrittsstellen aus dem Wirbelkanal oder sogar einer Kompression des Rückenmarks kommen. Die betroffenen Pferde zeigen Störungen von deutlichen Rittigkeitsproblemen bis hin zu Ataxien. In der Praxis leiden betroffene Pferde oft an Bewegungsstörungen, die an Lahmheit erinnern, sowie Schmerzen in einer bestimmten Gliedmaße. Dies führt zu einer drastischen Beeinträchtigung der sportlichen Leistung und der Lebensqualität der betroffenen Pferde.

In der aktuellen Literatur ist noch keine gezielte und umfassende Therapie für die Schmerzhaftigkeit der Facettengelenke bekannt. Daher bedarf es einer sehr detaillierten Darstellung der knöchernen Anteile sowie der umgebenden Strukturen dieser Gelenke. Dazu müssen im funktionellen Zusammenhang die Gelenkstrukturen, einschließlich der vorhanden Innervation, genau beschrieben werden.

Die sieben Halswirbel weisen, abgesehen von den ersten beiden (Atlas, C1; Axis, C2), die typischen Fortsätze des Wirbels auf (Abbildung 1, Abbildung 2): beidseits sind die Processus transversi zu finden mit einem Tuberculum ventrale und dorsale sowie median auf dem Wirbelbogen der niedrige Processus spinosus. Neben der Verbindung der Wirbelkörper durch die Zwischenwirbelscheiben (Disci intervertebrales) bilden an den Wirbelbögen die kranialen und kaudalen Gelenkfortsätze (Proc. articulares crann. und caudd.) aufeinanderfolgender Wirbel ein synoviales Gelenk. Die Facies articularis der Procc. articulares caudales zeigt nach ventral, die der Procc. articulares craniales nach dorsal. Unmittelbar ventral davon liegt das Zwischenwirbelloch (Foramen intervertebrale), aus dem der Spinalnerv austritt und sich in den Ramus dorsalis und ventralis aufzweigt. Direkt ventral davon ziehen A., V. und N. vertebralis in Längsrichtung der Wirbelsäule durch die aufeinanderfolgenden Querfortsatzlöcher (Foramina transversaria).

Methoden und Materialien

Im Rahmen des Projektes wurden zwei Halswirbelsäulen präpariert (1. Haflingerstute, 13 Jahre; 2. Vollblutstute, 24 Jahre). Die Präparation erfolgte nach zwei unterschiedlichen Ansätzen: Darstellung der Nervi spinales ab der Radix nervi spinalis und Betrachtung der Strukturen in unmittelbarer Nähe des Gelenkes. Zur Bestätigung des makroskopischen Befundes wurden mehrere histologische Untersuchungen durchgeführt.

In den Abbildungen werden die Halswirbel immer mit „C“ abgekürzt und mit der entsprechenden Zahl genannt, z. B. erscheint der 5. Halswirbel als „C5“.

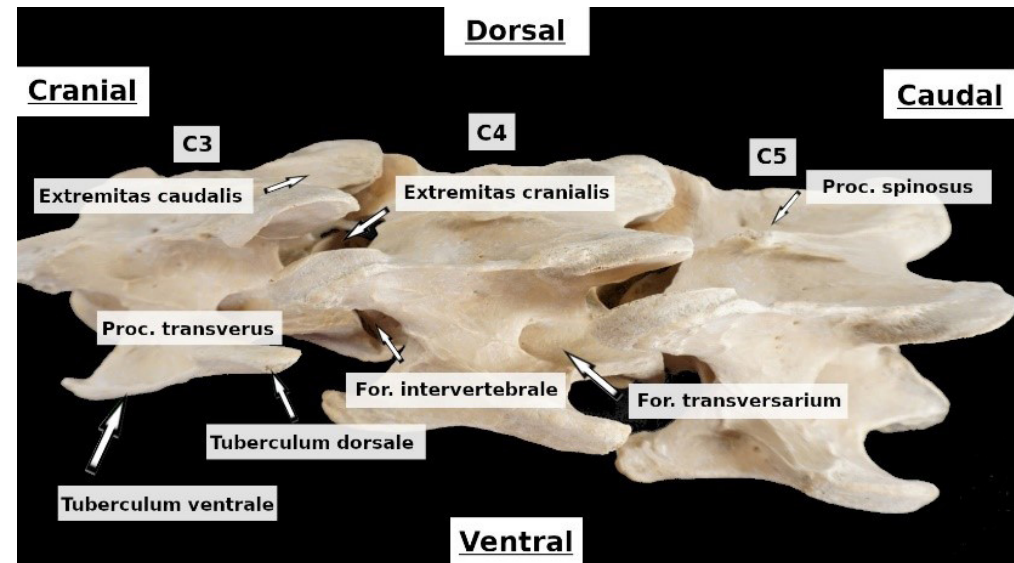


Abbildung 1: 3.-5. Halswirbel eines Pferdes (dorsolaterale Ansicht von links) C3 / C4 / C5 – 3.-5. Halswirbel
© Matilda Gromeier

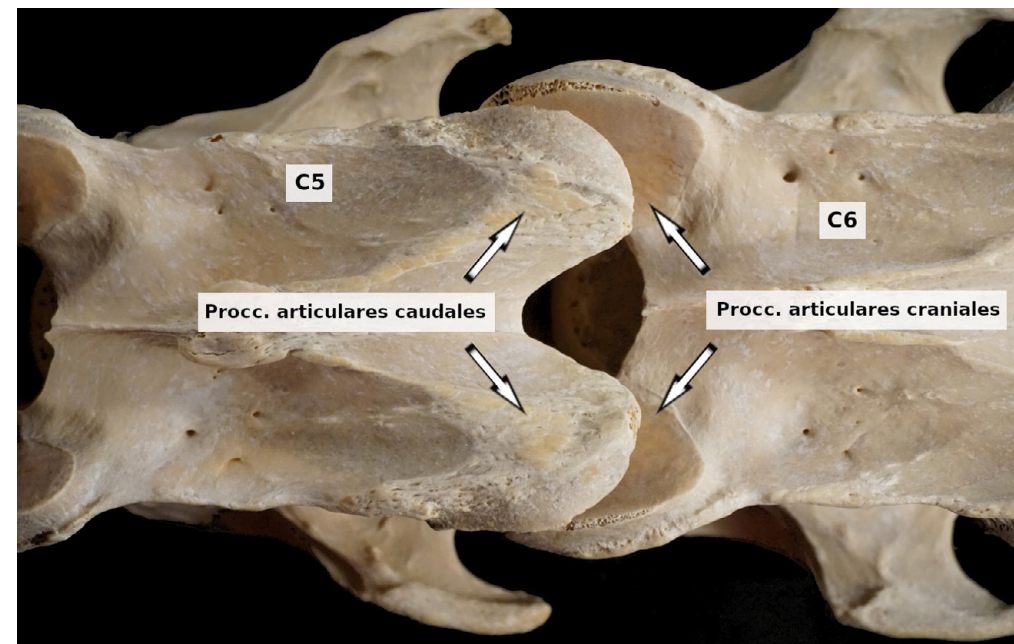


Abbildung 2: Facettengelenke der Halswirbelsäule eines Pferdes (dorsale Ansicht) C5 / C6 – 5. bzw. 6. Halswirbel
© Matilda Gromeier

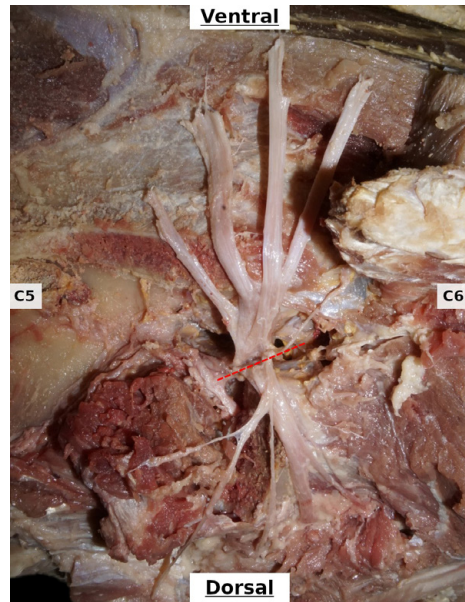


Abbildung 3:
Austritt des rechten Spinalnervens aus dem Foramen intervertebrale zwischen 5. und 6. Halswirbel (laterale Ansicht)
Die rote Linie markiert die Grenze zwischen den Anteilen des Dorsalastes (unterhalb) und denen des Ventralastes (oberhalb)
© Matilda Gromeier

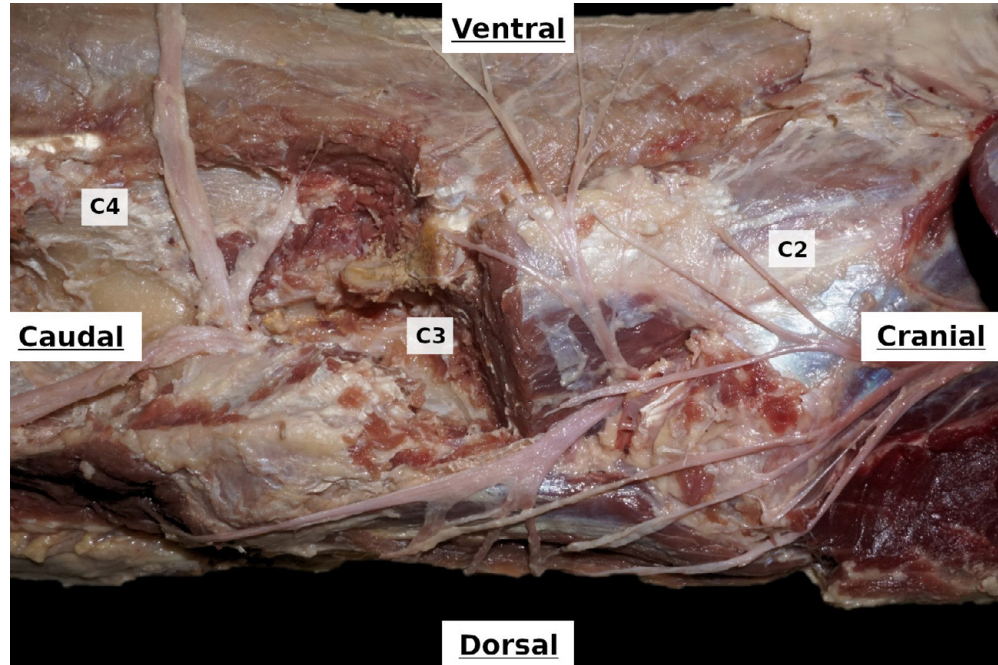


Abbildung 4:
Austritt des 2.-4. linken Spinalnervens (laterale Ansicht), Darstellung des Nervenplexus im kranialen Abschnitt des Halses
© Matilda Gromeier

Darstellung der Nervi spinales

Zunächst wurde der jeweilige Spinalnerv von verschiedenen Foramina intervertebraalia aus verfolgt und dabei versucht, gegebenenfalls einen Gelenkast des Nerven darzustellen. Regelmäßig zweigte sich der Nervus spinalis kurz nach dem Austritt aus dem Wirbelkanal in einen Ramus dorsalis und ventralis auf (Abbildung 3, Abbildung 4).

Betrachtung von Strukturen in unmittelbarer Nähe des Gelenkes

Im zweiten Präparationsansatz wurde direkt an der Gelenkkapsel nach makroskopisch sichtbaren Nervenästen oder feinen Plexus gesucht. Dazu wurde zunächst der rechte Processus articularis cranialis von C6 mit der oszillierenden Knochensäge entfernt. An der auffällig straffen Gelenkmembran ließen sich keine Nervenäste makroskopisch darstellen (Abbildung 5).

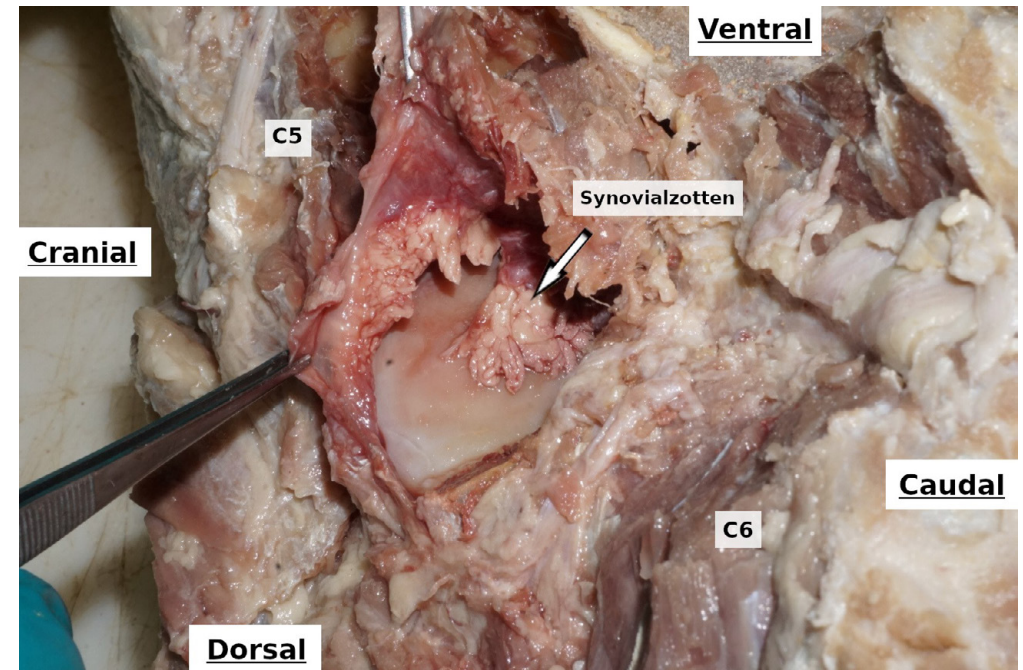


Abbildung 5:
Aufsicht auf die Gelenkfläche des rechten Processus articularis caudalis (C5) (kaudo-ventro-laterale Ansicht) nach Entfernung des Processus articularis cranialis (C6, siehe Abbildung 6)
© Matilda Gromeier

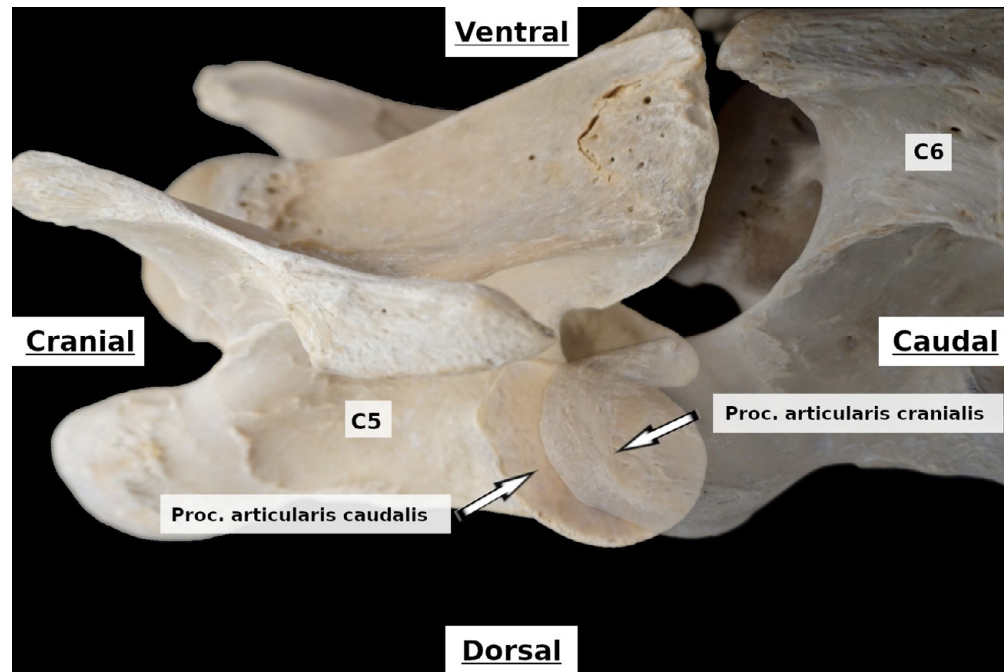


Abbildung 6:
Darstellung des Skelettes zur Veranschaulichung der Lage des Processus articularis caudalis in Abbildung 5
(kaudo-ventro-laterale Ansicht)
© Matilda Gromeier

Histologische Untersuchung

Zur Sicherung der makroskopischen Befunden wurden Proben für die histologische Untersuchung von periartikulärem Gewebe, von der Gelenkkapsel und von freipräparierten Nervenästen entnommen, in Paraffin eingebettet und nach GOLDNER gefärbt (Abbildung 7).

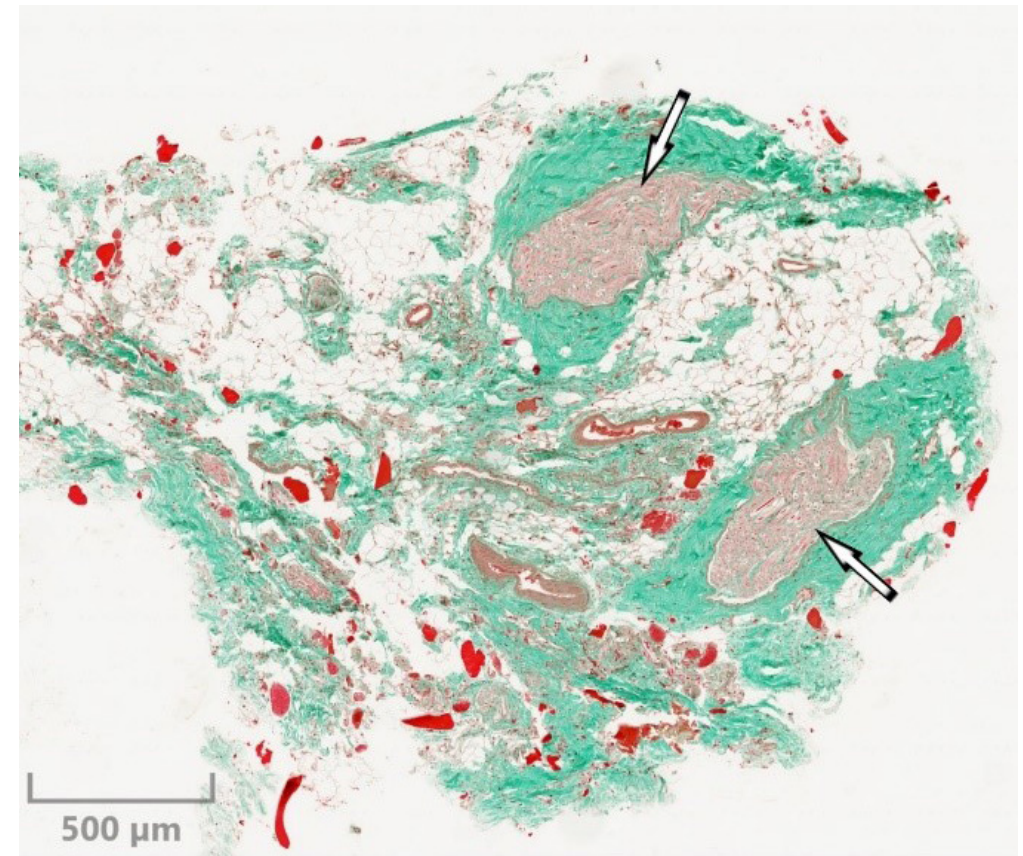


Abbildung 7:
Gelenkast („Ramus articularis ventralis“) des rechten 5. Spinalnerven (Färbung Goldner)
Nachweis von Nervengewebe in den Schnitten aus den „Ramus articularis ventralis“ (Pfeile)
© PD Dr. Rebecca Kenngott

Ergebnisse und Ausblick

Im Verlauf der Untersuchung wurde der Ramus dorsalis des Spinalnerven zunächst außerhalb des Foramen intervertebrale auf Kapseläste untersucht, die direkt vom Zwischenwirbelloch zum Gelenk ziehen. Zwar verzweigten sich die Rami dorsales stark in teilweise sehr filigrane Äste, allerdings zog keiner dieser Äste makroskopisch eindeutig zur Gelenkkapsel. So war zwar an zwei Gelenken (C5 / C6 der ersten untersuchten Halswirbelsäule; C2 / C3 der zweiten Halswirbelsäule) ein Nervenast darstellbar, welcher jeweils zum Facettengelenk zog, eine Aufzweigung in die entsprechende Gelenkkapsel war jedoch nicht eindeutig erkennbar.

Nach Abtragen der Gelenkfortsätze und Erweitern des Foramen intervertebrale zwischen C5 / C6 ließ sich ein dünner Ast (ca. 0,7 mm) darstellen, der vom Spinalnervstamm nach der Vereinigung der dorsalen und ventralen Spinalnervnervenzel lateral direkt zur Gelenkkapsel zog. Dieser Ast wurde als „Ramus articularis ventralis“ bezeichnet. Er konnte bei allen untersuchten Gelenken der ersten Halswirbelsäule regelmäßig dargestellt werden (Abbildung 8). An der zweiten Halswirbelsäule waren die beschriebenen Äste ebenfalls darstellbar, allerdings dort eher schwächer ausgeprägt.

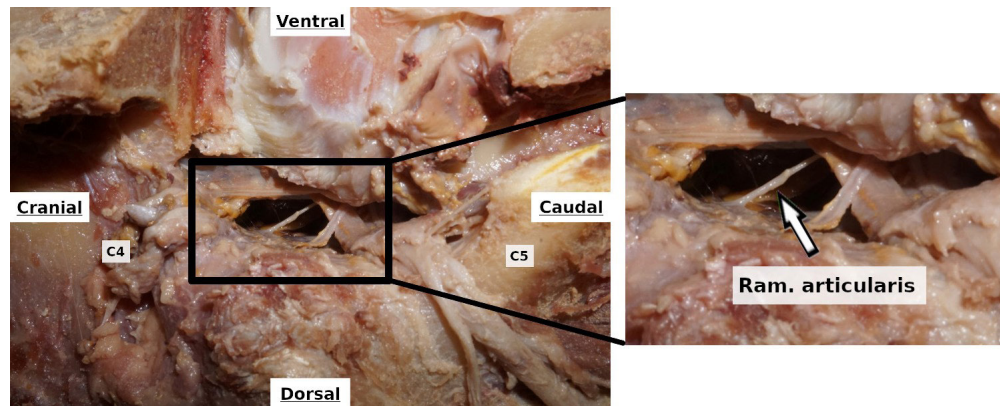


Abbildung 8: Darstellung des Spinalnervenaustritts zwischen C4 / C5 rechts. Im vergrößerten Ausschnitt rechts ist der Ramus articularis ventralis („Ramus articularis“) zu sehen.
© Matilda Gromeier

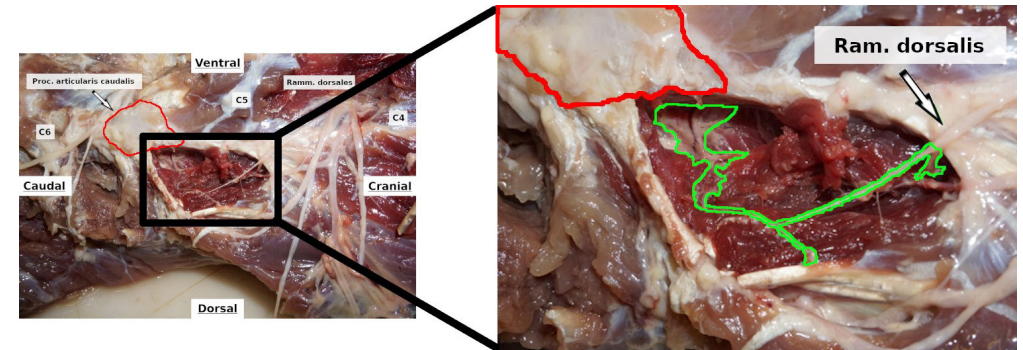


Abbildung 9: Darstellung des Spinalnervenaustritts zwischen C4 / C5 links mit dem Verlauf des Ramus articularis dorsalis („Ramus dorsalis“) durch die Anteile der Mm. multifidi zum kaudal folgenden Wirbelgelenk zwischen C5 / C6. rot umrandet – kaudaler Gelenkfortsatz C5; grün umrandet – Ramus articularis dorsalis
© Matilda Gromeier

Ein weiterer Präparationsansatz war es, die Verzweigungen von Nervenästen eines Halsnerven durch die entsprechenden Muskeln (Mm. multifidi) hindurch zum nächsten Halswirbel zu verfolgen. Dies konnte bei C5 / 6 und C4 / 5 eindeutig dargestellt werden (Abbildung 9). Die geringe Zahl an nachgewiesenen Nervenästen dorsal ist teils dem Umstand geschuldet, dass diese feinen Äste makroskopisch außerordentlich schwierig darstellbar sind.

Zusammenfassend lässt sich folgende Aussage treffen: Für die dorsolaterale Versorgung ist mutmaßlich ein zarterer dorsaler Nervenast zuständig, der vom vorzähligen Spinalnerv abzweigt, kaudal gerichtet durch die epaxiale Muskulatur hindurch zum Gelenk zieht. Dieser Ast muss als „Ramus articularis dorsalis“ bezeichnet werden, alleine schon um Verwechslungen zu vermeiden. Der regelmäßig vorkommende, oben als „Ramus articularis“ bezeichnete Ast, versorgt mutmaßlich vor allem die ventromedialen Anteile der Gelenkkapsel. Demnach ist dieser Ast als „Ramus articularis ventralis“ zu bezeichnen.

Letzterer ist für die Therapieentwicklung bei Gelenkproblemen nicht zielführend. Die schwer zugängliche Position des Ramus articularis ventralis im Wirbelkanal und seine große Nähe zum Rückenmark sind z.B. für eine lokale Anästhesie höchst riskant für den Patienten.

Der lateral leichter zugängliche Verlauf des zweiten darstellbaren Nervenastes, Ramus articularis dorsalis (C5 / C6 der ersten untersuchten Halswirbelsäule; C2 / C3 der zweiten Halswirbelsäule), ist für einen Therapieansatz mittels Injektion besser geeignet. Jedoch konnte dieser Nervenast nur bei den genannten Gelenken eindeutig dargestellt werden.

Die Nervenverzweigungen innerhalb der Muskulatur sind für einen möglichen Therapieansatz momentan noch schwer zu bewerten. Hierzu müssen weiterführende Untersuchungen nach dem Verlauf des Nervenastes und der Injektionsstelle durchgeführt werden.

Persönliche Erfahrung und Danksagung

Die gesammelten Erfahrung während der Durchführung des Projekts kann man nur, wie sehr gut im Englischen ausgedrückt, als eye opening einstufen.

Zu Beginn war mein persönliches Ziel, meine noch groben Präparierfähigkeiten zu verbessern. Für die Feinpräparation brauchte es viel Geduld, lange Konzentrationsfähigkeit und eine gewisse Strategie. Zum Glück war die Neugierde groß genug, um nicht zu verzweifeln. Die Anstrengung lohnte sich, da in relativ kurzer Zeit zahlreiche Ergebnisse erarbeitet werden konnten. Dank der vielfältigen Tätigkeiten habe ich einen ersten Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten erhalten, was mir sehr gefallen hat. Aktuell bin ich mir noch sicherer geworden, was meine zukünftige Karriere nach dem Studium betrifft: die Chirurgie. Große Träume einer jungen Studentin haben jetzt etwas mehr an Substanz gewonnen.

Der Vortrag, den ich dann zum Projekt gehalten habe, war auch eine große Herausforderung für mich. Nicht nur das Gestalten der Präsentation, sondern auch das Erlernen, Befunde effizient mitteilen zu können, stellten eine wertvolle Erfahrung für meine weitere Ausbildung dar.

Durch die enge Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Kenngott und Herrn Prof. Dr. Maierl habe ich auch Einblicke in die Arbeit am Lehrstuhl erworben, wodurch mein Respekt für alle Mitarbeiter nur noch mehr gewachsen ist.

Somit bedanke ich mich herzlich für das Vertrauen, das Frau PD Dr. Kenngott und Herr Prof. Dr. Maierl in mich gesetzt haben. Auch bin ich dankbar für die Unterstützung durch die Präparatoren, besonders Herrn Badebo und Herrn Hecher, und das Team der Histologie. Ich hoffe, dass meine Leistung für alle befriedigend war.

Mein erstes Projekt im Rahmen des VETResearch Programmes kann ich als Erfolg ansehen und hoffe in der Zukunft, weiter in diesem Programm tätig sein zu können.

Charakterisierung der Wirkung von Buprenorphin am Rezeptor

Isabel Kersting

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer, Dr. Maximilian Muehlhaupt

Einleitung

Unser VETResearch Projekt widmete sich der Wirkung von Buprenorphin am caninen μ -Opioidrezeptor (cMOR). Opioide wie Buprenorphin werden in der Kleintiermedizin häufig verwendet. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirkeigenschaften haben diese Wirkstoffe verschiedene Einsatzgebiete. Fentanyl beispielsweise, ein klassisches, starkes Analgetikum, wird vor allem zur Behandlung intra- und postoperativer Schmerzen eingesetzt. Buprenorphin hingegen wirkt nur schwach analgetisch und verstärkt die Wirkung sedativer Analgetika. Es wird daher zur Behandlung postoperativer Schmerzen und zur Sedation eingesetzt. Interessanterweise wirken beide Arzneistoffe über die Bindung am gleichen Rezeptor, dem μ -Opioidrezeptor. Der Unterschied, welcher für die unterschiedlichen Wirkeigenschaften verantwortlich ist, liegt in der Art der Aktivierung des Rezeptors. Fentanyl gilt als voller Agonist, das heißt, er aktiviert durch seine Bindung die nachgeschaltete Signalkaskade in vollem Ausmaß. Buprenorphin gilt dagegen als partieller Agonist, das heißt, er ist nur unvollständig in der Lage, die nachgeschaltete Signaltransduktion in der Zelle zu aktivieren und einen Effekt auszulösen. Wie genau diese unvollständige Signaltransduktion des Buprenorphins aussieht und wie der klinische Effekt ausgelöst wird, ist allerdings noch weitgehend ungeklärt und stellt die grundsätzliche Fragestellung dieses Projektes dar.

Buprenorphin ist ein halbsynthetisches Morphinan, welches aus dem Opium-Alkaloid Thebain hergestellt wird. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass es eine sehr hohe Affinität zum μ -Opioidrezeptor des Hundes besitzt, welche die des Fentanyls sogar noch um einiges übersteigt. Seine intrinsische Aktivität hingegen ist sehr gering bis kaum nachweisbar.

Um die klinische Wirkung auf Zellebene erklären zu können, haben wir in diesem Projekt die Regulation des μ -Rezeptors des Hundes nach Bindung von Fentanyl und Buprenorphin vergleichend dargestellt. Bei der Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, zu denen auch der μ -Opioidrezeptor zählt, werden im Zuge der intrazellulären Signalkaskade Proteinkinasen aktiviert, welche dann den Rezeptor an spezifischen Phosphorylierungsstellen phosphorylieren. An diesen phosphorylierten Rezeptor binden in der Folge verschiedene regulatorische Proteine, die Arrestine. Sie verhindern eine Wiederankopplung des G-Proteins und bewirken eine Internalisierung, das heißt, der Rezeptor wird von der Zellmembran entfernt und ins Zellinnere geschleust. Von Arrestin 3 ist zudem bekannt, dass es weitere Signalkaskaden in der Zelle auslöst, welche möglicherweise die Wirkung des Liganden beeinflussen.

Experimentelles Vorgehen und Ergebnisse

Im Rahmen dieses Projektes haben wir in einer ersten Versuchsreihe das Phosphorylierungsmuster und in einer zweiten Versuchsreihe die Arrestinbindung näher untersucht, jeweils nach Buprenorphin- und Fentanylbehandlung, vergleichend zueinander. Wir haben die Vorgänge unter dem Mikroskop an HEK 293 Zellen dargestellt, welche den caninen μ -Opioidrezeptor (cMOR) stabil exprimieren. Um die Vorgänge sichtbar machen zu können, haben wir verschiedene Antikörper eingesetzt. In der ersten Versuchsreihe zur Darstellung des Phosphorylierungsmusters am cMOR, haben wir zunächst an den extrazellulär gelegenen N-Terminus des Rezeptors einen HA-Tag angefügt. Das ist eine spezifische Aminosäuresequenz, welche von HA-Antikörpern erkannt und gebunden wird. Über diesen Antikörper können alle Rezeptoren der Zelle dargestellt werden, egal ob der Rezeptor reguliert wurde oder nicht. Zudem kamen zwei Antikörper am intrazellulären C-Terminus zum Einsatz. Dort befinden sich verschiedene Phosphorylierungsstellen. Der Hund besitzt insgesamt neun, von denen wir in diesem Projekt zwei näher untersucht haben. Zum einen das Serin 378 und zum anderen das Serin 398. Das Serin 378 besitzt besondere Relevanz, da in der Literatur am Rezeptor der Ratte gezeigt werden konnte, dass dieses Serin die Phosphorylierungsstelle ist, welche in der Kaskade als Erstes phosphoryliert wird und als Schrittmacher wirkt. Das heißt, sie wird am μ -Opioidrezeptor der Ratte nach Aktivierung von jedem Agonisten phosphoryliert und stellt somit einen sicheren Marker für die vorherige Aktivierung des Rezeptors dar. Die zweite ausgewählte Phosphorylierungsstelle, das Serin 398, ist von Interesse, da es sich um die spezifische Phosphorylierungsstelle des cMOR handelt. Durch speziesspezifische Abweichungen in der Aminosäuresequenz des caninen Rezeptors ergibt sich beim Hund diese zusätzliche Phosphorylierungsstelle im Vergleich zu anderen Tierarten, wie der Ratte. Diese könnte für speziesspezifische Besonderheiten der Wirkung des Buprenorphins beim Hund verantwortlich sein. Sowohl die Antikörper für die beiden Serine, als auch den HA-Antikörper, haben wir selbst in Kaninchen hergestellt. Mittels eines sekundären Anti-Kaninchen-Antikörpers, welcher mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff FITC gekoppelt ist, lassen sich alle drei Primärantikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen.

In der zweiten Versuchsreihe zur Darstellung der Arrestinrekrutierung wurden zusätzlich Arrestin 2 und 3 angefärbt. Um eine Parallelfärbung mit den FITC-gefärbten Rezeptoren zu ermöglichen, war es notwendig, Anti-Arrestin-Antikörper zuzukaufen, welche aus einer anderen Tierart als dem Kaninchen gewonnen wurden. Wir haben in den Versuchen Anti-Arrestin 2 und 3 Antikörper eingesetzt, welche in Mäusen produziert wurden, und diese dann mittels eines mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Rhodamin gekoppelten sekundären Anti-Maus-Antikörpers angefärbt.

Beide Versuchsreihen haben wir zunächst grob mit einem Keyence Fluoreszenzmikroskop und anschließend detaillierter mit einem konfokalen Mikroskop ausgewertet. Zur besseren Orientierung kam noch ein dritter Farbstoff zum Einsatz, der Kernfarbstoff DAPI. Dieser färbt die Zellkerne der HEK 293 Zellen an, indem er sich in die DNA einlagert. Somit interferiert er auch nicht mit den beiden über Antikörper vermittelten Färbungen.

Kriterium zur Auswertung der ersten Versuchsreihe war die Lokalisation der grünen Fluoreszenzsignale der Anti-S378- und Anti-S398-Antikörper. Ein Fluoreszenzsignal kommt generell nur nach Phosphorylierung des entsprechenden Serins zustande, das heißt, ein nicht phosphorylierter Rezeptor wird nicht angefärbt. Im Zuge der Regulation stellen sich phosphorylierte und internalisierte Rezeptoren als fokal im Zytoplasma gebündelte Fluoreszenzsignale dar, denn von der Zellmembran entfernte inaktive Rezeptoren lagern sich typischerweise im Zytoplasma in Vesikeln zusammen.

Zellen mit angefärbtem Serin 378 stellten sich in unseren Versuchen wie folgt dar: Sowohl bei unbehandelten Zellen, als auch bei Zellen, welche jeweils eine Stunde mit Buprenorphin oder Fentanyl behandelt wurden, waren fokal gebündelte Fluoreszenzsignale im Zytoplasma erkennbar, welche eine Phosphorylierung und Internalisierung des Rezeptors anzeigen. Das Serin 378 scheint somit beim Hund basal phosphoryliert zu sein. Liganden wie Buprenorphin oder Fentanyl haben daher auch keinen weiteren Effekt mehr auf die Phosphorylierung dieser Aminosäure.

Zellen mit angefärbtem Serin 398 verhielten sich anders. An unbehandelten Zellen waren kaum Fluoreszenzsignale nachweisbar. Das spricht für das Vorhandensein von aktiven, unphosphorylierten Rezeptoren, welche wir ohne Behandlung mit Liganden auch erwartet hatten. Nach jeweils einstündiger Fentanyl- oder Buprenorphinbehandlung zeigten sich typische fokal gebündelte Fluoreszenzsignale aus dem Zytoplasma, wie sie auch beim Serin 378 zu beobachten waren. Wir konnten dabei keinen Unterschied zwischen Fentanyl- und Buprenorphin-behandelten Zellen feststellen. Das Serin 398 scheint sich also wie eine klassische Phosphorylierungsstelle zu verhalten, im Grundzustand liegt sie im nicht phosphorylierten Zustand vor und wird nach Ligandenbindung im Zuge der Regulation des Rezeptors phosphoryliert (Abbildung 1).

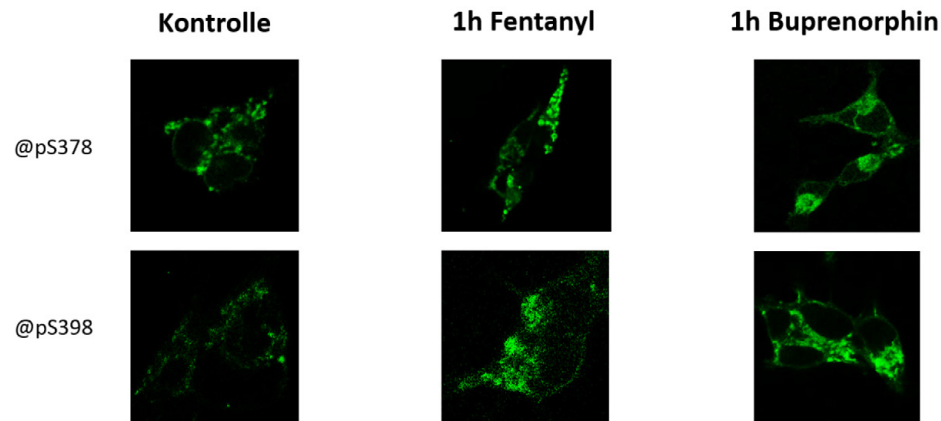


Abbildung 1: Darstellung der Rezeptorphosphorylierung an den Phosphorylierungsstellen S378 und S398 des cMOR mittels Immunzytochemie.

Kriterium für die Auswertung der zweiten Versuchsreihe war die Überlagerung grüner und roter Fluoreszenzsignale. Ist das Arrestin an den phosphorylierten Rezeptor gebunden, so überlagern sich das grüne Signal des HA-Antikörpers, welches den Rezeptor markiert, und das rote Signal des Anti-Arrestin 2 bzw. Arrestin 3 Antikörpers zu einem gelben Signal.

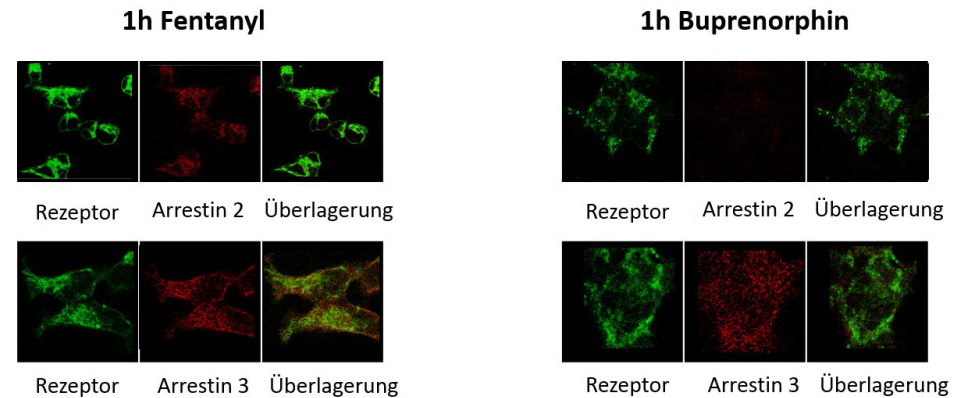


Abbildung 2: Darstellung der Rekrutierung von Arrestin 2 und 3 durch Fentanyl und Buprenorphin im konfokalen Mikroskop.

Bei Zellen mit angefärbtem Arrestin 2 waren sowohl nach einstündiger Buprenorphin- als auch nach einstündiger Fentanylbehandlung keine gelben Fluoreszenzsignale nachweisbar. Grüne und rote Signale lagen nebeneinander verteilt im Zytoplasma der Zellen, was darauf schließen lässt, dass Arrestin 2 im Zuge der Internalisierung nicht von den Rezeptoren rekrutiert wird, sondern weiter ungebunden im Zytoplasma liegt.

Zellen mit angefärbtem Arrestin 3 stellten sich nach entsprechender Buprenorphinbehandlung ebenso dar. Wir konnten auch hier keine gelben Fluoreszenzsignale nachweisen. Nach einstündiger Fentanylbehandlung hingegen waren deutliche gelb fluoreszierende Signale erkennbar (Abbildung 2). Fentanyl scheint durch seine Bildung also Arrestin 3 zu rekrutieren, dies entspricht den Untersuchungen am Rezeptor der Ratte.

Zusammenfassung

Wir konnten somit feststellen, dass weder das Phosphorylierungsmuster der beiden von uns untersuchten Phosphorylierungsstellen noch die Rekrutierung von Arrestin 2 oder 3 die klinische Wirkung von Buprenorphin erklären können. Die Phosphorylierungsstelle S378 scheint beim Hund basal phosphoryliert zu sein, daher kann Buprenorphin hier keinen nachweisbaren Effekt ausüben. An der Phosphorylierungsstelle S398 ist zwar eine Phosphorylierung nach Bindung von Buprenorphin am Rezeptor nachweisbar, die aber keine Rekrutierung der Arrestine auslöst. Buprenorphin ist also im Gegensatz zu Fentanyl nicht in der Lage, alle

Schritte der Regulationskaskade des Rezeptors auszulösen. Es stellt sich die Frage, ob die durch Buprenorphin phosphorylierten Rezeptoren nach Phosphorylierung inaktiv sind oder weiterhin aktivierbar in der Zellmembran vorliegen.

Persönliche Einschätzung

Mir hat das VETResearch Projekt sehr viel Spaß gemacht. Es hat mir die Möglichkeit geboten, mich mit einem Themengebiet, welches mich interessiert, selbst intensiver wissenschaftlich zu beschäftigen. Besonders interessant fand ich zu sehen, wie man von einer aus der Praxis hervorgehenden wissenschaftlichen Fragestellung über Grundlagenforschung auf Zellebene zu klinisch relevanten Ergebnissen kommen kann, also zu sehen und zu verstehen, wie man mit bunten Zellfärbungen unter dem Mikroskop klinische Wirkungen am lebenden Tier erklären kann. Das war sehr spannend und ich habe mich in der Arbeitsgruppe sehr wohl und gut betreut gefühlt. Daher würde ich VETResearch auf jeden Fall auch an andere Studenten weiterempfehlen. Solche studentischen Forschungsprojekte bieten meiner Meinung nach eine tolle Möglichkeit für Studierende, einen Einblick zu bekommen, wie es ist, an einer wissenschaftlichen Fragestellung zu arbeiten, vor allem für Studenten, die noch darüber nachdenken, ob sie eine Doktorarbeit schreiben wollen oder nicht. Man wird über Tätigkeiten, die man z.B. in einem Praktikum sehen würde, hinaus involviert und bekommt einen guten Einblick in den Gesamttablauf von der wissenschaftlichen Fragestellung bis hin zur Präsentation der Ergebnisse. Auch die Abschlusspräsentationen im Rahmen des VETResearch Retreats haben mir gut gefallen. So bekommt man als Student einen kleinen Überblick über die vielen verschiedene Themengebiete, die von der Fakultät als wissenschaftliche Arbeiten angeboten werden.

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.

Quantitative analysis of fish behaviour via video monitoring as health indicator in research systems

Dominik von La Roche
Lehrstuhl für Fischkrankheiten und Fischereibiologie
Betreuer: Univ.-Prof. Dušan Palić

Einleitung

Die Beobachtung des Verhaltens von Fischen ist ein integraler Bestandteil der klinischen Untersuchung. Sie ist die meist genutzte nicht-invasive Technik, um den Gesundheits- und Allgemeinzustand von Fischen zu beurteilen.

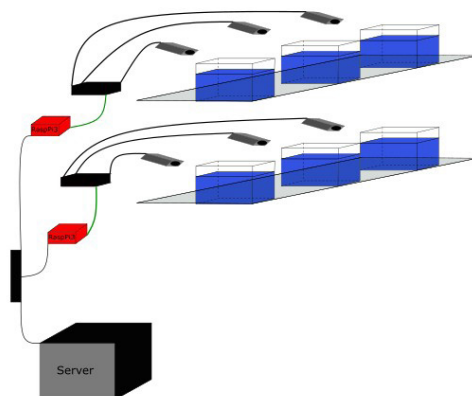
Solche Beobachtungen werden normalerweise von geschultem oder anderweitig qualifiziertem Personal durchgeführt; sie beinhalten die visuelle Überprüfung der Fische und das Festhalten der Ergebnisse in schriftlicher Form. Allerdings kann diese direkte Form der Interaktion zwischen Mensch und nicht-domestizierten Tieren Verhaltensmuster zu einem gewissen Grad verändern. Daher ist eine Möglichkeit, diese Interaktionen zu minimieren vor allem in Versuchstierhaltungen nötig, da die Tiere dort möglicherweise zusätzlichem Stress ausgesetzt sind. Mit den Fortschritten in der Videoüberwachungstechnik und im Bereich der Bewegungserkennung/-analyse durch Software, versuchen wir den Tier-Mensch-Kontakt auf ein Minimum zu reduzieren, indem wir direkte visuelle Kontrollen durch Menschen mit einem verlässlichen und finanziell tragbaren Videoüberwachungssystem ersetzen.

Um dieses Ziel zu erreichen, haben wir eine Kombination aus kostengünstigen Bestandteilen und Software auf dem aktuellen Stand der Technik benutzt, um verlässlich Fischbewegungen zu detektieren und automatisch Daten zu sammeln.¹

Methodik und experimentelles Setup

Sechs 50-Liter-Glasbecken wurden mit je einer Kamera (TechNet C018 Full HS) im Abstand von 40 cm ausgestattet. Die Kontrolle/Steuerung der Kameras erfolgte über Raspberry-Pi 3 Minicomputer per USB-Verbindung (= VSS video surveillance System).

Zwei VSS wurden per Switch (TP-Link TL-SG105) mit dem Intranet der Einrichtung verbunden. Über sie wurden Bilder gesammelt und auf einem auf unsere Bedürfnisse angepassten Server gespeichert, um diese im weiteren Verlauf zu analysieren.



Der Server ist mit einer Festplatte mit hoher Kapazität (8 TB) ausgestattet und einem Standardprozessor. Diese sind in einem platzsparenden Gehäuse verbaut. Für die Aufnahme von Bildern wurde ein Programm in C++ geschrieben, dessen Hauptaufgabe es ist, über vordefinierte Zeiträume, Bilderserien von einzelnen Aquarien zu erstellen. Die Einzelbilder werden dann von den Mini-Computern (Raspberry-Pi) über das Intranet mit einem Zeitstempel auf dem Server gespeichert. Für die Positionsbestimmung, Klassifikation und Erkennung der Fische und deren Bewegungen wird ein Mask R-CNN framework für künstliche Intelligenzen, wie vorgestellt von He, Kaiming² verwendet. Das framework wird in einem Python Skript in Intervallen aufgerufen und übernimmt die Segmentierung sowie die Positionsbestimmung der Fische. Der Server bietet die Grundvoraussetzungen um eine solche künstliche Intelligenz zu trainieren und um die Klassifizierung durchzuführen.

Die Becken wurden für Test- und Filmaufnahmen mit je 6 adulten Zebrafischen (*Danio rerio*) aus dem Bestand des Lehrstuhls besetzt.

Weiterer Ausblick/Diskussion

Weitere Schritte sind, dass das VSS in das bestehende Überwachungssystem des Lehrstuhls und somit die routinemäßige Überprüfung des Gesundheitsstatus integriert wird mit dem Ziel, eine 24/7 Überwachung der Bewegungsabläufe zu ermöglichen. Das VSS soll dann Bewegungen, die nicht der zuvor dem System antrainierten Norm entsprechen, erkennen und melden, um so ein möglichst frühzeitiges Einschreiten des Pflegepersonals zu ermöglichen. Nachdem immer mehr verschiedene Fischarten in der Forschung eingesetzt werden, sind Themen wie Enrichment und dessen Einfluss auf Verhalten und Wohlergehen auch im Fischbereich ein zunehmend wichtigeres Thema.³

Die Studie von Brydges und Braithwaite zeigt, dass Environmental Enrichment keinen Einfluss auf das Verhalten bei *Gasterosteus aculeatus* zeigt, während andere Publikationen (Kadry und Barreto⁵) reduziertes Aggressionsverhalten bei *Geophagus brasiliensis* durch Environmental Enrichment zeigen.

Daher sehen wir einen eindeutigen Bedarf an weiterer Forschung zu dieser Thematik bei verschiedenen in Versuchstierhaltung gehaltenen Fischarten.

Ein wirtschaftliches und nutzerfreundliches Überwachungssystem, wie das von uns entwickelte, kann hier einen weit größeren Nutzen zeigen als die reine Gesundheitsüberwachung. Ein mögliches weiteres Einsatzgebiet wäre die Analyse von Fischverhalten/-bewegungen in verschiedenen eingerichteten Becken, um den Tieren möglichst optimale Haltungsbedingungen zu ermöglichen.

Im weiteren Verlauf unserer Studie werden auch verschiedene Enrichmentmaterialien (Kunstpflanzen, Höhlen etc.) hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung des Überwachungssystems untersucht.

Quellen

1. Kane, Andrew S. et al. (2004): "A video based movement analysis system to quantify behavioural stress response of fish" 2004 Water Research Vol 38 Issue 18
2. He, Kaiming et al. (2017): "Mask R-CNN." 2017 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV): n. pag. Crossref. Web.
3. Williams et al. (2009): "Environmental enrichment for fish", Laboratory Animals Volume 43 April 2009
4. Nichola M. Brydges and Victoria A. Braithwaite (2009): "Does environmental enrichment affect the behaviour of fish commonly used in laboratory work?"; Applied Animal Behaviour Science, Volume 118, Issues 3-4, May 2009, pages 137-143
5. Vivian Oliveira Kadry and Rodrigo Egydio Barreto (2010): "Environmental enrichment reduces aggression during resident-intruder interactions", Neotropical Ichthyology, 8(2):329-332, 2010

Danksagung und eigene Erfahrung

Ich möchte mich zuerst bei Herrn Prof. Dušan Palić bedanken, der nicht nur ermöglicht hat, dieses Projekt in seiner Tierhaltung durchzuführen, sondern mich auch jederzeit voll unterstützt hat.

Ein großer Dank geht ebenfalls an Herrn Pascal Bawidamann, der mit mir gemeinsam die Idee zu dem Projekt hatte und uns bei der Planung und Umsetzung eine unglaublich große Hilfe war und immer noch ist.

Ein weiterer Dank gilt meinen Kollegen am Lehrstuhl für Fischkrankheiten und Fischereibiologie, Herrn Hasegawa, Frau Miljatovic und Frau Hussein für die Betreuung unserer Fische. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei dem Team von VETResearch, das dieses Projekt finanziell erst ermöglicht hat.

VETResearch war für mich eine sehr gute Möglichkeit, erstmals in das wissenschaftliche Arbeiten hineinzuschnuppern und Erfahrungen in einem Gebiet zu sammeln, das weit über den normalen Studienstoff hinausgeht.







Quantitative analysis of fish behaviour via video monitoring as health indicator in research systems

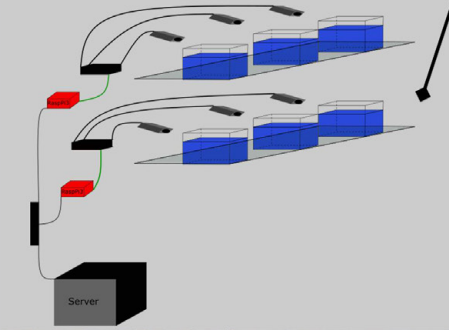
P. Bawidamann^a, D. von La Roche^b, D. Palić^b
^aB.Sc. Biology LMU, Computer Science TU Munich
^bChair of Fish Diseases and Fisheries Biology, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich

Introduction

Commonly used approach to assess fish health and welfare status in research facilities is based on visual inspection of the fish by trained qualified personnel. Such direct contact may interfere with both normal and abnormal behaviour patterns, reducing likelihood of observing potential problems. Therefore, in animal testing facilities where testing subjects may be exposed to additional stress, it is likely beneficial to investigate alternative observational techniques to reduce interference of human observers to a minimum. To accomplish this goal, a combination of low-cost parts and state of the art machine learning technology is used to reliably track fish movements and automatically assess collected behavioral data¹.

Materials

- Three 50 L glass tanks were equipped with cameras (one camera per tank) which are controlled via Raspberry-Pi 3 minicomputers (shortly: video surveillance system, VSS).
- Two identical VSSs were connected via a switch to facility intranet and collected images were stored for further processing on a customized server.
- The server is equipped with a high capacity storage drive and a standard processor fit into a small form factor case.





↓ (V)AI Processing ↓



Discussions/further steps

Further steps are to incorporate the surveillance system in routine monitoring of fish health status in the research facility and allow 24/7 behavioural monitoring. With different fish species becoming popular as research subjects, environmental enrichment and its influence on behaviour and welfare of the fishes is becoming a topic of importance³. As studies^{4,5} show heterogeneous results of the influence of environmental enrichment on fish behaviour, further science-based evaluation is needed.

CONCLUSIONS

Presented VSS may be used to detect changes in movements and behaviour of novel fish laboratory model species in differently enriched tanks, suggesting the researchers the direction toward optimal husbandry conditions. Our study will continue to investigate potential interference of various enrichment materials (PVC plants, tiles/caves etc.) with detection and analytical abilities of the VSS hardware and software in order to optimize VSS use in laboratory conditions.

Conflict of interest

There is no financial, occupational or any other personal interest in any product, service and/or a company that is referred to in this study.

Funding

Financed by Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Lehre@VET

References

¹Kane, Andrew S. et al. (2004). "A video based movement analysis system to quantify behavioural stress response of fish" 2004 Water Research Vol 38 Issue 18
²He, Kaiming et al. (2017): "Mask R-CNN." 2017 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV): n. pag. Crossref. Web.
³Williams et al. (2009): "Environmental enrichment for fish", Laboratory Animals Volume 43 April 2009
⁴Nichola M. Brydges and Victoria A. Braithwaite (2009): "Does environmental enrichment affect the behaviour of fish commonly used in laboratory work?"; Applied Animal Behaviour Science, Volume 118, Issues 3-4, May 2009, pages 137-143
⁵Vivian Oliveira Kadry and Rodrigo Egydio Barreto (2010): "Environmental enrichment reduces aggression during resident-intruder interactions", Neotropical Ichthyology, 8(2):329-332, 2010

Methods

- For automatic image acquisition, application software was written in C++ to record bursts of images and save them on the server.
- For identification and tracking of fish movement the Mask R-CNN framework as introduced by He, Kaiming et al² was implemented in a Python script to segment images and extract the position of fish.
- This artificial intelligence supported approach of video surveillance ((V)AI) is more accurate than traditional random forest detections.

Vorkommen von psychrophilen Clostridien in vakuumverpacktem Rindfleisch aus dem deutschen Handel

Richard Lindner

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit
Betreuer/in: Sirkka Mang, Dr. Samart Dorn-In

Hintergrund und Zielsetzung

Psychrophile Clostridien sind schon seit 1989 als Verderbserreger von vakuumverpacktem Rindfleisch bekannt [2, 4]. Es handelt sich hierbei um ubiquitär vorkommende, grampositive, obligat anaerobe Sporenbildner. Häufige Vertreter sind beispielsweise *C. estertheticum* und *C. frigoriphilum*. Kennzeichnend für den mikrobiellen Verderb von vakuumverpacktem Fleisch durch psychrophile Clostridien - auch Blown Pack Spoilage genannt - sind starke Gasbildung und ein damit verbundenes Aufblähen der Verpackung sowie ein deutlicher Verderbsgeruch. Trotz der immensen wirtschaftlichen Einbußen durch verdorbenes Fleisch ist über die Belastung von Rindfleisch aus dem deutschen Handel mit psychrophilen Clostridien wenig bekannt. Deshalb wurden im Rahmen dieses Projektes Rindfleischproben auf das eventuelle Vorkommen von Clostridien untersucht.

Methodik

Insgesamt wurden 60 vakuumverpackte Rindfleischproben aus dem Handel im Großraum München untersucht. Alle Proben wurden nach dem Erwerb bei 4 °C für 8 Wochen gelagert. Während der Lagerung wurde wöchentlich der Fleischsaftaustritt beurteilt sowie die bakterielle Gasbildung über den sogenannten Blown-Pack-Score (Abbildung 1 & 2) eingeschätzt. Nach erfolgter Lagerung wurde abschließend, neben abermaliger Beurteilung von Blown-Pack-Score und Fleischsaftaustritt, die Fleischbeschaffenheit protokolliert sowie die Unversehrtheit der Verpackung kontrolliert.

Der Fleischsaft wurde mittels einer sterilen Kanüle entnommen und der Verderbsgeruch beurteilt. Anschließend wurde vom Fleischsaft ein Ausstrich auf einer Columbia-Blut-Agar Platte angefertigt sowie eine PYGS-Bouillon mit 1 ml des Fleischsaftes beimpft [5]. Beide Medien wurden bei je 4 °C und 10 °C für 3 Wochen anaerob bebrütet. Aus dem Fleischsaft wurde nun die DNA extrahiert (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Scientific). Mit der gewonnenen DNA wurde anschließend eine qPCR mit SYBR Green I als Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt. Die dabei verwendeten Primer sind spezifisch für die Gattung *Clostridium*. Zusätzlich wurde eine Multiplex-qPCR mit 5 sequenzspezifischen Sonden durchgeführt, um gezielt auf psychrophile Clostridien zu untersuchen [3]. Bei Proben, die sowohl bei der SYBR-PCR, als auch bei der Sonden-PCR ein negatives Ergebnis zeigten, wurde das Vorgehen mit der bebrüteten PYGS-Bouillon wiederholt, um eine Kontamination mit psychrophilen Clostridien endgültig auszuschließen.



Abbildung 1: BPS 0



Abbildung 2: BPS 4-5

Abbildung 1 & 2: Exemplare der Klassifizierung des Blown-Pack-Scores [1]: 0: keine Gasblasen, Verpackung liegt überall dicht an; 1: einzelne Gasblasen sichtbar, Verpackung liegt dicht an; 2: scheinbarer Vakuumverlust, zwischen Folie und Fleisch kleine Hohlräume; 3: Vakuumverlust offensichtlich, zwischen Folie und Fleisch großflächige Hohlräume; 4: Packung ist auf volle Größe aufgebläht, Folie noch nicht straff; 5: Verpackung ist prall aufgebläht, Folie straff gespannt

PCR-Produkte, die mit der Sonden-PCR bzw. SYBR-PCR positiv auf psychrophile Clostridien getestet wurden, sich aber nicht bis auf Speziesebene identifizieren ließen, wurden anschließend aufgereinigt und sequenziert (Eurofins Genomics).

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 3 zeigt exemplarisch eine Multiplex-qPCR mit Sonden für psychrophile Clostridien und für die Spezies *C. estertheticum* und *C. frigoriphilum*. Von den 60 getesteten Proben waren 29 Proben und damit rund 48 % mit psychrophilen Clostridien kontaminiert. Die Verteilung auf die unterschiedlichen Spezies ist in Abbildung 4 dargestellt. *C. estertheticum* wird oft als hauptverantwortliche Spezies für den Verderb durch psychrophile Clostridien bei rotem Fleisch angegeben und wurde in der Vergangenheit häufig nachgewiesen. Allerdings ließ sich diese Spezies hier nur in 2 Proben nachweisen. Dahingegen erwiesen sich 16 der Proben als kontaminiert mit *C. frigoriphilum*. Auffällig war ebenfalls, dass 9 Proben *C. algidicarnis* bzw. *C. putrefaciens* enthielten. Während *C. algidicarnis* bereits in vakuumverpackten Rindfleischproben aus São Paulo, Brasilien nachgewiesen wurde [6], trat *C. putrefaciens* in den letzten Jahrzehnten kaum in Erscheinung. Über das Vorkommen von beiden Spezies in Deutschland wurde bislang noch nicht berichtet. Anhand der Sequenz der 16S rRNA ließ sich über die durchgeführte Sequenzierung nicht zwischen den beiden Arten differenzieren. Die endgültige Differenzierung wird im Rahmen künftiger Arbeiten am Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit erfolgen.

Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass psychrophile Clostridien auch in vakuumverpacktem Rindfleisch aus dem deutschen Handel bedeutende Verderbserreger darstellen.

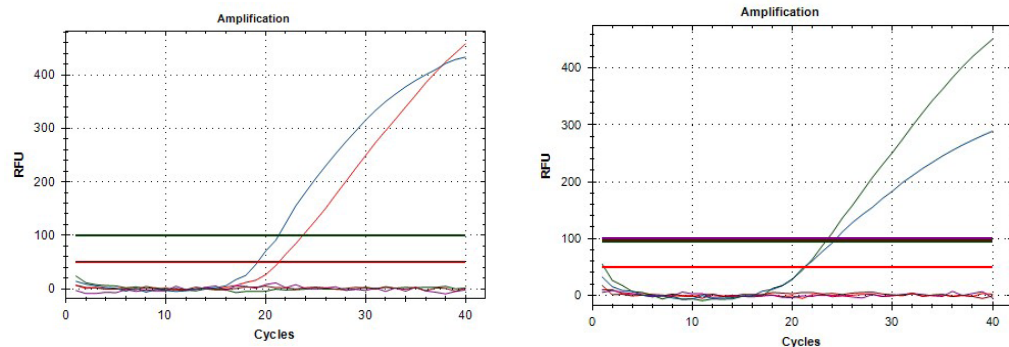


Abbildung 3: Multiplex-qPCR mit je einer Sonde für psychrophile Clostridien (Signal blau) und einer spezifischen Sonde. links: Probe 2 positiv für *C. frigidophilum* (Signal rot); rechts: Probe 46 positiv für *C. estertheticum* (Signal grün)

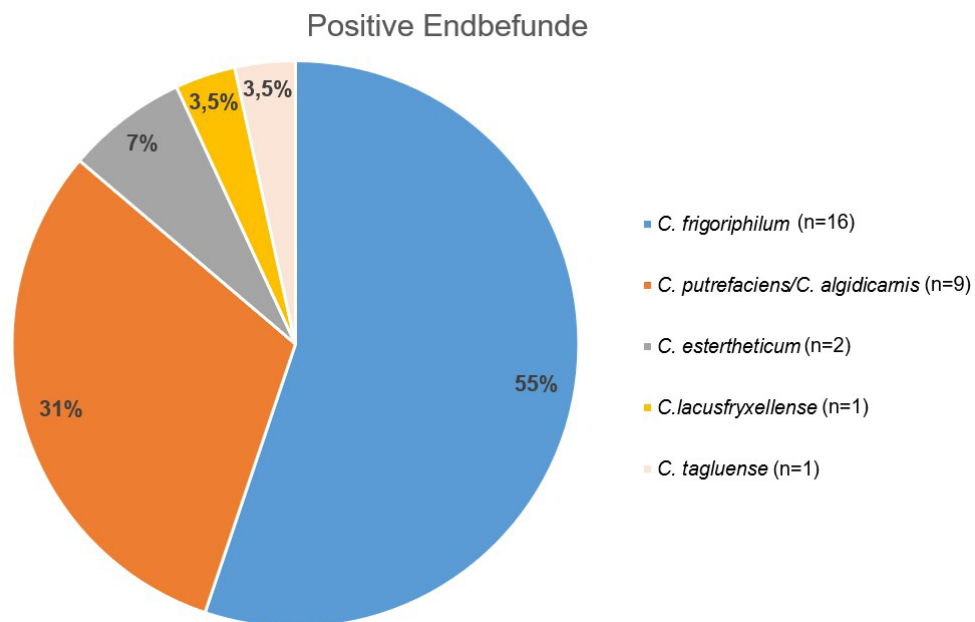


Abbildung 4: Verteilung der positiven Endbefunde

Persönliche Erfahrung

Die Arbeit an meinem Projekt war für mich eine gute Möglichkeit, theoretisch erworbenes Wissen zu vertiefen und praktisch anzuwenden. VETResearch ist ein gutes Konzept für alle Studenten, die im Rahmen einer kleinen Studie selbstständiges und wissenschaftliches Arbeiten erlernen wollen. Ich habe mich für das Projekt entschieden, um zu sehen, ob eine spätere Arbeit in der Forschung für mich in Frage kommt. Trotz kleinerer Rückschläge und der allzu oft repetitiven Arbeitsschritte hat es mir sehr viel Spaß gemacht, mich mit einem Thema vertieft auseinanderzusetzen. Ich kann mir nun sehr gut vorstellen, nach dem Studium im Rahmen einer Promotion im Labor zu arbeiten.

Mein Dank gilt besonders meiner Betreuerin Sirkka Mang, die mich geduldig und kompetent mit den Arbeiten im Labor vertraut gemacht und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Auch möchte ich meinem Betreuer Dr. Samart Dorn-In danken, der das Projekt begleitet hat und für Fragen aller Art immer zur Verfügung stand.

Referenzen

- [1] Boerema, J.A., Broda, D.M., Penney, N., Brightwell, G. (2007): Influence of peroxyacetic acid-based carcass rinse on the onset of "blown pack" spoilage in artificially inoculated vacuum-packed chilled beef, *Journal of Food Protection* (Ausgabe 70), Seite 1434–1439.
- [2] Dainty, R. H.; Edwards, R. A. und Hibbard, C. M. (1989): Spoilage of Vacuum-Packed Beef by A Clostridium Sp, *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Band 49), Nr. 4, Seite 473-486.
- [3] Dorn-In, S.; Schwaiger, K.; Springer, C.; Barta, L.; Ulrich, S.; Gareis, Mh. (2018): Development of a multiplex qPCR for the species identification of Clostridium estertheticum, C. frigidophilum, C. bowmanii and C. tagluense-like from blownpack spoilage (BPS) meats and from wild boars. *International Journal of Food Microbiology* 286, 162–169.
- [4] Kalchayanand, N.; Ray, B.; Field, R. A. und Johnson, M. C. (1989): Spoilage of Vacuum-Packaged Refrigerated Beef by Clostridium, *Journal of Food Protection* (Band 52), Nr. 6, Seite 424-426.
- [5] Lund, B.M.; Graham, A.F.; George, S.M.; Brown, D. (1990): The combined effect of incubation temperature, pH and sorbic acid on the probability of growth of non-proteolytic, type B Clostridium botulinum. *J. Appl. Bacteriol.* (4), 481–492.
- [6] Silva, A.; Paulo, E.; Sant'Ana, A.; Chaves, R.; Massaguer, P. (2011): Involvement of Clostridium gasigenes and C. algidicarnis in 'blown pack' spoilage of Brazilian vacuum-packed beef. *International Journal of Food Microbiology* 148(3), 156-163.

Food Fraud – falsche Deklaration von Lebensmitteln: Unterscheidung zwischen Lebergewebe von Kälbern und ausgewachsenen Rindern mittels MALDI – TOF MS

Michelle Müller

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie
Betreuer: Dr. Sebastian Ulrich

Hintergrund

Die amtliche Lebensmittelüberwachung überprüft unter anderem die Authentizität von Lebensmitteln. Dies gilt ebenfalls im Fall von Leber, die für den menschlichen Verzehr vorgesehen ist. Lebern von älteren Tieren werden oftmals als Lebern von Kälbern umdeklariert. Kälberlebern werden zu höheren Preisen gehandelt (Kalb: ca. 27,50 €/kg vs. Kuh: 9,40 €/kg). Bislang ist es mit herkömmlichen Methoden nicht möglich, die Leber eines Kalbes von der eines ausgewachsenen Rindes sicher zu unterscheiden. Dieser Mangel an sicheren Methoden ermöglicht es, dass es immer wieder zu Lebensmittelbetrug kommt, der nur schwer nachweisbar ist.

Im Rahmen des VETResearch Projekts wurde geprüft, ob eine Alterszuordnung der Leberproben mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie möglich ist. Anschließend sollte diese Methode dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) zur Verfügung gestellt werden.

Material und Methodik

Die Untersuchungen wurden mit Leberproben (n=13), gewonnen durch amtliche Tierärzte an verschiedenen Schlachthöfen innerhalb Bayerns, durchgeführt. Von den insgesamt 13 Proben waren 6 Proben von Kälbern und 7 Proben von Rindern.

Mit Hilfe eines sterilen Skalpels wurden die Leberproben in ca. 2 mm² große Stücke geschnitten. Anschließend wurden diese Proben in einem 1 ml Reagenzgefäß mit 200 µl organischem Lösungsmittel homogenisiert. Danach wurde das Gemisch für etwa 10 Sekunden gemischt, bevor es in einer Zentrifuge bei 14000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert wurde.

Von dem Überstand wurde 1 µl auf ein MALDI Target gegeben und trocknen gelassen, wonach sofort 1 µl CHCA (alpha-cyano-hydroxymizsäure)-Matrix aufgetragen und auch trocknen gelassen wurde.

Die MALDI-TOF MS Messung erfolgte im Massenbereich von 0 – 20 kDa mittels einer automatischen Messmethode. Das Massenspektrometer wurde vor jeder Messung anhand eines

Bakterien-Test-Standards (Massenbereich: 3637,8 Da - 16952,3 Da) kalibriert. Zur Auswertung der Ergebnisse diente die FlexAnalysis, FlexControl und ClinProTools-Software (Bruker Daltoniks GmbH, Bremen).

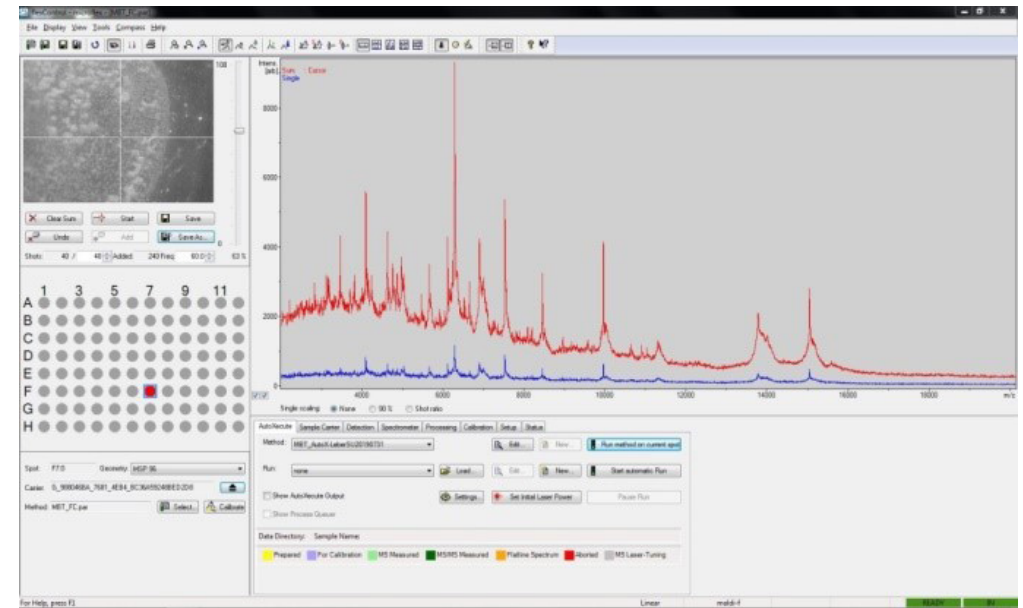


Abbildung 1: Ergebnisse der Messung einer Leberprobe, dargestellt in FlexControl

Ergebnisse

Zuerst wurden verschiedene Modelle in Statistikprogrammen errechnet, wobei unter anderem eine interne Validierung von 100 %ig korrekt identifizierten Proben erreicht wurde. Dabei gab es in einem ClinProTools Modell vielversprechende spezifische Peaks, wobei zwei Peaks (im Massenbereich von 4086,68 Da und 6288,35 Da) besonders gut geeignet zu sein schienen.

Letztendlich war eine Validierung mit den Realproben jedoch mit nur bis zu 85 % möglich, so dass das Modell unserer Einschätzung nach noch nicht ausreichend ist, um den Unterschied zwischen Kalbs- und Rinderlebern sicher bestätigen zu können.

Dennoch liegt in dieser Methodik ein großes Potential, da noch Optimierungsmöglichkeiten bestehen, die man in weiteren Versuchsansätzen, z.B. in einer Doktorarbeit, fortführend untersuchen könnte. Es wäre möglich, die Extraktionsmethodik zu variieren und zum Beispiel eine Ethanol-Ameisensäure Extraktion anstatt der Extraktion mit Acetonitril zu wählen.

Persönliche Einschätzung

Durch das VETResearch Projekt habe ich erste Erfahrungen mit Laborarbeit sammeln sowie mir Kenntnisse in der Arbeit mit der MALDI-TOF MS Technik aneignen können. Zudem konnte ich Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens erlernen. In meinen Augen stellt VETResearch eine tolle Gelegenheit dar, Einblicke in die Arbeitswelt außerhalb der tiermedizinischen Klinik zu erlangen sowie Vorkenntnisse für die Doktorarbeit zu sammeln.

Ich danke Herrn Dr. Sebastian Ulrich für die Möglichkeit, an diesem spannenden Projekt mitarbeiten zu dürfen, sowie die kompetente und nette Betreuung. Zudem danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Lehrstuhls für Bakteriologie und Mykologie für die Aufnahme ins Team, insbesondere Frau Stefanie Hiereth und Herrn Christoph Kleinemeier. Zudem möchte ich mich bei Frau Dr. Barbara Schalch sowie Herrn Philipp-Michael Beindorf für die Beschaffung und Bereitstellung der Proben bedanken.

Bewertung des toxischen Potentials von *Bacillus thuringiensis* Isolaten

Janina Riegg

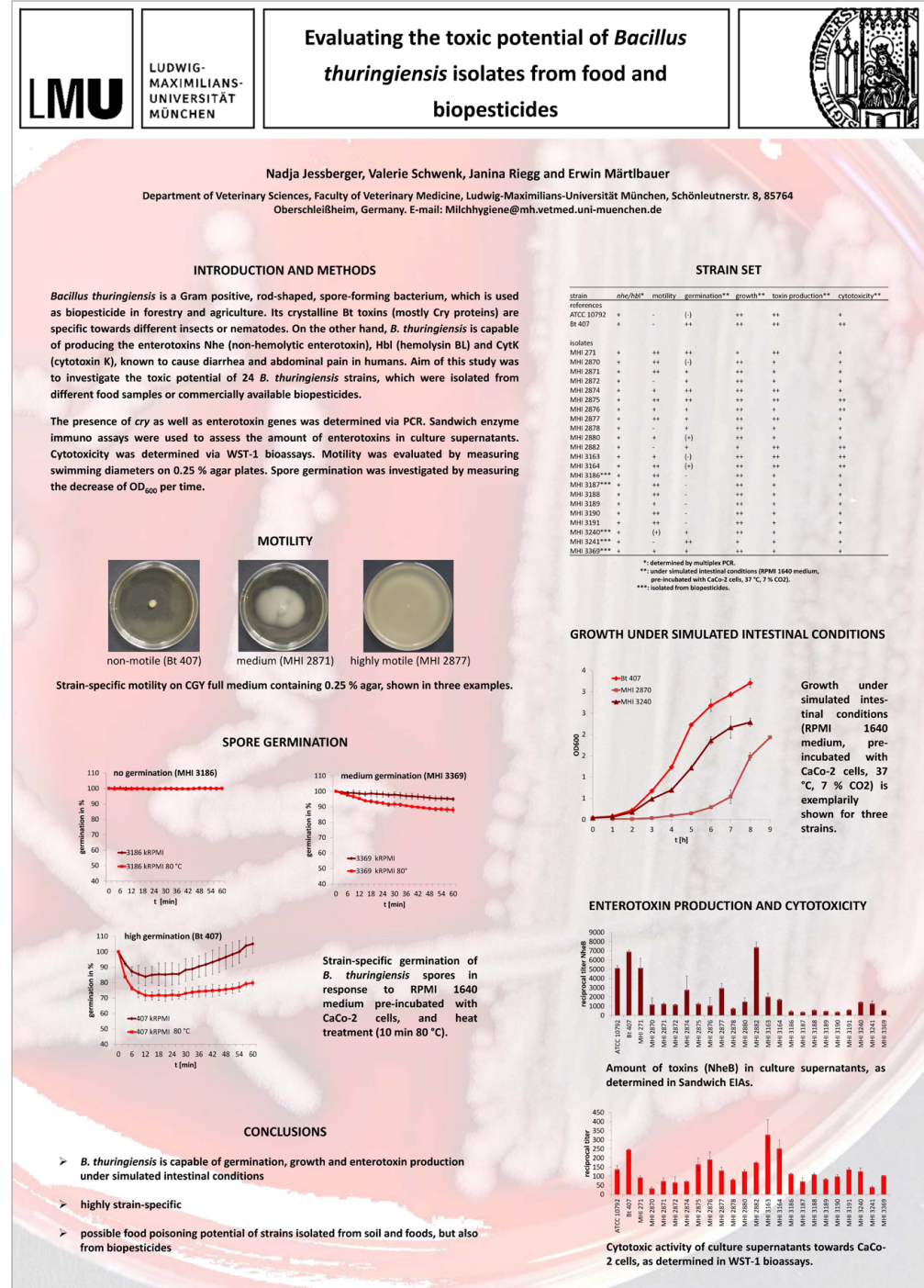
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
Betreuerin: Dr. Nadja Jeßberger

Bacillus thuringiensis ist ein grampositives, stäbchenförmiges, sporenbildendes Bakterium, das vor allem in der Land- und Forstwirtschaft als Biopestizid eingesetzt wird. Diese Wirkung entsteht durch die Produktion von kristallinen Bt-Toxinen (Cry-Proteinen), die spezifisch für verschiedene Insektenarten bzw. Nematoden sind. Die Vorteile bestehen darin, dass gänzlich auf chemische Pflanzenschutzmittel verzichtet werden kann und dass Bt-Toxine für Pflanzen und Wirbeltiere ungefährlich sind.

Auf der anderen Seite jedoch wird *B. thuringiensis* der *Bacillus cereus* Gruppe zugeordnet, d.h. ist genetisch eng verwandt mit dem Milzbranderreger *Bacillus anthracis* oder *Bacillus cereus*, welcher Lebensmittelinfektionen bzw. -intoxikationen auslösen kann. Es wurde bereits gezeigt, dass auch *B. thuringiensis* in der Lage ist, die Enterotoxine Hbl (Hämolysin BL), Nhe (nicht-hämolytisches Enterotoxin) und CytK (Cytotoxin K) zu produzieren, welche für abdominale Schmerzen und Diarrhö verantwortlich sind.

Ziel dieses Projekts war es, das toxische Potential von verschiedenen *B. thuringiensis* Isolaten, die am Lehrstuhl für Milchhygiene zur Verfügung stehen, zu ermitteln. Hierfür wurde zunächst die Präsenz der Enterotoxingene *nhe*, *hbl* und *cytK2* mittels PCR bestimmt. Anschließend wurden die Stämme unter Labor- und simulierten intestinalen Bedingungen kultiviert und die Menge an sekretierten Enterotoxinen mittels ELISA bestimmt. Die Toxizität der Isolate gegenüber humanen Darmepithelzellen wurde ermittelt, ebenso wie deren hämolytische Aktivität, Motilität sowie das Auskeimungsvermögen der Sporen.

Die Mehrzahl der getesteten *B. thuringiensis* Stämme war in der Lage, unter simulierten Darmbedingungen auszukeimen, sich zu vermehren und relevante Mengen an Enterotoxinen zu produzieren. Trotz hoher Stammspezifität muss daher von einem potentiellen Risiko für Lebensmittelinfektionen ausgegangen werden - sowohl bei Isolaten aus Boden- sowie Lebensmittelproben, aber auch bei Isolaten aus kommerziell verfügbaren Biopestiziden.



***Listeria monocytogenes* im „Viable But Not Culturable“ (VBNC)-Stadium – Rekultivierungsversuche zur Verbesserung der risikoorientierten Diagnostik**

Teilprojekt 1: Lebend-Tot-Differenzierung auf Basis einer PMA-qPCR

Anna-Sophia Stoll

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Betreuer/innen: PD Dr. Karin Schwaiger, Dr. Samart Dorn-In, Dr. Ulrike Friedlein

Hintergrund

Listeria monocytogenes besitzen in Anwesenheit bestimmter Stressoren die Fähigkeit, in einen „Viable But Not Culturable“ (VBNC)-Zustand überzugehen. Dieses Stadium erlaubt es ihnen, unter geringem metabolischem Aufwand, in einer Art Ruhezustand zu verweilen, in dem sie zwar weiterhin potentiell infektiös, aber nicht mit herkömmlichen Verfahren kultivierbar sind.

Der VBNC-Zustand kann die Lebensmittelsicherheit nachhaltig gefährden, wenn sich diese Listerien auf den Lebensmitteln befinden, aber nicht nachgewiesen werden können.

Ziel des Projekts

Ziel war die Differenzierung zwischen lebenden (inkl. Listerien im VBNC-Zustand) und toten *Listeria monocytogenes* mittels des Farbstoffs Propidium Monoazid (PMATM, Biotium, USA) und die anschließende Entwicklung einer qPCR, die sogenannte PMA-qPCR. Die Ergebnisse können dabei helfen, *Listeria monocytogenes* im VBNC-Zustand nachzuweisen und tragen somit zu einer zuverlässigeren Risikoeinschätzung bei.

Material und Methodik

Zunächst wurde *Listeria monocytogenes* (DSM 15675) auf Plate Count-Agar (37 °C, 48 h) inkubiert, anschließend ein Mc Farland von 1,0 (ca. 3×10^8 KbE/ml) eingestellt und zweimal jeweils 2,5 ml aliquotiert. Aliquot A bestand aus einer Frischkultur. Aliquot B wurde für 15 Minuten im Wasserbad auf 72 °C erhitzt, um die enthaltenen Listerien abzutöten.

Danach wurde mit beiden Aliquoten eine Verdünnungsreihe über eine Konzentrationsspanne von 1×10^8 - 1×10^2 KbE angelegt. Zur Überprüfung der Keimzahl wurden die mittels Mc Farland eingestellten Verdünnungen 10^4 - 10^2 KbE/ml kulturell untersucht. Zusätzlich wurden die Zellen der Verdünnung 10^7 KbE/ml mittels einer Thoma-Kammer unter dem Mikroskop gezählt. Die Verdünnungen 10^6 - 10^2 KbE/ml wurden für den Test der Lebend-Tot-Differenzierung weiterverwendet, welche in vier Varianten, je 500 µl, eingeteilt wurden: Frische und tote Kulturen, jeweils mit und ohne PMA (Endkonzentration: 50 µM). Der Versuch erfolgte im Dreifachansatz.

Im nächsten Schritt wurden alle Reaktionsgefäße abgedunkelt und bei 37 °C mit 550 rpm für 15 Minuten im Thermoblock (Eppendorf) inkubiert. Um das PMA mit der DNA der toten Zellen irreversibel zu verknüpfen, wurden alle Reaktionsgefäße auf Eis unter einer Halogen-Lampe (1000 W) im Abstand von 30 cm gelagert und von zwei Seiten jeweils 90 Sekunden bestrahlt. Mittels Zentrifugation wurde im nächsten Schritt ein Zell-Pellet gewonnen. Im Anschluss wurde die DNA Extraktion (Bioline ISOLATE II Genomic DNA Kit) und die qPCR mit Sonde durchgeführt. Das Primerpaar für *Listeria* spp. nach Somer und Kashi (2003) wurde modifiziert und es wurde eine Sonde für *Listeria monocytogenes* für diese Studie entwickelt.

Im zweiten Versuchsteil wurde die Toxizität des PMAs untersucht. Hierfür wurde, wie oben beschrieben, ein Mc Farland von 1,0 eingestellt und eine Verdünnungsreihe von 10^4 - 10^3 KbE erstellt. Nun wurden fünf Ansätze mit je 500 µl aus den Konzentrationen 10^4 - 10^3 KbE entnommen.

Eine Reihe stellte die Kontrollgruppe dar, die anderen Ansätze wurden jeweils mit den PMA-Konzentrationen 10 µM, 25 µM, 50 µM und 100 µM behandelt. Der weitere Ablauf entsprach dem ersten Versuchsabschnitt.

Ergebnisse und Diskussion

In den Durchgängen der Lebend-Tot-Differenzierung lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Gruppe der toten Listerien mit PMA (50 µM) und den anderen drei Ansätzen (frische und tote Kultur ohne PMA und frische Kultur mit PMA) erkennen. Abbildung 1 zeigt exemplarisch die qPCR-Kurve von toten Listerien (10^5 KbE/ml) mit PMA, welche unter der Nachweisgrenze lag, während die anderen drei Ansätze ein deutliches PCR-Signal erzeugten. Abbildung 2 zeigt die ausgewerteten qPCR Ergebnisse in $\log_{10}$ KbE/ml von drei unabhängigen Wiederholungen der Lebend-Tot-Differenzierung. Die DNA von toten Listerien bei Konzentrationen $\leq 10^4$ KbE/ml mit PMA ist nicht amplifizierbar. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei den Proben 10^5 KbE/ml und 10^6 KbE/ml der toten Listerien: Sie konnten zwar bei der PCR nachgewiesen werden, allerdings waren sie unter der Quantifizierungsgrenze (10^2 KbE/ml). Die Signale von frischen Listerien mit PMA erscheinen später als diejenigen der frischen und toten Kultur ohne PMA (Abbildung 2). Das könnte an zwei Gründen liegen: Entweder es liegen auch tote Zellen in der frischen Kultur vor und/oder das PMA wirkt toxisch.

Nach Angaben des Herstellers liegen die empfohlenen Konzentrationen von PMA zwischen 10 μM und 100 μM . Verschiedene Bakterienspezies können jedoch unterschiedlich auf PMA reagieren. Daher wurde im Rahmen dieses Projekts die Toxizität des PMAs zusätzlich überprüft. Abbildung 3 stellt die Ergebnisse der Wirkung von verschiedenen PMA-Konzentrationen auf die frische Kultur von *Listerien* (10^4 und 10^3 KbE/ml) dar. Die $\Delta \log$ Stufe der Konzentrationen 25 μM sowie 50 μM zwischen der frischen Kultur ohne PMA und mit PMA lag bei 0,3 $\log_{10}$, und mit 100 μM bei 0,6 $\log_{10}$. Auffällig ist, dass es nahezu keinen Unterschied zwischen der frischen Kultur ohne PMA und mit PMA bei einer Konzentration von 10 μM gibt sowie zwischen den Konzentrationen 25 μM und 50 μM . Hohe Konzentrationen von PMA (z.B. 100 μM) wirken zwar potentiell toxisch auf frische Kultur, jedoch mit geringem Ausmaß.

Nach den Ergebnissen dieser Untersuchung ist es möglich, die lebenden von den toten *Listeria monocytogenes* zu unterscheiden. Mit der oben beschriebenen Methode, der sogenannten PMA-qPCR, könnten daher VBNC-Zustände von *Listerien* in Lebensmitteln nachgewiesen werden.

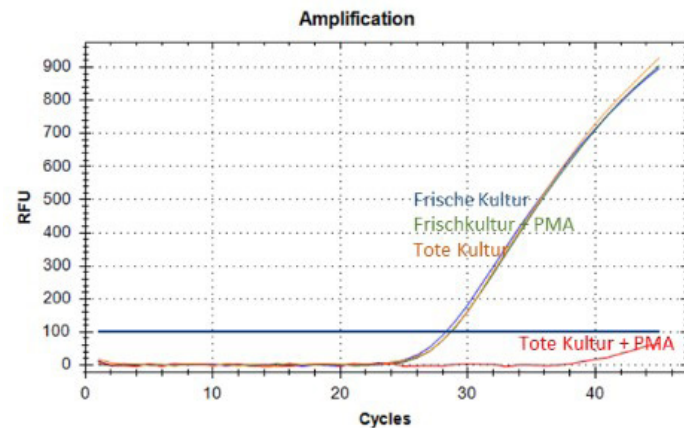


Abbildung 1: *L. monocytogenes*, Konzentration 10^5 KbE/ml: Ergebnisse der Lebend-Tot-Differenzierung mittels PMA-qPCR (RFU = Relative Fluorescence Unit)

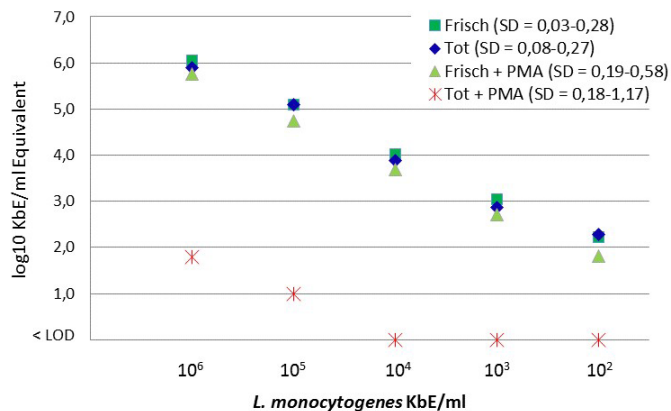


Abbildung 2: Ergebnisse der Lebend-Tot-Differenzierung von *L. monocytogenes* (Dreifachansatz) (SD = Standard Deviation; LOD = Limit of Detection)

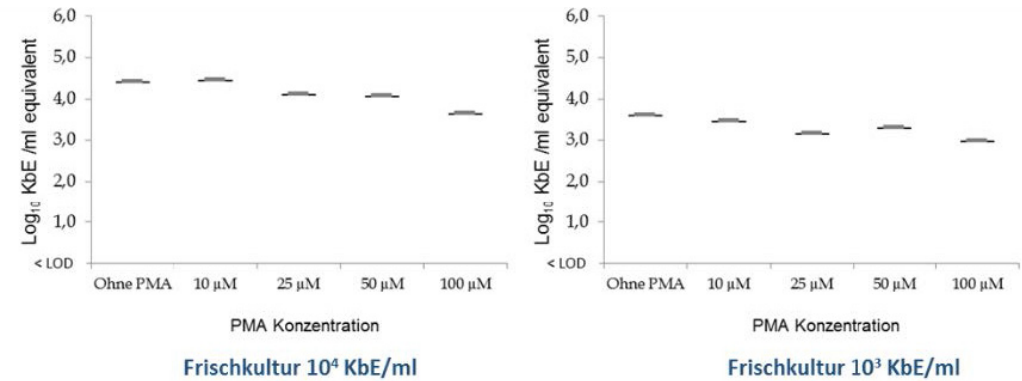


Abbildung 3: Ergebnisse der PMA-Toxizität; Überprüfung bei 10^4 und 10^3 KbE/ml mittels PMA-qPCR

Persönliche Erfahrungen

Als Laborneuling war die erste Woche ganz schön fordernd für mich. Wo stand was gleich nochmal? Muss ich jetzt Handschuhe wechseln? Und wie ging gleich dieser Mc Farland nochmal? Doch dank der geduldigen Einarbeitung durch Verena Hohenester erfasste mich bald der Laboralltag.

Es machte mir sehr viel Spaß, mein eigener Herr zu sein, fast selbst entscheiden zu können, was ich wann wie mache. Ich merkte, wie ich immer sicherer wurde, auch in der Literaturrecherche und z.B. immer schneller englischsprachige Paper verstand und für mich kategorisieren konnte.

So förderte das VETResearch Projekt nicht nur Grundkenntnisse zum Arbeiten im mikrobiologischen Labor und Erfahrung mit der qPCR, sondern auch Eigenverantwortung und Eigenrecherche.

Deswegen gilt ein großer Dank allen, die mir dies möglich gemacht haben.

Listeria monocytogenes im „Viable But Not Culturable“ (VBNC)-Stadium – Rekultivierungsversuche zur Verbesserung der risikoorientierten Diagnostik

Teilprojekt 2

Nadja Hillig

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Betreuer/innen: PD Dr. Karin Schwaiger, Dr. Samart Dorn-In, Dr. Ulrike Friedlein

Hintergrund

Listeria monocytogenes sind durch den Einfluss von externen Stressfaktoren, wie zum Beispiel Nährstoffmangel, in der Lage, in einen Ruhezustand überzugehen, in dem sie bei geringer metabolischer Aktivität lebensfähig und weiterhin potentiell infektiös sind. Da sie in diesem Zustand mit etablierten mikrobiologischen Methoden kulturell nicht nachweisbar sind, wird dieses Stadium als VBNC („Viable But Not Culturable“)-Stadium bezeichnet. Dieses Phänomen konnte bisher bei verschiedenen Bakterienspezies nachgewiesen werden und birgt großes Forschungspotential, nicht zuletzt da eine Listeriose insbesondere für Menschen mit schwachem Immunsystem schwerwiegende gesundheitliche Folgen haben kann. In der Vergangenheit traten bereits Listeriose-Fälle auf, ohne dass Listerien selbst nachgewiesen werden konnten.

Zielsetzung

Ziel des zweiten Teilprojektes war es, grundlegende Erkenntnisse über den VBNC-Zustand zu erhalten. Insbesondere die auslösenden Faktoren, ob und unter welchen Bedingungen eine Rekultivierung möglich ist, sowie ein gezielter Nachweis des VBNC-Zustandes auf Basis der PMA-qPCR des ersten Teilprojekts (siehe VETResearch Projekt Anna-Sophia Stoll) stellten die Forschungsschwerpunkte dar.

Material und Methodik

Zehn ausgewählte Teststämme der Spezies *Listeria monocytogenes* unterschiedlicher Herkunft (isoliert aus Milchprodukten, Schwein, Wild, Geflügel und Menschen) dienten als Grundlage für das Experiment. Zwei bereits beschriebene Methoden [1, 2] wurden durchgeführt, um die Listerien in den VBNC-Zustand zu überführen.

Nach Highmore et al. [1] wurden die Testbakterien mit einer Chlorlösung (12 ppm) versetzt und anschließend mittels PMA-qPCR untersucht.

Bei der zweiten Methode nach Lindbäck et al. [2] wurden die Listerien (5×10^7 KBE/ml) in Reinstwasser für sieben Wochen bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert und anschließend alle 10 Tage auf Blutagar ausgestrichen, um die Konzentration erneut zu bestimmen. Des Weiteren wurden mögliche morphologische Veränderungen der Testisolate mittels Gramfärbung mikroskopisch untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Trotz verschiedener Modifizierungen konnte der VBNC-Zustand durch die Methode nach Highmore et al. [1] in dieser Studie leider nicht nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen stellen entweder die, entgegen der ursprünglichen Annahme, vollständige Abtötung der Listerien durch die Chlorlösung oder das Hängenbleiben der Listerien im verwendeten Filter dar, welcher anschließend verworfen wurde.

Die Methode nach Lindbäck et al. [2] zeigte allerdings überraschende Ergebnisse.

Bis Tag 69 nahmen die Konzentrationen der Testisolate auf dem Blutagar stetig ab. Ab Tag 83 stieg die Konzentration bei drei von zehn Testbakterien wieder an (siehe Abbildung 1). Um eine mögliche Kontamination auszuschließen, wurde der Blutagar vor der nächsten Kultivierung an Tag 96 für 24 h bei 37 °C inkubiert. Hier konnte keine Kontamination des Agars festgestellt werden. Anschließend wurden alle zehn Testisolate mittels der entwickelten PMA-qPCR aus dem 1. Teilprojekt auf einen möglichen VBNC-Status untersucht.

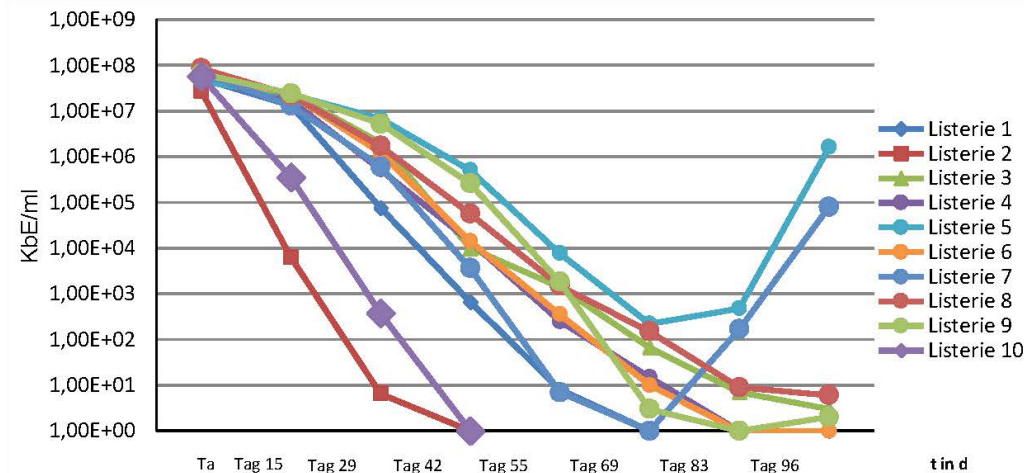


Abbildung 1: Konzentrationsverlauf der Testisolate

Es wurden auch morphologische Veränderungen der Listerien beobachtet (siehe Abbildung 2-4). Bei zwei Testisolaten bildeten sich im Grampräparat elongierte Zellen (siehe Abbildung 2). Bei den Testbakterien, die wieder Wachstum zeigten, zeigten sich im Grampräparat vor allem blau gefärbte Listerienzellen (siehe Abbildung 3), während bei den Testisolaten, deren Konzentration abnahm und konstant niedrig blieb, überwiegend rote Zellbestandteile zu beobachten waren (siehe Abbildung 4). Die blaue Färbung ist ein Hinweis auf vitale Bakterienzellen mit intakter Zellwand, während die rote Färbung der Zellen und Zellbestandteile ein Hinweis auf defekte Bakterienzellwände und somit tote Keime darstellt.

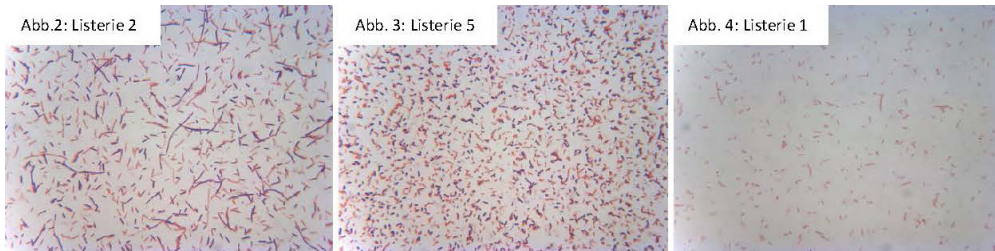


Abbildung 2-4: morphologische Unterschiede der Testisolate an Tag 96

Die Untersuchungen zeigen, dass Listerien teilweise über drei Monate ohne Nährstoffzugabe überleben können. Ob sie dabei immer in den VBNC-Zustand übergehen, muss in nachfolgenden Untersuchung geprüft werden.

Persönliche Erfahrungen

VETResearch hat mich sowohl persönlich als auch intellektuell weit gebracht. Besonders die ersten Wochen, geprägt von vielen neuen Eindrücken und bisher unbekannten oder nur im Biochemie Praktikum vorgestellten Arbeitsweisen, haben mir, zeitgleich mit Prüfungsvorbereitungen für das 2. Staatsexamen, strukturiertes zielorientiertes Arbeiten und ein optimales Zeitmanagement abverlangt. Während meiner 8-wöchigen Arbeit wurde mir erstmals bewusst, wie präzise im Labor gearbeitet werden muss, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Hier war für mich die größte Herausforderung, durch hochkonzentriertes, präzises Arbeiten einen identischen Versuchsaufbau über den gesamten Forschungszeitraum zu gewährleisten.

Trotz einiger Rückschläge und tagelangem Arbeiten ohne verwertbare Ergebnisse entwickelte sich unbewusst der Ehrgeiz, neue Erkenntnisse über den VBNC-Zustand herauszufinden. Das VETResearch Projekt im Bereich der Lebensmittelsicherheit zu machen war eine der besten Entscheidungen. Nicht nur, weil ich hier sehr selbstständig und ungezwungen arbeiten durfte, vor allem habe ich Einblick in ein Berufsfeld bekommen, das ich bis dahin noch nicht wirklich wahrgenommen hatte.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Mitarbeiter/innen des Lehrstuhls für die Unterstützung und Hilfestellung sowie für die geduldige Einarbeitung im Labor.

Referenzen

- [1] HIGHMORE, C. J., WARNER, J. C., ROTHWELL, S. D., WILKS, S. A. & KEEVIL, C. W. (2018) Viable-but-Nonculturable *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Thompson Induced by Chlorine Stress Remain Infectious. *mBio* 9, e00540-00518
- [2] LINDBÄCK, T., ROTTENBERG, M., E., ROCHE, S., M. & RØRVIK, L., MARIT (2010) The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Vet. Res.* 41, 08

Determination of particle size in different laboratory animal diets

Mara-Sophie Struck

Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik

Betreuerinnen: Dr. Linda Böswald, Prof. Dr. Ellen Kienzle

Persönliche Erfahrung

Ich habe beim VETResearch Projekt einen tollen Einblick in die Arbeit der Tierernährung, nicht nur in München, sondern auch in Hannover erhalten dürfen. Es hat Spaß gemacht, gerade auch an einem praktischen Forschungsprojekt zu arbeiten und bereits jetzt die Möglichkeit zu bekommen, an einem Lehrstuhl mitzuarbeiten. Ich bedanke mich von Herzen bei meiner Betreuerin und bei Frau Prof. Kienzle für die Gelegenheit, Teil vom diesjährigen VETResearch sein zu dürfen – ich empfehle das Programm mit seinen Möglichkeiten von Herzen jedem meiner Mitstudenten weiter.

Determination of particle size in different laboratory animal diets

M.-S. Struck

supervision L. F. Böswald, E. Kienzle

Chair of Animal Nutrition and Dietetics, Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-Universität München
In cooperation with the Institute for Animal Nutrition, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation

Introduction:

The dietary particle size influences digestibility and microbial fermentation in the gastrointestinal tract (1). This has a long-term impact on growth and health of the animal.

Previous studies on lab rats have already confirmed an effect of different particle sizes in wheat bran on gastrointestinal physiology, faecal quality and lipid metabolism (2,3).

In laboratory animal science, standardisation of experimental settings is essential to achieve reproducible results. It contributes to the implementation of the 3Rs (4), aiming at an ideal planning of trials (Refinement) and avoiding of unnecessary replications (Reduction).

The aim of this exploratory study was to examine the distribution of particle size of commercially available laboratory animal diets widely used in research facilities. A weighted average (5) was used as main test parameter to describe dietary particle size after wet sieving. The hypothesis was that the particle size distribution differs between diets of different brands and confection.

Material & methods:

- Commercially available standard maintenance and breeding diets for laboratory rodents and rabbits
 - n = 18 diets: 5 rabbit pellets maintenance, 2 rabbit pellets breeding, 4 rat/mouse pellets maintenance, 3 rat/mouse pellets breeding, 3 rat/mouse extrudate maintenance, 1 rat/mouse extrudate breeding
 - Samples of 30-40g dissolved in 1l aqua dest. + 10ml amylase overnight
 - Wet sieving through sieve stacks (pore sizes 3.15mm, 2.0mm, 1.4mm, 1.0mm, 0.8mm, 0.56mm, 0.4mm, 0.2mm; ISO 3310-1), flushing with 10l of cold tap water, oven drying overnight
 - Calculation of dMEAN according to Fritz et al. (5): $\sum_{i=1}^n p(i) \times \frac{S(i+1)+S(i)}{2}$ with i = number of the sieve, ordered in size from S(1) to S(n), and p(i) = percentage of particles retained at the size S(i). A lower dMEAN value indicates a smaller particle size of the sample.



Fig. 1: Example of residue in the smallest sieve (0.2mm) after completed sieving cycle.

Results:

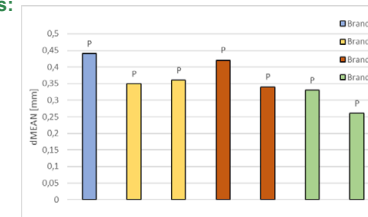


Fig. 2: Particle size distribution of different standard pelleted (P) maintenance diets for laboratory rabbits, described as dMEAN (mm). Products of 4 brands were analysed, indicated by colour.

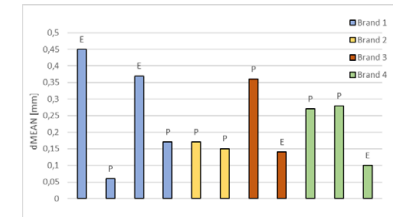


Fig. 3: Particle size distribution of different standard maintenance pelleted (P) and extruded (E) diets for laboratory rodents (rats & mice), described as dMEAN (mm). Products of 4 brands were analysed, indicated by colour.

- On average higher dMEAN particle size in rabbit diets (mean $\pm$ SD 38.44 $\pm$ 6.87mm) than in rat and mouse diets (59.44 $\pm$ 13.79mm)
- Especially in rat & mouse diets, high variation of dietary dMEAN within and between brands.
- No systematic differences between corresponding breeding and maintenance rabbit or rodent diets.
- No effect of processing (extrusion vs. pelleting).

Discussion:

The results show a high degree of variation in the weighted average particle size, calculated as dMEAN, between standard laboratory animal diets designed for maintenance and breeding, respectively.

In farm animals, the effect of feed particle size on diet utilisation and the intestinal microbiome is known (6-8). It can be assumed that the effect will be similar in laboratory animal species, i.e. rats, mice and rabbits. Thus, the dietary particle size may likely influence the outcome of experiments and should be taken into account when comparing results achieved under different feeding conditions.

Data from this orientational study can serve to generate an awareness of the issue with researchers who are not specialised in animal nutrition. Further research on a definite impact of dietary particle sizes in laboratory animals are needed. In regard of animal experiment standardisation, we recommend diet labels should contain information about the average particle size distribution and that this information should be contained in publications of animal experiment results.

References:

- (1) Amerah et al. (2007): World's Poultry Science Journal, Vol. 63, 439ff
- (2) Ranhotra et al. (1977): Journal of Food Science, Vol. 42, No. 6
- (3) Kahlon et al. (2011): Cereal Chemistry 79(4), 481-484.
- (4) Russel (1995): ATLA 0261-1929
- (5) Fritz, et al. (2011): Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition
- (6) Witte (2012): Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Tierernährung
- (7) Ruhnke et al. (2015): Poultry Science 00,1-8
- (8) Bjørndal et al. (1990): Physiological Zoology 63, no. 4, 710-721

Entwicklung einer Multiplex-qPCR für den Nachweis von Verderbserregern in „Gammelfleisch“

Judith Wiedemann

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Betreuer/innen: Eunike Bahlinger, Dr. Samart Dorn-In,
Univ.-Prof. Dr. Dr. Manfred Gareis, PD Dr. Karin Schwaiger

Um den Nachweis von „Gammelfleisch“ in erhitzten Wurstwaren zu ermöglichen, ist die kulturelle Anzucht keine geeignete Methode, da durch die Hitze einwirkung bei der Produktion die meisten Verderbserreger absterben (Borch et al, 1996).

Daher wurde eine Multiplex-Real-Time-PCR, auch Multiplex-qPCR genannt, zum Nachweis der hitzebeständigen bakteriellen DNA von Verderbserregern entwickelt. Diese PCR soll es in Zukunft ermöglichen, die Verwendung von verdorbenem Fleisch bei erhitzten Fleischprodukten nachzuweisen und somit einen erheblichen Beitrag für die Lebensmittelsicherheit und den Verbraucherschutz zu leisten.

Im Rahmen des VETResearch Projektes wurden die Ergebnisse der Quantifizierung des Bakteriengehaltes bei artifiziell verdorbenem Fleisch aus der mikrobiologischen Untersuchung mit den Ergebnissen der qPCR verglichen. Das Ziel war es, durch diesen Vergleich die Zuverlässigkeit der neu entwickelten Multiplex-Real-Time-PCR als Nachweismethode von Gammelfleisch zu validieren.

Bei den in diesem Projekt untersuchten Keimen handelte es sich um typische Verderbserreger von Fleisch unter aeroben Bedingungen, insbesondere *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta* und *Enterobacteriaceae* (EFSA, 2016). Ebenso wurden *Staphylococcus* spp. untersucht, die auf frischem Fleisch als Umweltkeime vorkommen können.

Im Rahmen des artifiziellen Fleischverderbs wurden je 2 kg Schweineschulter von 4 verschiedenen Metzgereien untersucht. Nach deren Zerkleinerung (in Würfel) wurden die Proben bei 4 °C für 20 Tage und bei 20 °C für 6 Tage gelagert und zu regelmäßigen Zeitpunkten auf die obengenannten Zielkeime untersucht. Dafür wurden jeweils 10 g Probenmaterial aus der Fleischoberfläche an Tag 0, 1, 2, 3, 6 (für den 22 °C Ansatz) und an Tag 0, 6, 13, 20 (für den 4 °C Ansatz) entnommen. Nach der Herstellung eines Homogenisats aus 10 g Probe aus der Fleischoberfläche mit 90 ml Verdünnungsflüssigkeit und der Erstellung einer Verdünnungsreihe, abhängig vom Verderbsgrad der jeweiligen Probe, wurden die Ansätze einerseits mikrobiologisch, andererseits molekularbiologisch untersucht. Für die kulturelle Methode wurden die Zielkeime auf vier selektiven Festmedien ausgespatelt und bei optimaler Bedingung des jeweiligen Keims bebrütet. Für die Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten (KbE) pro Gramm (g) Fleisch wurden die gewachsenen Kolonien nach 24 bis 48 Stunden ausgezählt und der KbE/g Gehalt berechnet. Zum Vergleich wurden DNA-Extrakte aus dem Homogenisat mittels neu entwickelter Multiplex-qPCR auf alle vier Zielkeime quantitativ untersucht.

Es konnte im anschließenden Vergleich beider Methoden festgestellt werden, dass die Ergebnisse sich kaum unterscheiden. Somit konnte durch das VETResearch Projekt gezeigt werden, dass die neu entwickelte Multiplex-qPCR geeignet ist, um typische Verderbserreger in künstlich verdorbenem Fleisch nachzuweisen und zu quantifizieren. In weiteren Versuchen soll nun überprüft werden, ob die qPCR ebenso für erhitzte Wurstwaren (z.B. Lyoner) verlässliche Ergebnisse liefert und somit die Lebensmittelsicherheit um ein bedeutendes Nachweisverfahren bereichern könnte.

Quellen

International Journal of Food Microbiology 33 (1996) 103-120 „Bacterial spoilage of meat and cured meat products“ (Borch et al, 1996)

Scientific Opinion of EFSA Journal, adopted June 2016 „Growth of spoilage bacteria during storage and transport of meat“ EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (EFSA, 2016)



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

TIERÄRZTLICHE FAKULTÄT
VETERINÄRWISSENSCHAFTLICHES DEPARTMENT

LEHRSTUHL FÜR LEBENSMITTELSICHERHEIT



Entwicklung einer Multiplex-qPCR für den Nachweis von Verderbserregern in "Gammelfleisch"

Judith Wiedemann, Eunike Bahlinger, Samart Dorn-In, Manfred Gareis, Karin Schwaiger

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit, Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), Oberschleißheim, Deutschland

Einleitung

Der Nachweis der Verwendung von „Gammelfleisch“ in erhitzten Fleischprodukten ist herausfordernd, da die kulturelle Methode nicht anwendbar ist. Aus diesem Grund werden molekularbiologische Methoden angewandt. Im Zuge des Projektes wurde eine Multiplex-qPCR für den Nachweis und die Quantifizierung von Verderbserregern (*Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae* [1]) und einem Umweltkeim (*Staphylococcus* spp. [2]) entwickelt. Primer und Sonden für die Zielkeime wurden bereits mit 60 Reinkulturen von verschiedenen Bakterien auf ihre Spezifität und Sensitivität getestet. Danach wurde die Multiplex-qPCR an artifiziell verdorbenem Fleisch angewandt. Der hier dargestellte Vergleich der Multiplex-qPCR mit der kulturellen Methode soll die Anwendbarkeit der entwickelten Multiplex-qPCR für „Gammelfleisch“ aufzeigen.

Material und Methoden

Insgesamt wurden 4 artifizielle Fleischverderbsversuche durchgeführt. Im Rahmen eines Versuchsdurchlaufs wurden jeweils 2 kg Schweinefleisch untersucht.

Artifizieller Fleischverderb von Schweinefleischproben (n = 4)
parallel in zwei Ansätzen: 22 °C Ansatz und 4 °C Ansatz

Entnahme von 10g Probenmaterial aus der Fleischoberfläche
an Tag 0, 1, 2, 3, 6 (22 °C Ansatz) und Tag 0, 6, 13, 20 (4 °C Ansatz)

Herstellung eines Homogenisats mit 90ml Peptonwasser

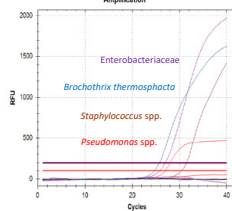
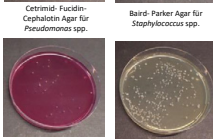
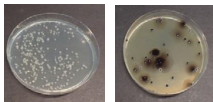
Erstellung einer Verdünnungsreihe

Anzucht der Zielkeime auf vier
selektiven Festmedien

DNA-Extraktion aus
Fleischhomogenisat

Auszählen der Kolonien (KbE/g Fleisch)

Multiplex- qPCR

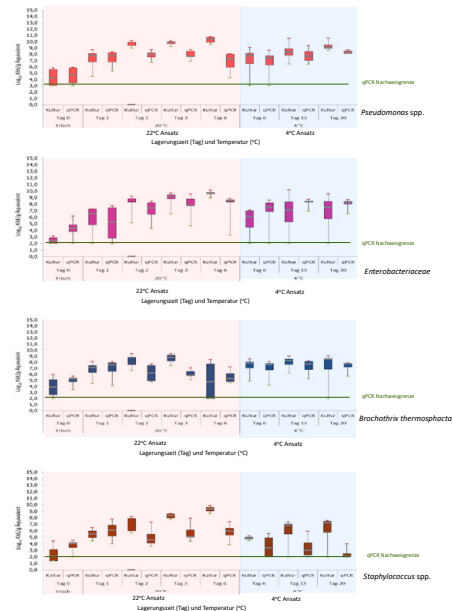


Darstellung einer Multiplex- qPCR mit vier
TaqMan Sonden.
RFU= Relative Fluorescence Units

Ergebnisvergleich

Ergebnisse

Vergleich Ergebnisse der kulturellen Methode und der Multiplex-qPCR:



Die Ergebnisse der Multiplex-qPCR und die der kulturellen Anzucht unterscheiden sich kaum. In einzelnen Probengruppen ließen sich die Zielkeime nicht kultivieren, während sie von der qPCR detektiert wurden. Die Nachweisgrenze der Multiplex-qPCR beträgt zwischen 2.0 und 3.0 log KbE/g.

Zusammenfassung

Die entwickelte Multiplex-qPCR ist eine geeignete Methode, den Verderbszustand von Schweinefleisch zu charakterisieren. In weiteren Versuchsreihen soll neben der Optimierung der Methode nun gezeigt werden, inwieweit die Anwendung bei erhitzten Produkten, bei denen kulturelle Verfahren scheitern, erfolgreich ist.

References:

- [1] EFSA: European Food Safety Authority (2016). Growth of spoilage bacteria during storage and transport of meat. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). www.efsa.europa.eu/efsa-journal EFSA Journal 2016; 14(6): 4523. doi: 10.2900/J.2016.4523
- [2] Nyman, G., J. E. et al. (2007). Meat, Poultry, and Seafood. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition, American Society of Microbiology

Förderung:

Bayerische Forschungsförderung (AZ-1250-16)
TÜV SÜD ELAB GmbH



Entwicklung des Körpergewichts, der Rückenfettdicke, der Widerristhöhe und des Body Condition Scores bei Kälbern der Rassen Deutsche Holsteins, Deutsches Fleckvieh sowie deren Kreuzungen bis zur 4. Lebenswoche unter Berücksichtigung der Milchaufnahme

Verena Büchler

Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim
Betreuer/in: Prof. Dr. Armin Scholz, Helen Schweizer

Einleitung

Ein leistungsstarkes und gesundes Milch- oder Mastrind geht aus einer gelungenen Aufzucht hervor. Damit steht außer Frage, dass es sich lohnt, der Kälberaufzucht ein besonderes Augenmerk zukommen zu lassen. In der jüngsten Vergangenheit wurde intensiv darüber berichtet, welche prä- und postnatalen Einflüsse die spätere Leistung der Kälber beeinflussen könnten (KASKE ET AL (2010) und BERNHART (2017)). In diesem VETResearch Projekt soll die Beziehung zwischen der Milchaufnahme und dem Wachstum von Kälbern unter Berücksichtigung der Rasse bzw. des Kreuzungsgenotyps untersucht werden. Dabei wird insbesondere die Entwicklung des Gewichts, des Body Condition Scores (BCS), der Widerristhöhe (WH) und der Rückenfettdicke (RFD) betrachtet.

Material und Methoden

Insgesamt wurden 60 Kälber in die Studie aufgenommen. Davon waren 31 Kälber männlich und 29 Kälber weiblich. Folgende Genotypschlüssel wurden definiert: DHg75 (Genanteil Deutsche Holsteins = $DH \geq 75\%$), DHg50 (Genanteil DH $>50\%$ bis $<75\%$), F1DHFV (Genanteil DH und Deutsches Fleckvieh = FV jeweils 50%), FVg50 (Genanteil FV $>50\%$ bis $<75\%$), FVg75 (Genanteil FV $\geq 75\%$).

Die Kälber wurden am Tag der Geburt, am 14. Lebenstag sowie am 28. Lebenstag untersucht. Es wurde jeweils das Gewicht, die RFD, die WH sowie der BCS bestimmt. Die Milchaufnahme wurde während der gesamten Studie täglich erfasst.

Das Gewicht wurde mittels einer in einer fahrbaren Kälberbox installierten Veterinärwaage erfasst. Die Widerristhöhe wurde mit einem handelsüblichen Meterstab gemessen. Dabei stand das Kalb auf einem geraden und flachen Untergrund. Die Bestimmung des BCS erfolgte anhand der BCS-Tafel nach EDMONSON ET AL (1989). Die in diesem Schema aufgeführten Messpunkte wurden anhand eines Punktesystems bewertet. Dafür wurden die entsprechenden Messpunkte beidseits adspektorisch und palpatorisch entsprechend der Beschreibungen der

einzelnen Punkte beurteilt und eingeteilt. Die Hungergrube wurde lediglich rechts beurteilt. Aus dem Mittel dieser Werte ergibt sich der BCS. Das verwendete Punktesystem liegt zwischen 1 (stark abgemagert) und 5 (hoch adipös). Zur Bestimmung der RFD gibt es verschiedene Methoden. In diesem Projekt wurde die RFD mittels Ultraschall bestimmt. Hierfür wurde ein Kaixin Ultraschallgerät mit einer 6,5 MHz-Linearsonde verwendet. Um an den Folgeuntersuchungstagen die Messung an der gleichen Stelle zu gewährleisten, wurde vor der ersten Messung die Messstelle ausgeschoren.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes SAS 9.3. Es wurden Varianzanalysen und Regressionsberechnungen durchgeführt. Die Varianzanalyse berechnet, welche Faktoren (Effekte) die Ausprägung eines Merkmals beeinflussen. Die fixen Effekte dabei waren: *Rasse*, *Geschlecht*, *Lebenstag*, *Rasse*Lebenstag* und *Geschlecht*Lebenstag* (siehe Tabelle 1-4). Das Geburtsdatum stellte zusätzlich einen zufälligen Effekt dar. In der Regressionsberechnung wurden die Beziehungen zwischen einzelnen Merkmalen anhand einer einfachen linearen Regression für intervallskalierte (normalverteilte) Merkmale dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß R^2 und der Standardschätzfehler RMSE (Root Mean Square Error) wurden als Maßzahlen zur Modellgüte bestimmt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p \leq 0,05$ festgelegt.

Ergebnisse

Der Zusammenhang zwischen dem Gewicht am Tag der Geburt und dem Gewicht mit 28 Lebenstagen kann mit einem hohen Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,84$ und einem Schätzfehler von $RMSE = 3,11$ kg mittels folgender Gleichung dargestellt werden:
Gewicht (4 Wochen) = $18,5 + 0,97 \times \text{Geburtsgewicht [kg]}$ (Abbildung 1).

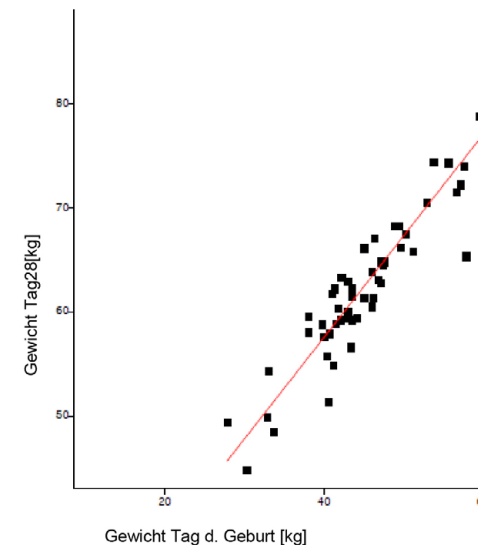


Abbildung 1: Zusammenhang des Geburtsgewichts und des Gewichts 28. Tag

Die gesamte Milchaufnahme und die Gewichtszunahmen stehen in keinem engen Zusammenhang. Es lässt sich also nicht sagen, dass Kälber mit einer hohen Tränkeaufnahme auch am stärksten zunehmen, obgleich eine schwach positive Beziehung erkennbar ist ($R^2 = 0,05$).

Die Auswertung des Einflusses der Rasse auf die tägliche Milchaufnahme ergab einen signifikanten Effekt (Abbildung 2). Dabei haben F1-Kreuzungstiere (F1DHFV) nach FVg50 im Durchschnitt die höchste und DHg75 die geringste tägliche Milchaufnahme.

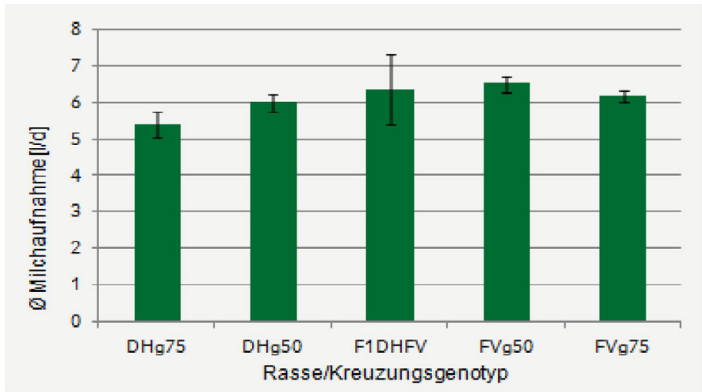


Abbildung 2:
Durchschnittliche tägliche
Milchaufnahme in
Abhängigkeit von Rasse
bzw. Kreuzungs-genotyp

Betrachtet man die Milchaufnahme an den einzelnen Lebenstagen in Abhängigkeit vom Geschlecht (Abbildung 3), so erkennt man, dass alle Kälber eine geringere Milchaufnahme nach dem Enthornen und nach dem Umstallen in Gruppenhaltung zeigen. Dieser Einbruch der Milchaufnahme ist bei den männlichen Kälbern signifikant größer als bei den weiblichen.

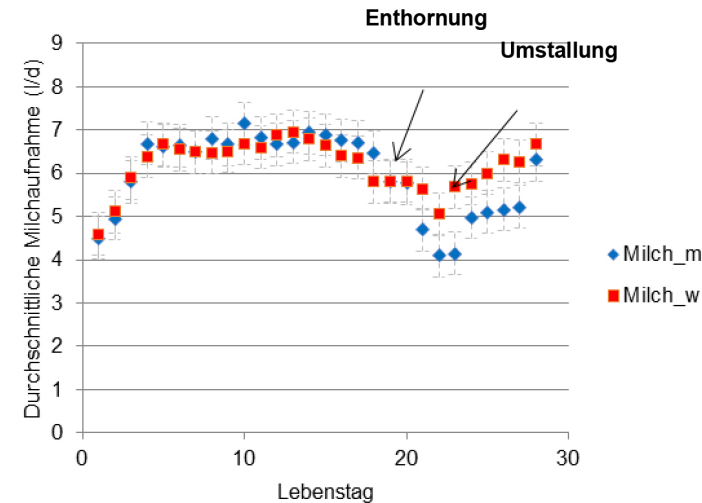


Abbildung 3:
Verteilung der durch-
schnittlichen täglichen
Milchaufnahme an den
einzelnen Lebenstagen
in Abhängigkeit des
Geschlechts;
m=männlich, w=weiblich

Die Ergebnisse der RFD-Messung weisen zwar eine geringe Spannweite auf (0,2 - 0,4 cm), dennoch zeigt sich eine signifikant größere RFD bei männlichen Tieren als bei weiblichen. DH (0,27 ± 0,02 cm) zeigt tendenziell eine geringere RFD als FV (0,33 ± 0,01 cm).

BCS

Test der fixen Effekte		
	F-Wert	p (Pr > F)
Rasse	6.12	0.0002
Geschlecht	0.64	0.4245
Tag	21.70	<.0001
Rasse*Tag	0.45	0.8877
Geschlecht*Tag	1.34	0.2672

RFD

Test der fixen Effekte		
	F-Wert	p (Pr > F)
Rasse	2.41	0.0542
Geschlecht	5.46	0.0215
Tag	0.35	0.7057
Rasse*Tag	0.94	0.4889
Geschlecht*Tag	0.21	0.8120

Gewicht

Test der fixen Effekte		
	F-Wert	p (Pr > F)
Rasse	6.91	<.0001
Geschlecht	0.40	0.5298
Tag	180.63	<.0001
Rasse*Tag	0.87	0.5465
Geschlecht*Tag	0.14	0.8679

WH

Test der fixen Effekte		
	F-Wert	p (Pr > F)
Rasse	4.11	0.0040
Geschlecht	0.47	0.4937
Tag	43.44	<.0001
Rasse*Tag	1.41	0.2038
Geschlecht*Tag	1.04	0.3567

Tabelle 1-4: Ergebnisse der Varianzanalyse (BCS = Body Condition Score, RFD = Rückenfettdicke, WH = Widerristhöhe)

Zusammenfassung & Diskussion

Bereits bei Kälbern bis zu einem Alter von 28 Tagen zeigen sich Unterschiede in BCS, RFD, WH, Gewicht und Milchaufnahme in Abhängigkeit von Geschlecht bzw. teilweise Rasse oder Kreuzungs-genotyp. Es konnten enge Zusammenhänge zwischen dem Geburtsgewicht und dem Gewicht im Alter von 4 Wochen dargelegt werden. Die durchschnittliche tägliche Milchaufnahme ist bei F1-Kreuzungstieren (F1DHFV) nach FVg50 am höchsten. Die F1-Kreuzungstiere weisen zudem neben dem höchsten durchschnittlichen Gewicht (60,3 ± 7,2 kg) die durchschnittlich größte Widerristhöhe auf (83,8 ± 3,5 cm). Allerdings besteht kein enger Zusammenhang zwischen der gesamten Milchaufnahme und der Tageszunahme.

Interessanterweise ist der Abfall der täglichen Milchaufnahme bei männlichen Kälbern nach dem Umstallen in Gruppenhaltung größer als bei den weiblichen. Die Ursache für diesen Unterschied ist ungeklärt. Zudem ergeben die Ergebnisse der RFD-Messung der männlichen Kälber trotz geringer Spannweite der Messergebnisse eine signifikant höhere RFD im Vergleich zu den weiblichen Kälbern (0,326 ± 0,009 cm vs. 0,304 ± 0,009 cm). Auch die Beobachtung, dass FV-Kälber eine leicht höhere RFD aufweisen als DH-Kälber ist sehr bemerkenswert und spiegelt Ergebnisse aus der Literatur über Messungen im erwachsenen Alter wider.

Ausblick

Aufgrund der prägnanten Ergebnisse wird das Projekt fortgeführt und ausgeweitet. Die weiblichen Tiere werden mit 12 Monaten und ggf. 24 Monaten erneut untersucht. Um eine aussagekräftige Fallzahl zu erreichen, müssen weitere weibliche Kälber gescort werden. Zusätzlich werden Gesundheitsparameter, Wetterdaten und Informationen der Muttertiere in die Auswertung einfließen.

Persönliche Erfahrungen & Danksagung

In meinem VETResearch Projekt konnte ich sowohl im praktischen Handling von Kälbern als auch im Bereich des wissenschaftlichen Arbeitens viel lernen. Die jedoch größte Erfahrung, welche ich aus diesem Projekt mitnehme, ist, dass man selbst über seine Grenzen hinauswachsen kann, wenn man sich mit viel Einsatz und Herzblut für ein Thema engagiert. Für diese wertvolle Erfahrung und für die Möglichkeit mit einem Dissertationsprojekt das Thema weiter verfolgen zu können, möchte ich meinen Betreuern Herrn Prof. Armin M. Scholz und Frau Helen Schweizer sowie dem gesamten Melkerteam vom Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim danken.

Antimikrobielle Aktivität von LAP (Lingual Antimicrobial Peptide) und SLPI (Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor) gegenüber bovinen Mastitis-Erregern

Elena Gerdes

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung
Betreuer: PD Dr. Wolfram Petzl

Die Eutergesundheit und der damit verbundene Antibiotikaeinsatz ist ein wichtiges Thema in der Milchviehhaltung. Seit mehreren Jahren rückt der Fokus immer mehr auf die Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika. Im Bereich der Veterinärmedizin hat dies aufgrund des zunehmenden gesellschaftspolitischen Drucks dazu geführt, den Antibiotikaeinsatz immer weiter zu reduzieren. Dies wirft gleichzeitig die Frage nach wirksamen Alternativen auf. Ein vielversprechender Ansatz ist die Erforschung antimikrobieller Peptide (AMPs). Der Begriff umschreibt eine große Gruppe verschiedener körpereigener kationischer Peptide, bei welchen eine Wirkung gegen Mikroorganismen nachgewiesen werden konnte. Die Forschung soll in Zukunft helfen, gezielt in körpereigene Sekretionsmechanismen von AMP eingreifen zu können. So wäre es zum Beispiel bei Infektionserkrankungen möglich, die Ausschüttung von AMPs zu steigern, um höhere Konzentrationen zur Erregerbekämpfung zu erreichen. Bei eigenen Untersuchungen von Drüsengewebe aus infizierten Eutern konnte eine deutlich gesteigerte Expression der kationischen Peptide LAP (Lingual Antimicrobial Peptide) und SLPI (Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor) im Vergleich zu gesunden Eutern nachgewiesen werden. Beide AMPs werden nachweislich von Milchdrüsenepithelzellen exprimiert und können durch gezielte Stimulation mit Immunmodulatoren in ihrer Expression gesteigert werden. Inwiefern LAP und SLPI gegen bovine Mastitiserreger wirken, sollte im Rahmen des vorliegenden Projekts geprüft werden. Da bekannt ist, dass AMPs teilweise eine Pathogen-spezifische Wirksamkeit zeigen, wurde in diesem Projekt die Wirksamkeit gegenüber den drei häufigsten Mastitiserregern *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Streptococcus uberis* untersucht.

Material und Methoden

Verwendung fand die Methode des Time-Kill-Assays. Durch wiederholte photometrische Messungen kann eine zeitabhängige Änderung der optischen Dichte (OD) aufgezeichnet werden. Mit zunehmendem Bakterienwachstum steigt die OD. Die ausbleibende oder reduzierte Zunahme der OD lässt dann Rückschlüsse auf die dosisabhängige antimikrobielle Wirkung des zu testenden Peptids zu. In diesem Projekt wurden mittels eines Platten-Photometers (CLARIOstar®) 14 Messungen in 30-minütigem Abstand (0 h - 6,5 h) bei 600 nm Wellenlänge angefertigt. Das verwendete LAP ist ein rekombinantes Peptid vom Wasserbüffel (*Bubalus arnee*), beim verwendeten SLPI handelt es sich um eine humane Rekombinante. Als Medium für die Bakterien und zum Anfertigen der Verdünnungsstufen wurde Lysogeny-Broth

(LB) verwendet. Im Dreifachansatz wurde für alle Bakterien je eine Positiv-Kontrolle (Pathogen ohne Zusatz), eine Negativ-Kontrolle (Pathogen mit Antibiotikazusatz – APS) sowie eine Mediumkontrolle ohne Pathogen/Zusatz gemessen. Im ersten Versuch zum jeweiligen Peptid wurde außerdem das Peptid ohne Zusatz gemessen, um auszuschließen, dass dies einen Einfluss auf die OD hat. Die Versuche wurden jeweils dreimal wiederholt. Die Peptide wurden in Konzentrationen von 20 µg/ml, 30 µg/ml und 40 µg/ml eingesetzt. Mittels des Programms „R“ erfolgte anschließend eine statistische Auswertung der Daten. Einige der erhobenen Daten zum Wachstum von *S. uberis* konnten aufgrund erheblicher Schwankungen nicht in die Auswertung mit einbezogen werden.

Ergebnisse

Wider Erwarten konnte bei keinem der untersuchten Peptide eine Hemmung gegen die ausgewählten Pathogene nachgewiesen werden. In allen Versuchen zeigten die Pathogene unter Zusatz der Peptide sogar ein gesteigertes Wachstum (siehe Abbildung 1). Bei dem eingesetzten *E. coli* Stamm konnte sogar mit zunehmender Peptid-Konzentration ein jeweils signifikant gesteigertes Wachstum verzeichnet werden. In den Versuchsansätzen mit *S. uberis* ließ sich aufgrund starker Schwankungen im Wachstum eine sehr große Standardabweichung beobachten. In Ermangelung von Peptiden konnten diese Versuche nicht wiederholt werden.

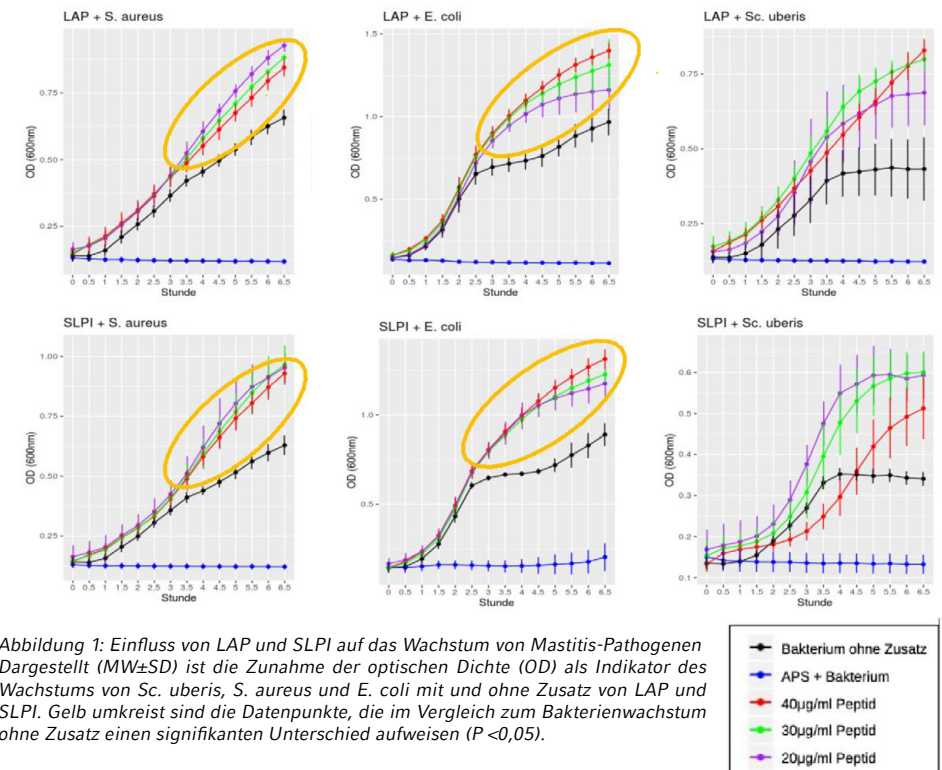


Abbildung 1: Einfluss von LAP und SLPI auf das Wachstum von Mastitis-Pathogenen Dargestellt (MW±SD) ist die Zunahme der optischen Dichte (OD) als Indikator des Wachstums von *Sc. uberis*, *S. aureus* und *E. coli* mit und ohne Zusatz von LAP und SLPI. Gelb umkreist sind die Datenpunkte, die im Vergleich zum Bakterienwachstum ohne Zusatz einen signifikanten Unterschied aufweisen ($P < 0,05$).

Schlussfolgerung

In diesem Projekt konnte wider Erwarten keine antimikrobielle Wirkung der AMPs LAP und SLPI gegenüber bovinen Mastitiserregern gezeigt werden. Hierfür könnte es möglicherweise mehrere Erklärungen geben: Die Beschaffung der verwendeten kommerziellen Peptide ist verhältnismäßig teuer und erlaubt nur eine eingeschränkte Anzahl an Versuchen. Für dieses Projekt stand nur eine begrenzte Menge der Peptide zur Verfügung. Auf dieser Grundlage wurden die Konzentrationen der Peptide basierend auf Vorarbeiten festgelegt und konnten nicht weiter erhöht werden. Es lässt sich nicht ausschließen, dass die Peptide in höheren Konzentrationen antimikrobielle Wirkung gezeigt hätten.

Weiterhin könnten Spezies-abhängige Unterschiede die ausbleibende antimikrobielle Wirksamkeit erklären: Mangels Verfügbarkeit wurde im Falle von SLPI auf eine humane Rekombinante zurückgegriffen, beim LAP auf eine Rekombinante vom Wasserbüffel. Dies ist insofern relevant, da die getesteten Pathogene gängige Mastitis-Erreger beim Rind sind. Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch nicht bekannt, ob die artspezifischen Rekombinanten unterschiedliche Erreger-spezifische Wirksamkeit zeigen. Auch eine nicht vorhandene biologische Wirksamkeit wird bei rekombinanten Peptiden immer wieder beschrieben und könnte das Ausbleiben einer antimikrobiellen Wirkung erklären.

Danksagung

Die Teilnahme am VETResearch Programm war eine tolle Erfahrung! Sie hat es mir erlaubt, einen guten und vielseitigen Eindruck von der wissenschaftlichen Arbeit, sowohl theoretisch als auch praktisch, zu sammeln. Es hat mir großen Spaß gemacht, mich in ein Projekt zu vertiefen und die Verantwortung dafür zu übernehmen. Gleichzeitig konnte ich auch erfahren, dass nicht immer alles so läuft wie man es plant, aber dass man sich nicht entmutigen lassen darf.

Für die gute Betreuung möchte ich mich herzlich bei Herrn PD Dr. Wolfram Petzl und Frau Julia Schneider bedanken. Auch gilt mein Dank dem Laborteam der Rinderklinik, die für alle Fragen immer ein offenes Ohr hatten. Nicht zuletzt möchte ich mich auch noch bei den Organisatoren des VETResearchs bedanken, ohne diese wäre das alles nicht möglich gewesen.

RNA-Gewinnung für die RT-qPCR aus bovinem Euterparenchym

Franziska Kienzle

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung
Betreuer/in: Dr. Frank Weber, Sandra Kirsch

Einleitung

Für die RNA-Gewinnung aus Geweben gibt es verschiedene Isolations-Kits, die zur Anwendung auf dem Markt zur Verfügung stehen. An der Klinik für Wiederkäuer wird schon seit längerem das RNA Mini Kit von Bio&SELL erfolgreich verwendet und wurde deshalb auch für die Dissertation zur Untersuchung von bovinem Euterparenchym eingesetzt. Das Prinzip bei diesem RNA-Isolations-Kit beruht darauf, dass durch mehrere Zentrifugationsschritte die Zellbestandteile, wie Zellorganellen oder auch DNA, abgetrennt werden. Durch darauffolgende Waschschritte, die die Probe aufreinigen, wird anschließend die reine RNA gewonnen.

Im weiteren Verlauf kontrolliert man mit Hilfe des „Experion“, ein Gerät von Bio-Rad Laboratories, die Qualität der gewonnenen RNA, indem vollautomatisch nach Beladung eines Chips, ein computergestütztes Elektropherogramm, sowie ein virtuelles Elektrophorese-Gel erstellt werden. Mit Hilfe dieser Grafiken kann eingeschätzt werden, wie gut die RNA-Qualität ist. Zusätzlich gibt das Programm auch automatisch einen sogenannten RQI-Wert (RNA-Quality-Index) aus. Der RQI-Wert ist ein fiktiver Wert und reicht von 1 bis 10, wobei 10 der bestmögliche Wert ist. Das heißt, die RNA ist vollständig intakt. Ein Wert von 1 bedeutet, dass die RNA vollständig fragmentiert beziehungsweise degeneriert ist. Diese Einschätzung ist sehr wichtig, da die RNA sehr fragil und empfindlich ist, sie sich schnell zersetzt, wenn die Gewebeproben nicht optimal gelagert werden und sie ebenso durch RNasen schnell abgebaut wird. Um jedoch optimal mit der extrahierten RNA weiter arbeiten und eine RT-qPCR durchführen zu können, benötigt man mindestens einen RQI-Wert von 5.

Problem und Lösungsansätze

Bei der Bearbeitung der Gewebeproben aus bovinem Euterparenchym erscheinen die ausgegebenen RQI-Werte und angeblichen RNA-Konzentrationen des Programms unrealistisch hoch und stimmen nicht mit den ausgegebenen Elektropherogrammen überein.

In dem Elektropherogramm sind nicht nur die typischen 18S- und 28S-Peaks zu sehen, sondern zusätzlich ein dazwischen liegender Peak, der so nicht eindeutig zugeordnet werden kann. Zudem sind die RNA-Banden im Elektrophorese-Gel stark verwaschen und undeutlich voneinander getrennt.

Schon vorausgehend vor dem Projekt wurde die Vermutung angestellt, dass es sich hierbei um eine DNA-Kontamination handeln könnte. Aus diesem Grund stellte sich mit Beginn des

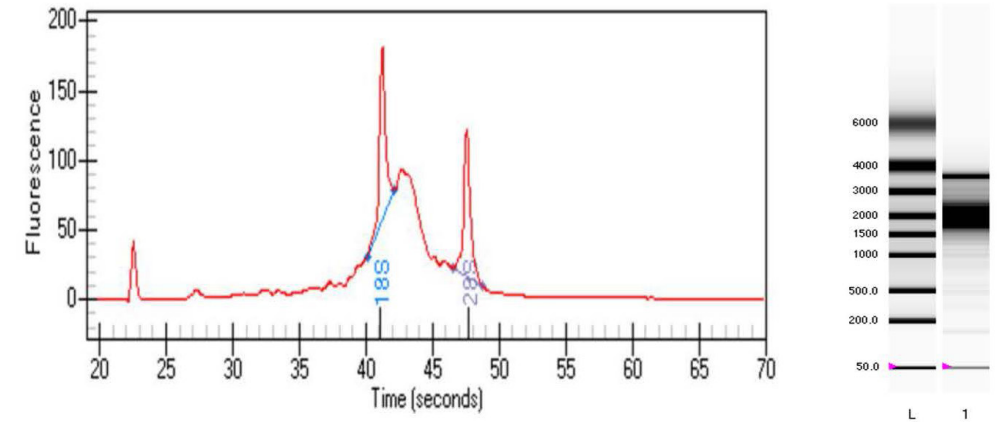


Abbildung 1: Elektropherogramm nach RNA-Gewinnung aus bovinem Euterparenchym

Abbildung 2:
Elektrophorese-Gel
zu Abbildung 1

Projekts die Frage, warum es zu dieser DNA-Kontamination kommt oder wieso eventuell die DNA nicht vollständig herausgefiltert wird, beziehungsweise ob eventuell auch eine andere Verunreinigung vorliegt.

Mit der Vermutung einer DNA-Kontamination galt es die Schritte, die die DNA abtrennen sollten, genauer zu untersuchen. Ein Ansatz war es die DNA-Abtrennung mittels Zentrifugationssäule zu wiederholen oder durch Verwendung kleinerer Mengen, welche auf die Zentrifugationssäulen aufgetragen wurden, die Säulen zu entlasten. Allerdings konnte dadurch keine Änderung der Ergebnisse erreicht werden. Auch die Verlängerung der Zeit im Lysepuffer, um die Probe besser auf die Weiterverarbeitung vorzubereiten, verbesserte die Ergebnisse nicht.

Der Einsatz einer DNase, die die vermutete DNA verdauen und somit die Probe reinigen sollte, erbrachte den gewünschten Erfolg. Allerdings waren die Ergebnisse nicht zuverlässig. Dies lag daran, dass die DNase einen speziellen pH-Bereich benötigt, um optimal arbeiten zu können. Aus diesem Grund wurde nun zusätzlich zu der DNase auch ein DNase-Reaction-Buffer zugegeben, wodurch ein optimales Milieu garantiert wird.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, gibt es die Möglichkeit die RNA-Probe photometrisch zu untersuchen. Hierfür wurde das „Pearl“ Nanophotometer der Firma Implen verwendet. Um eine Aussage über die Qualität, d.h. die Konzentration der Probe zu bekommen, wird die Absorption bei 260 nm gemessen. Zusätzlich wird die Absorption bei 230 nm, Detektion von Zucker, Salzen und Phenolen und bei 280 nm, Detektion von Proteinen, bestimmt. Das Verhältnis aus diesen Ergebnissen ($A_{260}/280$ und $A_{260}/230$) gibt eine Aussage über die Reinheit der Probe. Bei reiner RNA sollte das Verhältnis von $A_{260}/280$ bei 2,0 liegen sowie das von $A_{260}/230$ bei $\geq 2,0$.

Bei den Proben mit eingesetzter DNase und DNase-Reaction-Buffer konnte der Wert von 2,0 bei dem Verhältnis von A260/280 zuverlässig ermittelt werden. Jedoch fiel auf, dass das Verhältnis von A260/230, welches wie oben beschrieben Verunreinigungen mit Zucker, Salzen oder Phenolen anzeigt, deutlich zu niedrig und die Probe somit immer noch verunreinigt war. Aus diesem Grund wurde ein zusätzlicher Waschschriff mit Ethanol eingeführt, welcher vom Hersteller empfohlen wurde, sollten die Proben verunreinigt sein. Dieser alleine reichte allerdings nicht aus, es musste zusätzlich die sogenannte „Trockenzentrifugation“ ganz am Ende nach allen Waschschriffen verlängert werden.

Dieser Schriff soll sicherstellen, dass alle Reste, die sich noch auf der Säule befinden, abzentrifugiert werden und anschließend die reine RNA herausgelöst wird.

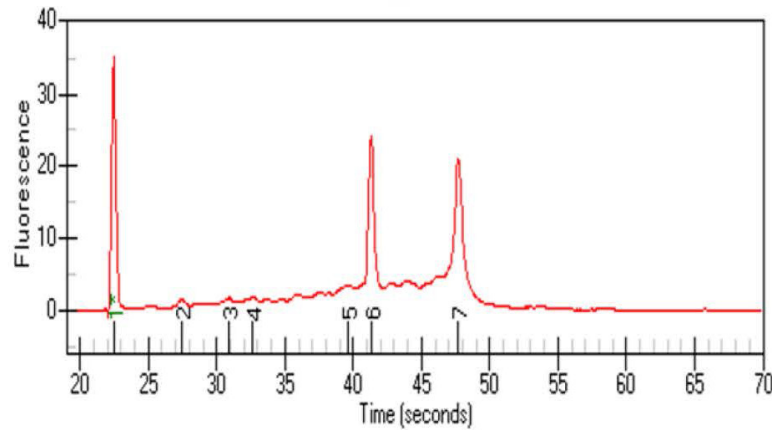


Abbildung 3: Elektropherogramm nach RNA-Gewinnung mit Verwendung von DNase und DNase-Reaction-Buffer

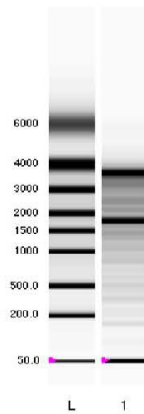


Abbildung 4:
Elektrophorese-Gel
zu Abbildung 3

Ergebnis

Aus den gewonnenen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass es in den Proben einerseits eine DNA-Kontamination gibt, aber andererseits auch organische Bestandteile die Reinheit der Probe beeinflusst haben. Durch den Einsatz von DNase gemeinsam mit dem DNase-Reaction-Buffer kann die Kontamination beseitigt werden. Mit Hilfe des zusätzlichen Waschschriffs und der verlängerten Trockenzentrifugation erhöht man zusätzlich die Reinheit der Probe.

Wieso es zu diesen Problemen mit dem Kit bei der Verwendung von bovinem Euterparenchym kommt, ist nicht bekannt. Vermutlich liegt es an der Gewebestruktur, durch die die Zentrifugationssäule nicht optimal funktioniert und Reste von DNA sowie andere Bestandteile in der Probe verbleiben.

Persönliche Erfahrung

Ich persönlich finde das VETResearch Programm eine gute Möglichkeit, die Arbeit im Labor kennenzulernen und weitere Erfahrungen über das Studium hinaus zu sammeln. Durch die Bearbeitung meines Projekts konnte ich das erste Mal im Studium Einblicke in die wissenschaftliche Arbeit bekommen. Es läuft nicht immer alles wie geplant, auch wenn viele Methoden schon mehrere Male erfolgreich angewendet wurden. Immer wieder kommen neue Probleme auf, aber ebenso auch neue Wege. Gerade das macht es doch immer spannend und es war für mich auch eine große Bereicherung hinsichtlich der Entscheidungsfindung für eine spätere Dissertation.

Mein Dank geht dabei auch an meine beiden Betreuer Dr. Frank Weber und Sandra Kirsch, die mich sehr gut an das Thema herangeführt und in die Laborarbeit hervorragend eingearbeitet haben. Sie haben mich während der Bearbeitung meines Projekts sehr gut begleitet und standen mir dabei auch immer gerne mit Rat und Tat zur Seite.

Quellenverzeichnis

Eppendorf, Application Note No. 279, Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen, https://www.eppendorf.com/product-media/doc/de/59828/Eppendorf_Detection_Application-Note_279_BioPhotometer-D30_Detection-contamination-DNA-protein-samples-photometric-measurements.pdf (Stand 11.01.2020)

Verlässlichkeit der Diagnose einer Bakteriurie bei automatisierter Harnsedimentanalyse bei Katzen

Elisabeth Neubert
Medizinische Kleintierklinik
Betreuerin: PD Dr. Karin Weber

Persönliche Erfahrung

Durch das VETResearch Projekt hatte ich nicht nur die Möglichkeit, essentielle Fertigkeiten zum wissenschaftlichen Arbeiten zu erlernen und zu vertiefen, auch erfuhr ich, wie es ist, an einem eigenen Projekt über mehrere Monate zu arbeiten und sich dabei selbst zu organisieren. Ich hatte das Glück, hervorragend betreut zu werden und konnte mit jeder Frage oder Absprache vorbeikommen. Auch die Präsentation der Ergebnisse im Rahmen des Retreats sehe ich als wunderbare Vorübung für eine Doktorarbeit. Ich kann es nur jedem wärmstens empfehlen, sich ebenfalls für ein VETResearch Projekt zu bewerben, da ich darin ausschließlich Vorteile sehe! Auch ich werde mich erneut bewerben.

Verlässlichkeit der Diagnose einer Bakteriurie bei automatisierter Harnsedimentanalyse bei Katzen

Zielsetzung

- Ziel der Studie war es, die Verlässlichkeit der automatisierten Harnsedimentanalyse im Bezug auf eine Bakteriurie zu evaluieren.
- Bei der automatischen Erkennung von Urinsediment- Bestandteilen können in ungefärbten Proben Stäbchen und Kokken detektiert werden.
- Da auch weitere kleine Urinbestandteile (z.B. Kristalle) als Bakterien interpretiert werden können (falsch positive Aussage) oder zu geringe Mengen an Bakterien nicht detektiert werden (falsch negative Aussage), galt es, die Vorhersage des Geräts durch Vergleich mit den Ergebnissen der bakteriologischen Untersuchung zu überprüfen.

Zusammenfassung

- Wenn weder das Analysegerät noch ein Betrachter von Fotos aus dem Analysegerät Bakterien im Sediment findet, so ist kein Bakterienwachstum oberhalb des Cut- offs nachweisbar.
- Wenn Analysegerät und Betrachter Stäbchen oder Kokken übereinstimmend detektieren, wird dies in der bakteriologische Untersuchung in ca. 90% der Fälle bestätigt.
- Als weiterer Parameter zur Bewertung einer Bakteriurie ist es ebenfalls ratsam, die Leukozytenzahl zu berücksichtigen.

Material & Methoden

Ausgangsmaterial waren 304 Datensätze von Katzen, welche im Zeitraum vom 01.01.2018- 31.12.2018 eine automatisierte Urinsedimentanalyse (Idexx Sedivue) mit anschließender bakteriologischer Untersuchung (BU) erhielten. Unter diesen waren 191 auswertbare Datensätze.

Insgesamt wurden die Ergebnisse von 168 Tieren untersucht, darunter 145 Katzen mit nur einer Messung, 17 mit zwei Messungen und 6 Tiere mit vier oder mehr Messungen.

Das Geschlecht der Tiere, sowie die Art der Uringewinnung wurde ebenfalls erfasst.

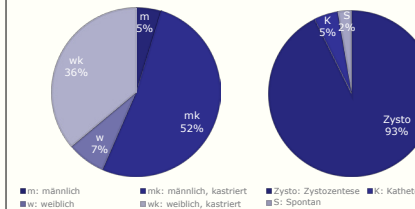


Abb. 1: Geschlecht der Tiere

Abb. 2: Urinart

Die Ergebnisse des Analysegeräts im Bezug auf die Anwesenheit von Bakterien werden in 3 Kategorien aufgeteilt: None to rare, Suspect presence und Present. Der Betrachter evaluierte drei vom Analysegerät gespeicherten Bilder nach dem selben Schema. Erst anschließend wurde das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung ausgewertet und die Anzahl sowie Art der gewachsenen Bakterien festgehalten.

Die Leukozytenzahl wird ebenfalls bei der automatisierten Harnsedimentanalyse erfasst. Dabei erfolgt die Einteilung von 0, 1-5, 6-20, 21-50 bis <50 Leukozyten pro high-power field (HPF).

Ergebnisse

In 191 ausgewerteten Datensätzen war bei 153 Proben (80%) kein bakterielles Wachstum oberhalb des Cut- offs von 10^3 Colony forming Units (CFU) bei Zystozentese- bzw. 10^4 CFU bei Spontanurin zu verzeichnen.

Bei 96 Proben (36%) wurden weder vom Gerät noch vom Betrachter Bakterien detektiert. Bei keiner dieser Proben war ein Bakterienwachstum oberhalb des Cut- offs nachweisbar. Der negative Vorhersagewert lag hier bei 100%.

Abbildung 3 und 4 zeigen die Ergebnisse für die getrennte Beurteilung von Stäbchen und Kokken. Sowohl die negativen als auch die positiven Vorhersagewerte erweisen sich als sehr gut für die Beurteilung 'None to rare' und 'Present' bei Übereinstimmung von Gerät und Betrachter. Abweichungen können durch antibiotische Vorbehandlung entstehen (Bakterien sichtbar, aber nicht kultivierbar), oder durch falsche Einordnung der Bakterienart (Stäbchenart, die als 'Kokken' klassifiziert wird). Bei 46 Proben (24%) wurden 'Stäbchen' und bei 111 Proben (58%) wurden 'Kokken' nicht übereinstimmend beurteilt.



	Stäbchen < Cut- off	Stäbchen > Cut- off
Analysegerät: None to rare	121	2
Betrachter: None to rare		
Analysegerät: Present	2	20
Betrachter: Present		

Abb. 3: Stäbchen im Harnsediment

	Kokken < Cut- off	Kokken > Cut- off
Analysegerät: None to rare	75	0
Betrachter: None to rare		
Analysegerät: Present	1	4
Betrachter: Present		

Abb. 4: Kokken im Harnsediment

Die Anzahl der Leukozyten korreliert mit dem Bakterienwachstum. Bei weniger als 20 Leukozyten/HPF sind nur in 7,7% der Proben Bakterien nachweisbar. Bei mehr als 20 Leukozyten/HPF sind bei 70,3% der Proben Bakterien nachweisbar (Abb. 5).



Abb. 5: Korrelation zwischen Leukozytenzahl und Bakterienwachstum

Durchflusszytometrische Analyse des Milch-Differentialzellbildes *in-vivo* und *post mortem*

Lisa Oberberger

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung
Betreuer/in: Dr. Marie Meyerholz, PD Dr. Wolfram Petzl, Dr. Frank Weber



LMU Forschungspreis
für exzellente
Studierende 2019

Hintergrund

In Vorgängerprojekten der Mastitis-Arbeitsgruppe der Klinik für Wiederkäuer der LMU München wurden am Schlachthof Gewebestücke aus Eutervierteln entnommen, um immunologische Fragestellungen *in-vitro* zu bearbeiten. Zur Verifizierung, ob es sich um ein gesundes Euter handelte, wurde das Euter der Spendertiere vor der Schlachtung palpatorisch sowie auf makroskopische Veränderungen des jeweiligen Sekretes, der Zellzahl sowie bakteriologischer Befunde der daraus gewonnenen Milch untersucht. Geeignete Spendertiere sollten im Bezug auf die Zellzahl der beprobten Viertel 200.000 Zellen/mL nicht übersteigen und bezüglich der mikrobiologischen Untersuchung sollten keine sogenannten „Major Pathogens“ wie *E. coli*, *Staphylococcus aureus* sowie *Streptococcus subspecies* nachweisbar sein. Aus Gründen des Tierwohls können seit kurzem die Spendertiere nicht mehr vor der Schlachtung beprobt werden, somit wurde das Protokoll auf die Untersuchung der gleichen Parameter an bereits geschlachteten Kühen umgestellt. Es stellte sich jedoch heraus, dass die genannten Anforderungen nicht direkt übertragbar waren. Obwohl palpatorische Veränderungen des Euters sowie makroskopische Veränderungen des Sekretes und positive bakteriologische Befunde ausgeschlossen wurden, lagen die Zellzahlen in der Milch geschlachteter Kühe immer > 200.000 Zellen/mL und häufig > 1.000.000 Zellen/mL. Um zu untersuchen, inwiefern der Tod bzw. die Schlachtung einen Einfluss auf die Verteilung der Zellpopulation in der Milch haben und um die Auswahlkriterien gegebenenfalls anzupassen, wurde die Milch von toten, geschlachteten und lebenden Kühen im Rahmen dieses Projektes durchflusszytometrisch analysiert und anschließend die Ergebnisse zwischen den Gruppen verglichen. Im Fokus der Betrachtung lagen die in der Milch zu findenden Immunzellen: neutrophile Granulozyten, lymphoide Zellen und Makrophagen/Epithelzellen.

Material und Methoden

Zur Bearbeitung der oben genannten Fragestellung wurden verschiedene Gruppen von Kühen herangezogen und auf je vier Eutervierteln beprobt: neun Kühe des Lehr- und Versuchsgutes der LMU München, zehn Kühe nach der Schlachtung sowie sechs Patientenkühe der Klinik für Wiederkäuer (n=3 lebend, n=2 vor und zu mehreren Zeitpunkten nach der Euthanasie und n=1 11 h *post mortem*). Repräsentiert wurden die Gruppen durch die Rassen Fleckvieh, Holstein und Braunvieh. Das Milchsekret aller beprobten Kühe war makroskopisch unauffällig. Bevor die Milch für die Durchflusszytometrie aufbereitet wurde, wurden die Proben bakteriologisch auf das Wachstum von „Major Pathogens“ untersucht und die somatische Zellzahl wurde bestimmt.

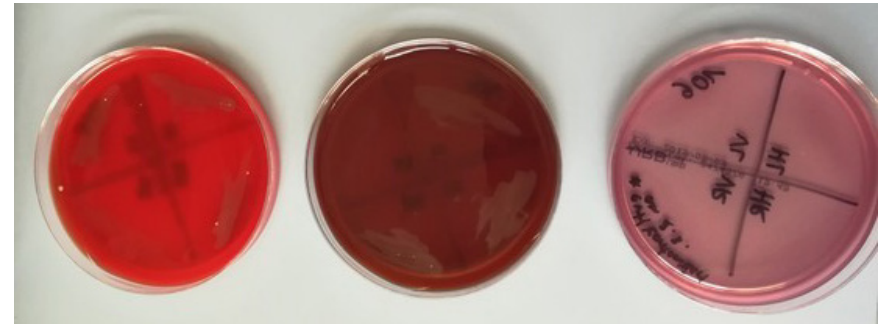


Abbildung 1: Für jede beprobte Kuh wurden die Milchproben für die bakteriologische Untersuchung je auf den verschiedenen Agarplatten aufgebracht. Von links nach rechts: Columbia sheep blood agar, edwards agar, violett red bile agar

Das Milchsekret wurde zunächst adspektorisch in einer Viertelgemelkschale beurteilt, um einen ersten Eindruck vom Milchcharakter zu bekommen und anschließend mittels California-Mastitis-Test (CMT) auf erhöhten Zellgehalt untersucht. Die absolute Quantifizierung der somatischen Zellzahl (Somatic Cell Count, SCC) erfolgte fluoreszenzoptisch über das Zellzahlmessgerät DCC der Firma DeLaval. Für die bakteriologische Untersuchung wurden die Zitzen gründlich mit Alkohol und Zellstoff gesäubert, 5-10 mL Milch in sterile Polystyrol-Röhrchen entnommen sowie auf drei verschiedenen Agarplatten (Abbildung 1) aufgebracht und bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Die Platten wurden hinsichtlich Morphologie und Wachstumsverhalten nach 24 und 48 h beurteilt.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden pro Euterviertel 50 mL Milch in Zentrifugenröhrchen gewonnen, dreimal abzentrifugiert, entrahmt, dekantiert und mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Die so entstandene Zellsuspension wurde mit PBS versetzt. Diese aufgereinigten Milchezellen wurden in 1,5 mL Eppendorfgefäße aliquotiert und mit zwei Farbstoffen versetzt: Zum einen mit Acridin-Orange (Firma Polysciences Inc., 0,01 %), um alle DNA- bzw. RNA- haltigen Zellen anzufärben und zum anderen mit Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, 10 %). Propidiumiodid interagiert zwar ebenfalls mit der DNA der Zelle, durchdringt jedoch nur die defekte Zellmembran von toten Zellen. Über die verschiedenen Emissionsmaxima der beiden Farbstoffe können lebende Zellen in den Densityplots der Auswertungssoftware des Durchflusszytometers (AccuriFlow, BD Biosciences) identifiziert werden. Um nun aus den vitalen Zellen die Immunzellen hervorzuheben, werden die Charakteristika Granularität und Zellgröße genutzt. Beide Parameter werden von dem Durchflusszytometer erkannt und können in Form des Seitwärtsstreulichts (side scatter, SSC-A) bzw. Vorwärtsstreulichts (forward scatter, FSC-A) als x- bzw. y- Achse des Densityplots herangezogen werden. Mithilfe dieser Kenngrößen können innerhalb der Immunzellen verschiedene Zellgruppen angesprochen werden. In dieser Auswertung wurden folgende Populationen ausgewertet: neutrophile Granulozyten, lymphoide Zellen und Makrophagen/Epithelzellen. Neutrophile Granulozyten besitzen aufgrund ihres Zellaufbaus eine höhere Granularität und sind größer als die Lymphozyten. Außerdem wurden diese einzelnen Zellgruppen in Vorgängerprojekten mit spezifischen Antikörpern markiert, um sie eindeutig zu identifizieren. Im Rahmen dieses Versuches wurde zur durchflusszytometrischen Aufarbeitung auf bestehende Auswertungsschemata zurückgegriffen (Abbildung 2).

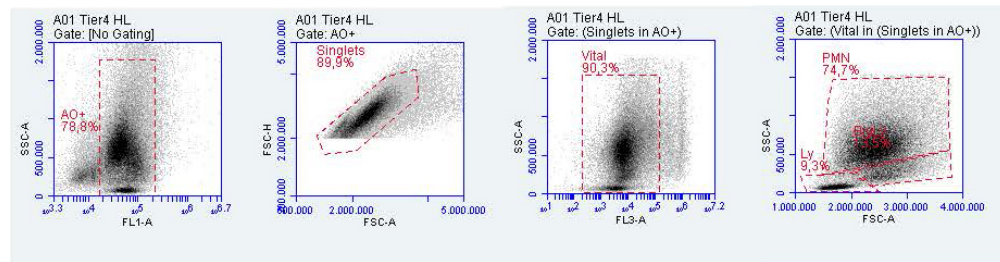


Abbildung 2: Gezeigt sind Density plots aus der durchflusszytometrischen Analyse des Milchsekretes eines Patienten der Klinik für Wiederkäuer elf Stunden post mortem. Von links nach rechts ist das Vorgehen zu erkennen, um im letzten Bild die Aufschlüsselung nach Immunzellpopulationen zu erhalten. Im dargestellten Fall sind neutrophile Granulozyten stärker vertreten, was auf ein entzündliches Geschehen hindeutet.

Im Anschluss wurden für jede Population die Daten bezüglich ihres prozentualen Anteils an der Gesamtleukozytenzahl sowie Größe, Granularität und Vitalität im Fischer-Test gegenübergestellt. Dafür wurden die open-source-Software „R“ und das Programm „R Studio“ verwendet.

Ergebnisse

Bei den 25 getesteten Kühen stellte sich heraus, dass geschlachtete Kühe eine signifikant höhere Zellzahl in der Milch aufweisen als lebende, obwohl sich für das Auftreten der „Major Pathogens“ kein Unterschied ergab. Dabei zeigte der Vergleich der durchflusszytometrisch erhobenen Daten, dass es sich vermehrt um Immunzellen handelt. Bei den Schlachthoftieren war ein signifikant höherer Anteil von neutrophilen Granulozyten zu finden, wobei diese gleichzeitig auch größer waren. Bei den lebend beprobten Kühen dagegen waren die Lymphozyten stärker vertreten. Die Anzahl an vitalen Zellen unterschied sich hingegen nicht (Abbildung 3).

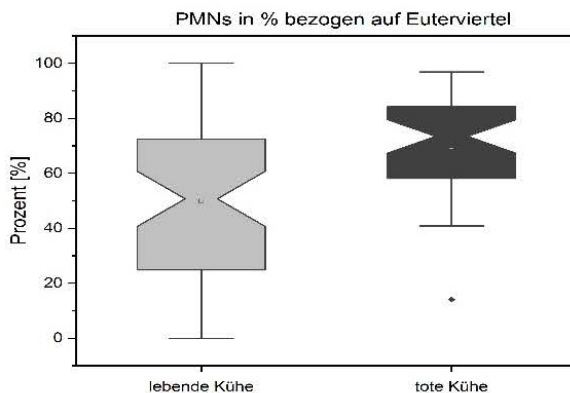


Abbildung 3: Erkennbar ist hier der signifikant höhere Anteil von neutrophilen Granulozyten im Milchsekret geschlachteter Kühe im Vergleich zum Milchsekret lebender Kühe.

Interessanterweise konnte bei den wenigen Kühen, die direkt nach der Euthanasie beprobt wurden, diese Beobachtung nicht eindeutig bestätigt werden. Hier kam es zwar *post mortem* ebenfalls zu einem erkennbaren Anstieg der Zellzahl, jedoch nicht in dem Maße wie bei Milch der geschlachteten Kühe und außerdem erst ab 40 Minuten *post mortem*. Dieser Zeitpunkt ist wesentlich später als die beobachteten Veränderungen im Milchsekret der geschlachteten Kühe. Die Probenahme am Schlachthof erfolgte nach Abtrennung des Euters, circa 10-20 Minuten *post mortem*. Darüber hinaus stellt sich die Zunahme an Immunzellen im Milchsekret von euthanasierten Kühe durchflusszytometrisch weniger imposant dar im Vergleich zum Milch-Differentialzellbild geschlachteter Kühe (Abbildung 4).

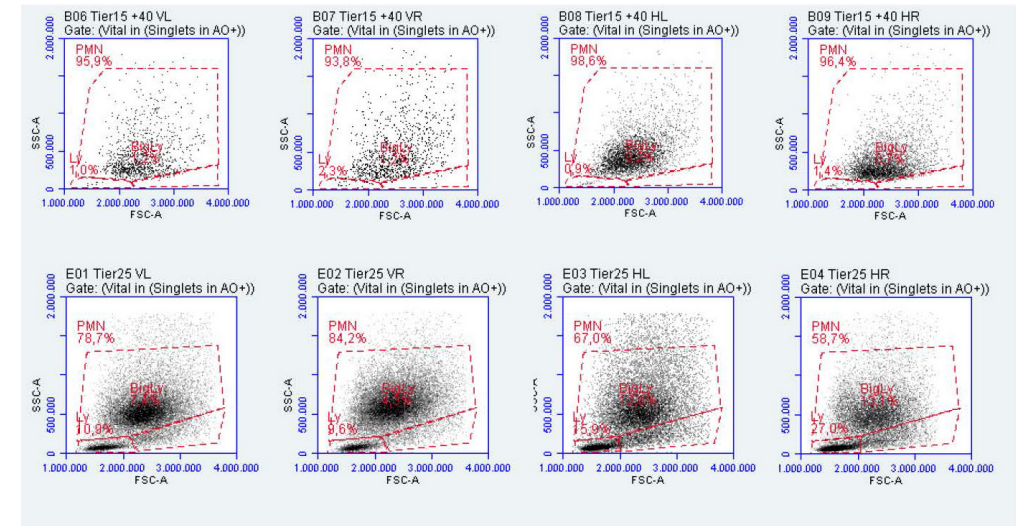


Abbildung 4: Vergleichende Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse des Milchdifferentialzellbildes einer euthanasierten Kuh 40 Minuten post mortem (obere Reihe) und einer geschlachteten Kuh (untere Reihe).

Diskussion und Ausblick

Schlussendlich stellt sich die Frage, weshalb sich euthanasierte und geschlachtete Kühe bezüglich der untersuchten Parameter unterscheiden. Mehrere Faktoren könnten die Unterschiede bedingen: der Stress bei Verladung und Transport des Rindes könnte eine Rolle spielen, wobei dann diskutiert werden könnte, ob sich nicht für alle lebenden Kühe, die an der Wiederkäuerklinik der LMU beprobt wurden, eine erhöhte Zellzahl ergeben müsste, was nicht der Fall war. Des Weiteren käme die mechanische Belastung beim Abtrennen des Euters als Ursache für die beobachteten Unterschiede in Frage. Allerdings handelt es sich bei den gefundenen Zellen um Immunzellen. Es wäre also denkbar, dass chemotaktische Reize bzw. Diapedese stattfinden wie bei einem entzündlichen Geschehen, was für lediglich mechanisches Abtrennen in der Literatur nicht beschrieben ist. Ursächlich könnte außerdem die unterschiedliche Art des Todes darstellen: Betäubung und Ausbluten im Vergleich zur

Euthanasie. Da bisher in der Literatur nicht beschrieben ist, ob es beim Ausbluten zu Chemotaxis der Immunzellen kommt, müsste dieser Aspekt differenziert untersucht werden. Dafür müssten Proben von lebenden Kühen kurz vor der Schlachtung und *post mortem* miteinander verglichen werden. Möglicherweise kann diese Theorie in weiteren Projekten überprüft und detaillierter untersucht werden.

Persönliche Erfahrung

Zunächst möchte ich mich bei der gesamten Klinik für Wiederkäuer bedanken. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Marie Meyerholz und Herrn Dr. Wolfram Petzl sowie dem Laborteam Frau Sandra Kirsch und Herrn Dr. Frank Weber.

Aufgrund einer stets guten Zusammenarbeit erhielt ich innerhalb kurzer Zeit einen intensiven Einblick in die Forschungstätigkeit der Mastitis-Arbeitsgruppe. Ganz selbstverständlich wurde ich in das Team integriert und konnte im Rahmen meines Themas selbstständig agieren. Außerdem wurde es mir ermöglicht, auch an internen Meetings teilzunehmen, um erste Ergebnisse meiner Arbeit vorzustellen und um an konstruktiven Diskussionen teilzunehmen. Diese Erfahrung stellt auf jeden Fall eine persönliche Bereicherung für mich dar, insofern sich auch ein neuer Bereich aus dem facettenreichen Beruf des Tiermediziners für mich neu präsentierte.

Aus diesem Grund kann ich es jedem Interessenten und auch jedem, der gerne Forschungsarbeit im Rahmen seiner Promotion betreiben möchte, nur empfehlen, ein VETResearch Projekt zu bearbeiten.

IL10 Genexpression in bovinem Euterparenchym: Abweichung einer Kontrollprobe bei der Durchführung der RT-qPCR

Luise Schmiderer

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung
Betreuer/in: Dr. Frank Weber, Sandra Kirsch

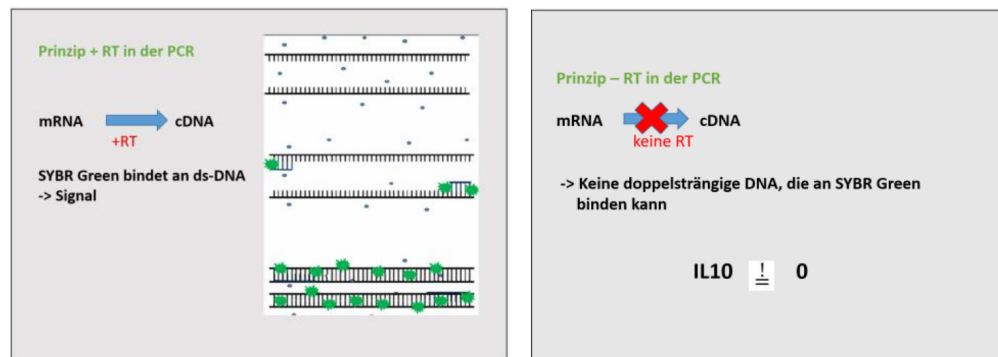
Einleitung

IL10 ist ein Gen aus der Entzündungskaskade, das für das gleichnamige antiinflammatorische Zytokin codiert, das in Vorgängerprojekten charakterisiert wurde. Bei der Durchführung der RT-qPCR ist eine Abweichung einer Kontrollprobe aufgefallen, die näher untersucht werden soll.

Das Prinzip

Aus einer Probe von bovinem Euterparenchym wurde die Gesamt-RNA isoliert und aufgereinigt. Um eine PCR durchzuführen, benötigt man DNA. Hierfür wird der RNA das Enzym Reverse Transkriptase (RT) zugesetzt. Der Farbstoff SYBR Green dient dem Nachweis doppelsträngiger DNA. Bindet er an diese, fluoresziert der DNA-SYBR-Green Komplex und kann im Rahmen der PCR quantifiziert werden (+RT-Kontrolle).

Wird im Umkehrschluss der RNA keine Reverse Transkriptase zugesetzt, wird keine cDNA gebildet und SYBR Green kann nicht binden, da keine doppelsträngige DNA vorhanden ist. Es kommt zu keinem positiven Signal (-RT-Kontrolle).



Bildquelle:
www.researchgate.net/figure/SYBR-Green-I-detection-mechanism-SYBR-Green-I-is-1-000-fold-more-fluorescent-in-the_fig2_257371648

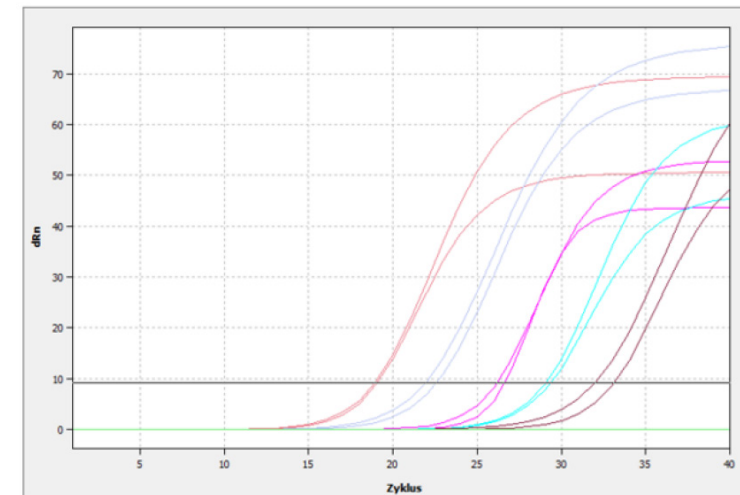
Ergebnisse, die in der PCR gewonnen und publiziert werden, sollen sich an den MIQE-Guidelines (Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time-PCR Experiments) orientieren, die der Qualitätssicherung dienen. Eine Vorgabe dieser Guidelines besagt, dass die -RT-Kontrolle negativ sein soll.

Sonderbar ist, dass die -RT-Kontrolle von allen im Kliniklabor überprüften Genen nur bei IL10 positiv ausfällt.

Versuch: Messung der IL10-Proben mit 2 unterschiedlichen Sonden

Was kann das positive Signal auslösen?

1. Eine DNA-Kontamination - Aber durch das neue Aufreinigungssystem ist eine Verunreinigung mit genomischer DNA mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Außerdem erhalten wir nur bei diesem Gen ein positives Signal.
2. Ein Primer-Problem - Aber IL10 wurde damals sequenziert und eine funktionierende Standardkurve wurde erstellt. Die Primer sind Exon überspannend.



Standardkurve von IL 10

Ziel des Versuchs

Verursacht IL10 selbst das positive Signal in der PCR in der -RT-Kontrolle?

Unterschied zwischen SYBR Green und TaqMan

Die PCR wurde einmal mit einer eigens designten Sonde und eigenen Primern und anschließend mit einer Sonde der Firma Thermo Fischer durchgeführt, deren Primer uns nicht bekannt sind.

PCR mit SYBR Green-Farbstoff	PCR mit Sonde
Signal bei jeglicher doppelsträngiger DNA → unspezifisch	Signal strikt sequenzspezifisch → hochspezifisch

Das Messergebnis

RT-qPCR mit SYBR Green und TaqMan mit IL 10

Probennahme	Mittlerer ct-Wert SYBR Green	Mittlerer ct-Wert eigener Sonde	Mittlerer ct-Wert TaqMan
IL 10_24R	21,7	25,3	31,1
IL 10_24R	21,7	25,3	31,1
24R-RT	21,9	25,2	Kein Ct
24R-RT	21,9	25,2	Kein Ct

Auswertung

Sowohl bei der Durchführung mit SYBR Green und der eigenen Sonde erhalten wir ein positives -RT-Signal. Die -RT-Kontrolle bei dem mit der vorgefertigten TaqMan-Sonde durchgeführten Experiment fällt hingegen negativ aus. Das negative Ergebnis der -RT-Kontrolle bei der Durchführung mit IL10 lässt vermuten, dass es sich nicht um IL10 in der -RT handelt.

Vermutung

Wahrscheinlich handelt es sich doch um ein Primer-Problem.

Der nächste Schritt

Das Produkt aus der -RT-Kontrolle auf ein Gel auftragen und ausschneiden, um sicher zu gehen, was tatsächlich das positive Signal auslöst.

Persönliche Erfahrungen

Der Einblick in die Forschungswelt, den mir das VETResearch Projekt ermöglicht hat, sehe ich als großen persönlichen Gewinn. Besonders gefallen hat mir, dass ich praktisch und selbstständig arbeiten durfte und nicht nur in dritter Reihe stand.

Während des Studiums konnte ich mir nie wirklich vorstellen, was es bedeutet, zu promovieren. Durch das Hineinschnuppern in die Forschung habe ich nun ein genaues Bild, was mir letztendlich in meiner Entscheidungsfindung bezüglich meiner weiteren Karriere sehr geholfen hat.

Ich möchte mich herzlich bei meinen Betreuern Herrn Dr. Frank Weber und Frau Sandra Kirsch bedanken, die mir stets geholfen haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht!

Einsatz von ovinen und bovinen ELISA zur genaueren Definition von PAG Verläufen sowie einer verlässlicheren Frühträchtigkeitsdiagnose beim Schaf

Anne Simoni

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung
Betreuer/in: Dr. Katja Voigt, Dr. Frank Weber

Einleitung

Als etablierte Methode und Gold Standard der Trächtigkeitsdiagnose für kleine Wiederkäuer gilt momentan die Ultraschalluntersuchung, die transabdominal ab Tag 35 der Trächtigkeit verlässliche Ergebnisse liefert. Da der sichere Umgang mit einem Ultraschallgerät jedoch Routine und Übung erfordert, sollte dieses Projekt alternative Möglichkeiten der Trächtigkeitsuntersuchung durch Nachweis trächtigkeitsassoziierter Glykoproteine (Pregnancy-associated glycoproteins, PAGs) untersuchen.

PAGs werden in den mono- und binucleären Trophoblastenzellen der Plazenta synthetisiert. Sie werden ab Implantation der Eizelle bis 1-2 Tage vor der Geburt produziert. Ihre physiologische Wirkung ist noch nicht abschließend geklärt. Klar ist aber die Nachweisbarkeit in Blut und Milch. Dies wird in der Rindermedizin bereits erfolgreich zur Trächtigkeitsdiagnose genutzt. Beruhend auf der Tatsache, dass sich die PAGs der Rinder und Schafe zu 75% gleichen (Xie et al. 1991), sollte nun die Praktikabilität des Nachweises von den für Rinder etablierten PAG-Tests bei Schafen untersucht werden.

Material und Methoden

Aus einem vorangegangenen Projekt (Steckeler et al. 2019) zeigte sich bereits die Möglichkeit, ovine PAGs erfolgreich mit einem bovinen qualitativen ELISA-Schnelltest von der Firma IDEXX zu detektieren. Es handelte sich um den IDEXX Rapid VISUAL Pregnancy Test, welcher in 30 Minuten ohne weiterführendes Laborequipment durchführbar ist und dessen Ergebnis optisch beurteilt wird. Doch die Ergebnisse zeigten Einbrüche der Sensitivität in der Frühträchtigkeit und in der Spezifität *post partum*.

In diesem Projekt werden 2 ELISA, ein semiquantitativer boviner ELISA ebenfalls von der Firma IDEXX und ein quantitativer oviner PAPP (pregnancy associated polypeptid A)-ELISA der Firma MyBiosource verwendet. Die Ergebnisse werden photometrisch bestimmt. Dies sollte eventuell aufgetretene diagnostische Unsicherheiten des optisch beurteilten Schnelltests aufgrund von Verfeinerung der Arbeitsweise und photometrischer Beurteilung ausschließen.

Als Probenmaterial standen Serum- und Plasmaproben des vorangegangenen Projekts (Steckeler et al. 2019) zur Verfügung. Dieses wurde zum einen von 11 Schafen *ante partum* wöchentlich von Tag 14 bis 49 und nachfolgend monatlich von Tag 60 bis 149 und zum anderen von 10 Schafen *post partum* wöchentlich bis Tag 63 entnommen.

Bei dem bovinen PAG ELISA der Firma IDEXX handelt es sich um einen Sandwich ELISA, der jeweils im Doppelansatz für die Serum- und Plasmaproben durchgeführt wurde, während es sich bei dem PAPP ELISA Test Kit der Firma My Biosource um einen kompetitiven ELISA, der mittels Standardkurve quantitativ ausgewertet werden kann, handelte. Es wurde ein einfacher Ansatz der Serum- und Plasmaproben nach Herstellerangaben durchgeführt.

Ergebnis

Aufgrund des Fehlens jeglicher Korrelation des PAPP ELISA Kits zu den Ergebnissen der Trächtigkeitsuntersuchungen per Ultraschall, welche sich beispielsweise durch niedrige Konzentrationen trächtiger Tiere und hoher Konzentrationen männlich-intakter Tiere abzeichnete, wurde dieser ELISA letztendlich von der Datenauswertung ausgeschlossen. Es fand daher ein Vergleich der Sensitivität und Spezifität zwischen den Daten des vorangegangenen Projekts (IDEXX Rapid VISUAL Pregnancy Test) und dem bovinen IDEXX ELISA des gegenwärtigen Projekts statt.

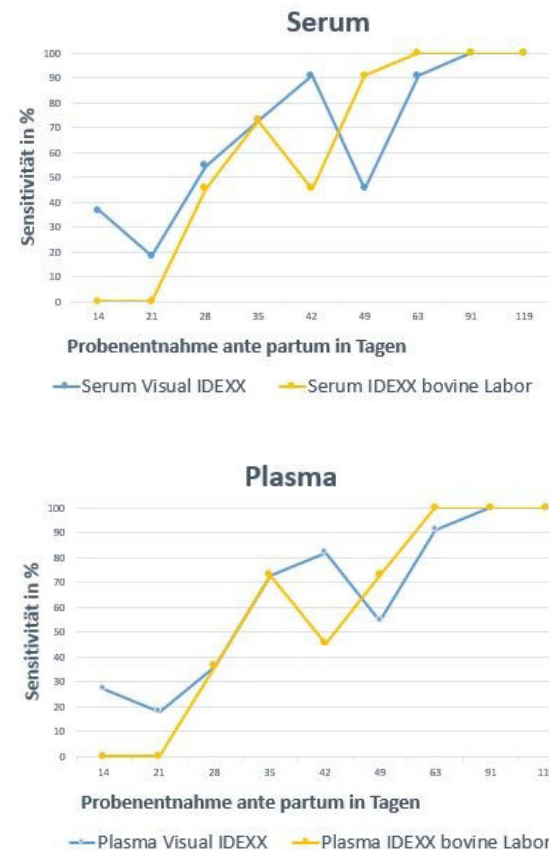


Abbildung 1: Vergleichende Sensitivität des visuellen IDEXX ELISA Schnelltests (blau) und des laborbasierten bovinen IDEXX ELISA (gelb) zu verschiedenen Zeitpunkten der Trächtigkeit

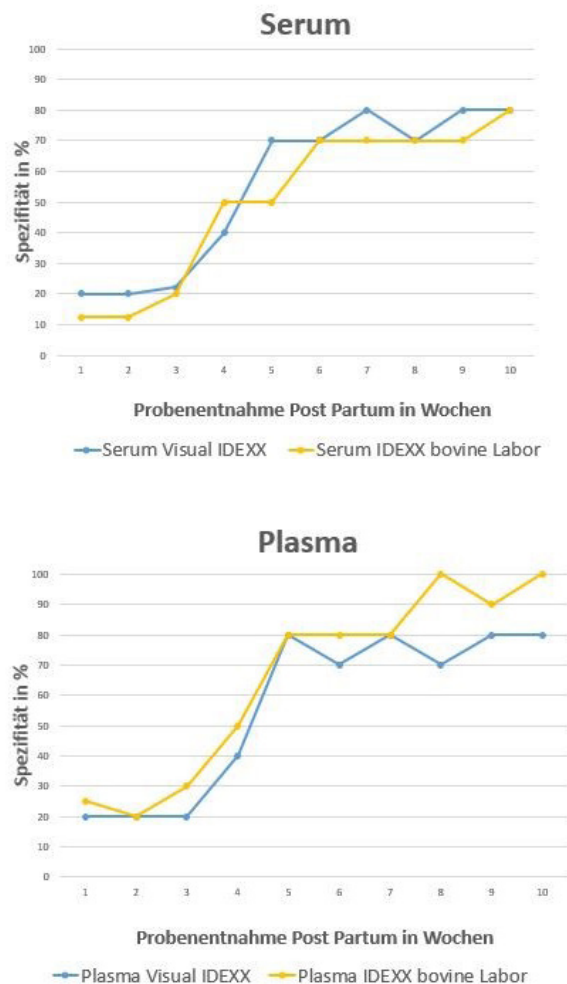


Abbildung 2: Vergleichende Spezifität des visuellen IDEXX ELISA Schnelltests (blau) und des laborbasierten bovinen IDEXX ELISA (gelb) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Geburt

Leider konnte anhand der neu durchgeführten Untersuchungen keine präzisere Aussage in der Frühträchtigkeitsdiagnostik getroffen werden, trotz Ausschluss der diagnostischen Unsicherheiten.

Dies veranlasst zu der Annahme, dass unterschiedliche PAGs zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Trächtigkeit verschieden sezerniert werden. Sie erreichen unterschiedliche Konzentrationen und besitzen individuell verschiedene Halbwertszeiten, was durch den unterschiedlichen Verlauf *post partum* belegt werden kann.

Aus der Literatur sind ähnliche Projekte bekannt mit sensitiveren Ergebnissen, allerdings erzielt durch sensitivere Untersuchungsverfahren sowie kleinere Versuchsgruppengrößen. Weitergehende Forschung bietet sich an (Rovani et al. 2016).

Persönliche Erfahrungen

Ich habe meine Zeit an der Klinik für Wiederkäuer sehr genossen. Durch nette Betreuung wurde ein Rahmen gesetzt, in dem man Freiraum für eigene Ideen haben konnte und gleichzeitig einen Ansprechpartner für Problem- und Hilfestellungen bekam. Es war sehr interessant, die strukturierte Arbeit im Labor kennen zu lernen, den Fokus auf die relevanten Arbeitsschritte zu setzen sowie Problemen und Fehlerquellen zu begegnen und an deren Lösung zu feilen.

Das VETResearch Projekt hat für mich einen Bereich der Tiermedizin beleuchtet, welcher mir zuvor unbekannt war. Ich hoffe, dass auch in Zukunft ähnliche Projekte ermöglicht werden können.

Literaturverzeichnis

Rovani, Monique Tomazele; Cezar, Alfredo Skrebsky; Rigo, Melânia Lazzari; Gasperin, Bernardo Garziera; Nóbrega Júnior, Janduí Escarião da; Torres, Fabrício Dias et al. (2016): Evaluation of a bovine pregnancy-associated glycoprotein enzyme-linked immunosorbent assay kit for serological diagnosis of pregnancy in sheep. In: *Cienc. Rural* 46 (2), S. 362–367. DOI: 10.1590/0103-8478cr20150270.

Steckeler, Patricia; Weber, Frank; Zerbe, Holm; Rieger, Anna; Voigt, Katja (2019): Evaluation of a bovine visual pregnancy test for the detection of pregnancy-associated glycoproteins in sheep. In: *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 54 (2), S. 280–288. DOI: 10.1111/rda.13356.

Xie, S. C.; Low, B. G.; Nagel, R. J.; Kramer, K. K.; Anthony, R. V.; Zoli, A. P. et al. (1991): Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (22), S. 10247–10251. DOI: 10.1073/pnas.88.22.10247.

Die Sensitivität im Verlauf der Trächtigkeit (Abbildung 1) sowie die Spezifität bei nicht-tragenden Tieren *post partum* (Abbildung 2) beider Tests zeigte ähnliche Verläufe.

In der Frühträchtigkeit zeigt sich im laborbasierten Test ebenfalls ein Einbruch der Sensitivität beider Testmaterialien, welcher sich nur etwas zeitlich verschoben darstellt.

Post partum deutet der IDEXX bovine Labor Test mit Plasma auf eine genauere Spezifität hin, da dieser als einziger alle beprobten Tiere am Ende des Beprobungszeitraums als richtig negativ diagnostiziert.

Vergleichende Untersuchung der Kolostrumqualität beim Schwein mittels Refraktometer und ELISA

Sebastian Sterk

Klinik für Schweine

Betreuerinnen: Dr. Sophie Gumbert, Dr. Susanne Zöls

Persönliches Fazit

Das VETResearch Projekt hat mir großen Spaß gemacht und ich kann es allen Studierenden unserer Fakultät uneingeschränkt weiterempfehlen. Zum einen fand ich es motivierend, mit Tieren praktisch zu arbeiten und gerade die selbstständige Geburtsüberwachung der Mutter-sauen war eine spannende Erfahrung für mich. Zum anderen war es interessant, Methoden der Labordiagnostik (ELISA) in der praktischen Durchführung zu sehen und alle Schritte, die es von der Probengewinnung bis zum Ergebnis und zur Auswertung braucht, nachverfolgen zu können. Die Durchführung eines Projekts mit lebenden Tieren ließ mich aber auch erahnen, wie herausfordernd eine klinische Studie mit größeren Probenzahlen wohl sein muss, da man trotz aller Planungen nie genau vorhersagen kann, ob und inwiefern sich der Plan auch tatsächlich am Tier umsetzen lässt. Diese Planungsunsicherheit im Umgang mit Tieren macht das Arbeiten, wie ich finde, jedoch auch sehr spannend und umso belohnender ist es, wenn am Ende ein brauchbares Ergebnis herauskommt.

Überaus positiv in Erinnerung bleiben wird mir auch das herausragende Arbeitsklima an der Klinik für Schweine. Ab der ersten Sekunde fühlte ich mich vom gesamten Team sehr herzlich aufgenommen - vielen Dank dafür! Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Betreuerinnen Frau Dr. Sophie Gumbert und Frau Dr. Susanne Zöls, mit denen ich dieses tolle VETResearch Projekt durchführen durfte.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

TIERÄRZTLICHE FAKULTÄT
ZENTRUM FÜR KLINISCHE TIERMEDIZIN
KLINIK FÜR SCHWEINE



Vergleichende Untersuchung der Kolostrumqualität beim Schwein mittels Refraktometer und ELISA

S. Sterk, S. Zöls¹, S. Gumbert¹

¹Klinik für Schweine, LMU München, Oberschleißheim

Einleitung

Neugeborene Säugetiere sind aufgrund ihres noch nicht vollständig ausgebildeten Immunsystems auf die Übertragung maternalen Antikörper angewiesen¹. Da beim Schwein eine Übertragung von Immunglobulinen (Ig) auf die Ferkel aufgrund der Plazenta epitheliochorialis² diaplastar nicht möglich ist, erfolgt dies ausschließlich über die Kolostralmilch. Ferkel sind innerhalb der ersten 36 Lebensstunden in der Lage oral aufgenommene Immunglobuline über die Darmschleimhaut zu resorbieren¹. Das Kolostrum unserer Hausschweine enthält Ig der Isotypen A, G und M – wobei IgG mit rund 80% der im Kolostrum vorhandenen Antikörper die vorherrschende Antikörperklasse darstellt³. In diesem VETResearch-Projekt sollte untersucht werden, ob die Kolostrumqualität von Sauen mit Hilfe eines Refraktometers beurteilt werden kann. Die Untersuchung des Kolostrums mittels Refraktometer könnte für den Landwirt eine im Stall durchführbare, kostengünstige Methode darstellen die Qualität des Kolostrums vor Ort zu überprüfen. Da der IgG-Gehalt im Kolostrum mittels ELISA bestimmt werden kann, wurde der IgG-Gehalt als Haupt-Qualitätskriterium gewählt.

Material und Methoden



Abbildung 1a-c: Geburtsüberwachung und Probenahme.

Ernehmen der Proben:

Mit der Geburt des 1. Ferkels wurde die erste Kolostrumprobe ermolken. Es wurde jeweils die entsprechende Zitze und der Zeitpunkt der Probenahme notiert. Weitere Proben folgten ungefähr zwei, vier und sechs Stunden später. Um zwischen der Qualität cranialer (ersten drei Zitzenpaare) und caudaler (letzten drei Zitzenpaare) Mammarkomplexe zu differenzieren wurden pro Zeitpunkt mindestens zwei Proben in jeweils ein Plastikröhrchen mit drei cm Durchmesser ermolken. Die Probengewinnung konnte generell ohne zusätzliche Oxytocingabe erfolgen. Eine Sau gab außerdem bereits ante partum genug Milch für eine Probe. Insgesamt konnten 61 Kolostrumproben ermolken werden.

Untersuchung der Proben:

Die während des Geburtsvorgangs ermolkenen Proben wurden bis zum Ende der Geburtsüberwachung bei 4°C gekühlt. Nach Abschluss der Geburt wurden die Proben mit einem digitalen Brix-Refraktometer des Herstellers „HANNA instruments“ (Typ-Bezeichnung: HI96801; Messweite: 0,0 - 85,0 %Brix) untersucht. Dieses Refraktometer misst außerdem die Temperatur der Probe und berücksichtigt sie im Messergebnis.



Abbildung 2a-d: Probenuntersuchung mittels Refraktometer und ELISA.

Nach dem Prinzip des Sandwich-ELISAs wurden die Proben durch den Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung der Tierärztlichen Fakultät auf ihren IgG-Gehalt untersucht. Die Proben wurden in zwei Zyklen untersucht.

Zusätzliche Datenerhebungen:

Von 86 lebend geborenen Ferkeln wurde das Geburtsgewicht vor Kolostrumaufnahme erfasst. Die Ferkel wurden nach dem Trockenreihen mit einem „Ferkel“-Pen nummeriert und die weitere Gewichtsentwicklung dokumentiert. Mittels der Formel nach Devillers⁴ konnte beispielsweise für die Ferkel von Sau 98099 eine durchschnittliche Kolostrumaufnahme von 25,65 Gramm/h innerhalb der ersten 19 Lebensstunden ermittelt werden.

Ergebnisse

Die Messergebnisse des Refraktometers betrugen für die Kolostrumproben zwischen 14,1 und 35,6 %Brix. Die mittels ELISA ermittelten IgG-Gehalte betrugen zwischen 8,7 und 135,5 mg pro ml Kolostrum. Für die Ergebnisse der beiden Messmethoden konnte eine signifikante Korrelation festgestellt werden ($r=0,684$).

In der vorliegenden Untersuchung konnte weder mittels Refraktometer noch mittels ELISA ein signifikanter Unterschied in dem IgG Gehalt der cranialen und caudalen Zitzen gemessen werden.

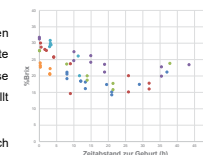


Abbildung 3: Refraktometer Messwerte der untersuchten Sauen zu verschiedenen Zeitpunkten.

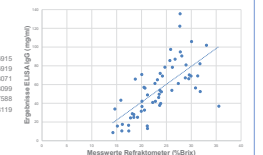


Abbildung 4: Ergebnisse der Untersuchung der Kolostrumproben mittels Refraktometer im Vergleich zu dem im ELISA gemessenen IgG-Gehalt.

Zusammenfassung und Diskussion

Aufgrund der positiven Korrelation der Ergebnisse der beiden Messmethoden und der für die Untersuchung mittels Refraktometer erforderlichen sehr geringen Probenmenge (<0,5 ml) kann das Refraktometer als praktisches Hilfsmittel zur Beurteilung der Kolostrumqualität im Stall betrachtet werden. Betriebsintern ist das Refraktometer geeignet, das Kolostrum verschiedener Sauen schnell und unkompliziert zu vergleichen. Bedingt durch den geringen Stichprobenumfang lassen sich jedoch keine Grenzwerte für gutes oder schlechtes Kolostrum definieren, hierfür wäre die Untersuchung von Kolostrum aus Sauen unterschiedlicher Betriebe, unterschiedlicher Genetik und ggf. mit unterschiedlichem Impfstatus interessant.

REFERENCES

1. Wolfram, S. (2014): Physiologie der Haustiere, S. 424
2. Kressin, M. (2019): Embryologie der Haustiere, S. 136 f.
3. Chase, C.; Lunney, K. (2012): Diseases of Swine, S. 242
4. Devillers, N. et al (2007): Variability of colostrum yield and colostrum intake in pigs, S. 1034

Auswirkung eines Ergänzungsfuttermittels („Energiekapsel“, Fa. Alfavet) auf die Inzidenz der subklinischen Ketose bei Kühen in der Frühlaktation

Verena Weinberg

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung
Betreuer: Dr. Rainer Martin

Persönliche Eindrücke

Die Teilnahme am VETResearch Projekt in der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität München war für mich eine perfekte Möglichkeit, erste Einblicke in Forschungsarbeiten zu erhalten. Da ich mir noch unsicher war, ob eine Doktorarbeit das Richtige für mich ist, hat dieses Projekt mir in der Entscheidungsfindung geholfen.

Für mich war es eine große Bereicherung, weitgehend eigenständig und wissenschaftlich arbeiten zu dürfen.

Spannend und wirklich sehr interessant habe ich die Entwicklung und Veränderung des Projekts im Laufe der Zeit empfunden.

Es hat mich sehr motiviert, die Verantwortung für ein eigenes Projekt zu übernehmen, Fortschritte zu sehen und Ergebnisse auswerten zu dürfen.

Ich kann es wirklich nur jedem empfehlen, solch ein Projekt im Laufe des Studiums zu machen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich für die geduldige und stetige Betreuung, Unterstützung und den Einsatz von Herrn Dr. Martin bedanken. Für die Möglichkeit dieser einzigartigen Erfahrung bin ich sehr dankbar. Es war mir eine Freude, mit ihm an diesem Projekt zu arbeiten.



Auswirkung eines Ergänzungsfuttermittels („Energiekapsel“, Fa. Alfavet) auf die Inzidenz der subklinischen Ketose bei Kühen in der Frühlaktation

Verena Weinberg, R. Martin

Hintergrund

- Laktationsbeginn → Leistungssteigerung → negative Energiebilanz
- Energieabgabe durch Milchproduktion höher als Energieaufnahme
- Entstehung von Ketosen und weiteren Erkrankungen
- Inzidenzen subklinischer Ketosen bis zu 70 %
- Zentrales Problem in Milchviehhaltung
- Studie: Überprüfung des prophylaktischen Einsatzes vom Ergänzungsfuttermittel zur Reduzierung der Häufigkeit von subklinischen Ketosen

Material und Methoden

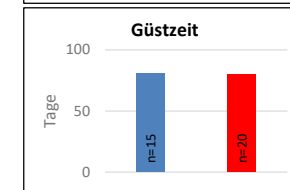
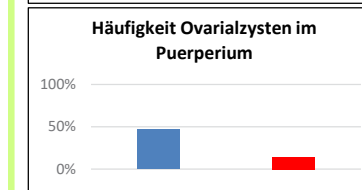
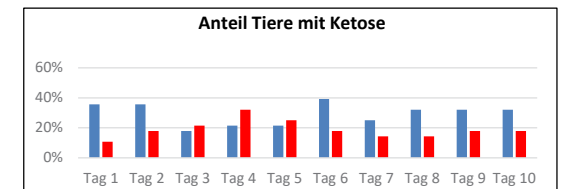
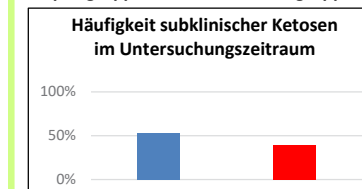
Anwendungsstudie:

- Besonderheiten der Kapsel: Pulverförmige Substanzen, leicht verabreichbar, schnell verfügbar
- 4 Betriebe im Ambulanzbereich
- Alternierende Gruppenzuteilung im jeweiligen Betrieb (Kapsel n=29/ohne (Kontrolle) n=29)
- Tag 10 und 11 p.p. Jeweils 2 Kapseln durch Landwirt
- Milchketosestest über 10 Tage (Tag 10 bis Tag 19 p.p.)
- Erkrankungen (subkl. Ketose, Ov. Zysten, Endometritis), Fruchtbarkeitskennzahlen



Ergebnisse (blau Kapselgruppe [n=29], rot Kontrollgruppe [n=29])

▪ Kapselgruppe Ø LN 3,0; Kontrollgruppe Ø LN 2,3



Zusammenfassung und Schlußfolgerung

- Therapeutischer Effekt zu erkennen (Abnahme des Anteils der Tiere mit Ketose)
- keine Aussage hinsichtlich prophylaktischem Effekt möglich
- Günstzeit ist trotz erhöhter Ovarialzysten- und Ketoseinzidenz in Kapselgruppe nicht erhöht

Referenzen

- Zhou R et al. (2019): Effects of oregano essential oil on the ruminal pH and microbial population of sheep. PLoS ONE 14(5):e0217054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217054>
- Dorn K et. al. (2016): A field trial on the effects of pure sodium propionate and a combination with herbal extracts on short term development of subclinical ketosis. Livestock Science 187, 87-95