

VETResearch 2020

LEHRE@VET
Research



Grußworte

Blickt man aus universitärer Sicht zurück auf das Jahr 2020, betrachtet man ein Jahr, welches von der SARS-CoV-2 Pandemie gezeichnet ist. Ein besonderes Jahr voller neuer Regeln, Umstrukturierungen und Einschränkungen. Labormeetings wurden durch Video-Konferenzen ersetzt, Vorlesungen und Seminare fanden nur noch online statt und oft mussten wissenschaftliche Fragestellungen hintenangestellt werden. Umso erfreulicher ist, dass trotz dieser außergewöhnlichen Situation im Rahmen der VETResearch Initiative viele spannende Forschungsprojekte von Studierenden durchgeführt werden konnten. Im Jahr 2020 war das Veterinärwissenschaftliche Department mit 10 Projekten vertreten und das Zentrum für Klinische Tiermedizin führte 6 Projekte durch.

Bereits seit 2013 wurden jährlich Forschungsprojekte durch das VETResearch Programm gefördert. Den Studierenden bietet dieses Format die Möglichkeit, sich erstmals eigenverantwortlich mit wissenschaftlichen Fragestellungen auseinanderzusetzen. Sie übernehmen Verantwortung für die Datenerhebung im Labor oder am Tier sowie für die Auswertung und Darstellung der erhobenen Ergebnisse. Dabei erhalten sie erste Einblicke in Literaturrecherche und statistische Analysen. Die Auswertung und Diskussion ihrer Ergebnisse erfolgt mit den Betreuern und der jeweiligen Arbeitsgruppe. Bei den Studierenden sind die VETResearch Projekte sehr beliebt, nicht zuletzt da durch den Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten der Wunsch nach einer Promotion konkretere Formen annimmt. Für uns BetreuerInnen ermöglicht das VETResearch Format die Bearbeitung einzelner Fragestellungen, die z.B. auch als Vorarbeiten für Projektanträge verwendet werden können. Die Studierenden bei der Umsetzung der Projekte zu begleiten ist sehr inspirierend und besonders schön, wenn dabei die Begeisterung für die Wissenschaft entfacht wird. Wir bedauern sehr, dass 2020 das vorerst letzte Förderungsjahr war und die VETResearch Initiative nun ausläuft. Einige der beteiligten Arbeitsgruppen haben bereits in Aussicht gestellt, das bewährte Format in modifizierter Form fortzuführen.

Normalerweise hätten die Studierenden bei der jährlichen Abschlussveranstaltung die Möglichkeit gehabt, ihre Ergebnisse vorzustellen und zu diskutieren. Leider musste die Veranstaltung aufgrund der Pandemie dieses Mal abgesagt werden. Wie jedes Jahr dient die vorliegende Broschüre der zusammenfassenden Darstellung der durchgeführten VETResearch Projekte 2020 und bildet die beeindruckende Vielseitigkeit der umschriebenen Forschungsprojekte der Studierenden ab. Die Lektüre möchte ich allen Interessierten wärmstens empfehlen.

An dieser Stelle möchte ich mich im Namen aller BetreuerInnen bei den Studierenden für ihre Motivation, ihr Interesse und ihre Ausdauer bei der Durchführung der Projekte in diesem außergewöhnlichen Jahr bedanken. Außerdem möchten wir uns ganz herzlich beim Studiendekanat unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Göbel, insbesondere bei unseren Ansprechpartnerinnen Frau Dr. Stoll und Frau Dr. Beitz-Radzio für die Organisation und Unterstützung bedanken.

Dr. Marie Meyerholz

Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Das VETResearch Programm als Teilprojekt des Hochschulpaktes Lehre wurde seit 2013 regelmäßig mit großem Erfolg durchgeführt. Leider wird es nach fast 10 Jahren jetzt aufgrund der fehlenden Finanzierung eingestellt. Es ist aus meiner Sicht extrem schade, ein so erfolgreiches Programm einstellen zu müssen. Viele Studierende konnten in diesem Projekt erste Erfahrungen mit eigenen Forschungsprojekten sammeln und so hautnah erleben, wie wissenschaftliche Ergebnisse generiert werden und wie mühsam diese Arbeiten häufig sind. Der Einblick in die Forschungstätigkeit kommt während des Studiums häufig zu kurz. Die studentischen Forschungsprojekte haben hier eine Lücke geschlossen. Auch wenn wir anfangs nicht wussten, wie sich dieses Projekt entwickeln würde, sehen wir rückblickend auf eine sehr erfolgreiche Zeit zurück mit weit über 100 Projekten und jährlichen Retreats, bei denen die Ergebnisse vorgestellt werden konnten. Es war stets beeindruckend, mit welcher Begeisterung die Studierenden ihre Projekte präsentiert haben. Zahlreiche Publikationen wurden veröffentlicht und für einige Studierende waren die Projekte der Start in eine wissenschaftliche Karriere. Auch für die Betreuer*innen waren die Projekte von großem Wert, nicht nur wegen der Rekrutierung neuer potentieller Doktorand*innen, sondern auch, weil die Studierenden sehr gute Fragen zu den Projekten gestellt haben.

Wir werden daher versuchen, auch künftig interessierten Studierenden wissenschaftliche Projekte im Rahmen von Praktika oder der Schwerpunktambulanz anzubieten, um dieses erfolgreiche Modell auch weiterhin an der Fakultät aufrechtzuerhalten. Mein Dank gilt allen Beteiligten der Projekte, den Studierenden, den Betreuer*innen und den Mitarbeiterinnen, die für die Organisation des Projekts verantwortlich waren.

Prof. Dr. Thomas Göbel

Studiendekan der Tierärztlichen Fakultät

Projekte aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department

MALDI-TOF Spektren und Milchsäurebakterien als potenzielle Frischemarker von vakuumverpacktem Rindfleisch **Laura Führer** • Distribution and development of $\gamma\delta$ -T-Cells in the intestinal tract of chickens **Matilda Gromeier** • Establishing a database of monoclonal antibodies against CD-Markers in chickens **Matilda Gromeier** • Einfluss von Lactoferrin auf enteropathogene *Bacillus cereus* **Clara-Sophie Jugert** • Pilotstudie zum Phosphorgehalt im Speichel der Wildwiederkäuer und Kameliden **Marion Kiechle** • *Listeria monocytogenes* im „Viable But Not Culturable“ (VBNC)-Stadium - Rekultivierungsversuche zur Verbesserung der risikoorientierten Diagnostik **Oksana Kovalenko** • 3D imaging of fish kept in research facilities **Dominik von La Roche** • Charakterisierung der Antibiotikaresistenz von mesophilen und thermophilen Sporenbildnern **Eraclitos Petrou** • Untersuchungen zur Wirkung und Synthese des antifungalen Wirkstoffs Pyrrolnitrin **Lea Sonnenburg** • Sicherheit von Sous-vide gegarten Rumpsteaks **Marleen Tobisch**

Projekte aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin

Etablierung eines ELISAs zur Bestimmung von Serumkonzentrationen des bovinen Trächtigkeitserkennungssignals Interferon- τ (IFN τ) **Rhea Büchel** • Etablierung eines Chemotaxisassays mit Schafblut **Elena Gerdes** • Evaluierung des Therapieerfolges durch Fütterung einer hydrolysierten Diät bei Hunden mit chronischen Magendarmerkrankungen **Katarina Kuzek** • Antimikrobielle Aktivität von Typ-I- und Typ-II-Interferonen gegenüber bovinen Endometritis-Erregern **Thomas Metzler** • Etablierung einer Standardkurve für die absolute Quantifizierung der Interferon-tau-induzierten Gene PI3K, MX-1 und MX-2 mittels real-time q-PCR **Karina Schechner** • Evaluierung von Messungen im Röntgenbild zur Auswahl der korrekten Sägeblattgröße bei der präoperativen Planung der TPLO **Hannah Schwaiger**



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

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

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

Stand: August 2021

MALDI-TOF Spektren und Milchsäurebakterien als potenzielle Frischemarker von vakuumverpacktem Rindfleisch

Laura Führer

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit und -analytik
Betreuer: Dr. Samart Dorn-In

Hintergrund

Die Vakuumierung von Fleisch beschränkt zwar das Wachstum aerober Verderbserreger, aber psychrotolerante fakultative Verderbserreger, wie zum Beispiel Enterobakterien und Milchsäurebakterien, können innerhalb des Haltbarkeitszeitraums weiter wachsen.

Es sind Betrugsfälle denkbar, bei denen vakuumverpacktes Rindfleisch nach Ablauf des Verbrauchsdatums ausgepackt, mit Wasser abgespült, abgetropft, und erneut vakuumiert wird. Dieses Fleisch könnte dann als angeblich frisches Fleisch wieder in den Handel gebracht oder in Drittländer exportiert werden.

Man geht davon aus, dass durch das Abspülen die Anzahl der Bakterien auf der Oberfläche des Fleisches so weit reduziert wird, dass die Gesamtkeimzahl den Anforderungen an frisches Fleisch entsprechen würde. Unter diesen Umständen wäre ein Betrug mit den gängigen mikro- und molekularbiologischen Methoden möglicherweise nicht nachweisbar.

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen dieses VETResearch Projektes vakuumierte Rindfleischproben untersucht, um eine Antwort auf die Frage zu ermöglichen, inwiefern das MALDI-TOF Spektrum und die Anzahl der Milchsäurebakterien im Fleischsaft ein geeigneter Indikator für frisches bzw. verdorbenes Rindfleisch sind.

Methodik

Im Verlaufe des Projektes wurden sieben Rindfleischproben (M1 - M7) untersucht. Bei den Proben handelte es sich um vakuumiertes Rindfleisch aus dem Handel; zweimal Hüftsteak, viermal Rumpsteak und einmal Minutensteak. Eine Probe bestand jeweils aus vier Fleischstücken der gleichen Charge. Die Proben wurden bis zum Verbrauchsdatum bei 4 °C gelagert. Nach Ablauf des Verbrauchsdatums (Tag 0) sind die Proben bei zwei Temperaturen, 4 °C und 10 °C, weitere 14 bzw. 21 Tage gelagert worden. Je zwei Fleischstücke derselben Probe wurden bei der gleichen Temperatur gelagert. Die Proben sind 7 bzw. 14 Tage nach dem Verbrauchsdatum ausgepackt, mit Trinkwasser abgewaschen, abgetupft und danach wieder in einer frischen Verpackung vakuumiert worden (siehe Abbildung 1). Per Kanüle und Spritze wurden 6- bzw. 4-mal Fleischtropfsaftproben, jeweils ca. 1 - 3 ml, entnommen (siehe Tabelle

1). Während der Entnahme des Fleischtropfsaftes wurde darauf geachtet, dass die anaeroben Bedingungen weiter bestehen bleiben.

Der Fleischtropfsaft wurde in zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße (im Weiteren Eppi) überführt. Für das MALDI-TOF MS wurden 100 µl (erstes Eppi), für die DNA-Extraktion 200 µl Fleischtropfsaft (zweites Eppi) benötigt. Der Rest wurde bei -20 °C aufgehoben.



Abbildung 1: Schematische Darstellung der Probenbearbeitung an Tag 7, von links nach rechts: Fleisch (Rumpsteak) vor dem Abwaschen, nach dem Abwaschen und nach dem erneuten Vakuumieren

Tabelle 1: Schema der Fleischtropfsaftentnahme der Rindfleischproben (M1 – M7)

Tag	Proben M1, M2, M4, M5	Proben M3, M6, M7
0	Tag des Verbrauchsdatums	Tag des Verbrauchsdatums
7	Sieben Tage nach dem Verbrauchsdatum	Sieben Tage nach dem Verbrauchsdatum*
8	-	Ein Tag nach der Wiederverpackung
14	14 Tage nach dem Verbrauchsdatum*	Sieben Tage nach der Wiederverpackung
15	Ein Tag nach der Wiederverpackung	-
21	Sieben Tage nach der Wiederverpackung	-

* Tag des Abwaschens und erneuten Vakuumierens

Am Tag der Entnahme sind die Fleischtropfsaftproben mit dem MALDI-TOF MS untersucht worden. Um die Proben für die Untersuchung vorzubereiten, wurden 100 µl Fleischtropfsaft zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weitere Protein-Extraktion mittels Ameisensäure verwendet.

Die Proben M1, M2, M3 und M4 wurden mit einem kommerziellen DNA-Extraktions-Kit, High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Deutschland), bearbeitet. Nach der DNA-Extraktion erfolgte bei allen Proben eine quantitative PCR zum Nachweis von Milchsäurebakterien. Am Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit (LMU) wurden bereits das PCR Protokoll, ein Primerpaar, eine spezifische Sonde und die Standards für die Quantifizierung etabliert und für diese qPCR verwendet.

Auswertung und Diskussion

Ergebnisse der MALDI-TOF MS

Während der Lagerung vermehren sich die anaeroben Mikroorganismen, z.B. Laktobazillen, auf dem vakuumverpackten Fleisch und verstoffwechseln dieses. Sobald die Glukose und Kohlenhydrate im Fleischtropfsaft oder an der Oberfläche des Fleisches nicht mehr für das bakterielle Wachstum ausreichen, beginnt die Proteolyse (Gill, 1983). Die proteolytischen Mikroorganismen dringen in die Fleischfasern ein und zersetzen diese. Dadurch werden Proteine freigesetzt. Diese treten teilweise in den Fleischsaft über und lassen sich hier massenspektrometrisch bestimmen. Die mittels MALDI-TOF MS erzeugten Spektren wurden mit Hilfe des Programms Bionumerics (Applied Maths, Belgien) verglichen und zusammengefasst.

Anhand der Spektren kann man die verschiedenen Fleischstücke nach Art des Fleisches klassifizieren. Minutensteak (Probe M3) und Hüftsteak (Proben M4 und M6) werden einer Gruppe zugeordnet sowie Rumpsteak einer anderen (Proben M1, M2 und M7, Abbildung 2 A). Die Probe M5 ist zwar Rumpsteak, ihre Spektren sind aber ähnlich zu denen von Hüftsteak. Die MALDI-TOF MS Spektren gleicher Fleischgruppen (Minuten/Hüftsteak vs. Rumpsteak) wurden an den in der Tabelle 1 aufgelisteten Tagen verglichen. Abbildung 2B zeigt exemplarisch die Ähnlichkeit der Spektren der Minuten-/Hüftsteakproben (M3, M4, M6) nach dem Verbrauchsdatum. Am Tag des Verbrauchsdatums (Tag 0) werden ähnliche Spektren generiert. Schon länger gelagertes Fleisch dagegen erzeugt, sowohl bei 4 °C als auch bei 10 °C, andere Spektren. Die Fleischsaftproben von Tag 15 und 21 wurden nicht in das Dendrogramm mit einbezogen, da die Fleischproben schon deutlich verdorben waren und somit nicht als angeblich frisches Fleisch in den Handel gelangen könnten. Einen Tag nach dem Abwaschen (Tag 8 bzw. Tag 15) weisen alle Proben ähnliche Spektren auf, wie an dem Tag vor dem Abwaschen (Tag 7 bzw. Tag 14) (Daten nicht dargestellt).

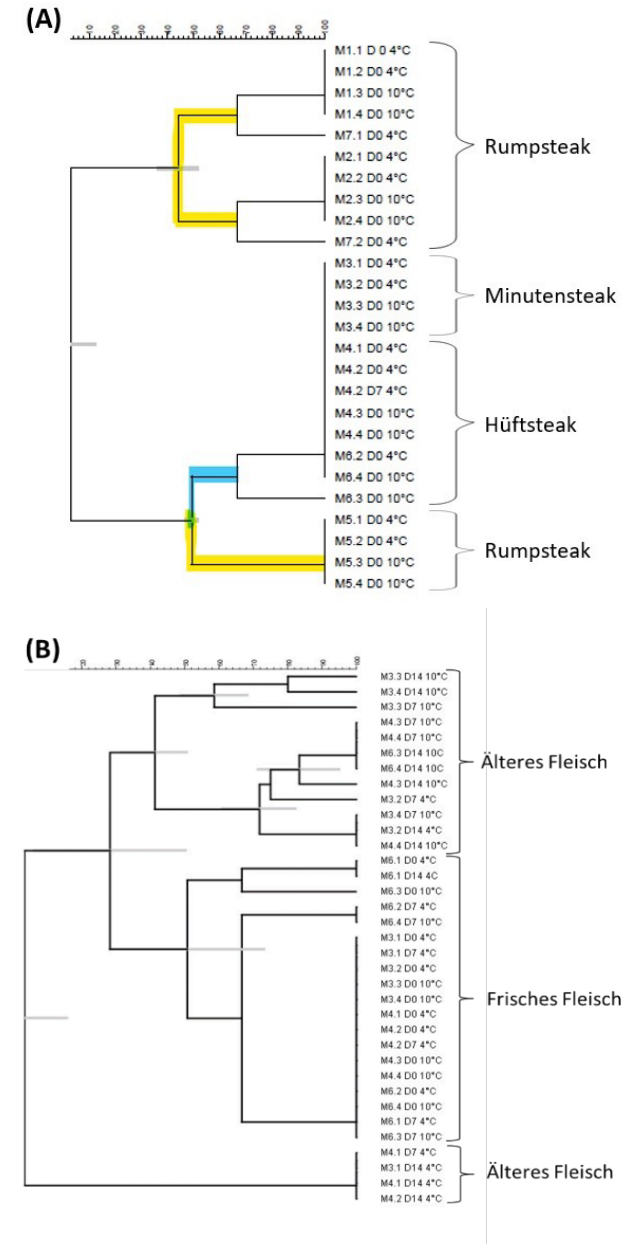


Abbildung 2: (A) Darstellung der Klassifizierung der Proben M1 - M7 am Tag des Verbrauchsdatums mittels Programm Bionumerics. (B) Dendrogramm der Minuten/Hüftsteakproben M3, M4, M6 ab dem Tag des Verbrauchsdatums bis 14 Tage später (M = Fleisch, D = Tag)

Ergebnisse der qPCR zum Nachweis von Milchsäurebakterien

Die Menge an Milchsäurebakterien-DNA nimmt ab dem Tag des Verbrauchsdatums immer weiter ab (Abbildung 3). Diese Abnahme lässt sich durch die Veränderungen während des Fleischverderbs erklären. Ein Grund dafür könnten PCR-Inhibitoren im verdorbenen Fleisch sein (Wolffs et al., 2004). Auch eine hohe Anzahl von Begleitkeimen im Fleisch kann einen hemmenden Effekt auf die PCR ausüben (Pennacchia et al., 2009) und in niedrigeren Werten resultieren.

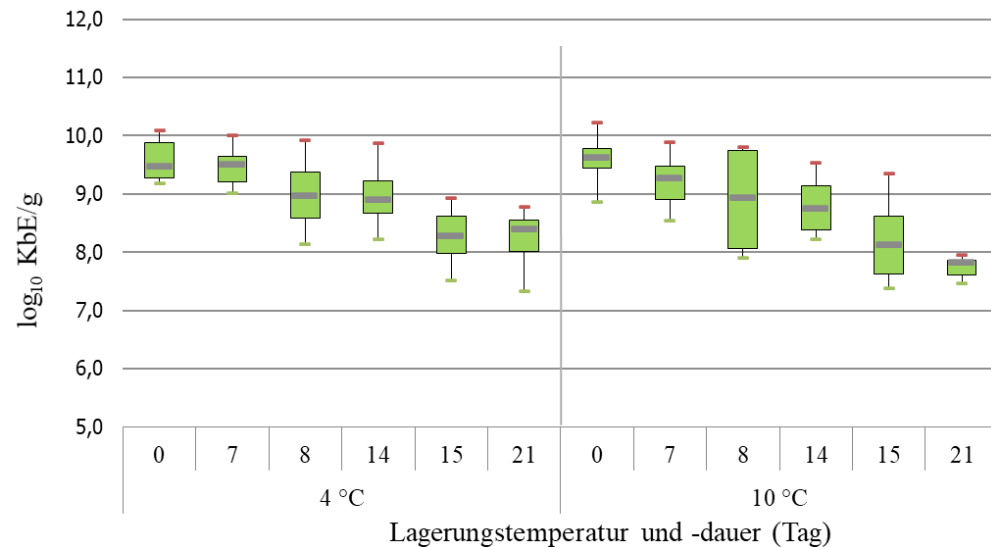


Abbildung 3: Darstellung der Menge an Milchsäurebakterien-DNA in den Proben M1 - M4 sowie M6 in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur und -dauer

Zusammenfassung

Abschließend kann man festhalten, dass die MALDI-TOF Massenspektrometrie als Marker für die Frische von Fleisch verwendet werden kann. Die verdorbenen Fleischproben weisen nach dem Abwaschen vergleichbare Spektren wie vor dem Abwaschen auf. Somit ist der Nachweis von verdorbenem Fleisch möglich. Jedoch sind weitere Forschungen für bestimmte Fleischmuskulaturen und -arten nötig, um die Methode der MALDI-TOF MS als Frischemarker weiter zu optimieren. Die qPCR auf Milchsäurebakterien ist kein geeigneter Frischemarker für vakuumverpacktes Rindfleisch, da in verdorbenem Fleisch (nach der Lagerung) weniger DNA nachgewiesen werden konnte als in Fleisch am Tag des Verbrauchsdatums.

Referenzen

1. PENNACCHIA, C., ERCOLINI, D. & VILLANI, F. (2009) Development of a Real-Time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh and spoiled raw meat. *Int J Food Microbiol* 134, 230-236.
2. GILL, C. O. (1983) Meat spoilage and evaluation of the potential storage life of fresh meat. *J Food Prot* 46, 444-452.
3. WOLFFS, P., KNUTSSON, R., NORLING, B. & RÅDSTRÖM, P. (2004) Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, Flotation, prior to Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 42, 1042.

Persönliche Erfahrung und Danksagung

Ein VETResearch Projekt kann ich jedem empfehlen, der sich für wissenschaftliches Arbeiten interessiert und hier einen Einblick bekommen möchte. Ich habe während meiner Zeit am Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit sehr viele neue und wertvolle Erfahrungen gesammelt. Besonders das selbstständige Arbeiten und die Verantwortung, die ich übernehmen durfte, haben mir sehr gut gefallen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Samart Dorn-In, der dieses Projekt möglich gemacht hat und immer als Ansprechpartner für mich da war. Außerdem bedanke ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für ihre großartige Unterstützung. Insbesondere bei Barbara Fritz und Sebastian Schlieff, die mich bei meinen Messungen mit dem MALDI-TOF unterstützt haben, sowie bei Erika Altgenug, die mir bei der Auswertung mit dem Bionumerics-Programm geholfen hat.

Distribution and development of $\gamma\delta$ -T-Cells in the intestinal tract of chickens

Matilda Gromeier

AG Immunologie

Betreuer/in: Dr. Grammatia Zengerling, Prof. Dr. Bernd Kaspers

Introduction

$\gamma\delta$ -T-cells are a subgroup of lymphocytes found in all mucosal tissues and in high numbers in blood of chickens. They are characterized by the expression of the $\gamma\delta$ -T-receptor that is recognized by the TCR1 monoclonal antibody. The receptor is a heterodimeric glycoprotein. Little is known about these cells, especially what role they play during immune responses and what their precise functions are. To facilitate future research into $\gamma\delta$ -T-cells, knowledge regarding their development and distribution post hatch is required. Thus, the aim of this project was to comprehensively describe the development of $\gamma\delta$ -T-cells in the gut over time and to compare this with the development of $\alpha\beta$ -T-cells by immune-histology.

Methods and materials

The chickens analyzed were from the genetic line M11 to assure a certain degree of comparable results. Samples from five age groups were harvested, composed of one day (1T), one week (1W), four weeks (4W), eight weeks (8W) and one year (1a) old animals, in which every age group was comprised of three animals (T₁, T₂, T₃). Once the samples were taken, they immediately got flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Samples from the Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum ("thin" and "thick" part) and Rectum were collected. As a control for the results another sub-population was stained, called $\alpha\beta$ -T-cells, which carry the TCR2-receptor.

7 μ M sections of each tissue sample were obtained using a cryomicrotome. To identify the cells in the samples an immune-histological staining procedure was applied. Using the antibodies TCR1 and TCR2, $\gamma\delta$ -T-cells and $\alpha\beta$ -T-cells were specifically stained. The antibodies were used at concentrations of 2,5 μ g/ml and 2 μ g/ml respectively. Next, samples were stained with a horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse antibody (Jackson Laboratories; 1:100 dilution in PBS with 25 % chicken serum) to detect binding of TCR1 and TCR2 to tissue resident cells. Samples were developed with DAB.

Immunohistological results

One day old birds

As shown in image 1, both T-cell populations were largely absent from the tissues regardless of the gut section. Sporadically, TCR1-positive cell were observed in the *Lamina propria*, but not in the epithelium. The same pattern was observed for TCR2-positive cells. In the small intestine (duodenum, jejunum and ileum), single cells are found, if at all. In contrast, in the large intestine and in particular in the rectum both cell populations formed small clusters close to the crypts of few samples.

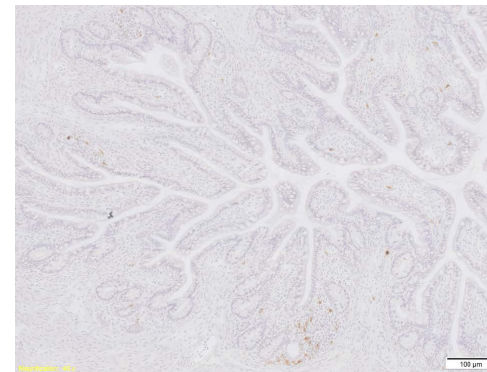


Image 1: 1T, T3 Rektum TCR1
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling



Image 2: 1T, T2 Jejunum TCR1
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling

One week old birds

At one week of age, more TCR1- and TCR2-positive cells appear in all gut sections. In addition, TCR1-cells were not restricted to the *Lamina propria* anymore, but start to appear between the epithelial cells.

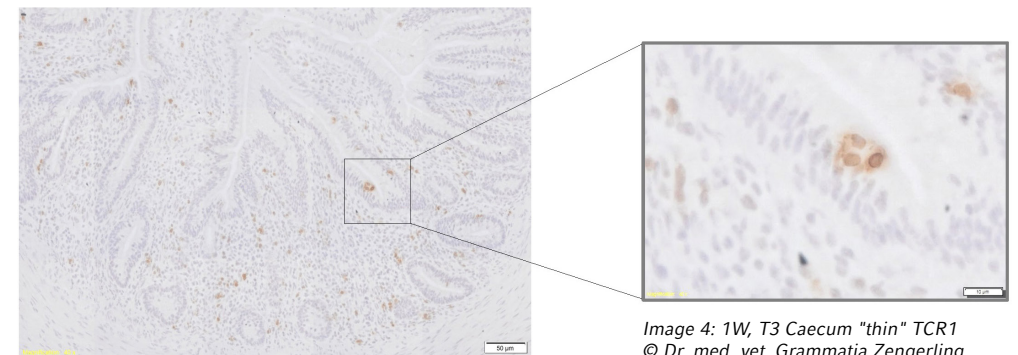


Image 3: 1W, T3 Caecum "thin" TCR1
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling

Image 4: 1W, T3 Caecum "thin" TCR1
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling

Four weeks of age

At this age, the migration of lymphocytes into the gut tissue has accelerated. A significant increase of both T-cell populations was observed. TCR2-positive cells are largely restricted to the *Lamina propria* and evenly scattered throughout the villi in their entire length. In contrast, TCR1+ cells are increasingly observed in the epithelium.

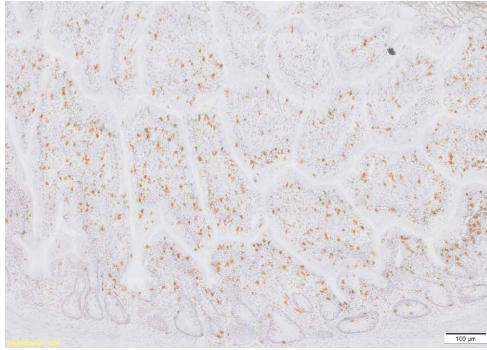


Image 5: 4W, T2 Ileum TCR1
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling

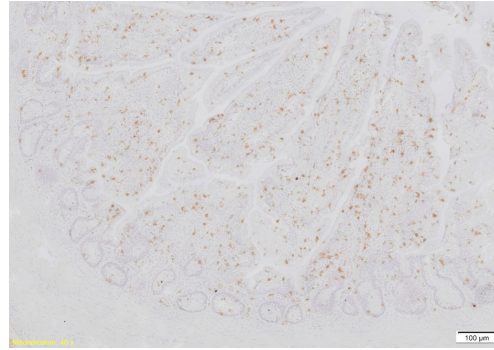


Image 6: 4W, T2 Caecum "thin" TCR1
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling

Eight weeks of age

Four weeks later even more cells are found in all gut sections, providing images of high densities of both cell types. TCR1+ cells are abundantly found in the epithelium, while TCR2+ cells mostly locate to the *Lamina propria* with the occasional exceptions found in the epithelium as well. TCR2+ cells also form clear clusters mostly adjacent to the crypt areas.

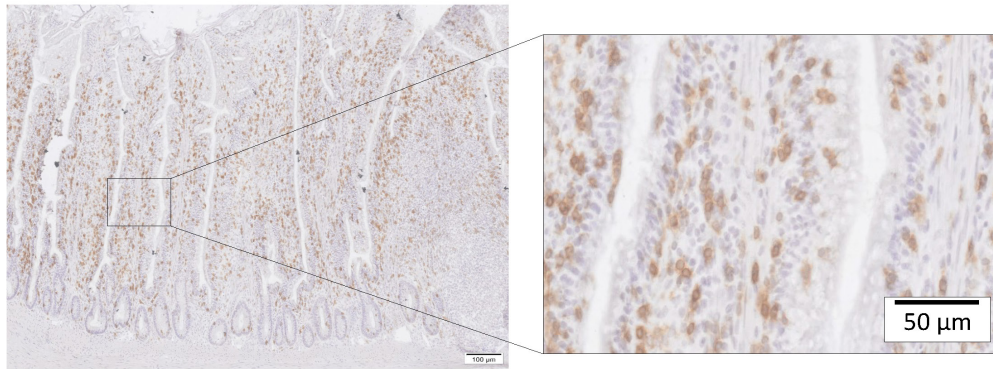


Image 7: 8W, T1 Ileum TCR1
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling

Image 8: 8W, T1 Ileum TCR1
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling

One year of age

Cell frequencies have not changed significantly in comparison with 8 weeks old birds. The distribution pattern observed is typical for adult animals, with TCR1+ cells frequently located in the epithelium and TCR2+ cells mostly restricted to the *Lamina propria*. Cluster formation can frequently be observed as well, predominantly in the large intestine, as can be seen in image 11.

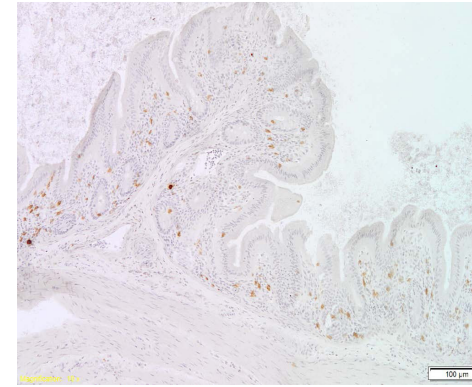


Image 9: 1a, T1 Caecum "thick" TCR1
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling

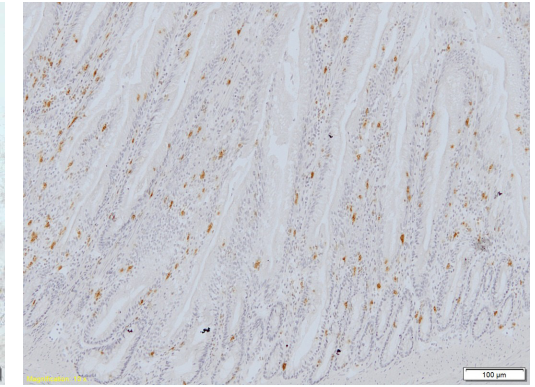


Image 10: 1a, T1 Duodenum TCR1
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling

Why TCR2 too?

Even though this project is primarily concerned with $\gamma\delta$ -T-Cells, the idea arose to analyze the development of $\alpha\beta$ -T-cells as well to serve as a comparison. These cells can be mostly found in the *Lamina propria* of the gut lining. In addition to that, one can also observe a tendency to form clusters, predominantly in the large intestine. Below some examples are shown.

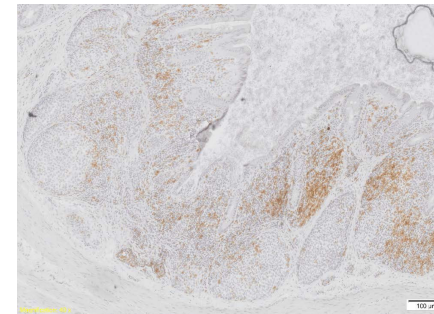


Image 11: 1a, T1 Caecum "thick" TCR2
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling

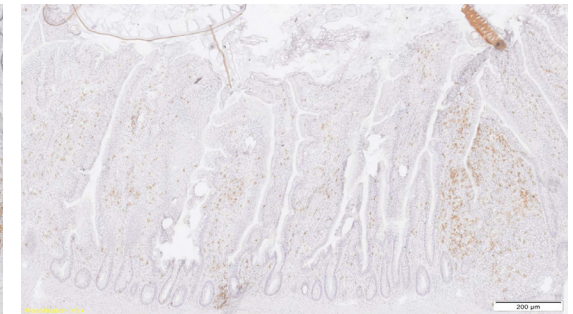


Image 12: 8W, T1 Ileum TCR2
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling

Conclusion

This extensive immuno-histological analysis provides a comprehensive picture of the colonization of the intestinal tissue by TCR1⁺ and TCR2⁺ T-lymphocytes from hatch to adulthood. While essentially no T-cells are present one day after hatch in all gut sections, increasing numbers are seen within one week. Initially, all cells are restricted to the *Lamina propria*, but TCR1⁺ cells start to migrate into the epithelial layer over the next couple of weeks. At 8 weeks of age, a fully mature picture is seen with large numbers of TCR2⁺ in the *Lamina propria*, but not in the epithelium. In contrast, TCR1⁺ cells populate both the *Lamina propria* and the epithelium.

Of note, no significant differences with regards to the developmental and distribution patterns and cell numbers were observed between different sections of the small and large intestine.

At this point of the project, it is unknown, if there are phenotypical and functional differences between those two populations. To address these questions, 8 weeks old birds should be studied since they display a fully mature gut T-cell system based on this study.

Personal experience

Overall I believe the work I have put into this project was just sowing the seeds, so I hope much more is to come.

What is to be done now is to try to understand the role of these lymphocytes. One approach that is on its way already, is to analyze their response in presence of a pathogen, for example Coccidian parasites, a single-celled intracellular parasite. The way these cells react could give insights for a possible therapy, given that these parasites pose a significant threat to poultry.

So the project goes on, and along with it I'll give my best to learn as much as possible. Already I am personally surprised as to what has now become usual for me to do. Not even a year ago, I would have been scared to hold a pipette that was worth one third of my monthly rent, while now I've gained enough dexterity around a laboratory setting for me to comfortably do my work. Of course, new challenges always arise on the horizon, so I hope the route I set sail on will lead me reliably.

I have to give a special thanks to Prof. Dr. med. vet. Bernd Kaspers and Dr. med. vet. Grammatia Zengerling for accompanying me along the way and constantly spurring me on. Also great thanks go out to all the coworkers at the laboratory, especially Marina Kohn for her great patience and astonishing abundance of knowledge.

Establishing a database of monoclonal antibodies against CD-Markers in chickens

Matilda Gromeier

AG Immunologie

Betreuer/in: Dr. Grammatia Zengerling, Prof. Dr. Bernd Kaspers

Introduction

Creating immune-histological images is a very common practice in laboratories all over the world, yet the results can differ greatly between institutions and within. Numerous monoclonal antibodies (mabs) reacting with chicken CD molecules were generated over the last decades. A data base is currently built to provide basic information on these mabs. Part of this information should be the applicability of such mabs for immune-histology best documented by well-selected images to provide a standard, laboratories using these mabs should live up to.

Materials and methods

Tissues from the small and large intestine of chickens aged one day and 8 weeks were used for immune-histology. For each age group, samples from three animals were collected and analysed. Samples were snap frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at -80 °C. To obtain appropriate histology slides, the samples were thawed to -20 °C and cut with the help of a Cryotome to a thickness of 7 µm. After dehydration of the slides, the mabs to be tested were applied for 30 min at concentrations of 10 µg/ml, 1 µg/ml and 0,1 µg/ml. Subsequently, the slides were washed and incubated with a horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse antibody (Jackson Laboratories; 1:100 dilution in PBS with 25 % chicken serum) to detect binding of primary mabs to tissue resident cells. Samples were developed with DAB.

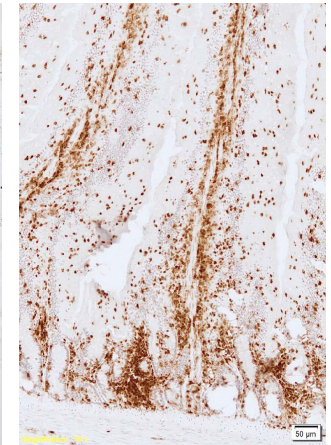
Results

Anti-CD45 (clone 16-6) antibody

The CD45-antigen is a member of the protein tyrosine phosphatase group and is the product of the PTPRC gene. It serves the purpose of regulating many different processes, among them cell growth and differentiation. It is found on differentiated hematopoietic cells, except plasma-cells and erythrocytes. Antibodies against CD45 are commonly used to differentiate between cells of the immune system and non-immune cells. As can be seen on the following images, CD45-positive cells can be found abundantly in the gut.



Image 1: 8W, T3 Jejunum, CD45 10 µg/ml
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling



Close-up of Image 1

Anti-CD25 (clone 28-4) antibodies

The CD25 antigen, also called interleukin-2 receptor alpha chain, is a transmembrane protein found on activated lymphocytes. Therefore, it is more commonly found in lymphatic tissue, for example as shown below in the caecal tonsil.

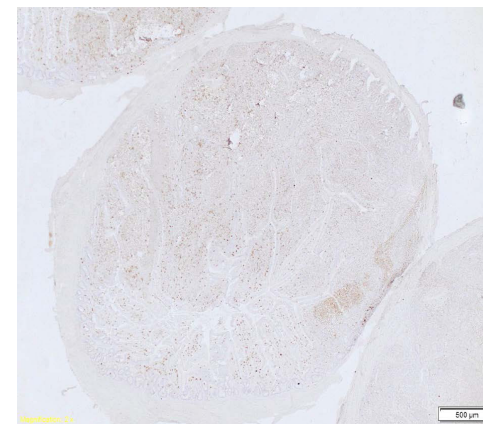
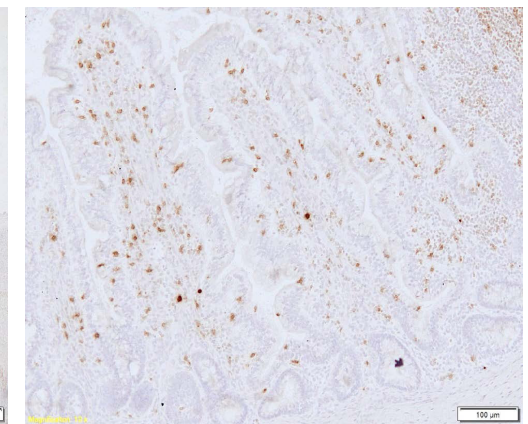


Image 2: 4W, T3 Tonsilla caecalis, CD25 10 µg/ml
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling



Close-up of Image 2

Anti-BAFF (clone 2C4) antibody

The anti-BAFF receptor is a member of the TNF-receptor family and an important prosurvival receptor on B-cells. It plays a vital role in the selection of adequate and mature B-cells. It is supposed to react as intensively as the AV20-antibodies, yet in our trials we couldn't confirm this, given that this antibody colored very lightly and diffusely, as seen in the image below.

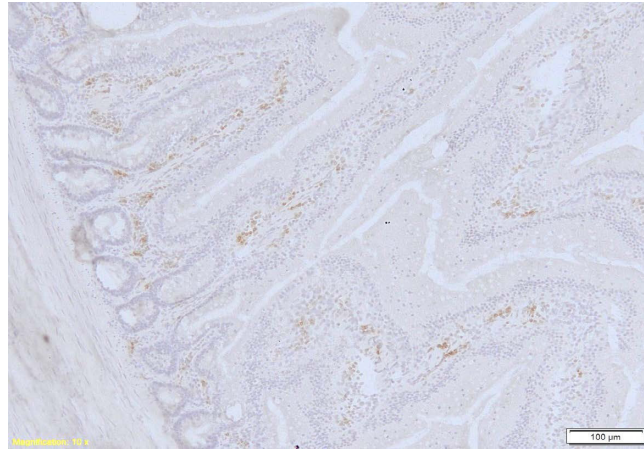


Image 3: 8W, T2 Jejunum,
anti-BAFF 10 µg/ml
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling

AV20 antibody

This antigen, also called Bu-1, is a transmembrane protein comprised of a glycosylated disulfide-linked homodimer. It is primarily found on B-cells and was reported to stain some intraepithelial T-cells, as well as a subset of macrophages and monocytes.

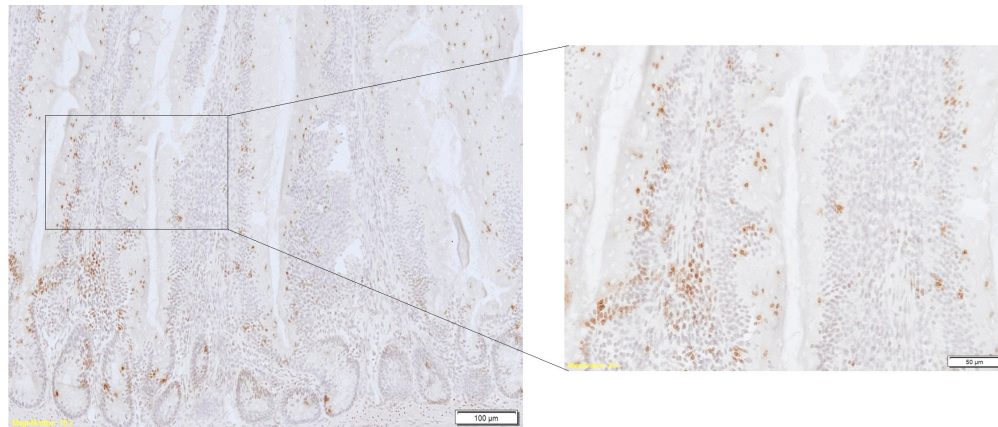


Image 4: 8W, T1 Duodenum, AV20 10 µg/ml
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling

Kul01 antibody

Kul01 is selective for macrophages and monocytes, as well as interdigitating cells and activated microglia cells. It doesn't react with Bu-1 positive cells or CD3 positive cells.

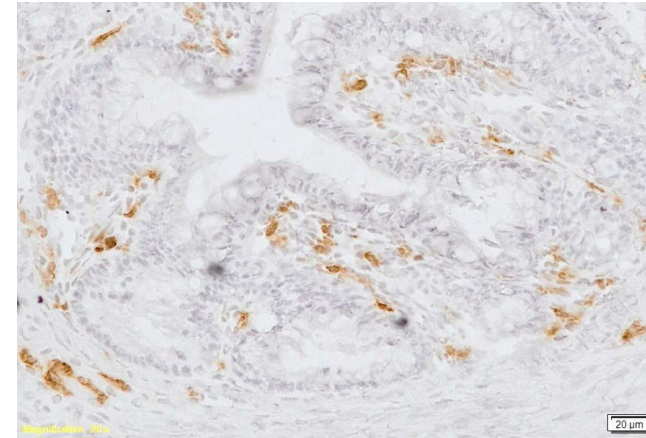


Image 5: 1T, T3 Rectum, Kul01 5 µg/ml
© Dr. med. vet. Grammatia Zengerling

Conclusion

As shown above, the selected mabs showed distinct staining patterns and staining intensities, even if they were reactive with CD molecules on the same cell type.

For example, while the AV20 antibody stained exceedingly well, also at low concentrations, the same can't be said for the anti-BAFF antibody, that stained very diffusely even at high concentrations. Trials with a positive control using samples from the bursa of Fabricius didn't conclude to a satisfactory result.

Another important distinction is the type of antibodies. For CD45 two different types of antibodies were used, one from our own laboratory generated in a bioreactor and one purified mab. Two experiments were carried out with the antibody from the cell culture and both were unsuccessful. So the purified antibody was tested and thankfully came back with great results.

In summary, I was able to obtain images of good quality for all tested antibodies which could be submitted to the Pirbright (UK) chicken mab database. Follow up studies should include additional antibodies, as well as studies with fluoro-chrom-labeled antibodies in multicolor experiments.

Personal experience

All in all I would personally call this a success. Of course, it takes much more than just five antibodies to build a database, but the base building blocks have been laid.

Immunohistochemistry is slowly beginning to feel much more practiced, so the idea of testing out much more antibodies is slightly less daunting, and just exciting enough.

Once again I warmly thank Prof. Dr. med. vet. Bernd Kaspers and Dr. med. vet. Grammatia Zengerling for the great opportunity and constant support. Special thanks go to Marina Kohn for all the additional help and insight.

Einfluss von Lactoferrin auf enteropathogene *Bacillus cereus*

Clara-Sophie Jugert
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
Betreuerin: PD Dr. Nadja Jeßberger

Hintergrund

Bacillus cereus ist ein ubiquitärer Bodenkeim, der in einer Vielzahl von Lebensmitteln nachgewiesen werden kann. Seine Fähigkeit zur Toxinbildung macht das Bakterium mittlerweile zu einem der häufigsten Erreger von Lebensmittelvergiftungen [1]. Die Toxine, die von *B. cereus* gebildet werden, sind primär für zwei Arten von Lebensmittelvergiftungen verantwortlich. Emetische Stämme lösen Lebensmittelintoxikationen aus, die Erbrechen hervorrufen. Enteropathogene *B. cereus*, die im Fokus dieses Projekts stehen, lösen Lebensmittelinfektionen aus, welche zu Diarrhö führen [2,3]. Es ist ein regelmäßig beobachtetes, aber bislang ungeklärtes Phänomen, dass *B. cereus* zwar sehr häufig in Milch und Milchprodukten nachgewiesen wird, aber dass es verhältnismäßig selten zu Krankheitsausbrüchen bedingt durch diese Lebensmittel kommt. Im Rahmen eines vorangegangenen Projekts wurden erstmals verschiedene Lebensmittel- und vor allem Milchkomponenten identifiziert, die sich hemmend auf die Aktivität der Enterotoxine im Zellkulturtest auswirken. Hierbei fiel vor allem Lactoferrin auf [4]. In diesem Projekt sollte der Einfluss von Lactoferrin auf enteropathogene *B. cereus* umfassend untersucht werden. Hierbei standen das Auskeimungsvermögen von Sporen, das Wachstumsverhalten der Bakterien in Minimalmedium, ihre Fähigkeit zur aktiven Bewegung sowie ihre zytotoxische Aktivität im Vordergrund. Durch die Untersuchung verschiedener enteropathogener *B. cereus* Isolate sollten in diesen Tests auch stamm-spezifische Unterschiede ermittelt werden.

Methodik

Auskeimung von Sporen

Die Auskeimung in LB Medium (ohne Zusatz oder mit 10 mg/ml Lactoferrin) wurde durch die Abnahme der optischen Dichte bei 620 nm per Zeiteinheit bestimmt. Die Messung erfolgte über 60 min alle 3 min. Die optische Dichte zum Zeitpunkt 0 wurde als 100 % definiert.

Wachstumskurven

CGY (Casein-Glucose-Hefe-Medium) wurde mit je einer Kolonie der *B. cereus* Stämme beimpft und über Nacht bei 32 °C und 250 rpm inkubiert. Frisches mMOD Minimalmedium (ohne Zusatz oder mit 1 mg/ml Lactoferrin, 10 mg/ml Lactoferrin, und 10 mg/ml Lactoferrin + 50 µg/ml FeCl₂) wurde mit den Übernachtskulturen auf OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Anschließend wurde über einen Zeitraum von neun Stunden alle 60 min die optische Dichte photometrisch bestimmt.

Toxinproduktion

Der quantitative Nachweis der Enterotoxine Hämolsin BL (Hbl) und nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe) im *B. cereus* Kulturüberstand erfolgte mittels Sandwich-Enzymimmunoassay mit folgenden spezifischen Antikörpern: 5 µg/ml mAb 2B11 / 1E11-HRP 1:2000 (NheB) und 10 µg/ml mAb 1A12 / 1H9-HRP 1:1000 (Hbl L2). Proben wurden anhand ihres reziproken Titors verglichen, dem umgekehrten Wert der höchsten Verdünnungsstufe mit einem Absorptionswert von ≥ 1.0 .

Zytotoxizitätsassays

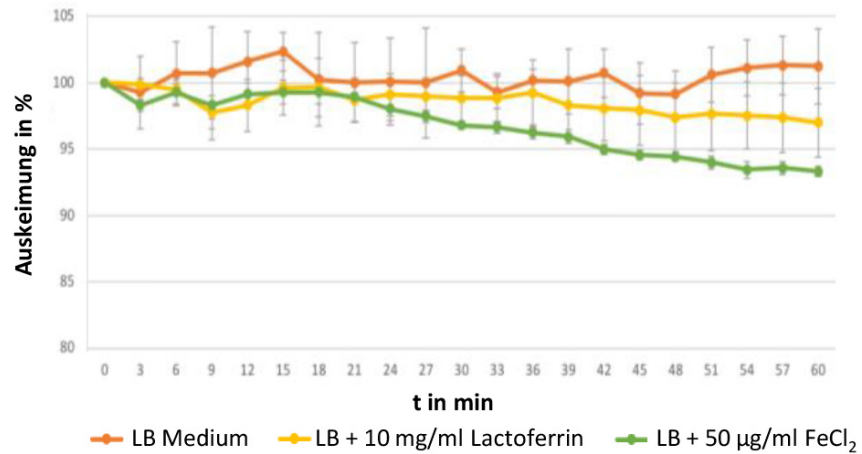
Zur Ermittlung der Zytotoxizität wurden zunächst serielle Verdünnungsreihen der *B. cereus* Kulturüberstände in 96 well Platten angelegt und 15.000 Vero Zellen pro well zugegeben. Nach 22-stündiger Inkubation bei 37 °C und 7 % CO₂ wurde WST-1 zugegeben, gefolgt von einer weiteren Stunde Inkubation. Viable Zellen mit intakter Atmungskette können durch die Umsetzung des schwach rot gefärbten Tetrazoliumsalzes WST-1 in das gelbe Formazan im Spektralphotometer bei 450 nm nachgewiesen werden. Der dadurch ermittelte reziproke Titer entspricht der Toxinverdünnung, bei der nach 24 Stunden 50 % der Zielzellen abgetötet wurden.

Motilität

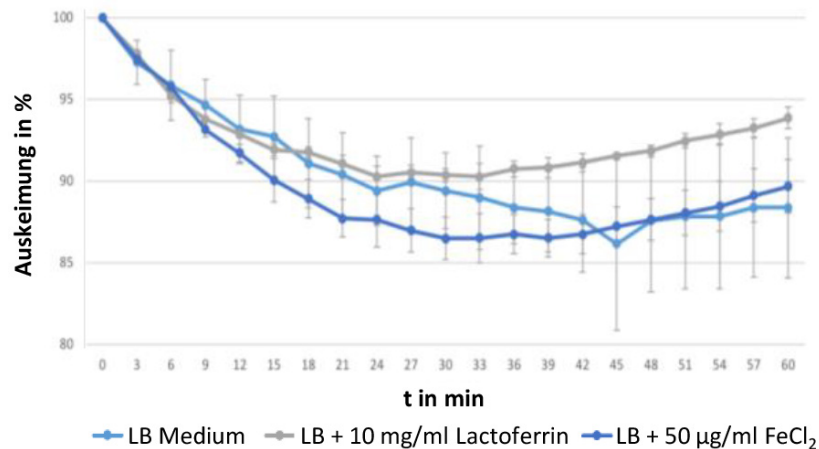
Je ein µl einer *B. cereus* CGY Übernachtskultur wurde mittig in eine mMOD Platte mit 0,25 % Agar injiziert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde der „swimming“ Durchmesser bestimmt.

Ergebnisse

MHI 3053 (schwache Auskeimung)

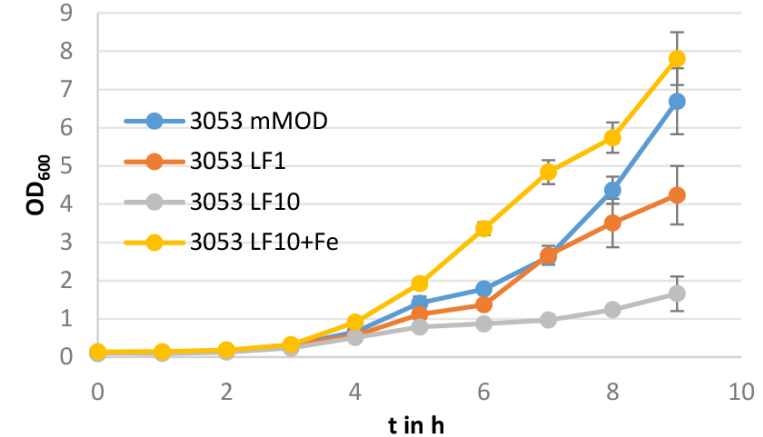


MHI 3172 (starke Auskeimung)

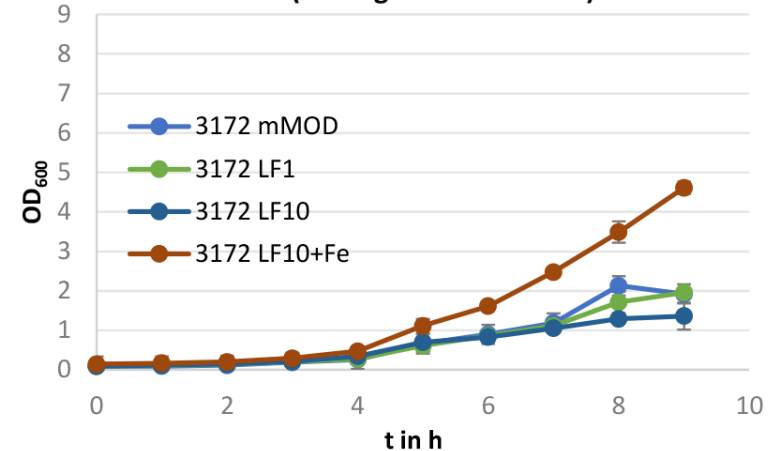


Das Auskeimungsvermögen von Sporen der *B. cereus* Stämme wurde vergleichend untersucht. Dargestellt sind jeweils ein Stamm mit schwacher sowie starker Auskeimungsrate. Durch Zugabe von 10 mg/ml Lactoferrin und vor allem 50 µg/ml FeCl₂ verbesserte sich die Auskeimung der Sporen generell deutlich.

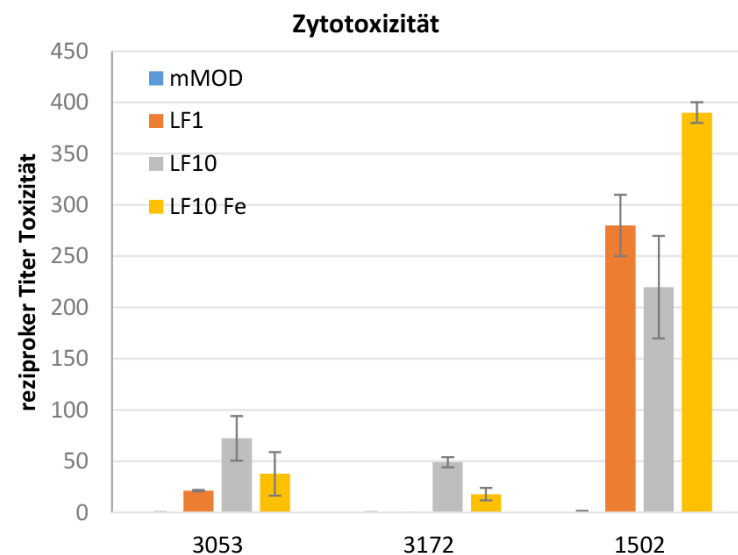
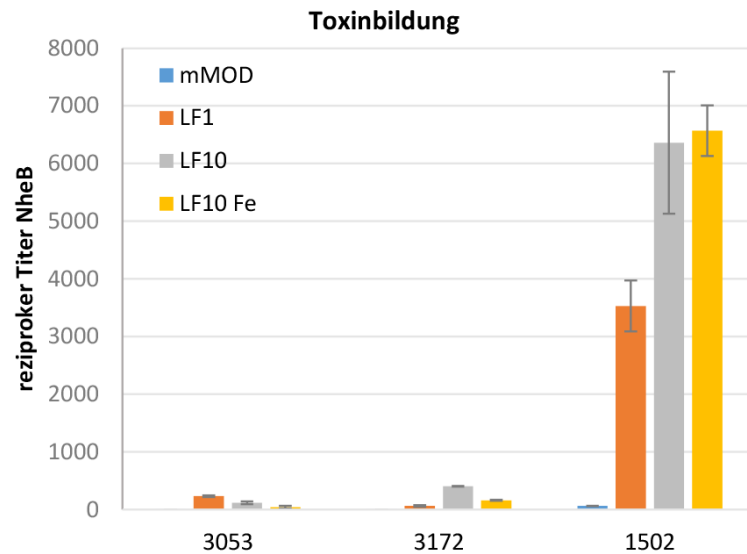
MHI 3053 (hohes Wachstum)



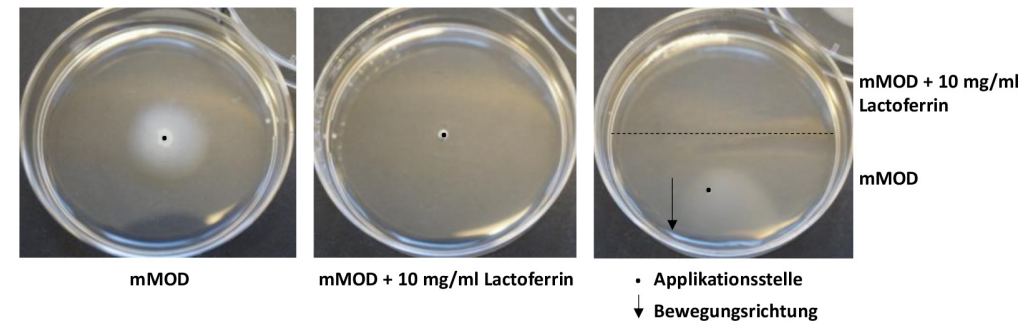
MHI 3172 (niedrigeres Wachstum)



Das Wachstum der Stämme in mMOD Minimalmedium war stamm-spezifisch sehr unterschiedlich. MHI 3053 z.B., der generell ein hohes Wachstum zeigte, wurde durch steigende Mengen an Lactoferrin gehemmt. Bei MHI 3172, generell mit verzögertem Wachstum, zeigten sich die Auswirkungen weniger. Generell wurde jedoch das Wachstum aller getesteten Stämme durch Zugabe von FeCl₂ gesteigert.



Auch das Toxinbildevmögen in Minimalmedium, hier getestet für die Toxin Komponente NheB, war stamm-spezifisch variabel. Nichtsdestotrotz wurde die Toxinbildung aller Stämme durch Zugabe von Lactoferrin gesteigert. Ebenso verhielt es sich mit der toxischen Aktivität gegenüber Vero Zellen.



Neben einer Hemmung des Wachstums sowie einer Steigerung der Enterotoxinproduktion führte die Zugabe von Lactoferrin auch zu einer Verringerung der Motilität der *B. cereus* Stämme auf mMOD Platten mit 0,25 % Agar, hier dargestellt für MHI 3053. Außerdem schienen sich einige Isolate auf geteilten Platten gezielt vom Lactoferrin wegzubewegen.

Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Projekt konnte erstmals gezeigt werden, dass sich die Zugabe des eisenbindenden Glykoproteins Lactoferrin zum einen hemmend auf das Wachstum sowie die Motilität, zum anderen aber fördernd auf die Produktion von Enterotoxinen und damit auf die zytotoxische Aktivität verschiedener *B. cereus* Stämme auswirkt. Ein Überschuss an Eisen hebt diese Wirkung nur zum Teil wieder auf. Die dem zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang noch unbekannt und können z.B. durch Gesamt-Transkriptomanalysen oder detaillierte Untersuchungen zu Genregulation und Motilität (Chemotaxis) aufgeklärt werden.

Referenzen

1. Märtlbauer, E., Becker, H. (2016). Milchkunde und Milchhygiene. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart.
2. Stenfor Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol Rev 32(4), 579-606. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x.
3. Jessberger, N., Dietrich, R., Granum, P.E., Märtlbauer, E. (2020). The *Bacillus cereus* food infection as multifactorial process. Toxins (Basel) 12(11), 701. doi: 10.3390/toxins12110701.
4. Da Rioli, C., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Jessberger, N. (2018). Consumed foodstuffs have a crucial impact on the toxic activity of enteropathogenic *Bacillus cereus*. Front Microbiol 9, 1946. doi: 10.3389/fmicb.2018.01946.

Persönliche Erfahrung

Ich möchte mich beim gesamten Team des Milchlehrstuhls bedanken! Allen voran bei meiner Betreuerin Frau Dr. Nadja Jeßberger, die es trotz der widrigen Umstände unter COVID-19 möglich gemacht hat, dass ich dieses derart interessante Praktikum absolvieren konnte. In den vier Wochen habe ich einen genaueren Einblick in den Laboralltag gewinnen können, mich mit Laborgeräten, Mediumsmischungen und Bakterienstämmen vertrauter gemacht sowie das wissenschaftliche Arbeiten geübt. Unter sehr guter Anleitung durfte ich vor allem auch viel praktisch arbeiten und selbst ausprobieren. Schnell wurde ich besser und präziser im sicheren Arbeiten im Labor und im Umgang mit Gefahrstoffen und Erregern. Ich begann, großen Spaß am Pipettieren, Inkubieren und Passagieren zu bekommen und auch das Auswerten der gewonnenen Daten war am Ende nur noch halb so schlimm. In diesem Praktikum konnte ich so viele neue Erfahrungen sammeln, dass sogar mein späterer Berufswunsch beeinflusst wurde. Durch das VETResearch Projekt ist mein Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten im Lebensmittelbereich noch einmal deutlich gestiegen, mehr noch als es die studiums begleitenden Kurse bereits vermocht haben. Ich hoffe sehr, nach abgeschlossenem Studium in diese Richtung gehen zu können. Vielen Dank für die lehrreiche Zeit!

Pilotstudie zum Phosphorgehalt im Speichel der Wildwiederkäuer und Kameliden

Marion Kiechle

Lehrstuhl für Tierernährung, Fakultät für Tierernährung
Betreuerinnen: Dr. Linda Böswald, Prof. Dr. Ellen Kienzle

Einleitung

Bei Wildwiederkäuern wie Reh- oder Rotwild spielt genau wie bei den Hauswiederkäuern Phosphor (P) in der Vormagenverdauung eine wichtige Rolle: Die Pansenmikroben benötigen eine optimale Versorgung mit P, um sich vermehren und die pflanzliche Nahrung fermentieren zu können. Nur so wird eine ausreichende Bereitstellung von Energie und Protein für den Wiederkäuer gewährleistet. Systematisch gehören Kameliden zwar nicht zur Unterordnung der Wiederkäuer (Ruminantia), allerdings ähnelt ihr Verdauungssystem dem des vierhöhligen Magensystems der echten Wiederkäuer. Ebenso wie die echten Wiederkäuer sind die Kameliden nicht dazu imstande, in Pflanzen enthaltene Zellulose ohne die im Magen vorkommenden, in Symbiose mit dem Tier lebenden Mikroben zu verdauen. Die echten Wiederkäuer (Ruminantia) lassen sich in drei Typen einteilen, die eine physiologische und anatomische Anpassung des Verdauungstraktes an ihre bevorzugte Nahrung aufweisen (Hofmann, 1989). Die „Grazer“ (GR, z.B. Rinder) fressen hauptsächlich Gras und damit sehr faserreiches Material, das intensiv wiedergekaut werden muss. Dagegen selektieren die „Browser“ („concentrate selectors“, CS, z.B. Rehwild) ihre pflanzliche Nahrung stärker auf energiereiche und leichter verdauliche Komponenten wie z.B. Blätter und junge Triebe hin. Viele Spezies sind sogenannte „Intermediate feeder“ (IM), die sich wechselnden Nahrungsgegebenheiten gut anpassen können (Hofmann, 1989).

Bei Hauswiederkäuern konnten Unterschiede im Phosphorgehalt im Speichel beobachtet werden. Laut Breves und Schröder (1991) liegt der P-Gehalt bei Ziegen höher als bei Rindern und Schafen, was für eine effizientere P-Rezyklisierung bei Intermediate feedern sprechen würde. Bislang liegen kaum Daten zum Gehalt an P im Speichel von Wildwiederkäuern vor. Fickel et al. (1998) fanden bei Damwild (IM) einen 6-fach höheren P-Gehalt im Speichel als bei Hausschafen (GR). Als Ursache für die höhere P-Sekretion im Speichel bei den IM werden Unterschiede im Knochenstoffwechsel zwischen den beiden Speziesgruppen vermutet, die sich im Calcium- und P-Haushalt niederschlagen. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Wildwiederkäuer aus der Gruppe der IM effizienter im P-Rezyklisieren sein könnten als die anderen Wiederkäuer-Typen (Böswald et al., under review, 2020), was zu dem bei Ziegen und Damwild (IM) beobachteten höheren Speichel-P-Gehalt passen würde.

Um diese Hypothese mit weiteren Daten zu überprüfen, sollte der P-Gehalt im Speichel von Wildwiederkäuern der Typen GR, IM und CS bestimmt und die Spezies miteinander sowie mit Hauswiederkäuern verglichen werden. Von Interesse war zudem, wie sich der P-Gehalt im Speichel von Kameliden im Vergleich zu den Ruminantia verhält.

Methodik

Um Speichelproben von Wildwiederkäuern und Kameliden in ausreichender Menge zu generieren, wurden verschiedene Forstämter sowie private Jäger, Tierparks, private Kamelidenhalter und Halter von Gatterwild dazu aufgerufen, Tiere zu beproben. Verschickt wurden Probenkits mit Salivette®-Probenröhrchen (Abbildung 1), Pinzetten, der Anleitung zur Probennahme und den vom Probennehmer auszufüllenden Probenbegleitscheinen. Bei zahmen Tieren wurden die Proben unter kurzer Fixierung des Kopfes entnommen (Genehmigung der Ethikkommission der Fakultät liegt vor), im Rahmen der Jagd ausübung bei frisch erlegten Tieren (Abbildung 2). Teilweise wurden auch bei aus anderen Gründen anästhesierten Tieren Proben gewonnen.



Abbildung 1: Salivette®-Probenröhrchen



Abbildung 2: Entnahme einer Speichelprobe am frisch erlegten Rehbock.
Foto: Sophia Lorenzoni für „Jagd in Baden-Württemberg“

Um Speichelproben zur Verfeinerung der Methodik zu gewinnen und gleichzeitig einen Vergleich unserer Wildwiederkäuer-Proben mit Hauswiederkäuern zu haben, wurden Speichelproben von Rindern (Klinik für Wiederkäuer, LMU) und Ziegen (private Haltung) verwendet.

Der im Salivette®-Schwamm enthaltene Speichel wurde abzentrifugiert und der P-Gehalt mit der Molybdat-Vanadat-Methode (Gericke und Kurmies, 1952) photometrisch gemessen. Zur Probenvorbereitung war die Enteiweißung der Probe mit Trichloressigsäure (1,2 mol; TCA) bei 4 °C und ggf. eine Verdünnung mit TCA nötig. Ein interner Standard ($c = 1,5 / 2 / 3$) diente zur Ermittlung des validen Messbereichs.

Da sich zeigte, dass der P-Gehalt zwischen Spezies und Individuen stark schwankt, wurde zunächst eine unverdünnte Probenmessung durchgeführt. Damit konnte grob eingeschätzt werden, wie die Probe in einem erneuten Ansatz verdünnt werden musste (VV), um ein Ergebnis im relativ kleinen Messbereich ($E = 0,1 - 0,2$) zu erzielen. Die Messung der Probe fand mittels Doppelbestimmung (E_1, E_2) unter Abzug der Eigentrübung (E_{leer}) bei 405 nm statt.

Mittels eingangs erstellter Standards konnte der P-Gehalt in mmol/L errechnet werden:
 $P \text{ [mmol/L]} = [(E_1 + E_2) / 2 - E_{\text{leer}}] / a \cdot VV$, wobei a die Steigung der Kalibriergerade ist.

Ergebnisse

Insgesamt wurden 99 Speichelproben analysiert (Verteilung siehe Tabelle 1). 49 Proben konnten aufgrund zu geringer Speichelmenge oder zu hoher Kontamination nicht ausgewertet werden.

Es konnten innerhalb der verschiedenen Spezies, sowohl bei Kameliden als auch bei den Ruminantia, erhebliche Unterschiede im P-Gehalt des Speichels festgestellt werden (Tabelle 1).

Während sich Altweltkameliden (AWK) verschiedener Subspezies ähneln, zeigten Neuweltkameliden (NWK) im Mittel einen höheren P-Gehalt im Speichel als Dromedare und Trampeltiere. Allgemein fiel auf, dass unter den in Mitteleuropa heimischen Ruminantia der P-Gehalt mit der Einteilung in die drei Typen GR, IM und CS (Hofmann 1989) korreliert. Somit weist z.B. das Rehwild als CS mit 36,18 mmol/L einen doppelt so hohen Gehalt an P auf als das Rotwild (IM), während in den von uns gemessenen Rinder- und Ziegenproben nur 3,97 bzw. 22,60 mmol P/L enthalten waren (Abbildung 3).

In Afrika beheimatete Antilopenarten sowie der asiatische Takin zeigten einen deutlich höheren Speichel-P-Gehalt (72,37 mmol/L) als der Rest der beprobten IM.

Tabelle 1: Übersicht über die analysierten Proben. Phosphorgehalt in mmol/L als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

Spezies	Systematik	Typ	n	P [mmol/L]
Trampeltier	AWK	GR	11	2,17 $\pm$ 0,68
Dromedar	AWK	GR	13	2,63 $\pm$ 1,16
Alpaka	NWK	GR	3	5,93 $\pm$ 8,21
Vikunja	NWK	IM	2	15,55 $\pm$ 11,10
Rehwild	R	CS	33	36,18 $\pm$ 14,88
Rotwild	R	IM	13	18,16 $\pm$ 5,66
Antilopen*	R	IM	6	72,37 $\pm$ 35,42
Takin	R	IM	1	81,20 $\pm$ 0
Bison	R	IM	2	32,30 $\pm$ 1,23
Java Banteng	R	GR	1	2,30 $\pm$ 0
Heckrind	R	GR	1	24,50 $\pm$ 0
Hausrind	R	GR	5	3,97 $\pm$ 1,51
Hausziege	R	IM	8	22,60 $\pm$ 15,68

* Mhorr gazelle, Flachlandnyala, Elenantilope

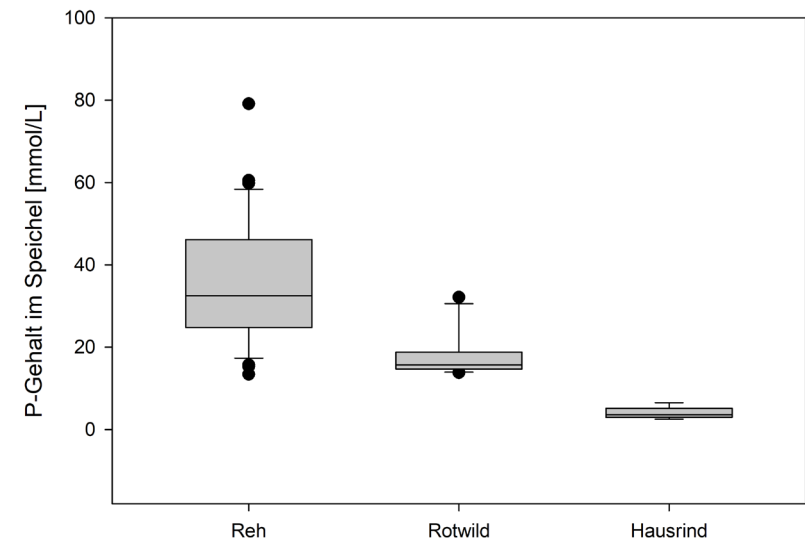


Abbildung 3: P-Gehalt im Speichel von Rehwild (CS), Rotwild (IM) und Hausrindern (GR).

Diskussion

Es konnte ein erster Überblick über den P-Gehalt im Speichel von Wildwiederkäuern und Kameliden gewonnen werden.

Da bedingt durch die Konzentrationsfähigkeit der Speicheldrüsen ab einer gewissen Obergrenze auch bei P-Exzess im Futter nicht mehr P in den Speichel sezerniert werden kann (Muscher 2006), können diese Ergebnisse auch nicht durch die Fütterung der in Menschenobhut lebenden Wildwiederkäuer erheblich falsifiziert werden.

In Bezug auf die in Mitteleuropa beheimateten Wildwiederkäuer konnte die Arbeitshypothese bestätigt werden, dass es Unterschiede im P-Gehalt des Speichels hinsichtlich der Ernährungstypen bei wiederkäuenden Herbivoren gibt. So verfügt z.B. das Rotwild als IM über weniger P im Speichel als das Rehwild (CS). Dieser Unterschied könnte evtl. mit dem höheren Tanningehalt der Nahrung der CS zusammenhängen, da vermutet wird, dass proteingebundenes P aus der Nahrung durch die Bindung der Proteine an Tannine weniger verfügbar ist (Hagermann und Butler, 1980; Tixier et al. 1997).

In Bezug auf die aus anderen Kontinenten stammenden Wiederkäuer bestätigte sich die Hypothese nicht. Spezies, in deren natürlichem Habitat P in Pflanzen eher knapp ist (Antilopen, Takin), wiesen einen auffallend hohen P-Gehalt im Speichel auf. Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass durch den Speichel möglichst viel P in den Verdauungskanal rezykliert werden soll. Es könnte hier eine Anpassung stattgefunden haben. Diese Vermutung bestätigt eine Arbeit von Böswald et al. (under review, 2020).

Die untersuchten Kameliden zeigen grundsätzlich einen niedrigeren P-Gehalt im Speichel als die Ruminantia, jedoch einen höheren Gehalt an P als nicht wiederkäuende Tiere wie z.B. Ponys (van Doorn et al., 2010).

Bei den Kameliden bildet sich ebenfalls die ursprüngliche Hypothese ab, dass die IM (Vikunja) höhere P-Gehalte im Speichel haben als die GR.

Zusammenfassung

Grundsätzlich konnten Zusammenhänge zwischen den Einteilungen nach Hoffmann (1989) und den gemessenen Phosphorgehalten nachvollzogen und ein Effekt des natürlichen Habitats festgestellt werden. Die Unterschiede in der Ernährungsweise (CS – GR – IM) bildet sich deutlich ab, wobei sich eine extrem niedrige P-Konzentration in den Pflanzen des natürlichen Habitats ebenfalls auswirkt. Spezies aus solchen Habitaten, wie z.B. die Antilopen, haben einen extrem hohen P-Gehalt im Speichel.

Auch bei den Kameliden konnten die Unterschiede der Ernährungsweise abgebildet werden.

Zusammenfassung

Durch mein Projekt hatte ich die Chance, einen guten ersten Einblick in mehrere Bereiche der Forschungsarbeit wie beispielsweise Labordiagnostik, Literaturrecherche und die statistische Auswertung zu erlangen, was für mich einen echten Zugewinn darstellte. Eine kleine Herausforderung war die Suche nach der richtigen Methode und die damit verbundene tiefere Recherche über Analytik, was mir sehr viel Spaß gemacht hat.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Ellen Kienzle, dem Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik und dessen Mitarbeitern. Mein besonderer Dank gilt Dr. Linda Böswald für die sehr gute Betreuung des Projekts, ihre Geduld und Hilfestellung und ihre didaktischen Fähigkeiten, mir das fachliche Knowhow zu vermitteln. Zudem möchte ich mich bei Dr. Mirja Wilkens (TiHo Hannover) für die Bereitstellung der modifizierten Methodik und bei Christian Overdiek für die Ermöglichung der Umsetzung dieser und sein großes Engagement für mein Projekt bedanken. Ein herzliches Dankeschön möchte ich an die Kollegen der Rinderklinik der LMU, alle privaten Tierhalter und den Tierpark Hellabrunn sowie ein kräftiges Waidmannsheil an alle Jäger richten, die mein Projekt mit zahlreichen Proben unterstützt haben.

Literatur

1. Böswald, L. F., Dobenecker, B., Lücht, M., Gohl, C., Kienzle, E., under review, (2020). Investigations on dietary and faecal calcium/phosphorus ratios in different types of captive ruminating herbivores. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*
2. Breves, G., & Schröder, B. (1991). Comparative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism. *Nutrition research reviews*, 4(1), 125-140.
3. Van Doorn, D. A., Everts, H., Wouterse, H., Homan, S., & Beynen, A. C. (2011). Influence of high phosphorus intake on salivary and plasma concentrations, and urinary phosphorus excretion in mature ponies. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 95(2), 154-160.
4. Fickel, J., Göritz, F., Joest, B. A., Hildebrandt, T., Hofmann, R. R., & Breves, G. (1998). Analysis of parotid and mixed saliva in Roe deer (*Capreolus capreolus* L.). *Journal of Comparative Physiology B*, 168(4), 257-264.
5. Gericke, S., & Kurmies, B. (1952). Colorimetrische Bestimmung der Phosphorsäure mit Vanadat-Molybdat. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*, 137(1), 15-22.
6. Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1980). Determination of protein in tannin-protein precipitates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 28(5), 944-947.
7. Hofmann, R. R. (1989). Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia*, 78(4), 443-457.
8. Muscher, A. S. (2006). Einfluss der diätetischen Phosphor-Versorgung auf die Parathormon- und Vitamin D3-Rezeptor-Expression in Niere und Jejunum bei Ziegen (Doctoral dissertation).
9. Tixier, H., Duncan, P., Scehovic, J., Yant, A., Gleizes, M., & Lila, M. (1997). Food selection by European roe deer (*Capreolus capreolus*): effects of plant chemistry, and consequences for the nutritional value of their diets. *Journal of Zoology*, 242(2), 229-245.

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

Teilprojekt 3

Oksana Kovalenko

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Betreuerinnen: Dr. Irene Esteban Cuesta, Prof. Dr. Karin Schwaiger

Hintergrund

Im VBNC-Zustand verlieren Bakterien ihre Fähigkeit, sich zu teilen und dadurch auf festem Medium zu wachsen, behalten aber ihre Virulenz und bleiben weiterhin infektiös. Unter günstigen Umständen können die Bakterien wieder in den teilungsfähigen Zustand übergehen, wodurch sie wieder kultivierungsfähig werden. Da *L. monocytogenes* schwere, teilweise lebensbedrohliche lebensmittelassoziierte Krankheiten auslösen kann, können die sich der konventionellen Diagnostik entziehenden VBNC-Formen eine Bedrohung für die öffentliche Gesundheit darstellen.

Zielsetzung

Im Rahmen dieses VETResearch Projekts sollen auslösende Faktoren und die Bedingungen, die zu einem VBNC-Zustand von *L. monocytogenes* führen, untersucht werden. Reaktivierungsversuche und der quantitative Nachweis von metabolisch aktiven Zellen auf Basis der CTC/DAPI-Färbung stellen die Forschungsschwerpunkte dar.

Material und Methodik

Für das Experiment wurden fünf Teststämme der Spezies *L. monocytogenes* unterschiedlicher Herkunft (aus Milchprodukten (L2), Schwein (L3), Wild (L7), Geflügel (L5) und Mensch (L10)) genommen.

Alle Testisolate wurden zuerst in 30 ml Brain Heart Infusion (BHI)-Bouillon angereichert (37 °C, 24 h), abzentrifugiert und die Bakterienpellets mit Reinstwasser gewaschen. Anschließend wurde ein McFarland Standard von 0,5 eingestellt. Der Ansatz erfolgte doppelt: Einmal in 200 ml Reinstwasser und einmal in 200 ml Reinstwasser mit 7 % NaCl.

Um die Listerien in den VBNC-Zustand zu überführen, wurden die Bakterien bei 20 °C auf einem Horizontalschüttler (100 rpm) unter einer Tageslichtlampe inkubiert [1]. Während der ersten 10 Tage wurden die Ansätze auf Plate-Count Agar ausgespatelt, um die Anzahl an kultivierbaren Bakterien zu bestimmen. Nach dem 10. Tag erfolgte die Ausplattierung wöchentlich (gerechnet ab Tag 0). Morphologische Veränderungen wurden parallel mittels Gram-Färbung untersucht.

CTC/DAPI Doppelfärbung für den Nachweis und die Zählung von VBNC *L. monocytogenes*

Der Nachweis von Isolat mit metabolischer Aktivität wurde mit Bacstain Bacterial Viability Detection Kit-CTC/DAPI (Dojindo EU GmbH) durchgeführt. Während DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) doppelsträngige DNA von allen (toten und lebenden) Zellen bindet, verstoffwechseln nur gesunde, metabolisch aktive Zellen CTC (5-Cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chlorid) und reduzieren dies zu unlöslichen rot fluoreszierenden Formazan Salzen.

Die CTC/DAPI-Färbung wurde an ausgewählten Tagen durchgeführt. Dafür wurde 1 ml der Bakteriensuspension zentrifugiert, mit PBS gewaschen und mit 20 µl CTC (37 °C, 1 h im Dunkeln) sowie 1 µl DAPI (Raumtemperatur, 5 min) inkubiert. Die gefärbte Suspension wurde auf eine Polycarbonat Filter Membran aufgebracht, filtriert und anschließend mikroskopiert. Die Zählung erfolgte stichprobenweise an sechs Mikroskopfeldern pro Filter (Fluoreszenzmikroskop Leica DM 5000B, 1000 x). Anhand der Formel:

$$T = N \times A / a \div V$$

wobei T die Bakterienzahl/ml ist, N der Mittelwert der Bakterienzahl pro Feld, A die Filterfläche (mm²), a die Sichtfläche, V das filtrierte Volumen, wurde die Zahl an VBNC-Listerien bestimmt.

Nicht mehr kultivierbare Stämme wurden parallel mittels der PMA-qPCR aus dem Teilprojekt 1 (2019) analysiert.

Rekultivierungsversuche

Die Wiederbelebung von VBNC-Bakterien kann durch mehrere Faktoren induziert werden. Kombinationen von Aminosäuren wie Methionin, Glutamin oder Threonin sowie Animal-Passage wurden bereits zur Wiederbelebung von VBNC-Zellen verwendet [2].

In diesem Projekt wurden nur die Ansätze ohne NaCl zur Rekultivierung verwendet. Alle Ansätze zeigten bereits seit dem Tag 7 kein Wachstum. Die VBNC-verdächtigen Zellen wurden mit Schweinenierenzellen zusammengesetzt (1:10). Die Zellkulturmischung (VBNC-Suspension und Schweinenierenzellen) wurde auf 5.69 Log₁₀ Zellen/ml verdünnt und 200 µl jeweils in Mikrotiterplatten aufgetragen. Die Ausplattierung erfolgte nach Inkubation bei 37 °C für 72 h. Es wurde jeweils 400 µl Überstand sowie 400 µl abtrypsinierte Zellsuspension auf Caso-Agar ausplattiert.

Im Rahmen der Rekultivierungsversuche wurde auch geprüft, ob die VBNC-Bakterien tote Bakterienzellen als Nährstoffquelle nutzen können, um sich rekultivieren zu lassen. Zu diesem Zweck wurde BHI mit Listerien beimpft und bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h wurde die Lösung zentrifugiert, mit Reinstwasser gewaschen und auf einen McFarland Standard von 7 eingestellt. Die Abtötung der Bakterien erfolgte bei 80 °C, 30 min, 500 rpm. Diese Suspension

diente als „Futter“ für die VBNC-Ansätze.

Den Teststämmen L2, L3, L7 wurden jeweils im Verhältnis 1:1 Futter zugegeben, und anschließend wurden sie bei 37 °C für 48 h inkubiert. Die Ausplattierung von jeweils 100 µl erfolgte täglich während zwei Wochen auf Blutagar. Als Kontrollansatz wurde BHI 1:1 mit den abgetöteten Bakterien ausplattiert und unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

Ergebnisse und Diskussion

Im Laufe des Versuchs wurde beobachtet, dass NaCl einen Einfluss auf Vitalität der Bakterien haben könnte. Während alle Ansätze ohne NaCl schon am Tag 7 nicht mehr kultivierbar waren, zeigten 4 von 5 Ansätzen mit 7 % NaCl nach 4 Wochen noch Wachstum (Abbildung 1).

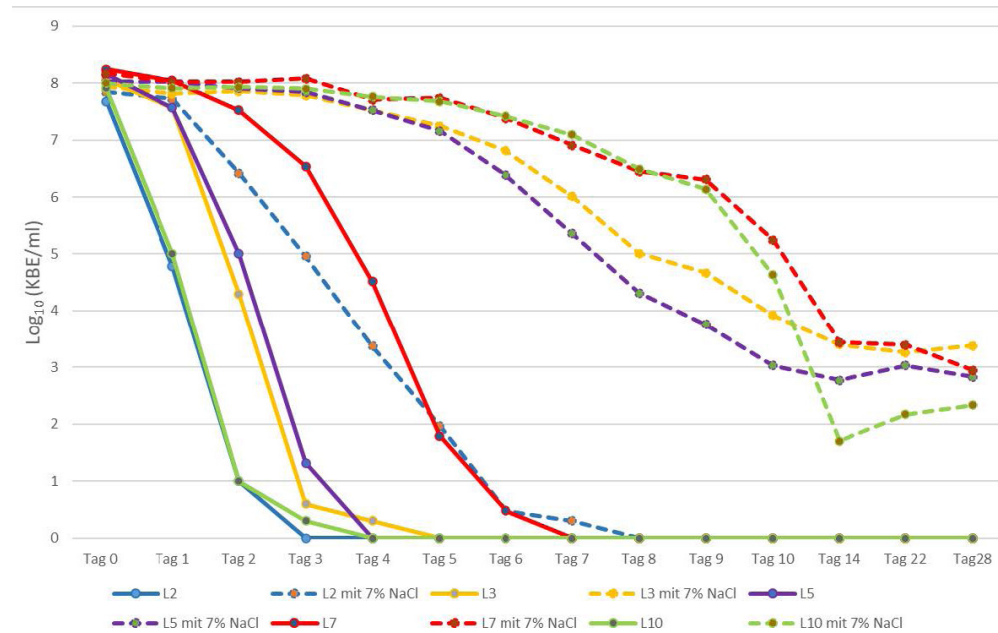


Abbildung 1: Wachstumsfähigkeit der Testisolate über 28 Tage

Auch in der Gram-Färbung konnten deutliche morphologische Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 2-5). Bei den Testisolaten aus dem Ansatz mit 7 % NaCl zeigten sich überwiegend blau gefärbte, vitale Zellen. Bei dem Ansatz ohne NaCl zeigten sich dagegen immer mehr rote, gramlabile Zellen, was auf geschädigte oder tote Zellen hindeutet. Manche Teststämme bildeten elongierte Stäbchen aus (Abbildung 5).

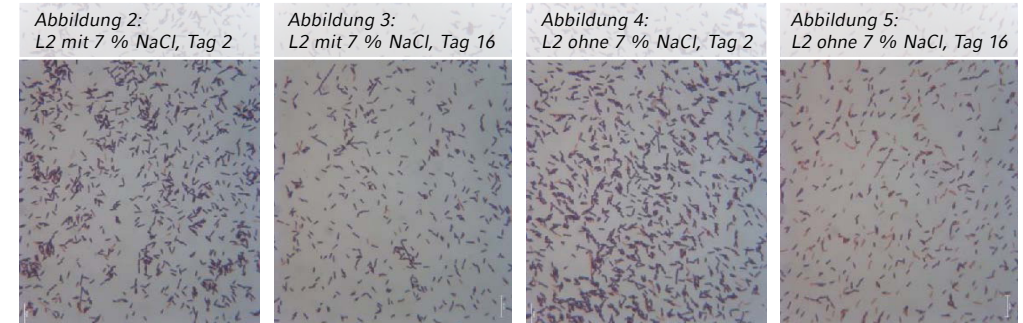


Abbildung 2-5, Gramfärbung: Morphologische Unterschiede der Teststämme aus Ansätzen mit und ohne 7% NaCl an verschiedenen Tagen

Direkte VBNC-Zählung mittels CTC/DAPI Färbung

Um die metabolische Aktivität in den nicht mehr kultivierbaren Zellen nachzuweisen, wurde die CTC/DAPI-Färbung eingesetzt (Abbildung 6-9). Während die Koloniezahl im Laufe des Versuchs bei allen Testisolaten abnahm, blieb die Konzentration an CTC-verstoffwechselten Bakterien nahezu konstant im Laufe der gesamten Experimentdauer (Abbildung 10). Auch mit der CTC/DAPI Färbung konnte man bei manchen Testisolaten elongierte Zellen sehen (Abbildung 9).

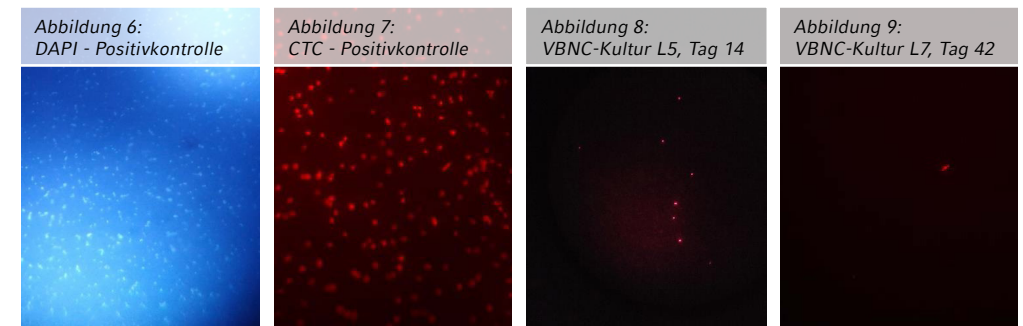


Abbildung 6-9: Nachweis der metabolischen Aktivität der Bakterien mit CTC/DAPI Färbung

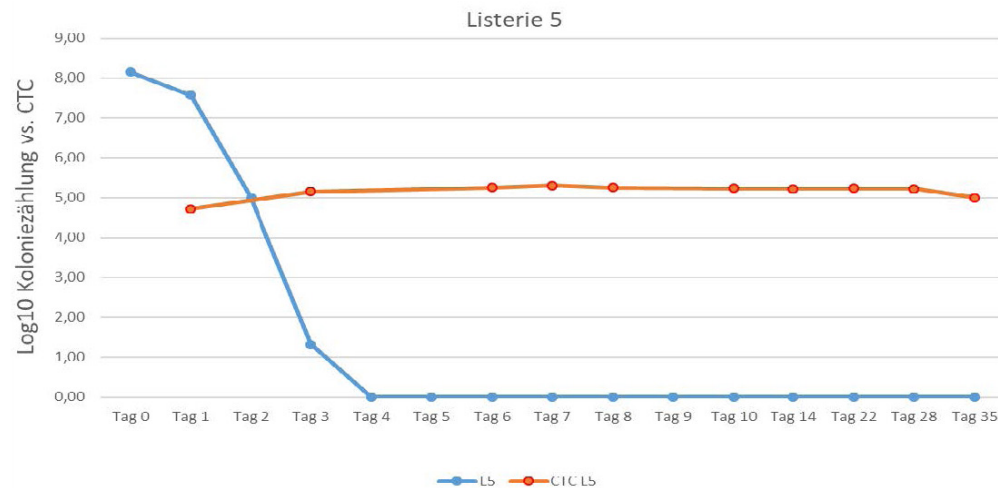


Abbildung 10: Vergleich der Koloniezahl mit der CTC-Zahl (Testkeim L5) - Testkeim L5 ist ab Tag 4 nicht mehr kultivierbar, aber die Anzahl der metabolisch aktiven Zellen in CTC Färbung liegt konstant leicht über 5,0 Log₁₀ KbE/ml. Da nur lebende Zellen CTC verstoffwechseln können, lässt sich vermuten, dass die Anzahl an VBNC Listerien bei 5,0 Log₁₀ KbE/ml liegt.

Rekultivierungsversuche

Bei der Ausplattierung der Suspension aus den Mikrotiterplatten konnte kein Bakterienwachstum nachgewiesen werden. Bei dem Fütterungsversuch hat der Testkeim L7 nach Ausplattierung am Tag 3 einen dichten Zellrasen auf dem Blutagar ausgebildet. Dies konnte auch bei den weiteren Ausplattierungen beobachtet werden. Bei den anderen Teststämmen konnte, auch nach wiederholter Zugabe von Nährsuspension, weder am Tag 5 noch am Tag 10 das Wachstum angeregt werden.

Zusammenfassung

Die Inkubation von *L. monocytogenes* unter den beschriebenen Bedingungen könnte als Methode zur Induzierung des VBNC-Zustandes verwendet werden. Ergebnisse der CTC/DAPI-Färbung zeigen, dass diese Methode zur Differenzierung zwischen toten und VBNC-Listerien verwendet werden kann. Weitere Rekultivierungsversuche sind notwendig.

Persönliche Erfahrungen

Während des VETResearch Projekts habe ich einen guten Einblick in den Arbeitsablauf im Labor gewonnen. Obwohl es in der ersten Woche alles ein bisschen kompliziert war und für mich hieß „Hauptsache nichts kaputt machen“, konnte ich bald mit Geräten und Materialien

sicher umgehen. Ich habe nicht nur mikrobiologische und v.a. molekularbiologische Methoden, wie DNA-Extraktion oder Durchführung einer qPCR, gelernt, sondern auch, wissenschaftlich zu arbeiten und Fachliteratur zu suchen und zu verstehen.

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die dieses Projekt ermöglicht haben. Besonderen Dank richte ich an meine Betreuerin Dr. Irene Esteban Cuesta und an die technischen Assistentinnen Barbara Fritz und Verena Hohenester, die so geduldig waren, meine Fragen zu beantworten und fachliche Sachen zu erklären.

Referenzen

1. Besnard, V., et al., Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Vet Res*, 2002. 33(4): p. 359-70.
2. Ramamurthy, T., et al., Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Frontiers in Public Health*, 2014. 2(103).

3D imaging of fish kept in research facilities

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

Einleitung

Bei dem Projekt handelt es sich um eine Fortsetzung des VETResearch Projekts „*Quantitative analysis of fish behaviour via video monitoring as health indicator in research systems*“, das im Rahmen des Retreats 2019 vorgestellt wurde.

Nachdem beim bisherigen System nur eine Kamera pro Becken eingesetzt wurde, wurden die Becken nun in der Folge mit einer zusätzlichen Kamera pro Becken ausgestattet, um eine dreidimensionale Darstellung der Tiere zu ermöglichen.

Material, Methodik und experimentelles Set-Up

Zunächst wurde der Server mit einer Grafikkarte (EVGA GeForce GTX 1060 SC GAMING, ACX 2.0 (Single Fan), 6GB GDDR5) ergänzt. Die Hardware Komponenten wurden in das bestehende Software System integriert. CUDA Treiber und Pakete wie Tensorflow und PyTorch für Machine Learning Applikationen wurden installiert und vorbereitet.

Die „intelligente optische Fischerkennung“ war bis dato nur auf 3000 Bildern trainiert worden. Das Trainieren mit mehr Bildern war aufgrund der fehlenden Hardware nicht möglich, was zu Ungenauigkeiten geführt hat. Durch die neue Hardware konnte nun mit allen Bildern (etwa 250.000), die im ersten Teil des Projekts gesammelt wurden, trainiert werden und eine verlässliche Fischerkennung erstellt werden.

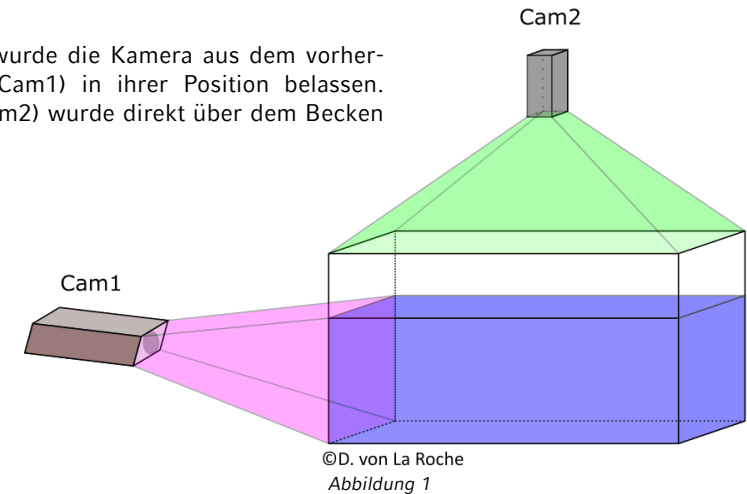
Für die dreidimensionale Darstellung der Fische wurde eine zweite Webcam (Openeye 1080P Webcam Full HD, USB 2.0) an den Becken installiert.

Die Steuerung der Kameras erfolgte über einen Raspberry Pi 4 (LABISTS Raspberry Pi 4 Model B 4 GB Ultimatives Kit mit 32 GB Class10 Micro SD-Karte).

Die 50-l-Glasbecken wurden, wie in der vorherigen Studie, mit 6 adulten Zebrafischen (*Danio rerio*), Bestandsfische des Lehrstuhls (eigene Nachzucht) im Geschlechterverhältnis 4:2 (weiblich:männlich), besetzt.

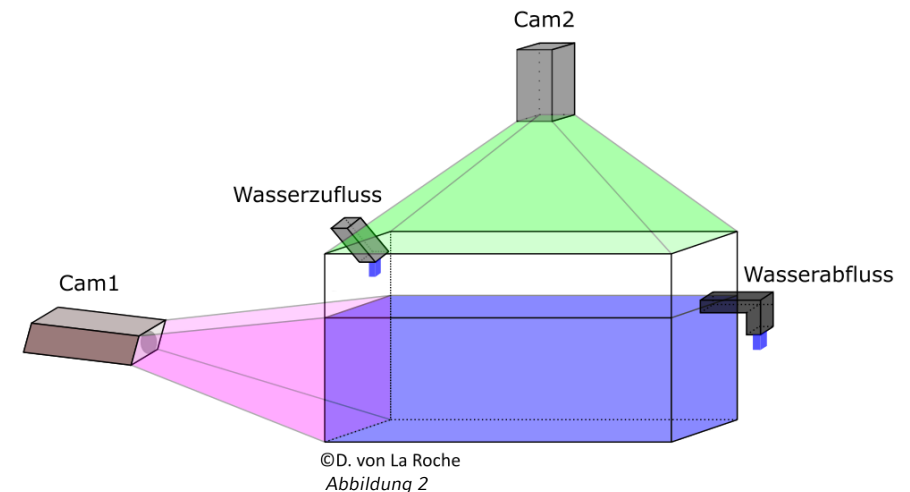
Set-Up 1

Für das erste Set-Up wurde die Kamera aus dem vorhergegangenen Projekt (Cam1) in ihrer Position belassen. Die zweite Kamera (Cam2) wurde direkt über dem Becken platziert.



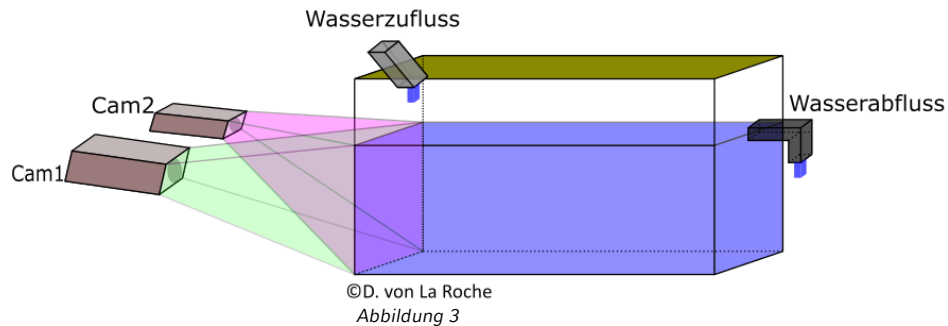
Problematik Set-Up 1

Die Problematik des zweiten Set-Ups wird in Abbildung 2 dargestellt. Beim Filmen von oben muss die normale Abdeckung des Beckens entfernt werden und durch ein Netz (grün; hier deckungsgleich mit dem Kamerawinkel) oder ähnliches ersetzt werden, um zu verhindern, dass Fische bspw. im Rahmen der Fütterung aus dem Becken springen. Das bedeutend größere Problem stellt jedoch die Bewegung der Wasseroberfläche durch Zu- und Abfluss des Wassers dar. Hierdurch ist es für die Kameras nahezu unmöglich, zu fokussieren und so Fische eindeutig zu identifizieren.



Set-Up 2

Nachdem sich Set-Up 1 als nicht praktikabel erwiesen hat, wurde die Position der zweiten Kamera verändert. Sie wurde versetzt zu Cam1 hinter dem Becken angebracht. Nachdem der Filmwinkel beider Kameras nun unterhalb der Wasseroberfläche liegt, wird das Problem von Set-Up 1 umgangen, ebenso kann die normale Abdeckung der Becken verwendet werden.



Verarbeitung der Bilder

Die Bilder werden an einem zentralen Server gesammelt und auf einem Massenspeicher gespeichert. Zeitstempel sowie Herkunft (Kamera-ID) werden in einer Datenbank gespeichert und mit dem Bild verknüpft.

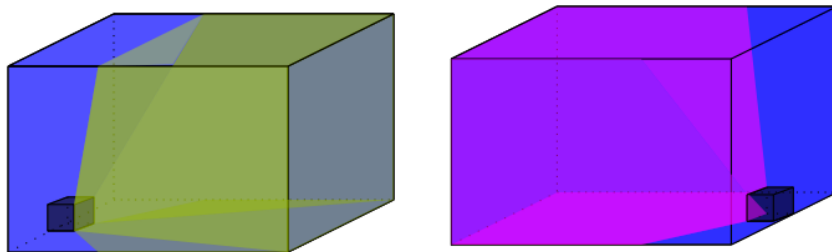
An der Machine Learning Verarbeitung der Bilder wird gearbeitet. Da 3D Tracking mithilfe mehrerer Kameras ein bisher ungelöstes Problem ist und viele Gruppen daran forschen, werden in der kommenden Phase die neuesten Erkenntnisse in dem Bereich wie die von You et al. [9] direkt getestet, bis eine stabile Version vorliegt.

Mögliches Set-Up 3 (Unterwasser-Kameras)

Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz von Unterwasserkameras, die via Funk mit dem Server in Verbindung stehen.

Hieraus ergibt sich jedoch das in Abbildung 4 dargestellte Problem der toten Winkel beim Einsatz von nur einer Unterwasserkamera.

Um dies zu umgehen, müssten zwei Unterwasserkameras in Verbindung mit einer weiteren, sich außerhalb des Beckens befindlichen Kamera eingesetzt werden. Dieses Set-Up war aus finanziellen und zeitlichen Gründen innerhalb dieses Projekts jedoch nicht realisierbar, erscheint aus unserer Sicht jedoch eine weitere sinnvolle Option.



©D. von La Roche Abbildung 4

Diskussion

Die dreidimensionale Erfassung der Fische ermöglicht eine genauere Bestimmung ihrer Position im Becken.

Ihre Positionierung innerhalb der Wassersäule kann nicht nur einen Hinweis auf den direkten Gesundheitszustand der Fische geben, sondern erlaubt indirekt auch Aussagen über die Wasserqualität, vor allem die Sauerstoffsättigung [1, 2].

Die Positionsbestimmung der Fische kann folglich als Ergänzung zu den *Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research* [3] genutzt werden.

Im Sinne des Tierschutzes ist in der experimentellen Fischhaltung Environmental Enrichment (EE) einzusetzen, auch wenn die Umsetzung noch hinter den Fortschritten bei anderen Versuchstierspezies zurück bleibt [4]. Die bisherigen Studien zum Einfluss von EE auf das Verhalten der Fische variieren nicht nur zwischen den verschiedenen Spezies [5, 6], sondern auch innerhalb der Spezies. So beschreiben Marcon et. al. in ihrer Studie, dass Zebrafische durch EE eine reduzierte Stressreaktion auf UCS (unpredictable chronic stress) zeigen [7], wohingegen Woodward, Winter et. al. beim Zebrafisch ein erhöhtes Aggressionspotential beschreiben [8]. Dies zeigt, dass auf diesem Gebiet dringend weiter geforscht werden muss, um den Tieren ein möglichst optimales Haltungsumfeld bieten zu können.

Literatur

1. Breitburg DL. Behavioral response of fish larvae to low dissolved oxygen concentrations in a stratified water column. *Marine Biology* 1994; 120: 615 – 625
2. Breitburg DL, Rose KA, Cowan JH. Linking water quality to larval survival: predation mortality of fish larvae in an oxygen-stratified water column. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1999; 178: 39 – 54
3. Johansen R, Needham JR, Colquhoun DJ et al. Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory animals* 2006; 40: 323 – 340
4. Corcoran M. Environmental enrichment for aquatic animals. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice* 2015; 18: 305 – 321
5. Kadry VO, Barreto RE. Environmental enrichment reduces aggression of pearl cichlid, *Geophagus brasiliensis*, during resident-intruder interactions. *Applied Animal Behaviour Science* 2010; 8: 329 – 332
6. Brydges NM, Braithwaite VA. Does environmental enrichment affect the behaviour of fish commonly used in laboratory work? *Applied Animal Behaviour Science* 2009; 118: 137 – 143
7. Marcon M, Mocelin R, Benvenuti R et al. Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish. *The Journal of experimental biology* 2018; 221
8. Woodward M, Winder L, Watt P. Enrichment Increases Aggression in Zebrafish. *Fishes* 2019; 4: 22
9. You Q, Jiang H. Real-Time 3D Deep Multi-Camera Tracking

Danksagung und eigene Erfahrung

Ich möchte mich zuallererst bei Herrn Prof. Palić für die Unterstützung bei der Durchführung des Projekts sowie die Möglichkeit, unsere Forschung in seiner Tierhaltung fortsetzen zu können, bedanken.

Ein großer Dank geht, wie auch schon im letzten Jahr, an Herrn B.Sc. Pascal Bawidamann für die Hilfe bei der technischen Umsetzung und für die Programmierung.

Des Weiteren bedanke ich mich bei dem Team von Lehre@VET / VETResearch, speziell Frau Dr. Beitz-Radzio und Frau Dr. Stoll für die Unterstützung und die Möglichkeit, unser Projekt von letztem Jahr fortzuführen und zu verbessern.

VETResearch bietet aus meiner Sicht eine sehr gute Möglichkeit für Studierende, in das wissenschaftliche Arbeiten hineinschnuppern zu können und auch Einblicke in das tiermedizinische Arbeiten außerhalb der Klinik zu erlangen.

Charakterisierung der Antibiotikaresistenz von mesophilen und thermophilen Sporenbildnern

Eraclitos Petrou

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
Betreuerin: PD Dr. Kristina Schauer

Eine verbrauchergerechte und gleichzeitig wirtschaftliche Milchproduktion stellt heute eine große Herausforderung für Milchviehhalter dar. Die Entwicklung neuer Haltungs-, Fütterungs- und Milchgewinnungssysteme sowie artgerechte Zucht der Tiere tragen bereits zum Erhalt der tierischen Gesundheit und allgemeinen Tierwohl bei. Nichtsdestotrotz findet Antibiotikaeinsatz weiterhin statt, wodurch diese in die Umwelt und in Lebensmittel gelangen.

Ziel der vorliegenden Studie war es, Antibiotikaresistenz-Profile von mesophilen und thermophilen Sporenbildnern zu erstellen, die häufig in der Milch und Milchprodukten nachgewiesen werden und in seltenen Fällen Lebensmittelinfektionen in Form von Diarrhö auslösen.

Dazu wurden für jeden der 130 Stämme, die aus diversen Lebensmitteln isoliert werden konnten, mittels Microdilution-Assays die minimalen inhibitorischen Antibiotikakonzentrationen (MIC) der für die Milch relevanten antimikrobiellen Substanzen ermittelt und mit E-Test verifiziert. Zusätzlich wurde die phänotypische in vitro Empfindlichkeit gegenüber weiteren Fluorchinolonen mithilfe eines Plattendiffusionstests ermittelt (Abbildung 1).

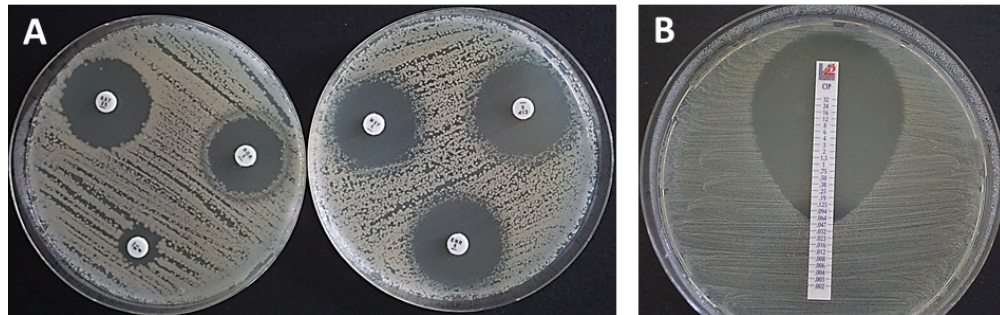


Abbildung 1: **A.** Plattendiffusionstest mit Enrofloxacin, Norfloxacin, Moxifloxacin, Ciprofloxacin, Penicillin G und Trimethoprim-sulfamethoxazol; **B.** Gradientendiffusionstest (E-Test) mit Ciprofloxacin.

Eine Anzahl von 82 Vertretern der mesophilen und 48 Vertretern der thermophilen Sporenbildner wurden aus unterschiedlichen frischen Produkten (Milch, Butter, Schlagsahne, Joghurt, Pudding, Babynahrung, Eis, Käse, Milchpulver, Milchreis) isoliert und gegen relevante Antibiotika getestet. Dabei wurde festgestellt, dass einige detektierte Resistenzen (z.B. β -Lactam-Antibiotika), vor allem bei den Vertretern der *Bacillus cereus*-Gruppe, auf eine natürliche (intrinsische) Resistenz gegenüber dieser Antibiotikagruppe zurückzuführen sind (Abbildung 2).

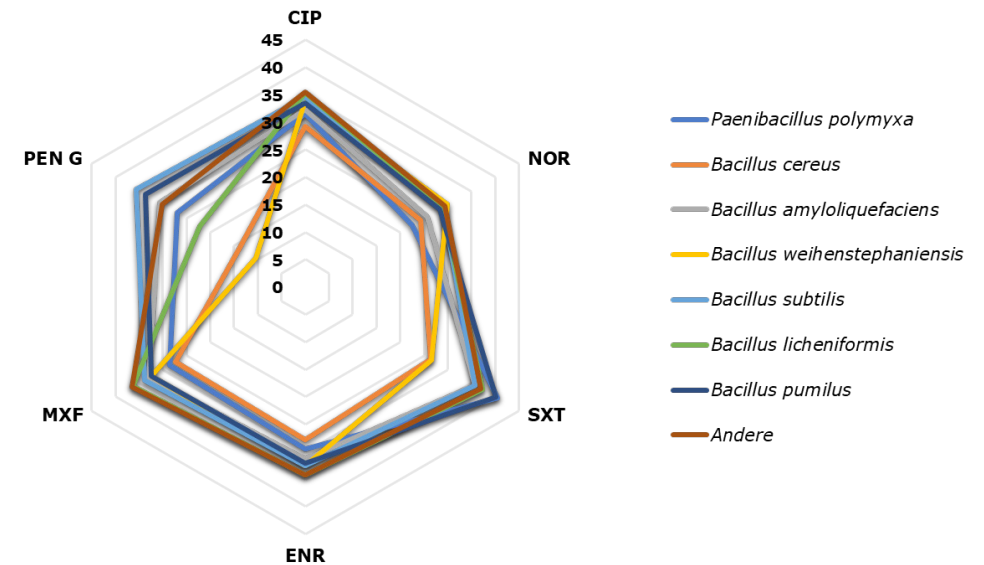


Abbildung 2: Antibiogramm zu den mesophilen Sporenbildnern (ENR, Enrofloxacin; NOR, Norfloxacin; MXF, Moxifloxacin; CIP, Ciprofloxacin; PEN G, Penicillin G; und SXT, Trimethoprim-sulfamethoxazol).

Die Sensitivität gegenüber human- und veterinärmedizinisch relevanten Antibiotika, ermittelt mittels Diskdiffusionstest, zeigte zudem ein grundsätzlich positives Bild mit Resistenzanteilen zwischen 0 % bis maximal 0,3 %. Allerdings konnte eine leichte Antibiotikatoleranz gegenüber verschiedenen Fluorchinolonen vor allem in *Bacillus licheniformis*-, *Bacillus cereus*- und *Paenibacillus polymyxa*-Gruppen bei den mesophilen Sporenbildnern und in *Geobacillus stearothermophilus*- und *Bacillus smithii*-Gruppen bei den thermophilen Sporenbildnern beobachtet werden. Dies konnte durch Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) für entsprechende Antibiotika verifiziert werden und ist exemplarisch anhand von Ciprofloxacin in Abbildung 3 dargestellt.

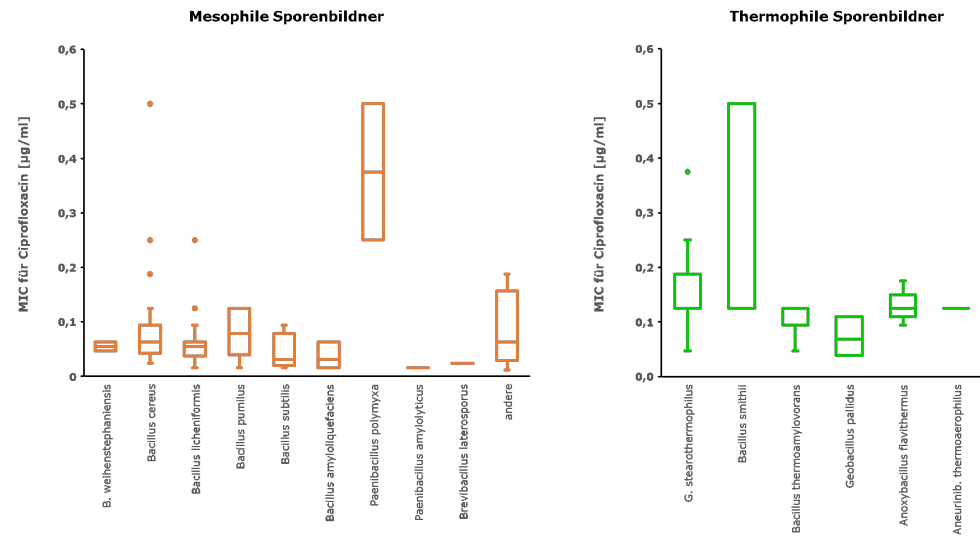


Abbildung 3: MIC für Ciprofloxacin für mesophile und thermophile Sporenbildner-Isolate.

Aus den vorliegenden Daten lässt sich somit eindeutig schließen, dass zum jetzigen Zeitpunkt Antibiotikaresistenzen bzw. antibiotikaresistente Bakterien durch Milch und Milchprodukte lediglich in geringem Maße in die Lebensmittelkette eingetragen werden. Das Auftreten und Vorkommen antibiotikaresistenter Keime in Lebensmitteln auf Milchbasis soll weiterhin durch regelmäßige Untersuchungen erfasst werden, um im Sinne des vorsorglichen Gesundheitsschutzes die Eintragsquellen und Verbreitungswege zu untersuchen und zu erfassen.

Untersuchungen zur Wirkung und Synthese des antifungalen Wirkstoffs Pyrrolnitrin

Lea Sonnenburg

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Betreuer: Prof. Dr. Frank Ebel

Einleitung und Grundlage des Experiments

Pilzinfektionen können sowohl als oberflächliche, als auch als invasive Infektionen verlaufen. Oberflächliche Infektionen von Haut und Nägeln sind die am meisten verbreiteten Pilzinfektionen, die alle Lebewesen betreffen können, jedoch meist problemlos ausheilen. Hingegen treten invasive Infektionen vor allem bei immunsupprimierten Lebewesen auf und sind meist schwierig zu behandeln oder gehen mit einer hohen Mortalitätsrate einher.¹

Ein Vertreter, der invasive Infektionen verursachen kann, ist *Aspergillus fumigatus*. Infektionen mit *A. fumigatus* führen in der Regel zu Krankheiten innerhalb der Lunge, die chronisch verlaufen und Aspergillose genannt werden. Trotz eindeutiger Diagnose und Behandlung der Krankheit hat die invasive Aspergillose im Menschen eine Mortalitätsrate von ca. 50 %. Daher wird dauerhaft nach wirksameren neuen Wirkstoffen gesucht.^{1,2}

Fludioxonil ist ein interessanter antifungaler Wirkstoff, welcher seit Jahrzehnten in der Landwirtschaft eingesetzt wird.² Bei dem Wirkstoff handelt es sich um ein Derivat von Pyrrolnitrin, welches von *Burkholderia pyrrocinia* 2327 (DSM 10685) sowie einigen Pseudomonaden-Stämmen natürlich synthetisiert werden soll.³

Ziel dieses VETResearch Projekts war es, zu überprüfen, ob sich die vier Gene des Pyrrolnitrin-Synthesewegs aus dem Genom des Stammes DSM 10685 per PCR amplifizieren und anschließend sequenzieren lassen sowie ob sich mit dem Wirkstoff bzw. dem Stamm DSM 10685 entsprechende Wachstumshemmungen bei *A. fumigatus* erkennen lassen.

Material und Methoden

Versuch 1: PCR-Test auf das Vorhandensein des Genclusters Pyrrolnitrins

Es wurde der Stamm *B. pyrrocinia* 2327 (DSM 10685) von der DSMZ bestellt. Genomische DNA wurde isoliert und mittels PCR auf das Vorhandensein des nach der Literatur besonders konservierten prnD-Gens aus dem Gencluster für die Pyrrolnitrin-Synthese untersucht. Zudem wurden weitere Pseudomonas-Stämme (siehe Abbildung 1) aus der Sammlung des Instituts für Infektionsmedizin und Zoonosen eingesetzt. Dazu wurde sich am Protokoll aus Costa et al. (2009) orientiert. Um die Qualität der genomischen DNA zu überprüfen, wurde auch eine Kontroll-PCR auf 16S-rDNA durchgeführt (siehe Abbildung 2). Die Proben wurden mit einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Versuch 2: Überprüfung der Wachstumshemmung von Pyrrolnitrin auf Aspergillus-Spezies

Um fehlerhafte Ergebnisse der PCR auszuschließen, wurde zur Kontrolle der Stamm der DSM 10685 auf einer Sabouraud-Platte ausgestrichen und gegen AfS35 wachsen gelassen. Die beimpfte Platte wurde dann in den Brutschrank für 3-5 Tage bei 37 °C gestellt und immer wieder angesehen, um evtl. Änderungen im Wachstum wahrzunehmen.

Versuch 3: Überprüfung der Wachstumshemmung von Pyrrolnitrin auf Aspergillus-Spezies

Im letzten Versuch wurden Hemmstofftests mit AfS35 und den aus diesem Stamm hergestellten Mutanten Δ tcsC, Δ skn7, Δ sakA und der Doppelmutante Δ skn7/ Δ sakA bezüglich der Wirkstoffe Pyrrolnitrin und Fludioxonil in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt.

Auf Agarplatten wurden der Wildtyp (AfS35) sowie seine Mutanten Δ tcsC, Δ skn7, Δ sakA und der Doppelmutante Δ skn7/ Δ sakA gleichmäßig ausgestrichen. Danach wurden Papier-Plättchen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Fludioxonil und Pyrrolnitrin aufgelegt. Die Platten wurden dann im Brutschrank bei 37 °C 2 Tage bebrütet.

Ergebnisse

Versuch 1: PCR-Test auf das Vorhandensein des Genclusters Pyrrolnitrins

Auch nach verschiedener Anpassung des Temperatur- und Zeit-Profiles für den Cycler (siehe Abbildung 1) ließ sich prnD im Stamm DSM 10685 und in den anderen Pseudomonas-Stämmen nicht nachweisen, obwohl die Kontroll-PCRs für die 16S-rDNA positiv verliefen (siehe Abbildung 2).

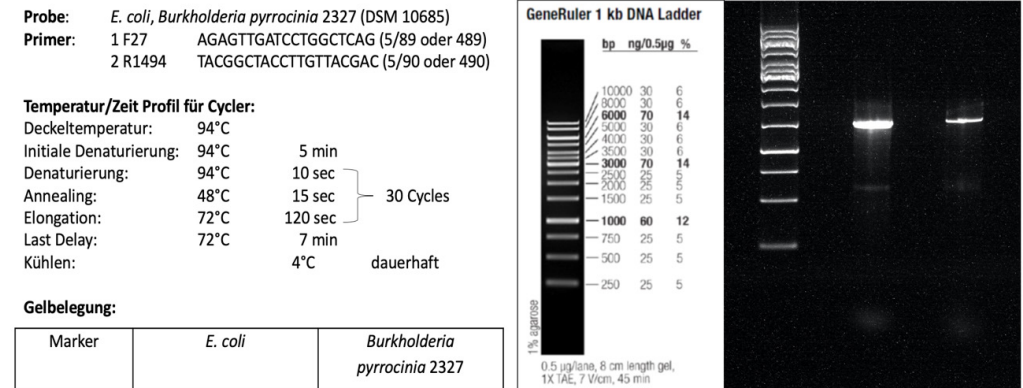
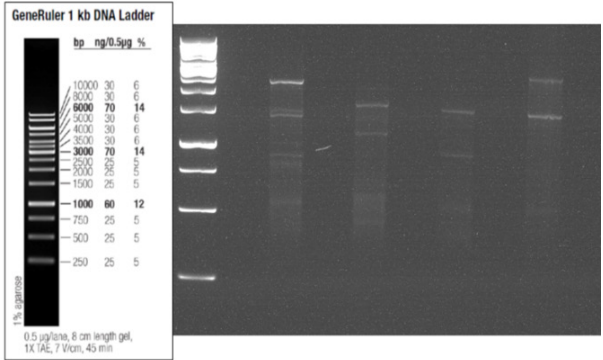


Abbildung 1: 16s - rDNA PCR für *E. coli* und *Burkholderia pyrrocinia* 2327

Probe: *Burkholderia pyrrocinia* 2327 (DSM 10685) (1:200)
Pseudomonas aeruginosa Diag 217/20 (1); Diag 289/20 (2);
Diag484/20 (3)

Primer: 1 PRND1 GGGGCGGGCCGTGGTGATGGA (5/83 oder 483)
2 PRND2 YCCCGCGCCTGYCTGGTCTG (5/84 oder 484)

Temperatur/Zeit Profil für Cycler:
Deckeltemperatur: 95°C
Initiale Denaturierung: 95°C 2 min
Denaturierung: 95°C 60 sec
Annealing: 50°C 60 sec } 35 Cycles
Elongation: 72°C 120 sec
Last Delay: 72°C 1 min
Kühlen: 4°C dauerhaft



Gelbelegung:

Marker	<i>Burkholderia pyrrocinia</i> 2327 1:200 Ansatz 1	<i>Pseudomonas</i> Diag 217/20 (1) 1:10 Ansatz 2	<i>Pseudomonas</i> Diag 289/20 (2) 1:10 Ansatz 3	<i>Pseudomonas</i> Diag 484/20 (3) 1:10 Ansatz 4
--------	---	---	---	---

Abbildung 2: PCR nach Costa et al. (2009) für *Burkholderia pyrrocinia* 2327 und verschiedene *Pseudomonaden*stämmen

Versuch 2: Überprüfung der Wachstumshemmung von Pyrrolnitrin auf Aspergillus-Spezies

Da Pyrrolnitrin als Reinsubstanz eine deutliche Wachstumshemmung bei *A. fumigatus* bewirkt, wurde erwartet, dass bei der Bildung des Pyrrolnitrins durch den Bakterienstamm eine deutliche Hemmung des Wachstums des Pilzes zu sehen sein müsste.

Im entsprechenden Versuch war nach 3 Tagen zu erkennen, dass der Pilz sich in seiner Wachstumszone nicht ganz gerade radiär ausbreitet, jedoch insgesamt keine eindeutige Hemmung seines Wachstums festzustellen war. Nach 5 Tagen überwuchs der *A. fumigatus* Stamm AfS35 den Bakterienstamm. Daher ist nicht davon auszugehen, dass der untersuchte *Burkholderia*-Stamm das entsprechende DNA-Cluster aufweist.

Versuch 3: Überprüfung der Wachstumshemmung von Pyrrolnitrin auf Aspergillus-Spezies

Die Ergebnisse entsprachen den Erwartungen, die aus früheren Experimenten² gewonnen worden waren: So zeigte sich AfS35 besonders empfänglich für beide Substanzen, Gleiches gilt für die Δ sakA-Mutante. Für die Δ tcsC-, die Δ skn7- und die Δ skn7/ Δ sakA-Mutante war bekannt, dass sie resistent gegenüber Fludioxonil sind. Es zeigte sich, dass dies auch für Pyrrolnitrin gilt (siehe Abbildung 3).

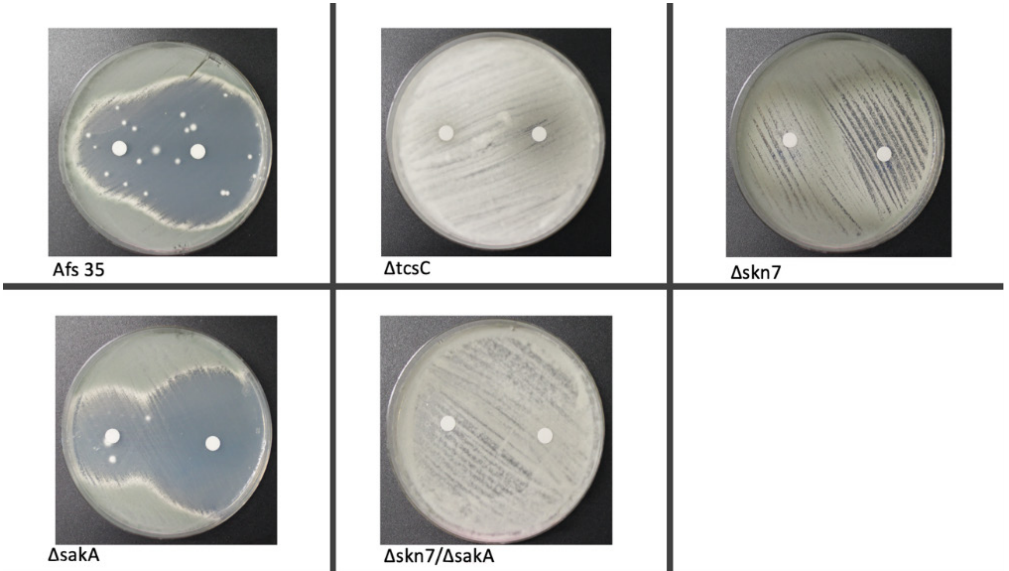


Abbildung 3: Hemmstoffkonzentrationstest, Anordnung der Plättchen links: 5 μ l Fludioxonil, rechts: 5 μ l Pyrrolnitrin. Die weißen Punkte in den Hemmhöfen sind Punktmutationen des entsprechenden Pilzes.

Schlussfolgerung

Das prnD-Gen aus dem Gencluster für die Pyrrolnitrin-Synthese konnte weder im Stamm *B. pyrrocinia* 2327, der aufgrund der Daten von Costa et al. (2009) als positive Kontrolle dienen sollte, noch in diversen anderen *Pseudomonas*-Stämmen nachgewiesen werden. Warum dies so ist, konnte leider nicht geklärt werden.

Obwohl Pyrrolnitrin als Reinsubstanz eine starke antifungale Wirkung auf *A. fumigatus* ausübt, wie die Versuchsreihe zur Wachstumshemmung des Pilzes und seiner Mutanten zeigte, konnte auch bei einem direkten Konfrontationsversuch mit dem Stamm DSM 10685 keine antifungale Aktivität nachgewiesen werden.

Persönliche Erfahrung

Die Teilnahme am VETResearch Projekt des Instituts für Infektionsmedizin und Zoonosen der LMU München ermöglichte mir - trotz der Corona-bedingten Online-Lehre im Sommersemester 2020 - erste Einblicke in Forschungsarbeiten außerhalb der üblichen Lehrinhalte des Studiums zu erhalten.

Meine Tätigkeit im mykologischen Labor war lehrreich und produktiv, da ich stets eine optimale praktisch-wissenschaftliche und menschlich sehr angenehme Betreuung durch alle Mitarbeiter erfahren durfte. Dafür war auch die intensive und praxisnahe Einarbeitung Voraussetzung, die mir ein selbständiges Arbeiten erlaubte.

Ich möchte mich daher auch sehr herzlich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Frank Ebel und seinen Mitarbeitern bedanken.

Quellen

¹ Gordon D. Brown, David W. Denning, Neil A. R. Gow, Stuart M. Levitz, Mihai G. Netea, Theodore C. White. (2012). Hidden Killers: Human Fungal Infections. Sci. Transl. Med., 4, 1-3.

² Anja Spadinger, Frank Ebel. (2017). Molecular characterization of *Aspergillus fumigatus* TcsC a characteristic type III hybrid histidine kinase of filamentous fungi harboring six HAMP domains, Int. J. Med. Microbiol., 307, 200-208.

³ Kojima, K. (2015). Complete genome sequence of *Burkholderia pyrrocinia* 2327T, the first industrial bacterium which produced antifungal antibiotic pyrrolnitrin. J. Biotechnol., 211, 3-4.

⁴ Costa R, van Aarle IM, Mendes R, van Elsas JD. (2009) Genomics of pyrrolnitrin biosynthetic loci: evidence for conservation and whole-operon mobility within gram-negative bacteria. Environ. Microbiol. 11, 159-75.

Sicherheit von Sous-vide gegarten Rumpsteaks

Marleen Tobisch
 Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit und -analytik
 Betreuer: Philipp-Michael Beindorf, Dr. Samart Dorn-In

Einleitung

Unter Sous-vide (SV) oder Vakuumgaren versteht man eine Form des Niedrigtemperaturgarens, welche für den Garprozess den Wärmeaustausch eines Wasserbades nutzt. Das Gargut wird dabei in Kunststoffbeuteln unter Erzeugung eines Vakuums luftdicht eingeschweißt und bei konstanten Temperaturen für mehrere Stunden gegart. Die Dauer richtet sich dabei nach der Art des Lebensmittels, der Tierart und dem Gewicht beziehungsweise der Dicke der Zutaten. Die Vorteile dieser Zubereitungsmethode bestehen darin, dass weder flüchtige Geschmacksstoffe noch Wasser oder Aromen den Beutel verlassen können. Außerdem kann durch Beilegen von beispielsweise Gewürzen oder Kräutern der Geschmack beeinflusst werden. Durch anschließendes Grillen oder Backen sind auch die typischen Aromen der Maillard-Reaktion zu erhalten (Melanoidine). Bereits seit den 1960er Jahren wird dieses Verfahren zur Produktion von Convenience Food und später auch in Gastronomiebetrieben eingesetzt. Mittlerweile sind auf dem Markt fertige SV-Bäder oder SV-Sticks erhältlich. Diese kostengünstige Alternative und die einfache Anwendungsart sorgen für eine immer größere Verwendung in privaten Haushalten. Auf Grund der gestiegenen Bedeutung und der Tatsache, dass viele „Laien“ das SV-Verfahren anwenden, stellen sich neue Fragen im Zusammenhang mit der Lebensmittelhygiene und Produktsicherheit. Vor allem die Zubereitung und anschließende Lagerung als vermeintlich sicheres SV-gegartes Lebensmittel wurde bisher noch nicht näher betrachtet. In meinem VETResearch beschäftigte ich mich damit, ob die Temperaturen und Garzeiten, welche in Rezepten immer wieder als Fixpunkte genannt werden, ausreichen, um verschiedene Infektions- und Verderbserreger zu deaktivieren und es gelingt, die hygienische Qualität über einen längeren Zeitraum zu erhalten.

Material und Methoden

Für den Versuch wurden 4 kg Rindfleisch (Rumpsteaks) frisch nach der Schlachtung erworben und in 350 g Portionen (+ 50 g) aufgeteilt. Für die artifizielle Kontaminierung des Fleisches wurden Bakterien der Gattung *Salmonella*, *Listeria* und *Clostridium* verwendet. Die entsprechenden Bakterien wurden im Vorfeld des Versuchs angezüchtet, in drei Gruppen eingeteilt und miteinander gemischt. Die Anzahl der jeweiligen Bakterien einer Probe lagen zwischen 5×10^3 und 5×10^4 KbE/g.

Das portionierte Fleisch wurde in die Gruppen A – E eingeteilt (Tabelle 1). Abschließend wurden die Fleischproben in Kunststoffbeutel gegeben und mit 0,2 ml der entsprechenden Anreicherung (Gruppe A – C) beimpft. Das Fleisch der Gruppe E wurde am Tag des Erwerbs

als Ausgangsmaterial kulturell auf die Gesamtkeimzahl (GKZ) untersucht, anschließend wurden alle Fleischproben vakuumiert. Insgesamt wurden 21 Einheiten vorbereitet und auf zwei Durchgänge aufgeteilt.

Tabelle 1: Fleischprobengruppe und verwendete Bakterienstämme sowie deren Herkunft

Gruppe	Salmonellen	Listerien	Psychrophile Clostridien
A (3/3)*	<i>Salmonella</i> Typhimurium DSM 554	<i>Listeria monocytogenes</i> (Truthahnschinken)	<i>Clostridium frigoriphilum</i> DSM 17811 + <i>C. algidicarnis</i> DSM15099
B (3/3)*	<i>Salmonella</i> Typhimurium DSM 19587	<i>Listeria monocytogenes</i> (Tonsillen / Rotwild)	<i>Clostridium frigoriphilum</i> DSM 17811 + <i>C. algidicarnis</i> DSM15099
C (3/3)*	<i>Salmonella</i> Enteritidis DSM 14221	<i>Listeria monocytogenes</i> (Hinterschinken Schwein)	<i>Clostridium frigoriphilum</i> DSM 17811 + <i>C. algidicarnis</i> DSM15099
D (2/1)*	ohne Kontaminierung (Negativkontrolle)		
E (1)*	frisches Fleisch		

* in () = Anzahl der Fleischproben für jede Gruppe, für Durchgang 1 und 2



Abbildung 1: Vakuumierte Fleischproben und Sous-vide-Garen mit dem Sous-vide-Stick.

Im Anschluss wurden die Beutel, die für den SV-Prozess vorgesehen waren, bei 54 °C für zwei Stunden gegart (Abbildung 1). Verwendet wurde dabei ein handelsüblicher SV-Stick der Firma Bartscher (Bartscher Sous-Vide-Stick SV ST15L-115133).

Nach dem Garprozess wurden die Proben bei 4 °C für vier Wochen (Durchgang 1) beziehungsweise acht Wochen (Durchgang 2) gelagert. Nach der Lagerungszeit wurde jeweils der BPS-Score (Blown-Pack-Spoilage-Score) der Verpackungen beurteilt und der Fleischsaft entnommen und gemessen. Anschließend wurden alle Fleischproben von Durchgang 1 kulturell auf die GKZ und auf das Wachstum von Salmonellen, Listerien und psychrophile Clostridien untersucht. Dafür wurden selektive Anreicherungsverfahren und selektive Festmedien für Salmonellen und Listerien (Methode nach ASU, LFGB § 64) angewendet. Für den Wachstumsnachweis von Clostridien wurde von den verdächtigen Kolonien, die auf Blutagar wachsen, DNA extrahiert und mit der spezifischen qPCR für Clostridien bestätigt. Für den Durchgang 2 wurden nur Fleischsaftverlust und BPS-Score untersucht, auf die kulturelle Untersuchung wurde verzichtet.

Ergebnisse und Ausblick

Für das frische Fleisch wurde eine GKZ am Tag des Erwerbs von 3 x 10³ Kbe/g festgestellt. In allen SV-Proben (Gruppe A – C) konnte das Wachstum von Listerien und Clostridien nach 28 Tagen Lagerung qualitativ nachgewiesen werden, während vier von diesen sechs SV-Proben das Wachstum von Salmonellen zeigten. Die Abbildung 2 und Tabelle 2 zeigen die Ergebnisse der GKZ, den Prozentanteil des Fleischsaftverlustes und den BPS-Score der SV- und Kontrollproben, jeweils nach 28 beziehungsweise 56 Tagen Lagerung. Allgemein muss festgestellt werden, dass durch die gewählte Garmethode keine Deaktivierung der Erreger erreicht werden konnte. Vergleicht man die Gesamtkeimzahl, kann man aber feststellen, dass die Garmethode die lebende Begleitmikrobiota im Fleisch reduzieren konnte, sodass das Wachstum verlangsamt wurde und die GKZ bei fast allen Proben am Tag 28 niedriger ist, als es bei den ungegarten Proben der Fall ist. Beim BPS-Score und dem Fleischsaftverlust zeigen die SV-Proben ein höheren Wert in beiden Durchgängen, was auf eine höhere Aktivität der gasbildenden Clostridien und Druck der Atmosphäre hindeuten könnte.

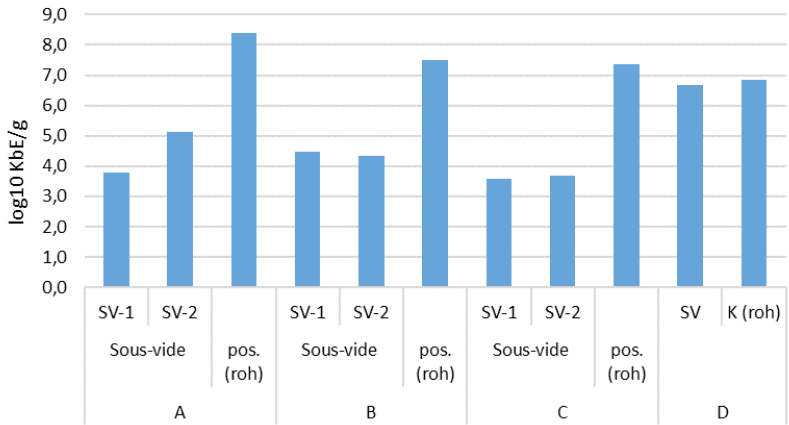


Abbildung 2:
Ergebnisse der
mikrobiologischen
Untersuchung an
Tag 28 (nach 4
Wochen Lagerung,
Durchgang 1)

Tabelle 2: Fleischsaftverlust in Prozent, BPS-Score nach 4 und 8 Wochen Lagerung

Gruppe	Probe	nach 4 Wochen			nach 8 Wochen		
		n =	% FS Verlust	BPS-Score	n =	% FS Verlust	BPS-Score
A - C	Sous-vide pos. (roh)	6	7,9 (± 1,5)	2,5 (± 0,5)	6	9,6 (± 1,1)	4,1 (± 0,7)
		3	1,3 (± 0,4)	0,6 (± 0,5)	3	2,6 (± 1,7)	1,0 (± 0)
D	SV K (roh)	1	8,3	0	1	10,5	2
		1	1,2	1	-	-	-

Zu berücksichtigen bleibt natürlich, dass es sich um eine künstliche und damit hohe Kontamination handelt, die im privaten oder gastronomischen Rahmen so nicht zu erwarten wäre. Dennoch zeigt sich, dass eine längere Lagerung eines Fleischprodukts nach SV-Behandlung nicht den Kriterien eines sicheren Lebensmittels entspricht. Abzuklären bliebe in diesem Zusammenhang, welcher Faktor dabei die größte Rolle spielt. Da im Versuch nur eine Temperatur und eine Zeitspanne experimentell erfasst wurde, müsste der Versuchsaufbau mit gleicher Temperatur und längeren Zeitintervallen beziehungsweise bei gleicher Zeit aber höheren Temperaturen wiederholt durchgeführt werden, um den entscheidenden Parameter herauszufinden und daraus eine Empfehlung ableiten zu können. Wünschenswert wäre es, den optimalen Grenzwert zwischen den noch vorhandenen Vorteilen des Niedrigtemperaturgarens und der Produktsicherheit herauszufinden, um vor allem für das Gastronomie-gewerbe Richtwerte zur Verfügung stellen zu können. Bis dahin muss man davon ausgehen, dass Sous-vide gegartes Fleisch am besten zeitnah verbraucht oder mindestens tiefgekühlt gelagert werden sollte.

Persönliche Erfahrungen

Durch mein Bachelorstudium der Biologie konnte ich bereits Erfahrungen im Bereich der Mikrobiologie sammeln und wollte auch in meinem aktuellen Studium dieses Wissen auf neue Themengebiete anwenden und so neue Erfahrungen sammeln. Durch mein persönliches Interesse im Bereich der Lebensmittelgewinnung und durch meine Erfahrungen aus der Jagd und damit der Verarbeitung von Fleisch, bot das Thema dieses VETResearch Projekts für mich die ideale Gelegenheit dazu. Besonders gefreut habe ich mich über die freundliche Aufnahme am Lehrstuhl und die vielfältigen Methoden, mit denen ich mich in meiner Zeit im Labor befassen konnte. Mein Dank geht dabei an Verena Hohenester, die mich überwiegend im Labor betreut hat und mir dabei auch die Tipps und Tricks einer CTA nähergebracht hat. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Samart Dorn-In für die gute fachliche Betreuung und Beantwortung meiner zahlreichen Fragen in der Endphase meiner Labortätigkeiten bedanken. Abschließend bedanke ich mich ausdrücklich bei Philipp-Michael Beindorf für die Möglichkeit, an diesem Projekt teilzunehmen und die Betreuung über die gesamte Phase des Versuchs bis zum Erstellen dieses Textes. Über die Teilnahme an diesem VETResearch habe ich mich sehr gefreut und bin für die gesammelten Erfahrungen sehr dankbar.

Etablierung eines ELISAs zur Bestimmung von Serumkonzentrationen des bovinen Trächtigkeits-erkennungssignals Interferon- τ (IFN τ)

Rhea Büchel

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

Einleitung

Das bovine Trächtigkeitserkennungssignal Interferon- τ (IFN τ) wird vom embryonalen Trophoblasten produziert und ist während der frühen Trächtigkeit beim Rind maßgeblich dafür verantwortlich, die notwendigen immunendokrinen Mechanismen zum Erhalt der Trächtigkeit und zur Entwicklung des Embryos zu sichern. IFN τ wird vom Embryo ins Lumen der Gebärmutter sezerniert (maximale Menge circa an Tag 18 nach der Befruchtung) und gelangt durch Resorption in den maternalen Blutkreislauf. Dort ist IFN τ aufgrund sehr geringer Konzentrationen im Blut bisher schwer nachweisbar. Zum Nachweis der Trächtigkeit wird auf palpatorische, ultrasonographische Methoden oder auf den Nachweis von Trächtigkeitsassoziierten Glykoproteinen (PAGs) in Milch und Blut zurückgegriffen (frühestens ab Tag 28 nach der Befruchtung). In der Milchwirtschaft wäre die Möglichkeit eines früheren Nachweises einer bestehenden Trächtigkeit von großer Bedeutung.

Die Wissenschaftler Savchenko und Koautoren (2019)¹ des FSBSI (All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy) wiesen mithilfe eines rinderspezifischen IFN τ ELISA Kits (Bovine Interferon-Tau Elisa Kit, Cloud-Clone Corp., USA) das Typ-1-Interferon im Blutserum von 25 Kühen an verschiedenen Tagen nach der künstlichen Besamung in unterschiedlichen Konzentrationen nach. Dabei wurden Probenzeitpunkte zwischen Tag 8 und Tag 17 nach Besamung berücksichtigt. Die IFN τ Konzentrationen variierten von 278.4 ± 19.4 pg/ml bis 1403.2 ± 71.8 pg/ml.

Im Rahmen dieses VETResearch Projektes sollte der IFN τ ELISA im Labor der Klinik für Wiederkäuer etabliert werden und dessen Aussagekraft anhand asservierter Proben überprüft werden. Um die Haltbarkeit der verwendeten Proben zu verifizieren und um Routine in der Durchführung von ELISA-Assays zu gewinnen, wurden die Proben außerdem auf ihren Progesteron Gehalt geprüft.

Material

Verlaufsproben

Für den ersten Durchlauf des ELISAs wurden Blutserum Proben von Färsen ($n = 16$) genutzt, deren Trächtigkeit entweder nach einer künstlichen Besamung oder nach einem

Embryotransfer bestätigt worden war. Um einen Verlauf der Interferonwerte nachvollziehen zu können, wurden Proben von Tag 0 (Tag der Ovulation), 7, 14, 16 und 18 ausgewählt. Die Proben waren im Rahmen eines abgeschlossenen Projektes im Zeitraum Juni 2012 bis April 2013 gewonnen worden (Dissertation Meyerholz, 2014²). Es handelte sich um aliquotierte Rückstellproben, die nach der Entnahme bei -20 °C eingefroren wurden und bisher nicht analysiert worden waren. Der Transport von Hannover nach München erfolgte im September 2020 auf Eis.

Einzelproben

Für den zweiten Durchlauf wurden frischere Blutserum Proben von einzelnen Tieren verwendet. Diese Proben stammten von Färsen ($n = 4$) und Kühen ($n = 4$) des Lehr- und Versuchsgutes der LMU. Für die Unterstützung bei der Probenentnahme möchten wir uns bei Herrn Dr. Nüske und seinem Team ganz herzlich bedanken. Die Probenentnahme erfolgte zwischen Tag 12 und Tag 19 nach der Besamung. Als Negativkontrolle wurde Blutserum einer klinikeigenen, adulten, sicher nicht-tragenden Kuh verwendet. Die Proben wurden abzentrifugiert und das gewonnene Blutserum wurde bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren.

Standardkurve und Verdünnungsversuch

Im dritten Durchlauf wurde untersucht, ob durch Verdünnung der Verlaufsproben mögliche Störfaktoren beseitigt werden können, um sinnhaftere Ergebnisse zu erzielen. Hierzu wurden die Verlaufsproben von zwei ausgewählten Färsen jeweils 1:10 verdünnt und die Ergebnisse wurden mit den erneut gemessenen unverdünnten Proben verglichen. Bei jedem Durchlauf wurde die vom Hersteller mitgelieferte Standardkurve verwendet.

Methoden

Zur Bestimmung der Progesteron Konzentrationen in Serumproben wurde das bovine Sensio-Screen Progesterone ELISA Kit (Medogen Diagnostika, Altenmünster) verwendet. Dabei handelt es sich um einen kompetitiven ELISA. Bei diesem ELISA konkurriert das Progesteron aus der Serumprobe mit dem Progesteron-Enzym-Konjugat aus der Standardlösung um die Bindungsstellen der monoklonalen Antikörper auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte. Da bei hohen Progesteron Konzentrationen in der Probe wenig Progesteron-Enzym-Konjugat an die Antikörper bindet, ist die Intensität der gemessenen Farbreaktion umgekehrt proportional zum Gehalt an Progesteron in der Probe.

Bei dem bovinen IFN τ ELISA Kit der Firma Cloud-Clone handelt es sich um einen Sandwich ELISA. Die Proben sowie der Standard werden in Doppelansätzen gemessen. Auf der Oberfläche der Wells der bereitgestellten Platte befinden sich IFN τ spezifische Antikörper. Die Proben werden in die Wells gegeben und das Interferon kann an diese binden. Anschließend wird ein weiterer spezifischer Antikörper, welcher mit Biotin konjugiert ist, hinzugegeben. Die Platte wird nach der Zugabe von Meerrettichperoxidase (HRP), dem Reporterenzym, inkubiert. Nach der Zugabe des Tetramethylbenzidine (TMB) Substrates ändert sich die Farbe der Proben, die IFN τ und damit auch das an ihm gebundene Reporterenzym enthalten. Die Reaktion wird durch eine Stopplösung beendet. Die Farbveränderung wird photometrisch

bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt (CLARIOstar, BMG Labtech, Ortenberg) und die Konzentration der Proben wird im Vergleich zur Standardkurve ermittelt.

Ergebnisse und Interpretation

Mit der Analyse der asservierten Verlaufspuben konnten die Ergebnisse der Wissenschaftler des FSBSI nicht repliziert werden. Zwar zeigten die gemessenen Progesteronwerte den erwarteten Verlauf mit niedrigen Werten < 1 ng/ml am Tag 0 und höheren Werten mit Fortschritt der Trächtigkeit (Abbildung 1), bei der Analyse im IFN τ Assay waren jedoch keine zeitlichen Unterschiede darstellbar. Umgerechnet wiesen alle Proben eine sehr hohe Konzentration an IFN τ auf, ohne sichtbaren Anstieg oder Abfall entlang der Zeit.

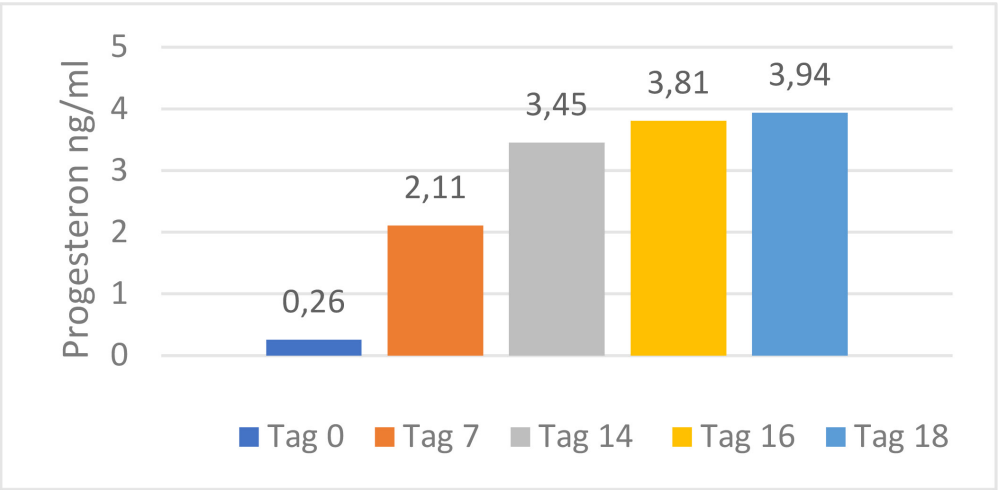


Abbildung 1: Durchschnittliche Progesteron Konzentration in Verlaufspuben entlang der Zeit. Der Zahlenwert über jedem Balken gibt den jeweiligen Mittelwert an.

Einige Proben konnten bei 450 nm vom Photometer nicht mehr abgelesen werden (Abbildung 2A). Es wäre zu erwarten gewesen, dass an Tag 0 bei Tieren nach Besamung und an Tag 0 und 7 bei Tieren mit Embryotransfer kein IFN τ gemessen werden kann. Vermutlich kam es lagerungsbedingt zur Bildung von Fragmenten, die vom Assay fälschlicherweise als IFN τ detektiert wurden.

Die Messung der Einzelproben ergab auswertbare IFN τ Konzentrationen zwischen 10,7 und 278,8 pg/ml. Die Intensität der Farbe der gemessenen Proben lag im Bereich der Standardkurve (Abbildung 2B).

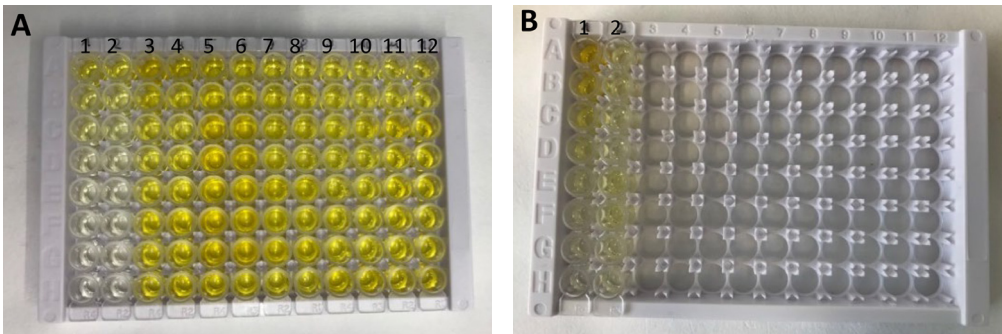


Abbildung 2A: Erster Durchlauf: Reihe 1 und 2 enthalten den Standard (500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6 und 7,8 pg/ml im Doppelansatz). In Reihe 3 bis 12 befinden sich die Verlaufspuben im Doppelansatz.

Abbildung 2B: Zweiter Durchlauf: Reihe 1 enthält den Standard im Einzelansatz. Reihe zwei enthält Einzelproben im Doppelansatz.

Zwei der beprobten Tiere wurden zu einem späteren Zeitpunkt mittels Ultraschall als trächtig eingestuft, die verbleibenden sechs Tiere waren nicht trächtig. Eine Unterscheidung zwischen den beiden Kategorien anhand der IFN τ Konzentrationen war nicht möglich. Die Ergebnisse der IFN τ Konzentrationen im Serum sind in Tabelle 1 auf Einzeltierebene dargestellt. Färse 3 und 4 zeigten IFN τ Konzentrationen im dreistelligen Bereich, obwohl sie mittels Ultraschall als nicht-tragend eingestuft wurden. Möglicherweise waren sie zum Zeitpunkt der Probenentnahme tragend und es kam zu embryonaler Mortalität. Die beiden tragenden Tiere lagen im Mittel bei 78,0 pg/ml.

Tabelle 1

Identität	Tag nach Besamung	IFN τ [pg/ml]	Trächtigkeit Ultraschall
Negativkontrolle	-	10,7	-
Färse 1	14	78,9	positiv
Färse 2	12	33,5	negativ
Färse 3	18	278,8	negativ
Färse 4	12	144,4	negativ
Kuh 1	15	56,4	negativ
Kuh 2	19	24,7	negativ
Kuh 3	13	31,1	negativ
Kuh 4	14	77,1	positiv

Standardkurve und Verdünnungsversuch

Die im Kit enthaltene Standardkurve lieferte zuverlässige Ergebnisse. Der Interassay-Variationskoeffizient lag zwischen 0,4 und 13,4 % im Bereich 500 bis 15,6 pg/ml.

Beim Verdünnen der Verlaufspröben konnten die vermeintlich hohen IFN τ Konzentrationen erfolgreich runterverdünnt werden. Allerdings ergaben die korrigierten Werte weiterhin nicht den erwarteten Anstieg entlang der Zeit. Potentielle Störfaktoren konnten somit nicht mittels Verdünnung beseitigt werden, um sinnhaftere Ergebnisse zu erzielen.

Ergebnisse und Interpretation

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieses VETResearch Projektes der bovine IFN τ ELISA der Firma Cloud Clone Corp im Labor der Klinik für Wiederkäuer erfolgreich etabliert werden. Die Überprüfung von dessen Aussagekraft anhand der asservierten Verlaufspröben sowie anhand von weniger lang eingefrorenen Einzelproben lieferte leider keine belastbaren Ergebnisse, obwohl die Haltbarkeit der asservierten Proben mittels Bestimmung der Progesteron Konzentration bestätigt werden konnte. Auch wenn im Rahmen dieser Studie nur wenige Proben analysiert wurden, entstand der Eindruck, dass der Prozess des Einfrierens die Ergebnisse beeinträchtigt. Vermutlich entstehen durch die Lagerung bei -20 °C Fragmente, die vom Assay fälschlicherweise als IFN τ detektiert wurden. Die Aussagekraft des verwendeten Assays sollte im Rahmen weiterer Studien überprüft werden.

Referenzen

¹ Savchenko et al. 2019, Reproduction in Domestic Animals, Volume 54, Supplement 3, page 112-113

² Dissertation Marie Meyerholz, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, 2014
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:gbv:95-105102>

Persönliche Erfahrungen

Mein VETResearch Projekt konnte mir trotz COVID-19 einen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten und den Laboralltag geben.

Nachdem wir zusammen das Projekt und die Durchführung besprochen haben, konnten wir mit dem Sortieren der Proben und dem Progesteron ELISA beginnen, welchen ich nach einem gemeinsamen Durchlauf eigenständig durchführen konnte.

Der anschließende erste Durchlauf des IFN τ ELISA und seine unerwarteten Ergebnisse brachten uns dazu, unsere Probenauswahl neu zu überdenken, aber auch der nächste Durchlauf war wenig aussagekräftig.

COVID-19-bedingt konnte ich den letzten Durchlauf leider nicht mehr selber durchführen, aber auch dieser brachte uns nur wenig schlüssige Ergebnisse.

Das Projekt hat mir vor allem beigebracht, dass Wissenschaft und wissenschaftliches Arbeiten nicht immer geradlinig ist und man auf unvorhergesehene Probleme stoßen kann und eventuell sein Projekt neu überdenken muss.

Alles in allem war es eine sehr gute Entscheidung, an dem VETResearch Projekt teilzunehmen. Durch die Pandemie konnten meine Laborstunden in der Uni nicht stattfinden und ich hatte die Möglichkeit, Praxiserfahrung zu sammeln.

Etablierung eines Chemotaxisassays mit Schafblut

Elena Gerdes

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Betreuer: PD Dr. habil. Wolfram Petzl

Einleitung

Die Problematik der Mastitis-Erkrankungen, und auch damit verbundene Abgänge, ist ein wichtiges Thema in der heutigen Bestandsbetreuung der Rinder. Durch die regelmäßige Behandlung der Mastitiden mit Antibiotika kann es dabei zu einer Rückstandsproblematik der Medikamente in der produzierten Milch kommen. Werden die Grenzwerte überschritten, führt dies zu wirtschaftlichen Einbußen für den Landwirt. Um den Antibiotika-Einsatz in Zukunft zu reduzieren, liegt das Augenmerk vor allem auf einem besseren Verständnis der Immunabwehr im Euter. So sollen Wege gefunden werden, wie man in Zukunft präventiv handeln kann, um eine Infektion gänzlich zu vermeiden.

Im Sinne eines „One Health Approach“ ist die veterinärmedizinische Mastitis-Forschung auch speziesübergreifend von Interesse. Auch in der Schafhaltung spielt die Mastitis eine große Rolle. Von der EFSA wurde sie als eine von drei der bedeutendsten Faktoren für das Wohlbefinden der Tiere eingestuft. Das Bakterium *Staphylococcus aureus* gilt als wichtigster Verursacher von Mastitiden beim Schaf.

Intensive Forschung zur frühen molekularen Regulation bei der bovinen Mastitis haben die große Bedeutung angeborener Immunmechanismen hervorgehoben. Viele dieser Untersuchungen wurden im Rahmen von Tierversuchen (In-vivo-Infektionsmodellen) durchgeführt. Die Vermeidung und Reduzierung von Tierversuchen rückt jedoch immer mehr in den Fokus der öffentlichen Diskussion und erfordert die Erforschung alternativer Modellsysteme. Oft wird hier das Prinzip „der 3 R“ (Replace, Reduce, Refine) angewandt. Hierbei spielen unter anderem die Kultivierung intakter Gewebeverbände spezifischer Organe eine große Rolle (sogenannte „Explantmodelle“).

Die Spezies Schaf ist hinsichtlich sowohl der deutlich günstigeren Anschaffung, Haltung und Fütterung, als auch der schnelleren Entwicklung und des schnelleren Einsetzens der Reproduktion/Laktation oftmals als Modelltier dem Rind überlegen. Das Schaf gewinnt so immer mehr an Interesse, um Versuche an Rindern in Zukunft zu ersetzen. In vielen anderen medizinischen Bereichen wurden schon erfolgreich Explantmodelle für das Schaf entwickelt. Auch in der Mastitis-Forschung hat der Einsatz von Explantmodellen beim Schaf ein hohes Potential. Bis jetzt wurden jedoch noch keine Untersuchungen in diese Richtung angestrengt. Im Rahmen einer geplanten Doktorarbeit soll erstmals ein Eutergewebe-Modell beim Schaf etabliert und publiziert werden.

Zur Auswertung des Eutergewebe-Modells bedarf es eines Systems, welches die Immunantwort der Explants auf einen Reiz (z.B. Bakterien) quantifizieren kann. Dies soll mittels eines Chemotaxisassays geschehen, welcher im Rahmen dieses VETResearch Projektes etabliert werden soll.

Material und Methoden

Ein Chemotaxisassay dient dem Nachweis und der Quantifizierung von chemotaktischen Stoffen in einer Probe. Der große Vorteil dieser Methode liegt darin, dass man nicht gezielt einen speziellen Stoff nachweisen muss, sondern stattdessen einfach beurteilen kann, ob in der vorliegenden Probe etwas enthalten ist, das neutrophile Granulozyten anlockt.

Der Assay wird mittels einer Chemotaxiskammer durchgeführt. Diese besteht aus einer Bodenplatte, einer Gummidichtung, einer Membran und einem Deckel und wird mittels Schrauben zusammengehalten. In die Bodenplatte sind Wells gebohrt, in welche die Proben eingefüllt werden. Das Befüllen der Wells erfolgt mit der Bildung von einem kleinen positiven Meniskus auf der Oberseite, damit zwischen der Membran und der Flüssigkeit keine Luftblasen entstehen. Sind alle Wells befüllt, wird vorsichtig die Membran aufgelegt. Anschließend wird die Gummidichtung platziert, gefolgt von dem Kammerdeckel. Dieser wird durch sechs Schrauben fixiert. In den Deckel sind Löcher gebohrt, die mit den Wells der Bodenplatte ausgerichtet sind. Mit der Membran als untere Begrenzung bilden sie die oberen Wells, in welche eine Zellsuspension mit neutrophilen Granulozyten eingesetzt wird. Während der Inkubationszeit wandern die neutrophilen Granulozyten, wenn sie durch einen chemotaktischen Stoff gelockt werden, durch die Membran in das untere Well. Dort sind sie anschließend durch eine Messung im Durchflussszytometer nachweisbar. Zur Etablierung dieser Methode wurde ausschließlich mit Positiv- und Negativkontrollen gearbeitet. Verwendung fand hier vor allem die humane Rekombinante des Interleukin-8.

Zur Durchführung eines Chemotaxisassays wird eine Zellsuspension benötigt, welche neutrophile Granulozyten enthält. Um diese herzustellen, benötigt man frisches Vollblut, welches mit einem gerinnungshemmenden Stoff (z.B. EDTA) versetzt wird. Durch ein Trennmittel werden in einer Dichtezentrifugation die neutrophilen Granulozyten von den Monozyten und Lymphozyten getrennt. Diese befinden sich somit in einer separaten Schicht und können abpipettiert werden. Anschließend werden die Erythrozyten lysiert. Übrig bleibt eine Zellsuspension, welche fast ausschließlich neutrophile Granulozyten enthält.

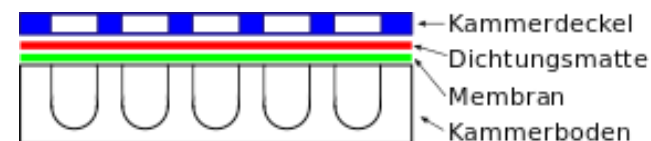


Abbildung 1: Chemotaxiskammer

Ergebnisse

Bevor die Etablierung des Chemotaxisassays beginnen konnte, erfolgte die Herstellung der Zellsuspension. Von verschiedenen Herstellern gibt es Trennmedien mit unterschiedlichen Dichten, welche für die Dichtezentrifugation genutzt werden können. Wie auch bei dem restlichen Versuchsaufbau erfolgte die Orientierung an einem erfolgreich etablierten Chemotaxisassay des Rindes. Aus diesem Grund begann ich meine Versuche mit dem Animal Pancoll (PAN Biotech™). Leider waren die erreichten Reinheitswerte der neutrophilen Granulozyten nicht im erwünschten Bereich von ca. 90 %. Es folgten weitere Versuche mit variierenden Parametern von Zentrifugationszeit und -kraft, welche nicht zu besseren Werten führten.

Daraufhin begann eine Recherche bezüglich anderer Trennmedien. Die Hoffnung war, durch ein anderes Trennmedium mit einer anderen Dichte bessere Ergebnisse zu erzielen. Anwendung fanden hier Human Pancoll (PAN Biotech™), Mouse Pancoll (PAN Biotech™), Rat Pancoll (PAN Biotech™) und Percoll (Merk). Auch wurden die Trennmedien teilweise verdünnt, um noch andere Dichten zur Verfügung zu haben.

Trennmedium	Dichte (g/ml)
Animal Pancoll	1,077
Human Pancoll	1,100
Mouse Pancoll	1,086
Rat Pancoll	1,091
Percoll	1,130

Leider führten diese Untersuchungen zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Zwar konnten teilweise Reinheitswerte von um die 90 % erreicht werden, jedoch waren diese Werte nicht reproduzierbar. Da in dem Chemotaxisassay nur neutrophile Granulozyten durch die Membran wandern, wurde der Entschluss getroffen, eine Zellsuspension ohne Separation der weißen Blutzellen in die Kammer einzusetzen. Die Annahme war, dass die Ergebnisse

dadurch nicht weiter beeinflusst werden. Dies bestätigte sich in einigen Versuchen und bildete somit die Grundlage zur weiteren Etablierung des Chemotaxisassays. Als Grundlage für die weiteren Versuche dient somit die Gesamtleukozytenzahl in der Zellsuspension.

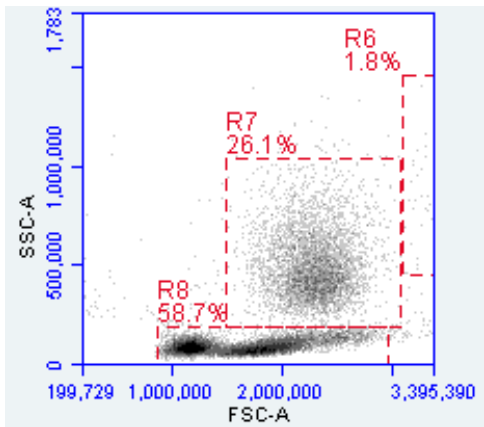


Abbildung 2: Zellsuspension gemessen im FACS nach Lyse der Erythrozyten
R7: neutrophile Granulozyten
R8: Lymphozyten, Monozyten

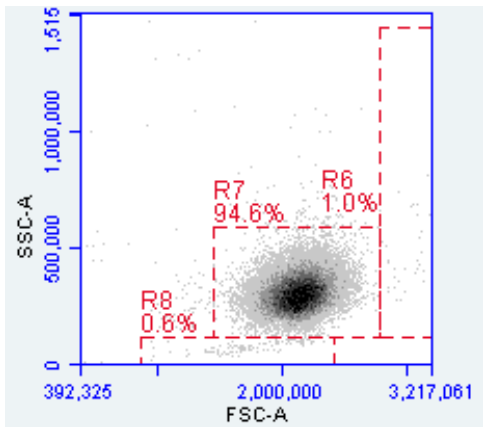


Abbildung 3: Zellsuspension gemessen im FACS nach Lyse der Erythrozyten und anschließender Migration in der Chemotaxiskammer
R7: neutrophile Granulozyten

Bei der Etablierung des Chemotaxisassays kamen ausschließlich Positiv- und Negativkontrollen zum Einsatz. Für die Kultivierung der zukünftig gewonnenen Explants wird ein Eutermium angemischt. Dies bildete auch die Grundlage für die Proben. Die Negativkontrolle erhielt keine weiteren Zusätze, während der Positivkontrolle humanes Interleukin-8 beigemischt wurde. Von der Konzentration wurden hier zunächst zehner Verdünnungsstufen von 100 ng/ml bis 0,1 ng/ml als Positivkontrolle verwendet. Durch mehrere Versuche wurde eine Positivkontrolle von 40 ng/ml festgelegt.

In den folgenden Versuchen stellte sich ein weiteres Problem dar. Zwar gab es einen Unterschied zwischen den Positiv- und Negativkontrollen, allerdings war dieser nicht so deutlich wie erhofft. Die Zellanzahl der Negativkontrolle betrug 20-40 % der Positivkontrolle. Zum Vergleich: Im Rindermodell des Chemotaxisassays liegen die Negativkontrollen bei 1-5 % der Positivwerte. Es folgten weitere Versuche, um die Ursache dieses Unterschieds zu finden. Nachdem eine Verunreinigung der Kammern ausgeschlossen wurde, probierte ich unterschiedliche Inkubationszeiten aus, um den Anteil an zufälliger Migration so weit wie möglich zu reduzieren. Zwar gab es Tage, an denen eine kürzere Inkubationszeit zu besseren Ergebnissen führte, allerdings schwankten die Ergebnisse sehr und waren weiterhin nicht zufriedenstellend.

Eine weitere mögliche Einflussgröße ist die Porengröße der Membran. Diese beträgt 3 µm und wird standardmäßig für einen Chemotaxisassay mit neutrophilen Granulozyten verwendet. Denkbar wäre, dass die Granulozyten vom Schaf sich in ihrer Größe und/oder Granularität stark von denen vom Rind unterscheiden, sodass die verwendete Membran aus dem Rindermodell zu große Poren hat. Dies lässt sich allerdings nicht einfach überprüfen, da der Hersteller der verwendeten Kammern keine Membranen mit kleineren Poren für das verwendete System produziert. Somit wäre hierfür ein Umstieg auf ein anderes System notwendig.

Letztendlich hat die Veränderung der Konzentration der Zellsuspension zum Erfolg geführt. Nach der Gewinnung der Zellsuspension wird die Konzentration gemessen und die Flüssigkeit anschließend auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Diese wird zuvor berechnet und orientiert sich an der Anzahl an exponierten Poren im Well. Für eine sensitive Methode wird für jede exponierte Pore eine Zelle in das Well eingesetzt. Da die Gesamtleukozytenzahl verwendet wird, haben wir die Anzahl an eingesetzten Zellen pro Pore verdoppelt. Diese Entscheidung basierte auf der Annahme, dass ungefähr die Hälfte der Gesamtleukozyten neutrophile Granulozyten sind und die verwendete Anzahl somit einem Granulozyt pro Pore entspricht. Da die Lymphozyten und Monozyten nicht durch die Membran wandern, geht man davon aus, dass diese keinen Einfluss auf das Ergebnis haben.

In den folgenden Versuchen wurden unterschiedliche Konzentrationen der Zellsuspension getestet. Es wurde schnell deutlich, dass die Ergebnisse bei niedrigeren Konzentrationen der Zellsuspension besser und auch konstanter sind. Durch weitere Optimierung konnte die spontane Migration deutlich reduziert werden und die Negativkontrollen liegen jetzt bei 5-10 % der Positivkontrollen. Die hierfür verwendeten Parameter sind eine Zellsuspension in der Konzentration von 4*10⁶ Zellen/ml, eine Inkubationszeit von 120 min und eine IL-8 Positivkontrolle mit einer Konzentration von 40 ng/ml.

Fazit

Trotz vieler Problemstellungen in der Etablierung dieses Chemotaxisassays, ist es in diesem Projekt gelungen, den Assay so zu optimieren, dass er auch auf die Spezies Schaf anwendbar ist. Auch wenn die erreichte Sensitivität geringer ist als im Rindermodell, ist sie dennoch ausreichend, um damit Proben zu analysieren, die durch die Gewinnung von Explants anfallen.

Eine weitere Fragestellung ist, ob der Chemotaxisassay durch die Verwendung von anderen Rekombinanten des Interleukin-8 andere Ergebnisse produziert. Diese Fragestellung war ursprünglich auch für dieses VETResearch Projekt vorgesehen. Da jedoch die Etablierung des Assays sehr zeitaufwendig war, sprengte es den Zeitrahmen des Projektes. Erste Untersuchungen zeigen allerdings, dass es keine wesentliche Unterschiede bei der Verwendung von den humanen, ovinen und bovinen Rekombinanten gab. Dies könnte allerdings in einem weiteren Projekt noch genauer untersucht werden.

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 dies alles nicht möglich gewesen.

Evaluierung des Therapieerfolges durch Fütterung einer hydrolysierten Diät bei Hunden mit chronischen Magendarmerkrankungen

Katarina Kuzek

Medizinische Kleintierklinik

Betreuer/in: Dr. Kathrin Busch-Hahn, PD Dr. Stefan Unterer

Hintergrund

Chronische Magendarmerkrankungen bei Hunden sind ein häufiger Vorstellungsgrund in der tierärztlichen Praxis. Sie werden meist retrospektiv nach Ausschluss infektiöser und sekundärer extra-gastrointestinaler Ursachen sowie aufgrund des Ansprechens auf eine Therapie mit Eliminationsdiät, Antibiose oder Immunsuppressiva diagnostiziert: Futtermittelresponsive Enteropathie (FRE), antibiotikaresponsive Enteropathie (ARE) und steroidresponsive Enteropathie (SRE). Bei Patienten mit geringgradig gestörtem Allgemeinbefinden ist eine mehrwöchige Eliminationsdiät mit nur einer Protein- und einer Kohlenhydratquelle zunächst Therapie der Wahl. Der Hund sollte mit dem ausgewählten Protein bislang noch keinen Kontakt gehabt haben. Ein Ansprechen ist bei Vorliegen von FRE in der Regel bereits nach zwei Wochen zu sehen. Eine Alternative zur klassischen Eliminationsdiät stellen kommerzielle Diätfuttermittel mit hydrolysierten Proteinen dar. Bei der Hydrolyse werden Proteine enzymatisch zerkleinert, sodass sie vom Immunsystem nicht erkannt werden und eine Immunreaktion ausbleibt. Darüber hinaus ist die Verdaulichkeit meist überdurchschnittlich gut. Ein Beispiel für eine stark hydrolysierte Diät ist Anallergenic® von Royal Canin. Das verwendete Federprotein-Hydrolysat zeichnet sich durch ein durchschnittliches Molekulargewicht unter 1000 Dalton aus. Da bislang nur wenige Studien über den Einsatz einer hydrolysierten Diät bei Hunden mit chronischen Magendarmerkrankungen veröffentlicht wurden, war das Ziel der vorliegenden Pilotstudie die retrospektive Evaluierung des Therapieerfolges durch Fütterung von Anallergenic® von Royal Canin bei chronischen Magendarmerkrankungen bei Hunden, die in der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München vorgestellt worden sind.

Material und Methoden

In die retrospektive Auswertung gingen die Krankenakten von 39 Hunden ein, die im Zeitraum zwischen Juni 2017 und November 2019 mit chronischem Durchfall an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München vorgestellt worden sind. Während dieses Zeitraums wurden alle Hunde, welche mit chronischem Durchfall vorgestellt wurden und eine milde bis moderate Krankheitsaktivität aufwiesen, prospektiv im Rahmen der diagnostischen Aufarbeitung auf eine hydrolysierte Diät umgestellt. Einschlusskriterien für diese Studie waren Durchfall für mindestens drei Wochen und Durchführung einer Eliminationsdiät mit Anallergenic® von

Royal Canin für mindestens zwei Wochen sowie eine ausreichende Dokumentation bei der Erst- und Kontrolluntersuchung. Ausschlusskriterien waren eine erstmalige Verschreibung oder eine Dosiserhöhung von Immunsuppressiva oder Antibiotika in den letzten drei Wochen vor der Erstuntersuchung oder während der Eliminationsdiät. Hunde mit einer Dosiserniedrigung von Immunsuppressiva oder Antibiotika während des Beobachtungszeitraums wurden eingeschlossen.

Aktivität			
0: normal	1: ggr. reduziert	2: mgr. reduziert	3: hgr. reduziert
Appetit			
0: normal	1: ggr. reduziert	2: mgr. reduziert	3: hgr. reduziert
Erbrechen			
0: kein Erbrechen	1: 1 x / Woche	2: 2-3 x / Woche	3: > 3 x / Woche
Kotkonsistenz			
0: normal	1: weich	2: sehr weich	3: wässrig
Kotabsatzfrequenz			
0: 1 x / Tag	1: 2-3 x / Tag	2: 4-5 x / Tag	3: > 5 x / Tag
Gewichtsverlust			
0: kein Gewichtsverlust	1: < 5 %	2: 5-10 %	3: > 10 %
Albumin (g/L)			
0: > 20	1: 15-19,9	2: 12-14,9	3: < 12
Aszites			
0: kein Aszites	1: ggr.	2: mgr.	3: hgr.
Juckreiz			
0: kein Juckreiz	1: selten	2: regelmäßig	3: wacht davon auf
Einteilung des Krankheitsschweregrades			
0-3:	Klinisch insignifikant		
4-5:	Milde Enteropathie		
6-8:	Moderate Enteropathie		
9-11:	Schwere Enteropathie		
> 12:	Sehr schwere Enteropathie		

Abbildung 1: Canine chronic enteropathy activity index (CCEAI) nach Allenspach et al. (2007) (ggr. = geringgradig, mgr. = mittelgradig, hgr. = hochgradig, x / T = Anzahl pro Tag, < = kleiner, > = größer)

Im Datenverwaltungsprogramm Vetera® wurden die Patienten anhand des Suchbegriffs Anallergenic gesucht. Anschließend wurden die Daten in einer Tabelle in Microsoft Office Excel 2010 gesammelt. Für Daten, wie z.B. das Alter, wurden die numerischen Werte verwendet. Qualitative Merkmale, wie z.B. das Geschlecht, wurden kodiert und anhand dieser Werte statistisch ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SAS-Software. Bei allen Patienten wurden Informationen über Signalement (Alter bei Vorstellung, Geschlecht, Rasse), Anamnese (Dauer der klinischen Symptome bis zur Vorstellung, Entwurmungsstatus und

Kotuntersuchung, Fütterung zum Vorstellungszeitpunkt, Anzahl vorhergehender Ausschlussdiäten), Gewicht und Body-Condition-Score (BCS) sowie Therapie festgehalten. Die Dauer der klinischen Symptome bis zur Vorstellung wurde in Kategorien eingeteilt. Die Kategorien waren drei bis sechs Wochen, sechs Wochen bis sechs Monate, sechs bis zwölf Monate und mehr als 1 Jahr. Der Canine chronic enteropathy clinical activity index (CCECAI) nach Allenspach et al. (2007) diente der Erhebung des Schweregrades und des klinischen Verlaufs der Erkrankung bei Erst- und Kontrolluntersuchung. Die Parameter Aktivität, Appetit, Erbrechen, Kotkonsistenz, Kotabsatzfrequenz, Gewichtsverlust, Albumin (g/L), Aszites und Juckreiz wurden mit jeweils 0 bis 3 Punkten bewertet, sodass insgesamt 0 bis 27 Punkte erreicht werden konnten. Die Einteilung jedes Patienten in einen Krankheitsschweregrad erfolgte wie in Abbildung 1 dargestellt. Die Kategorien zur Beurteilung des Body-Condition-Scores (BCS) waren mager (BCS = 0-3/9), normalgewichtig (BCS = 4-6/9) und adipös (BCS = 7-9/9).

Ergebnisse

Signalement

Die Hunde waren im Alter zwischen 1 und 13 Jahren mit einem Median von 5 und einem Mittelwert von 5,5. Hunde im mittleren Alter (≥ 3 bis < 9 Jahre) waren am häufigsten vertreten ($n = 16/39$, 41 %), gefolgt von jungen Hunden (≤ 2 Jahre: $n = 13/39$, 33 %) und alten Hunden (≥ 9 Jahre: $n = 10/39$, 26 %). 20 Hunde waren weiblich ($n = 20/39$, 51 %) und 19 Hunde waren männlich ($n = 19/39$, 49 %). Von diesen Hunden waren 10 % männlich kastriert, 39 % männlich intakt, 18 % weiblich kastriert und 33 % weiblich intakt. Die untersuchte Hundepopulation bestand zu etwa einem Drittel aus Mischlingen ($n = 11/39$, 28 %) und zu etwa zwei Dritteln aus reinrassigen Hunden ($n = 28/39$, 72 %). Die häufigsten Rassen waren Golden Retriever ($n = 3/39$), Labrador Retriever ($n = 3/39$), Rhodesian Ridgeback ($n = 3/39$), Dackel ($n = 2/39$) und Französische Bulldogge ($n = 2/39$). Folgende Rassen waren einmal vertreten: Afghanischer Windhund, Deutscher Boxer, English Cocker Spaniel, Großer Schweizer Sennenhund, Cavalier King Charles Spaniel, Landseer, Großer Münsterländer, Magyar Vizsla, Malteser, Zwergschnauzer, Pudel, Mops, Schapendoes, Yorkshire Terrier, Whippet, Weißer Schäferhund.

Anamnestiche Informationen

Die Dauer der klinischen Symptome bis zur Vorstellung betrug in 26 % der Fälle ($n = 10/39$) bis zu drei Monate, in 20 % der Fälle ($n = 8/39$) bis zu sechs Monate, in 8 % der Fälle ($n = 3/39$) bis zu einem Jahr und in 46 % der Fälle ($n = 18/39$) über ein Jahr. Bei 59 % der Hunde ($n = 23/39$) wurde bei der Erstuntersuchung an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München eine Kotuntersuchung (Flotation und Giardia Antigen ELISA) durchgeführt. Bei 41 % der Hunde ($n = 16/39$) wurde entweder aufgrund einer vorangegangenen negativen Kotuntersuchung oder einer Behandlung gegen Endoparasiten in den letzten drei Monaten auf eine erneute Kotuntersuchung verzichtet. Von den 39 Hunden wurden 69 % ($n = 27/39$) in den letzten drei Monaten entwurmt, 23 % ($n = 9/39$) in den letzten zwölf Monaten und 8 % ($n = 3/39$) unregelmäßig oder gar nicht entwurmt. Die Daten zur Fütterung der Patienten zum Zeitpunkt der Vorstellung sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt. Folgende Proteinquellen

wurden in absteigender Reihenfolge verwendet: Huhn, Rind, Pute, Ente, Pferd, Hirsch, Schwein, Känguru, Hermetia illucens. Folgende Kohlenhydratquellen wurden in absteigender Reihenfolge gefüttert: Reis, Mais, Kartoffel, Süßkartoffel, Pastinake, Tapioka.

Tabelle 1: Fütterung bei Vorstellung

Fütterung bei Vorstellung	Anzahl	Prozentualer Anteil
Kommerzielles Fertigfutter	28	72
Hypoallergene kommerzielle Diät	7	18
Hypoallergene selbstgekochte Diät	3	8
Hydrolysierte Diät	1	2

Tabelle 2: Anzahl vorhergehender Ausschlussdiäten

Anzahl vorhergehender Ausschlussdiäten	Anzahl	Prozentualer Anteil
0	19	50
1	4	10
2	6	15
3	4	10
> 3	6	15

Therapie

46 % der Hunde ($n = 18/39$) waren bei Vorstellung über einen Zeitraum von mehr als drei Wochen vorbehandelt. Sieben Hunde (18 %) wurden mit Immunsuppressiva (vier Hunde mit Prednisolon, ein Hund mit Prednisolon und Cyclosporin, ein Hund mit Prednisolon und Azathioprin, ein Hund mit Prednisolon und Sulfasalazin), fünf Hunde (13 %) mit Antibiotika (drei Hunde mit Metronidazol, ein Hund mit Amoxicillin, ein Hund mit Tylosin) und fünf Hunde (13 %) mit Probiotika vorbehandelt (drei Hunde mit SivoMixx®, zwei Hunde mit *Enterococcus faecium*). Bei der Kontrolluntersuchung wurden fünf Hunde (13 %) mit Immunsuppressiva (drei Hunde mit Prednisolon, ein Hund mit Prednisolon und Cyclosporin, ein Hund mit Sulfasalazin), zwei Hunde (5 %) mit Antibiotika (ein Hund mit Metronidazol, ein Hund mit Tylosin) und 23 Hunde (59 %) mit Probiotika behandelt (23 Hunde mit SivoMixx®). Im Zeitraum bis zur Kontrolluntersuchung wurden bei fünf Hunden Immunsuppressiva reduziert und bei zwei Hunden komplett abgesetzt sowie bei drei Hunden Antibiotika komplett abgesetzt.

Gewicht und Body-Condition-Score (BCS)

Der Mittelwert des Gewichts aller Patienten lag bei der Erstuntersuchung bei 17 kg, der Median bei 20,6 kg (Range: 3-46 kg, SD: 13,6). Der Mittelwert des BCS aller Patienten lag bei der Erstuntersuchung bei 4,3, der Median bei 4 (Range: 2-8, SD: 1,3). Normalgewichtige Hunde waren mit 69 % ($n = 27/39$) am häufigsten vertreten, gefolgt von mageren Hunden mit

26 % (n = 10/39). Gewicht und BCS sind bei der Kontrolluntersuchung im Vergleich zu der Erstuntersuchung gleich geblieben.

Outcome

Der Mittelwert des CCECAI aller Patienten lag bei Vorstellung bei 6,4, der Median bei 6,0 (Range: 3-11 Punkte, SD: 2,0). Die Einstufung in die bestimmten Krankheitsschweregrade nach dem CCECAI der Hunde ist in Abbildung 2 dargestellt. Die meisten Hunde mit chronischem Durchfall hatten anhand der CCECAI Einteilung bei Vorstellung eine milde bis moderate Enteropathie. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Einteilung der Patienten (n = 39) in Krankheitsschweregrade nach CCECAI bei Vorstellung

Krankheitsschweregrad	Anzahl	Prozentualer Anteil
0-3: Klinisch insignifikant	2	5
4-5: Milde Enteropathie	10	26
6-8: Moderate Enteropathie	22	56
9-11: Schwere Enteropathie	5	13
> 12: Sehr schwere Enteropathie	0	0

Die Akzeptanz von Royal Canin Anallergenic® wurde durch die Besitzer evaluiert und war bei 24 Hunden (62 %) hoch, bei sechs Hunden (15 %) mittel und bei neun Hunden (23 %) gering, sodass die Eliminationsdiät vorzeitig (< 2 Wochen) abgebrochen werden musste. Bei acht Hunden (21 %) traten während des Beobachtungszeitraumes folgende Symptome auf, welche vor der Erstvorstellung noch nicht beschrieben wurden: Obstipation (n = 3), Erbrechen (n = 2), Schlecken (n = 2) und Verschlimmerung des Durchfalls (n = 1). Bei zwei Hunden musste die Eliminationsdiät aufgrund des Erbrechens ebenfalls vorzeitig abgebrochen werden, sodass die Kontrolluntersuchung und Evaluierung des Therapieerfolges nur bei 28 von 39 Hunden stattfinden konnte. Der Mittelwert des CCECAI der 28 Hunde, bei denen die Eliminationsdiät über zwei Wochen durchgeführt werden konnte, lag bei Vorstellung bei 6,6, der Median bei 7,0 (Range: 3-11 Punkte, SD: 2,1). Der Mittelwert des CCECAI dieser 28 Hunde lag bei der Kontrolluntersuchung bei 1,8, der Median bei 1,5 (Range: 0-10 Punkte, SD: 2,4). Die Einstufung in die bestimmten Krankheitsschweregrade nach dem CCECAI der 28 Hunde bei Vorstellung und Kontrolluntersuchung ist in Abbildung 2 dargestellt.

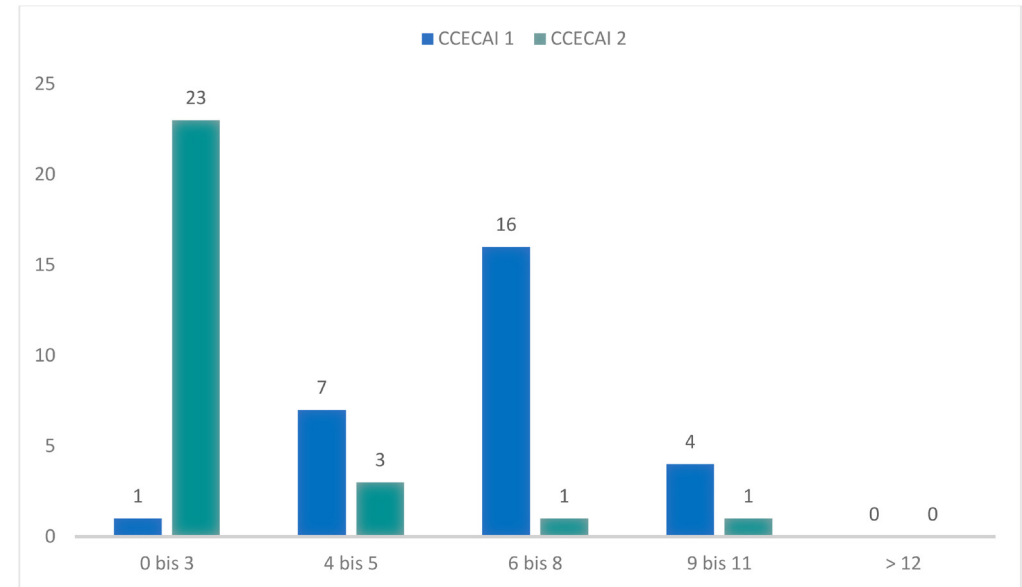


Abbildung 2: In dieser Abbildung ist der Krankheitsschweregrad nach dem CCECAI, vergleichend zwischen Erstuntersuchung (CCECAI 1) und Kontrolluntersuchung (CCECAI 2) dargestellt. Auf der x-Achse ist der Krankheitsschweregrad abgebildet, auf der y-Achse die Anzahl der Tiere.

Bei 27 von 39 Hunden (69 %) kam es zu einer klinischen Remission. Bei 13 Hunden konnte eine Vollremission (CCECAI = 0) und bei 14 Hunden eine Teilremission verzeichnet werden. Die übrigen 12 Hunde (31 %) verschlechterten sich auf die Eliminationsdiät (n = 1), mussten aufgrund von Nebenwirkungen die Eliminationsdiät vorzeitig abbrechen (n = 2) oder verweigerten aufgrund geringer Akzeptanz die Futteraufnahme (n = 9). Die mediane Zeitspanne zwischen CCECAI bei der Erstuntersuchung und CCECAI bei der Kontrolluntersuchung betrug fünf Wochen (Range: 1 Woche – 9 Monate). Die mediane Zeitspanne zwischen Erstuntersuchung und klinischer Besserung betrug, nach Besitzerangaben, drei Wochen (Range: 1 Woche – 3 Monate). Neben der deskriptiven Statistik wurden CCECAI bei der Erstuntersuchung und CCECAI bei der Kontrolluntersuchung inferenzstatistisch untersucht. Bei kleiner Stichprobengröße und fehlender Normalverteilung wurden nichtparametrische Tests verwendet. Um den Zeitunterschied zwischen CCECAI bei der Erstuntersuchung und CCECAI bei der Kontrolluntersuchung zu untersuchen, wurde der Wilcoxon-Test durchgeführt. Darüber hinaus wurde ein Mann-Whitney U-Test durchgeführt, um festzustellen, ob die Symptomstärke bei den Hunden mit vorzeitigem Abbruch der Eliminationsdiät vor ihrem Dropout der Symptomstärke der übrigen Hunde entsprach. Die Symptome wurden hoch signifikant gemindert. Die Effektstärke des Wilcoxon-Tests war groß (SD: 4,5). Die Symptomstärke bei den Hunden mit vorzeitigem Abbruch der Eliminationsdiät entsprach vor ihrem Dropout der Symptomstärke der übrigen Hunde.

Diskussion und Ausblick

Diese retrospektive Studie zeigt eine gute klinische Verbesserung aufgrund einer konsequenten Fütterung einer hydrolysierten Diät bei Hunden mit milder bis moderater chronischer Enteropathie. Die Ergebnisse decken sich mit der klinischen Erfahrung an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München und anderen Studien. Demnach sprechen vor allem Hunde mit einer milden bis moderaten Enteropathie ohne Hypalbuminämie auf eine Eliminationsdiät an. Das Ansprechen von Hunden mit einer schweren oder sehr schweren Enteropathie auf eine Eliminationsdiät kann meistens nicht evaluiert werden, da diese Patienten zeitnah eine intensivere Therapie mit Einsatz von Immunsuppressiva benötigen. Die hohe Erfolgsrate in dieser Studie lässt sich dadurch erklären, dass Hunde mit einer schweren oder sehr schweren Enteropathie bereits durch die Ausschlusskriterien aus der Studie gefiltert wurden. Es ist anzunehmen, dass es bei diesen Hunden nur unter Einsatz einer Eliminationsdiät nicht zu einer signifikanten Verbesserung der klinischen Symptome gekommen wäre. Die Studie weist mehrere Limitationen auf. Die Patientenpopulation von 39 Hunden ist aufgrund fehlender Daten der gesamthaft in die Studie eingegangenen Patienten klein. Darüber hinaus handelt es sich lediglich um eine deskriptive Pilotstudie ohne Kontrollgruppe. Es ist unklar, inwiefern Vorbehandlungen und die Verabreichung des Probiotikums Sivomixx® bei einem Großteil der Patientenpopulation das Ergebnis beeinflusst haben. Eine weitere Limitation dieser Pilotstudie ist das Fehlen einer Provokation in Form eines Futterwechsels im Anschluss an eine Verbesserung der Symptome. Unter Praxisbedingungen muss davon ausgegangen werden, dass nur wenige Besitzer bereit sind, eine zeitweise Verschlechterung der Symptome durch eine Rechallenge in Kauf zu nehmen. Zukünftig sind Studien mit einer größeren Patientenzahl und einer Kontrollgruppe nötig, um die Wirksamkeit einer hydrolysierten Diät bei Hunden mit chronischen Magendarmerkrankungen zu evaluieren. Um auf eine hohe Patientenzahl zu kommen, sollte eine prospektive Multi-Center-Studie durchgeführt werden, beispielsweise in Form einer prospektiven Studie oder einer retrospektiven Multi-Center-Studie.

Trotz dieser Limitationen kann davon ausgegangen werden, dass viele Hunde mit einer chronischen Enteropathie auf eine hydrolysierte Diät ansprechen. Aus diesem Grund sollte eine Diät mit einem hohen Hydrolysegrad immer ein fixer Bestandteil bei der diagnostischen Aufarbeitung und Erkennung einer Futtermittel-responsiven Erkrankung bei Hunden mit chronischem Durchfall sein.

Persönliche Erfahrung

Die Teilnahme am VETResearch Programm war eine sehr wertvolle Erfahrung und hat mir große Freude bereitet. Ich konnte einen guten Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten gewinnen. Diese Erfahrung und das daraus gewonnene Wissen stellen eine große Bereicherung für meine berufliche Zukunft dar und haben mein Vorhaben, nach Beendigung des Studiums eine Dissertation im klinischen Bereich anzufertigen, weiter bestärkt.

Ich möchte mich herzlich bei meinen Betreuern Frau Dr. Kathrin Busch-Hahn und Herrn Dr. Stefan Unterer bedanken, die mich herzlich in das Gastroenterologie-Team aufgenommen

haben und mir trotz Corona-Pandemie dank zahlreicher Zoom Meetings stets bei der Erstellung des Projektes geholfen haben. Darüber hinaus durfte ich über Zoom bei zahlreichen internen Fortbildungen zu Themen aus der Gastroenterologie und dem Journal Club teilnehmen, sodass ich über das VETResearch Projekt hinaus viel lernen konnte. Dieses Wissen wird mir bestimmt bei der anstehenden Staatsexamensprüfung in Innerer Medizin viel helfen.

Quellen

1. Allenspach K, Wieland B, Grone A, et al. Chronic enteropathies in dogs: Evaluation of risk factors for negative outcome. Vet Intern Med 2007;21:700-708.
2. Allenspach K, Culverwell C, Chan D. Long-term outcome in dogs with chronic enteropathies: 203 cases. Vet Rec 2016;178:368.

Antimikrobielle Aktivität von Typ-I- und Typ-II-Interferonen gegenüber bovinen Endometritis-Erregern

Thomas Metzler

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung
Betreuerinnen: Simone Schabmeyer, Dr. Marie Meyerholz

Hintergrund

Interferone (IFNs) sind Glykoproteine, die eine immunstimulierende Wirkung haben und bei Infektionen und Tumorerkrankungen ausgeschüttet werden. Dabei wirken sie in erster Linie indirekt auf die Genexpression benachbarter Zellen, wodurch sich diese besser auf Angriffe vorbereiten können. IFNs sind bisher vor allem für ihre antivirale und antitumorale Aktivität bekannt und spielen bereits in der Therapie entsprechender Erkrankungen eine bedeutende Rolle. Neue Studien zeigen, dass sie auch an der Bekämpfung bakterieller Infektionen beteiligt sein können. Im Zuge der Bekämpfung von Antibiotikaresistenzen und der Erforschung neuer antibakterieller Wirkstoffgruppen stellen sie deshalb eine interessante Stoffgruppe dar. Im Bereich der Fortpflanzung ist insbesondere Interferon- τ (IFN- τ), ein Vertreter der Typ-I-Interferone, als embryonales Schlüsselsignal für die maternale Erkennung der Trächtigkeit ein spannender Kandidat. Neben der primären Aufgabe der Trächtigkeitsvermittlung beim Rind wird IFN- τ in der Humanmedizin therapeutisch bei viralen Erkrankungen eingesetzt. Nachdem die indirekte antibakterielle Aktivität von IFNs sowohl in vivo (FUJIKI und TANAKA, 1988) als auch in vitro mittels Zellkultur (SHTRICHMAN und SAMUEL, 2001) nachgewiesen wurde, konnten KAPLAN et al. (2017) eine direkte mikrobielle Aktivität von IFN- β auf *Staphylococcus aureus* zeigen. Angelehnt an die genannte Veröffentlichung sollte im vorliegenden Projekt die direkte antibakterielle Aktivität der Typ-I-Interferone IFN- α , IFN- β und IFN- τ sowie des Typ-II-Interferons IFN- γ auf die Erreger *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Streptococcus uberis* (*Sc. uberis*) untersucht werden. Die genannten Bakterien wurden zuvor aus einer Kuh mit klinischer Endometritis isoliert. Außerdem wurde analog zur Veröffentlichung von KAPLAN et al. (2017) als drittes Pathogen ein *Staphylococcus aureus*-Stamm (*S. aureus*) eingesetzt, der zuvor aus einer Kuh mit klinischer Mastitis isoliert worden war.

Material und Methoden

Verwendung fand die Methode des Time-Kill-Assays. Durch wiederholte photometrische Messungen wird die zeitabhängige Änderung der optischen Dichte (OD) aufgezeichnet. Von einer steigenden OD kann dann auf Bakterienwachstum geschlossen werden. Die ausbleibende oder reduzierte Zunahme der OD lässt Rückschlüsse auf die dosisabhängige antimikrobielle Wirkung des zu testenden Zusatzes zu. Im vorliegenden Projekt wurde für diese Messungen ein Platten-Photometer (CLARIOstar, BMG LABTECH, Ortenberg) verwendet. Die kryokonservierten Bakterien wurden auf Agarplatten mittels Drahtöse ausplattiert und für

24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde jeweils eine einzelne Kolonie in 10 ml Lyso-geny-Broth-Medium (LB) überführt und erneut für 18 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde jeweils eine Messung der OD bei 600 nm dieser Bakteriensuspensionen vorgenommen, um sie dann so zu verdünnen, dass jeweils dieselbe Bakterienkonzentration vorlag. Diese Ansätze wurden erneut für 90 min bei 37 °C inkubiert, damit sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Die Bakterienlösung wurde mit Medium und Zusätzen inkubiert und im Photometer wurden 15 Messungen der OD bei 600 nm im 30-minütigen Abstand (0-7 h) vorgenommen. Als Zusätze kamen folgende IFNs zum Einsatz: Bovines rekombinantes IFN- α , IFN- β , IFN- γ und IFN- τ in verschiedenen Konzentrationen (2,5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml, 1500 ng/ml und 2000 ng/ml bei IFN- α , IFN- γ , IFN- τ sowie 0,06 μ M, 0,006 μ M, 0,003 μ M und 0,0006 μ M bei IFN- β). Die Einheit μ M wurde für IFN- β in Anlehnung an die oben beschriebene Publikation von KAPLAN et al. (2017) gewählt, um die Ergebnisse besser vergleichen zu können. Als Medium für die Bakterien und zum Anfertigen der Verdünnungsstufen wurde auch hier LB-Medium verwendet. Zusätzlich wurde für alle Bakterien im Dreifachansatz je eine Positivkontrolle (Bakterium ohne IFN), eine Negativkontrolle (Bakterium mit Antibiotikazusatz (Antimycin / Penicillin / Streptomycin (APS) oder Sulfadimidin / Trimethoprim) sowie eine Mediumkontrolle (Blank) ohne Bakterium/IFN gemessen.

Ergebnisse

Insgesamt konnte bei keinem der verwendeten Zusätze ein ähnlich starker wachstumshemmender Effekt wie beim Zusatz von Antibiotikum auf die Bakterien beobachtet werden. Allerdings konnten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zusätzen und Konzentrationen dargestellt werden. Diese werden im Folgenden erläutert und ausgewählte Daten graphisch dargestellt.

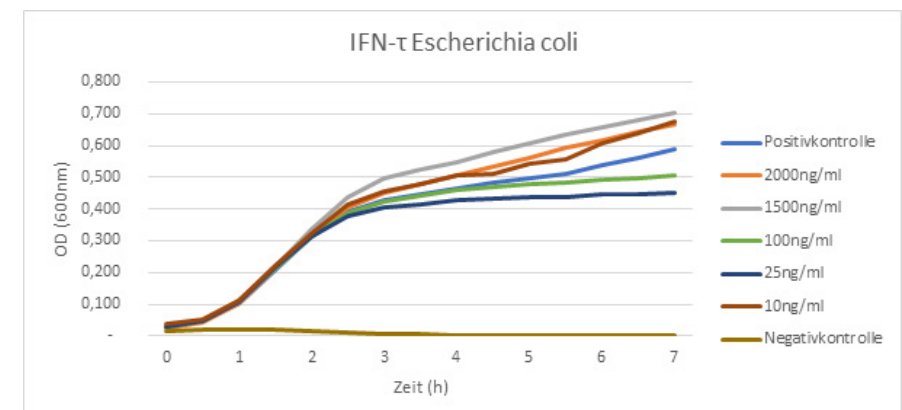
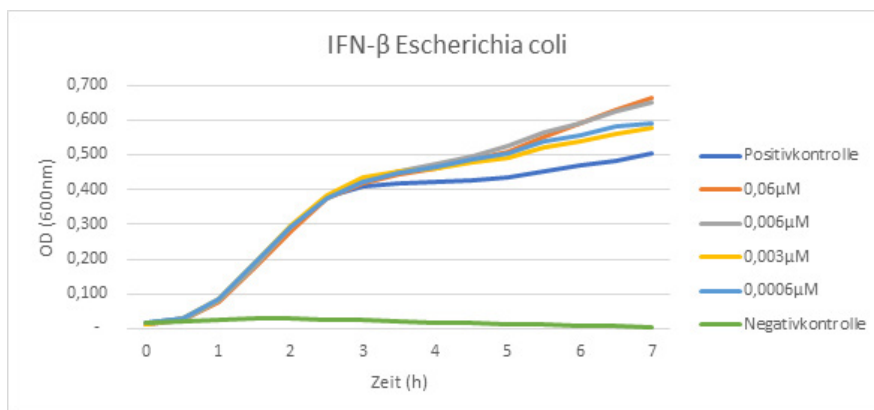
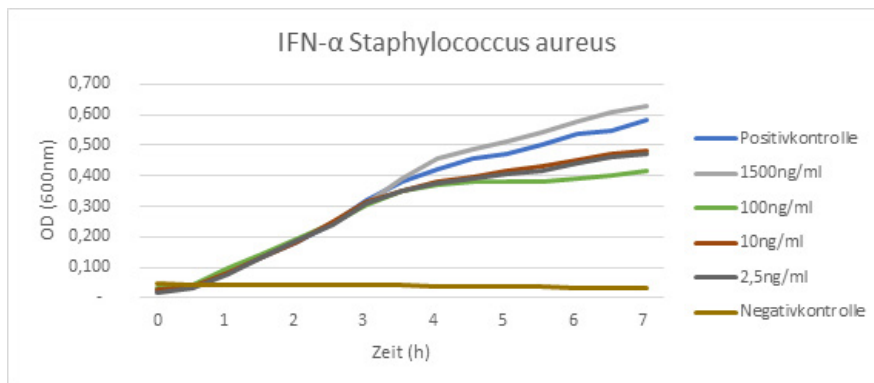
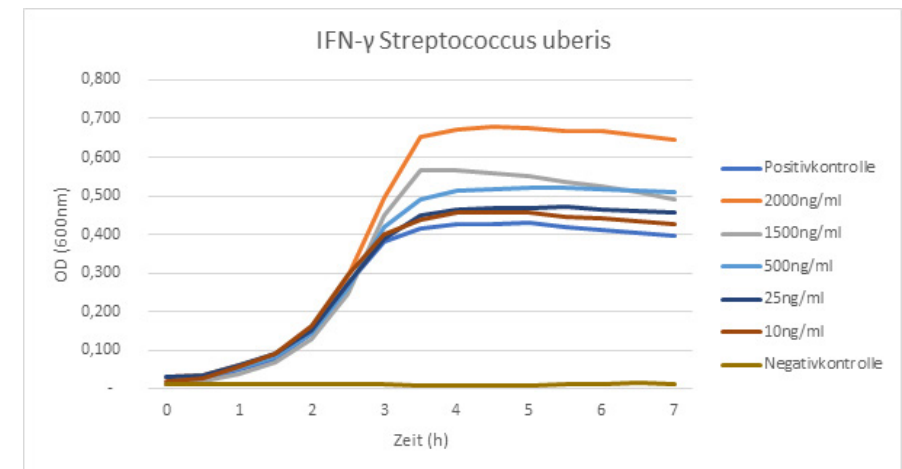
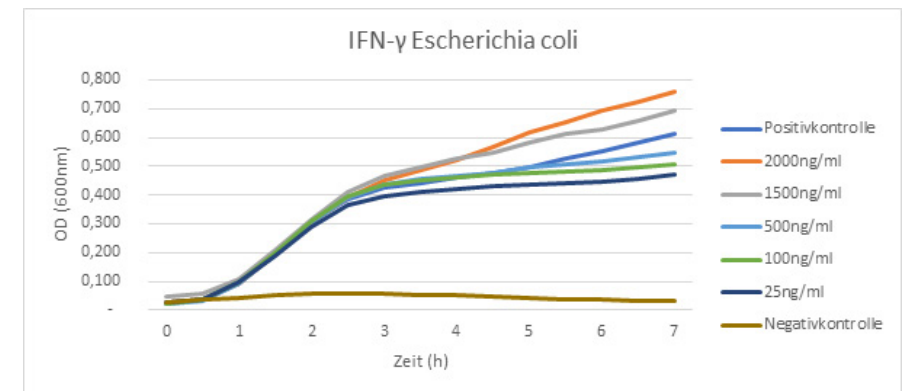
IFN- α zeigte in den meisten Konzentrationen auf *E. coli* einen eher wachstumshemmenden Effekt, nur bei einer Zugabe von 2,5 ng/ml IFN- α konnte ein eher wachstumsfördernder Effekt beobachtet werden. Auf *S. aureus* hatten die Konzentrationen 2,5 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml IFN- α einen eher wachstumshemmenden Effekt und der Zusatz von 1500 ng/ml IFN- α einen eher wachstumsfördernden Effekt. Bei den anderen Konzentrationen konnte kein Einfluss auf das Wachstum beobachtet werden. Bei *Sc. uberis* hatte nur die Konzentration 500 ng/ml IFN- α einen scheinbar wachstumshemmenden Effekt, alle anderen verwendeten Konzentrationen hatten keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum.

IFN- β zeigte entgegen der Erwartungen auf alle Bakterien einen eher wachstumsfördernden Effekt, der bei höheren Konzentrationen stärker ausfiel. Lediglich auf *S. aureus* hatte die niedrigste verwendete Konzentration IFN- β (0,0006 μ M) keinen Einfluss auf das Wachstum.

IFN- γ zeigte ähnlich wie IFN- α einen konzentrationsabhängigen, entweder wachstumsfördernden oder wachstumshemmenden Effekt. Dies wurde bei der Inkubation mit *E. coli* besonders deutlich. Die Konzentrationen 2000 ng/ml und 1500 ng/ml IFN- γ wirkten eher wachstumsfördernd und die Konzentrationen 500 ng/ml, 100 ng/ml und 25 ng/ml IFN- γ wirkten eher

wachstumshemmend auf *E. coli*. Die anderen verwendeten Konzentrationen zeigten keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum. Ähnliche Effekte konnten bei Inkubation mit *S. aureus* beobachtet werden. Interessanterweise zeigten alle Konzentrationen auf *Sc. uberis* einen eher wachstumsfördernden Effekt.

Ebenfalls ähnliche Effekte konnten bei Inkubation mit IFN- τ beobachtet werden. Höhere Konzentrationen zeigten einen eher wachstumsfördernden Effekt, niedrigere Konzentrationen einen eher wachstumshemmenden Effekt auf *E. coli*. Interessanterweise zeigte die zweitniedrigste verwendete Konzentration IFN- τ (10 ng/ml) wiederum einen eher wachstumsfördernden Effekt, während die Inkubation mit 25 ng/ml IFN- τ die deutlichste hemmende Wirkung auf das Wachstum von *E. coli* zeigte, verglichen mit den anderen verwendeten Konzentrationen von IFN- τ .



Schlussfolgerung

Anders als erwartet, konnte im Rahmen dieses Projektes keine komplette Hemmung des Bakterienwachstums durch Inkubation mit IFNs gezeigt werden. Interessanterweise ließ sich eine gewisse wachstumshemmende Wirkung bei den niedrigeren verwendeten IFN-Konzentrationen beobachten, während bei Inkubation mit hohen IFN-Konzentrationen eine tendenzielle Wachstumsförderung dargestellt werden konnte. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass IFNs zwar einen gewissen direkten antibakteriellen Effekt zeigen, jedoch gleichzeitig von den Bakterien als Substrat verwendet werden können. Da IFNs als Glykoproteine aus Aminosäuren und Zuckern aufgebaut sind, könnten sie von den Bakterien zerkleinert und Bestandteile verstoffwechselt werden.

Danksagung

Für mich war die Teilnahme am VETResearch Projekt ein toller Einstieg in die wissenschaftliche Arbeit und hat mir gezeigt, wie viel Arbeit selbst in einem scheinbar kleinen Projekt steckt. Es hat mir viel Freude bereitet, mich intensiver mit einem Thema zu beschäftigen und eigenständig Verantwortung für das Projekt zu übernehmen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Marie Meyerholz und Simone Schabmeyer für die großartige Betreuung und die viele investierte Zeit neben ihren eigenen Projekten. Mein Dank gilt außerdem dem gesamten Laborteam der Klinik für Wiederkäuer, das auf jede Frage eine gute Antwort parat hatte.

Literatur

Fujiki T, Tanaka A. Antibacterial activity of recombinant murine beta interferon. *Infection and Immunity* 1988; 56: 548-51.

Kaplan A, Lee MW, Wolf AJ, Limon JJ, Becker CA, Ding M, Murali R, Lee EY, Liu GY, Wong GCL, Underhill DM. Direct Antimicrobial Activity of IFN- β . *J Immunol* 2017; 198: 4036-45.

Shtrichman R, Samuel CE. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Current Opinion in Microbiology* 2001; 4: 251-9.

Etablierung einer Standardkurve für die absolute Quantifizierung der Interferon-tau-induzierten Gene PI3K, MX-1 und MX-2 mittels real-time q-PCR

Karina Schechner

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Betreuer/innen: Dr. Frank Weber, Dr. Marie Meyerholz, Sandra Kirsch, Simone Schabmeyer

Hintergrund

Beim Wiederkäuer wird die maternale Erkennung einer Trächtigkeit durch das Typ-I-Interferon- τ (IFN- τ) vermittelt. Dieses Signal wird vom Embryo vor der Implantation in das uterine Lumen abgegeben. Durch Bindung an die beiden Rezeptoren IFNAR1 und IFNAR2 und die entsprechende Signalkaskade verhindert IFN- τ letztlich die Luteolyse des Gelbkörpers. Außerdem regt es weitere Mechanismen an, die für das Wachstum und die Entwicklung des Konzeptus notwendig sind.

Dies ist ein komplexer Prozess, welcher noch nicht gänzlich aufgeklärt ist. Man weiß mittlerweile, dass dabei verschiedene Signaltransduktionskaskaden eine Rolle spielen. So ist bereits allgemein bekannt, dass es sowohl einen klassischen, als auch einen nicht klassischen Weg der IFN- τ Kaskade gibt, welche sogar an mehreren Punkten miteinander vernetzt sein könnten.

Heutzutage rückt das Thema Fruchtbarkeit in der Rindermedizin, vor allem hinsichtlich der Optimierung der Zwischenkalbezeiten und einer längeren Nutzungsdauer des Einzeltieres, vermehrt in den Fokus der Wissenschaft. Vor diesem Hintergrund ist es umso erstrebenswerter, die Prozesse der Typ-I-Interferon-vermittelten Signaltransduktionskaskaden besser zu verstehen und somit auch eine genauere Vorstellung von möglichen Störungen dieser Abläufe zu gewinnen.

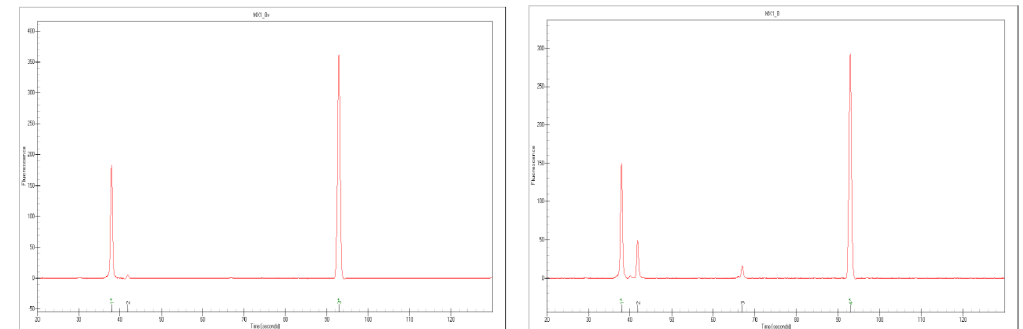
Aus diesem Grund wurde an der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität in München ein Projekt ins Leben gerufen, welches die Expression verschiedener Interferon-induzierter Gene (ISGs) aus diesen Signaltransduktionskaskaden direkt im endometrialen Gewebe nachweisen soll. Am Schlachthof wurden Gewebestückchen aus bovinen Uteri für *in vitro* Versuche entnommen. Mit Hilfe dieses sogenannten „Explantmodells“ soll mehr Wissen über die Aktivität von Typ-I-Interferonen im endometrialen Gewebe erlangt werden. Nach den Stimulationsversuchen sollte die cDNA ausgewählter ISGs in den Gewebeproben absolut quantifiziert werden.

Im Rahmen dieses VETResearch Projektes wurde je eine Standardkurve für die cDNA der Gene PI3K, MX-1 und MX-2 etabliert. Anschließend folgte die absolute Quantifizierung der Gene in den oben genannten Endometriumsproben (Dissertation Simone Schabmeyer).

Material und Methoden

Zu Beginn des Projekts wurden zunächst mehrere Uterusproben von den insgesamt 26 Spendertieren ausgewählt. Im Vorfeld dieser Versuche waren aus vorherigen Auswertungen einige Proben bekannt, welche generell einen hohen Expressionsgehalt aufweisen. Dies war für die weitere Durchführung von großem Vorteil, da auch einige Tiere zu wenige oder keine der gesuchten Gene exprimieren. Sie wären somit für die Standardkurvenetablierung untauglich.

Nach dieser gezielten Auswahl wird die entsprechende cDNA in den Proben mittels zuvor getesteter Primer in einer konventionellen PCR vervielfältigt. Im Anschluss wird das fertige PCR-Produkt gemäß Protokoll verdünnt und im Experion Chip (Bio-Rad, Hercules, USA) seiner Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Das errechnete Bandenmuster wird nun auf eine Bande untersucht, welche in ihrer Länge der Zielsequenz entspricht. Darüber hinaus ist darauf zu achten, dass die Proben nicht kontaminiert sind, was durch unerwünschte Banden sichtbar werden würde. Da die Peaks der Zielsequenzen bei den ersten Auftrennungen sehr schlecht zu erkennen waren, wurde ein Doppelversuch mit verdünnten und unverdünnten PCR Amplifikaten durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass die unverdünnten Proben deutlich besser zu befunden waren, weshalb im Weiteren auf den Verdünnungsschritt verzichtet wurde (Abbildung 1).



Verdünntes Amplifikat

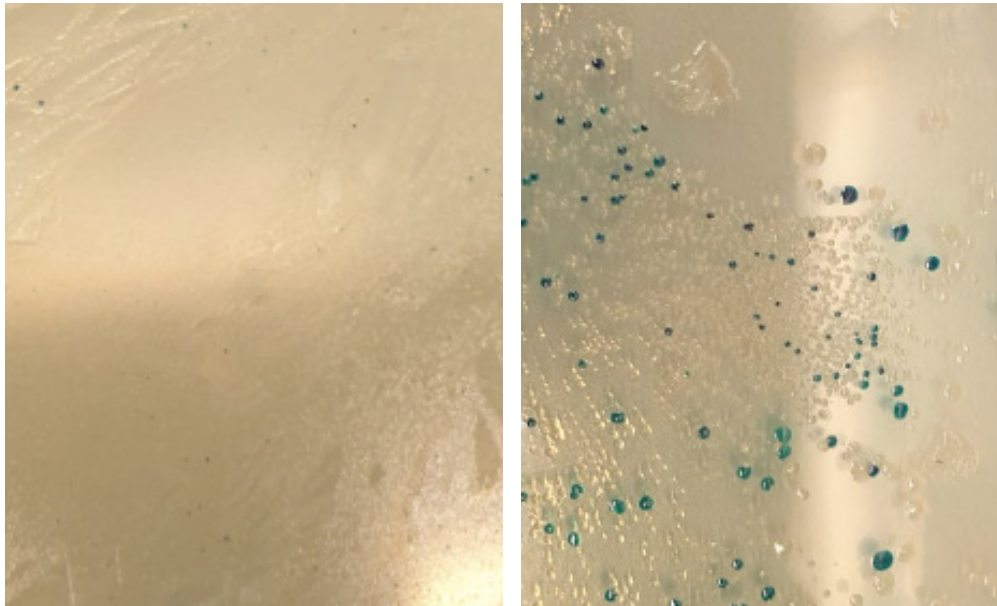
Unverdünntes Amplifikat

Abbildung 1: Auswertung der Elektrophorese zur Expression von MX-1 in einer Endometriumsprobe durch den Experion Chip

Im Anschluss werden die vervielfältigten Zielsequenzen mittels pGEM-T Vector System I Cloning Kit (Promega Corporation, Madison, USA) in ein Plasmid eingefügt. Idealerweise wird dabei das lacZ-Gen des verwendeten Vektors unterbrochen. Um dies zu überprüfen, wird das Plasmid am folgenden Tag mittels Hitzeschock in Ampicillin resistente *E. coli* Bakterien eingebracht. Daraufhin wird die Bakteriensuspension auf einem LB-Agar ausplattiert, welcher zuvor mit dem Antibiotikum Ampicillin, dem künstlichen lac-Operon-Induktor IPTG und dem chromogenen Substrat x-Gal beimpft wurde. Nach 24 Stunden wird das Koloniewachstum auf den Platten beurteilt. Da das zugegebene Plasmid sowohl ein lacZ-Gen als auch ein Gen für Ampicillinresistenz enthält, können sich nur Bakterien auf dem Agar vermehren, welche zuvor ein Plasmid aufgenommen haben. Kolonien mit intaktem lacZ-Gen erscheinen blau.

Bei weißen Kolonien wurde das lacZ-Gen dagegen zerstört, weshalb sie das zugesetzte x-Gal nicht verstoffwechseln können. Diese Kolonien enthalten mit hoher Wahrscheinlichkeit eines der zugegeben Plasmide, welches zuvor am lacZ-Gen gespalten wurde. Es wird jeweils eine weiße Einzelkolonie ausgewählt und in ein Ampicillin haltiges LB-Flüssigmedium überführt.

Dieser Schritt stellte sich bei den Standardkurven von MX-1 und MX-2 als problematisch dar, weil aus zunächst unerfindlichen Gründen keine Einzelkolonien, sondern ein dichtes Rasenwachstum auf dem Agar sichtbar wurde. Entsprechend der Anleitung von Promega (Promega Corporation, Madison, USA) wurde nach der Ursache gesucht. Mit hoher Wahrscheinlichkeit resultierte das Problem entweder aus einem Wirkungsverlust oder aus einer Kontamination des LB-Agars oder seiner Zusätze. Um einen derartigen Fehler auszuschließen, wurde ein neuer Agar angemischt, wobei ein frisches Aliquot des Ampicillins als Zusatz verwendet wurde. Die erneut ausplattierten Bakteriensuspensionen zeigten am nächsten Tag das gewünschte Koloniewachstum mit deutlich abgrenzbaren Einzelkolonien (Abbildung 2). Daraus lässt sich schließen, dass ein Wirkungsverlust des Ampicillins die Ursache des Problems darstellte. Dieser wurde vermutlich durch das mehrmalige Auftauen des zuvor verwendeten Aliquots verursacht. Es ist in Zukunft darauf zu achten, das Ampicillin nicht mehrmals aufzutauen oder nach wenigen Anwendungen die Reste zu verwerfen.



Agar mit mehrfach aufgetautem Ampicillin beimpft - Rasenwachstum

Agar mit einmalig aufgetautem Ampicillin beimpft - Einzelkolonien

Abbildung 2: Koloniewachstum von *E. coli* Bakterien auf beimpften LB-Agarplatten an Tag 3 der Standardkurven-etablierung

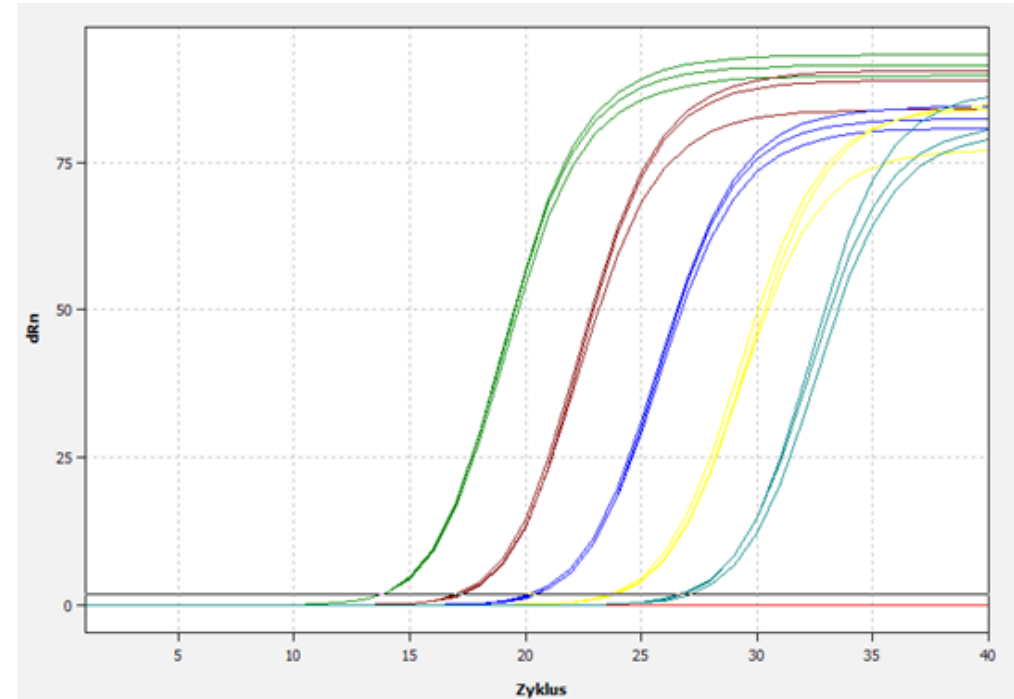


Abbildung 3: Standardkurve für MX-2

Ist die Vermehrung der Bakterien im LB-Medium erfolgreich, kann nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C eine deutliche Trübung der Suspension festgestellt werden. Hiervon werden jeweils 2 ml entnommen, woraus mittels eines DNA-Extraktionskits die Plasmide extrahiert werden. Daraufhin werden sie der Firma Eurofins (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) zur Sequenzierung übergeben. Wurde die Zielsequenz erfolgreich vermehrt und sequenziert, wird mit dem linearisierten und aufgereinigten Plasmid eine Verdünnungsreihe angelegt. Auf Basis dieser Verdünnungsreihen kann schließlich die Standardkurve ausgetestet werden. Beispielpf ist in Abbildung 3 eine Standardkurve für MX-2 dargestellt.

Ergebnisse und Ausblick

In diesem Projekt konnten letztlich insgesamt drei Standardkurven etabliert werden. Diese umfassen die IFN- τ vermittelten Gene PI3K, M-1 und MX-2. Im Anschluss konnte damit der Genexpressionsgehalt in jeweils n=312 Endometriumsproben von 26 beprobten Uteri absolut quantifiziert werden. Zusätzlich zu den in diesem VETResearch Projekt untersuchten Genen hat TÄ Simone Schabmeyer die cDNA der Gene IFNAR1, IFNAR2, STAT1 und FABP3 mit Hilfe der jeweiligen Standardkurve absolut quantifiziert. Alle Ergebnisse werden derzeit für eine Publikation vorbereitet.

Für die Zukunft ergeben sich durch die in diesem Projekt etablierten Standardkurven viele Möglichkeiten, neue Daten bezüglich der IFN- τ Signalkaskade zu erheben. So ist es von großem Interesse, in welchem Maße die Expression der jeweiligen Gene mit Fruchtbarkeitsproblemen korreliert. Ein ähnlicher Versuch wurde bereits von Angela Pitz im Rahmen eines früheren VETResearch Projektes durchgeführt. Dabei wurden Proben von an subklinischer Endometritis erkrankten Rindern mit Proben gesunder Rinder auf deren absoluten Gehalt an Typ-I-Interferon Rezeptor-Untereinheiten (IFNAR1/2) untersucht. Ein nächster Schritt könnte es sein, diese Proben auf die Expression von PI3K, MX-1 und MX-2 zu untersuchen.

Darüber hinaus gibt es noch einige Gene der IFN- τ Kaskade, welche bereits in der Literatur beschrieben werden, für die allerdings noch keine Standardkurve etabliert werden konnte. Ein Beispiel dafür wäre das klassische ISG „ISG-15“. Die Etablierung einer geeigneten Standardkurve für dieses Gen stellt einen möglichen nächsten Schritt dar. Dabei könnte die in diesem Projekt optimierte Methode hilfreich sein.

Persönliche Erfahrung

Das Tiermedizinstudium ist ein sehr breit gefächelter Studiengang. Von Tierschutz über Lebensmittelhygiene bis hin zur Chirurgie bekommt man viele Einblicke in die verschiedensten Tätigkeitsbereiche. Dennoch ist es meiner Erfahrung nach so, dass die wissenschaftliche Arbeit im Labor häufig nur theoretisch oder im Rahmen von Wahlpflichtfächern vermittelt wird. Deshalb kommen viele Studierende erst bei ihrer Dissertation aktiv damit in Berührung. Aus diesem Grund war es für mich eine großartige Chance, durch dieses Programm erste Laborluft schnuppern zu dürfen. Das Besondere an VETResearch liegt darin, dass man selbstständig und doch nicht völlig auf sich allein gestellt an einer wissenschaftlichen Fragestellung arbeiten darf. Man muss bereit sein, sich mit labortechnischen Methoden und manchmal auch mit daraus resultierenden Problemen auseinanderzusetzen. Man erlebt erste Erfolge im Labor und lernt gleichzeitig, zielorientiert und logisch auf Rückschläge zu reagieren.

Ich bin sehr dankbar, dass ich an diesem Programm teilnehmen durfte. Dadurch habe ich gelernt, die Laborarbeit aus einem ganz neuen Blickwinkel zu betrachten. Zusätzlich konnte ich mir ein erstes Bild davon machen, was es wirklich heißt, wissenschaftlich zu arbeiten und vielleicht sogar zu promovieren. An dieser Stelle möchte ich nochmal Herrn Dr. Frank Weber und Frau Dr. Marie Meyerholz für diese einmalige Gelegenheit und die großartige Betreuung danken. Außerdem gilt mein Dank ganz besonders VMTA Sandra Kirsch, TÄ Simone Schabmeyer und TÄ Elena Gerdes, die mich während dieses Projekts stets an die Hand genommen haben und ohne die dieses VETResearch nicht hätte stattfinden können. Ich durfte in meiner Zeit an der Klinik für Wiederkäuer ein nettes, sehr motiviertes Team kennenlernen, das mich großartig aufgenommen und mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Evaluierung von Messungen im Röntgenbild zur Auswahl der korrekten Sägeblattgröße bei der präoperativen Planung der TPLO

Hannah Schwaiger

Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik

Betreuer/in: Dr. Julius Klever, Dr. Martin Zöllner, Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Einleitung

Der Riss des kranialen Kreuzbandes gehört zu den häufigsten Lahmheitsursachen beim Hund. Das Lig. cruciatum craniale wirkt einer Verschiebung der Tibia zum Femur nach kranial entgegen. Bei einem Kreuzbandriss kommt es zu Gelenkinstabilität und sekundärer Arthrosebildung. Mittel der Wahl zur chirurgischen Behandlung dieser Ruptur ist die sogenannte Tibial Plateau Leveling Osteotomy (TPLO). Diese OP-Methode wurde erstmalig 1993 von Slocum beschrieben und hat sich zur weitverbreitetsten Therapiemethode entwickelt.¹ Bei der OP wird die Biomechanik des Kniegelenks verändert, indem die Kraft, die auf das vordere Kreuzband wirkt, so weit reduziert wird, dass kein Bandersatz nötig ist. Zuerst wird eine halbkreisförmige Osteotomie durchgeführt, wofür verschiedene Sägeblätter zur Auswahl stehen. Ist die Tibia durchtrennt, wird durch Rotation des Tibiaplateaus der sogenannte Tibiaplateauwinkel reduziert, der nach der Operation circa 5 ° betragen sollte. Um mögliche Komplikationen zu vermeiden, ist eine präzise Planung der Operation wichtig, um beispielsweise das Risiko einer Fraktur der Tuberositas tibiae zu senken.² Die präoperative Planung wird an einer mediolateralen Röntgenaufnahme der Tibia durchgeführt, bei der Knie- und Tarsalgelenk im 90 ° Winkel stehen. Anhand dieser Röntgenaufnahme wird nun der Tibiaplateauwinkel ausgemessen.

Das Sägeblatt sollte anhand folgender Kriterien ausgewählt werden:

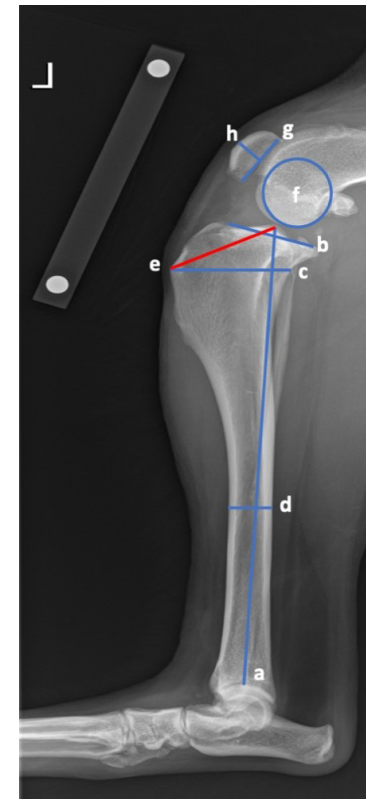
- Die gesamte Gelenkfläche (Tibiaplateau) wird ausgesägt.
- Um Frakturen der Tub. tibiae zu vermeiden, sollte der verbliebene Anteil mindestens 10 mm breit sein.³
- Das Zentrum der Osteotomie sollte dem Rotationszentrum des Gelenks entsprechen.⁴
- Die Osteotomie sollte so platziert sein, dass kein „Impingement“ der Tuberositas tibiae entsteht.
- Die Osteotomie sollte so groß gewählt sein, dass das ausgesägte Knochenstück genug Platz für eine stabilisierende TPLO-Platte bietet.

Die Auswahl der Sägeblattgröße erfolgt mit Hilfe von Schablonen auf dem präoperativen Röntgenbild unter Berücksichtigung der Anatomie und Größe der Tibia. Dieses Vorgehen ähnelt meist dem „Trial and Error“ Prinzip. Werden die Kriterien nicht erfüllt, verwendet man eine andere Sägeblattgröße.

In der Literatur finden sich keine weiteren Empfehlungen bzw. Hinweise oder Messungen zur Auswahl des am besten geeigneten Sägeblattes. Das Ziel dieser Studie ist es, Richtlinien für die Auswahl der korrekten Sägeblattgröße festzulegen und somit die präoperative Planung zu erleichtern.

Material und Methoden

Für diese retrospektive Studie wurde die Datenbank der chirurgischen Kleintierklinik der LMU München nach Hunden durchsucht, bei denen im Zeitraum von 2013 bis 2018 eine TPLO durchgeführt wurde. Bei allen ausgewählten Patienten lag eine prä- und postoperative medio-laterale Röntgenaufnahme vor, bei der Knie- und Tarsalgelenk im 90 ° Winkel ausgerichtet sind. Außerdem musste die verwendete Sägeblattgröße im jeweiligen OP-Bericht angegeben sein. Als Einschlusskriterium wurde definiert, dass die oben genannten Kriterien zur Auswahl der Sägeblattgröße erfüllt sein mussten. Dies war bei allen Tieren der Fall. Es waren Rasse, Geschlecht, Gewicht und Alter der Tiere, an welchem Knie die OP durchgeführt wurde sowie die verwendete Sägeblattgröße dokumentiert.



Wie in Abbildung 1 zu sehen, wurden mithilfe eines DICOM-Viewers an den Röntgenaufnahmen der Tibia folgende Messungen vorgenommen: Durchmesser der Tibia auf Höhe der Tuberositas tibiae sowie auf Höhe der Diaphyse, Länge des Tibiaplateaus, Länge und Höhe der Patella, Länge der Tibia und Durchmesser des medialen Femurcondylus. Die Messungen mussten an der vorliegenden mediolateralen Aufnahme der Tibia messbar sein und wurden so gewählt, dass sie möglichst reproduzierbar sind. Zusätzlich wurde sowohl der prä- und postoperative Tibiaplateauwinkel als auch die Distanz zwischen der Tuberositas tibiae und der Osteotomie ausgemessen und die Werte aufgezeichnet.

Abbildung 1: Durchgeführte Messungen
a = Länge der Tibia von der Eminentia intercondylaris zum proximalsten Punkt der Cochlea tibiae;
b = Länge des Tibiaplateaus;
c = Durchmesser der Tibia auf Höhe der Tuberositas tibiae;
d = Durchmesser der Tibia auf Höhe der Diaphyse;
e = Länge der Strecke zwischen Tuberositas tibiae und Eminentia intercondylaris;
f = Durchmesser des medialen Femurcondylus;
g = Länge der Patella;
h = Höhe der Patella

Die in der OP verwendete Sägeblattgröße wurde als Referenz verwendet, um die oben beschriebenen Messungen zu evaluieren. Die gesammelten Daten und Messungen wurden in einer Excel-Tabelle erfasst. Daraufhin folgten die statistischen Analysen und Auswertungen, welche mit SPSS 26 durchgeführt wurden. Zur Beschreibung der Patientenpopulation wurde eine deskriptive Statistik verwendet. Um Abhängigkeiten zwischen den Messwerten und der Sägeblattgröße darzustellen, wurde eine Multivariate Varianzanalyse (MANOVA) und Pearson's Korrelationskoeffizient verwendet. Zur graphischen Darstellung der Daten wurden Box-Plots angefertigt und für die vielversprechendste Messung Receiver Operating Characteristic (ROC) Kurven erstellt. Zuletzt wurden mithilfe des Youden-Index anhand der ROC Kurven die besten Grenzwerte ermittelt.

Ergebnisse

Insgesamt wurden in dieser Studie 187 Hunde verschiedener Rassen betrachtet. Den größten Anteil bildeten dabei Mischlinge, gefolgt von Labrador Retrievern. Das Alter der Hunde zum Zeitpunkt der Operation variierte zwischen 10 Monaten und 14 Jahren, der Mittelwert lag bei 5 Jahren und 11 Monaten. Die Operationen wurden von verschiedenen Chirurgen durchgeführt, die alle über mehr als 5 Jahre Berufserfahrung in der Kleintierchirurgie verfügen. Das Gewicht der untersuchten Patienten betrug zwischen 3,6 kg und 90 kg, hier lag der Mittelwert bei 31,5 kg.

Bei der Analyse von Varianz und Korrelation zeigte die Messung der Länge der Strecke zwischen Tuberositas tibiae und Eminentia intercondylaris bei beiden Methoden den größten Zusammenhang mit der Sägeblattgröße (Tabelle 1).

Tabelle 1: Ergebnisse der Multivariaten Varianzanalyse (MANOVA) und des Pearson Korrelationskoeffizienten

	MANOVA		Korrelationskoeffizient	
	Partielles Eta-Quadrat	Signifikanz	Korrelation nach Pearson	Signifikanz
Länge der Tibia	0.783	0.000	0.882	0.000
Länge des Tibiaplateaus	0.671	0.000	0.802	0.000
Durchmesser der Tibia (auf Höhe der Tuberositas Tibiae)	0.789	0.000	0.855	0.000
Durchmesser der Tibia (auf Höhe der Diaphyse)	0.815	0.000	0.880	0.000
Länge der Strecke zwischen Tuberositas tibiae und Eminentia intercondylaris	0.835	0.000	0.907	0.000
Durchmesser des Femurkondylus	0.763	0.000	0.857	0.000
Länge der Patella	0.801	0.000	0.872	0.000
Höhe der Patella	0.807	0.000	0.854	0.000
Gewicht	0.806	0.000	0.862	0.000

Um den Zusammenhang zwischen der Messung der Länge der Strecke zwischen Tuberositas tibiae und Eminentia intercondylaris und der Sägeblattgröße genauer zu analysieren, wurden in der ROC-Kurvenanalyse mithilfe des Youden-Index die Grenzwerte zwischen den Sägeblattgrößen ermittelt. Die Sensitivität und Spezifität der ermittelten Grenzwerte ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2: Grenzwerte der Längenmessung zur Unterscheidung der Sägeblattgröße

	Länge der Strecke zwischen Tuberositas tibiae und Eminentia intercondylaris	Sensitivität	Spezifität
Grenzwert zwischen Sägeblatt 12 mm und 15 mm	24,5 mm	0,8	0,947
Grenzwert zwischen Sägeblatt 15 mm und 18 mm	26,5 mm	0,833	0,778
Grenzwert zwischen Sägeblatt 18 mm und 21 mm	31,5 mm	0,645	1
Grenzwert zwischen Sägeblatt 21 mm und 24 mm	34,5 mm	0,787	0,758
Grenzwert zwischen Sägeblatt 24 mm und 27 mm	40,5 mm	0,682	0,902
Grenzwert zwischen Sägeblatt 27 mm und 30 mm	45 mm	0,875	0,792

Zur besseren Verständlichkeit sind die Ergebnisse aus Tabelle 2 noch einmal umgestellt in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3: Empfehlungen zur Orientierung bei der Auswahl der Sägeblattgröße bei der OP-Planung

Länge der Strecke zwischen Tuberositas tibiae und Eminentia intercondylaris	Empfohlene Sägeblattgröße
< 24,5 mm	12 mm
24,5 mm - 26,5 mm	15 mm
26,5 mm - 31,5 mm	18 mm
31,5 mm - 34,5 mm	21 mm
34,5 mm - 40,5 mm	24 mm
40,5 mm - 45 mm	27 mm

Diskussion

Bei den Patienten dieser retrospektiven Studie wurden die Sägeblattgrößen 21 mm (n=62), 24 mm (n=61) und 27 mm (n=22) am häufigsten verwendet. Dies ist damit zu erklären, dass häufig mittelgroße bis große Hunde aufgrund eines Kreuzbandrisses vorgestellt werden.

Eine Limitierung dieser Studie stellt jedoch die relativ geringe Anzahl an Patienten, bei denen die Osteotomie mit einem 12 mm (n=19), 15 mm (n=9), 18 mm (n=6) oder 30 mm (n=8) großen Sägeblatt durchgeführt wurde, dar. Um genauere Grenzwerte zu ermitteln, wäre es sinnvoll, eine Studie mit höherer Stichprobengröße durchzuführen.

Obwohl die Röntgenaufnahmen mit großer Sorgfalt angefertigt werden, können durch Rotation oder Verkipfung die Messungen beeinflusst werden. Dies ist jedoch bei allen Messungen in Röntgenaufnahmen zu beachten.

Um eine Verfälschung der Ergebnisse auf ein Minimum zu reduzieren, wurden nur Patienten miteinbezogen, bei denen kein Hinweis auf eine falsch gewählte Sägeblattgröße vorlag. Trotzdem basieren die Ergebnisse auf den Sägeblattgrößen, die der jeweilige Chirurg bei der Operation gewählt hat. Dies kann möglicherweise dazu führen, dass die Ergebnisse der Studie von den persönlichen Präferenzen der Operateure beeinflusst wurden. In einer Folge-studie könnten die Ergebnisse verifiziert werden, indem prospektiv bei der OP-Planung die Sägeblattgröße anhand der Messung der Strecke zwischen der Tuberositas tibiae und der Eminentia intercondylaris erfolgt und dann ermittelt wird, ob alle Kriterien für die Auswahl des richtigen Sägeblatts erfüllt werden können.

Ziel dieser Studie war es, die Auswahl der richtigen Sägeblattgröße bei der OP-Planung zu erleichtern. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass sich die Länge der Strecke zwischen der Tuberositas tibiae und der Eminentia intercondylaris (in Abbildung 1 rot eingezeichnet) als Orientierungspunkt zur Auswahl der richtigen Sägeblattgröße eignet. Gemäß unserer Ergebnisse lassen sich die in Tabelle 3 gezeigten Empfehlungen ableiten.

Diskussion

1. Pfeil DJF, Kowaleski MP, Glassman M, Dejardin LM. Results of a survey of Veterinary Orthopedic Society members on the preferred method for treating cranial cruciate ligament rupture in dogs weighing more than 15 kilograms (33 pounds). *J Am Vet Med Assoc.* 2018 Sep 1;253(5):586-597. doi: 10.2460/javma.253.5.586. PMID: 30110219.
2. Collins JE, Degner DA, Hauptman JG, DeCamp CE. Benefits of pre- and intraoperative planning for tibial plateau leveling osteotomy. *Vet Surg.* 2014 Feb;43(2):142-9. doi: 10.1111/j.1532-950X.2013.12093.x. Epub 2013 Dec 23. PMID: 24491234.
3. Bergh MS, Rajala-Schultz P, Johnson KA. Risk factors for tibial tuberosity fracture after tibial plateau leveling osteotomy in dogs. *Vet Surg.* 2008 Jun;37(4):374-82. doi: 10.1111/j.1532-950X.2008.00391.x. PMID: 18564262.
4. Mossman H, von Pfeil DJ, Nicholson M, Phelps H, Morris E, Bradley R, Taylor J, Langenbach A. Accuracy of three pre- and intra-operative measurement techniques for osteotomy positioning in the tibial plateau levelling procedure. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2015;28(4):250-5. doi: 10.3415/VCOT-14-12-0188. PMID: 26167862.