

VETResearch 2018 Retreat

Grußwort

VETResearch wurde an der Tierärztlichen Fakultät der LMU München zur Nachwuchsförderung junger Wissenschaftler im Jahr 2012 ins Leben gerufen und fand im vergangenen Jahr zum siebten Mal statt. In der vorliegenden Broschüre finden sich die Ergebnisse von 20 studentischen Forschungsprojekten aus 10 verschiedenen Instituten der Tierärztlichen Fakultät, die auf dem Retreat am 30.11.2018 als Poster oder Vortrag vorgestellt wurden. Wir freuen uns darüber, dass wir mit unserem Beitrag an sechs Projekten Teil dieser Erfolgsgeschichte sein durften, auf die alle Verantwortlichen und Beteiligten stolz sein können und hoffen, dass VETResearch auch nach der bis 2020 geplanten Finanzierung von Seiten der LMU in der Zukunft fortgesetzt werden kann.

Für die betreuenden Mentoren stellen VETResearch-Projekte eine Herausforderung dar. Es müssen von den Studierenden teilweise komplexe Fragestellungen in einer begrenzten Zeit bearbeitet werden. Dies erfordert klar konzipierte Projekte und eine enge Betreuung. Wir als Betreuer konnten über die Jahre viel dazu lernen und sind dankbar für die guten Erfahrungen. Es hat uns zudem sehr gefreut, dieses Jahr eines unserer Projekte in einer internationalen, wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlichen zu können. VETResearch hat damit viel mehr Potenzial bewiesen, als wir initial erwartet hatten.

Für die Studierenden geht es bei VETResearch nicht nur um die wissenschaftliche Arbeit an sich. Einblick in die verschiedenen Institute, Kliniken und Fachdisziplinen, Entscheidungshilfe bei der Wahl einer Doktorarbeit, das Knüpfen von Kontakten oder eine Referenz im Lebenslauf für den Start in das Berufsleben sind nur einige der vielen interessanten Aspekte. Während des Projektzeitraums sind die Studierenden stets ein Teil des Teams der Radiologie geworden, teilweise sogar lange darüber hinaus. Trotz der vielen zusätzlichen Arbeit für alle Beteiligten hat jedes dieser Projekte viel Freude gemacht. Mit Kollegialität, Teamwork und Humor haben wir versucht, bei den Studierenden Interesse und Freude an wissenschaftlicher Arbeit zu wecken und zu fördern.

Wir möchten den Verantwortlichen von VETResearch für ihr Engagement danken, allen voran den Mitarbeitern des Studiendekanats, insbesondere Frau Dr. Hao Stoll und Frau Dr. Christina Beitz-Radzio, sowie allen Betreuern der Forschungsprojekte und nicht zuletzt den hoch motivierten Studierenden für ihren Enthusiasmus in der Durchführung der Projekte.

Julius Klever und Andreas Brühschwein

*Funktionsbereich Radiologie der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik,
Vorstand: Prof. Dr. A. Meyer-Lindenberg
Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München*



Projekte aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department

Entwicklung einer Multiplex Real-Time PCR mit Sonden zur Quantifizierung potentieller Verderbserreger von Fleisch **Divi-Sophie Sofiya Ba Trung** • Regulation von Opioidrezeptoren beim Hund nach intra- und postoperativer Analgesie **Katharina Frey** • Einfluss von Lebensmittelkomponenten auf die toxische Aktivität von *Bacillus cereus* **Monika Heidrich** • Charakterisierung der Eigenschaften von *Salmonella*-Stämmen aus pflanzlicher und tierischer Herkunft **Katharina Hunt** • Einfluss der probiotischen Bakterienstämme auf die Virulenz von *Cronobacter sakazakii* **Emma Charlotte Kaeder** • Screening von Nahrungsergänzungsmitteln auf toxische Pyrrolizidinalkaloide **Verena Kukula** • Untersuchung von molekularen Veränderungen der TLR4-Signalkaskade in Hunden mit Epilepsie **Maria Reiber, Katharina Maria Aulehner, Noëmi Ortmann** • Untersuchungen an den pathogenen Hefepilzen *M. pachydermatis* und *C. albicans* **Amelie Rinner** • Stuserhebung von *Trichinella* spp. in Straußenfleisch **Christopher Wöstmann**

Projekte aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin

Antimikrobielle Aktivität von CCL20 gegenüber bovinen Mastitis-Erregern **Veronika Erhard** • Wie wirken sich Alter und Kolostrum-/Nahrungsaufnahme auf den GCSF-Rezeptor bei Kälbern aus? **Isabel Jaspersen** • Evaluierung verschiedener Marker und Methoden zur Kalibrierung von Röntgenaufnahmen **Anastasia de Motte** • Nachweis und Charakterisierung von Circoviren bei Rabenkrähen **Pia Pickelmann** • Einfluss von subklinischer Endometritis auf die Expression der Typ-I Interferon Rezeptor Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 **Angela Pitz** • Aussagekraft verschiedener diagnostischer Methoden zur Progesteronbestimmung **Alena Katharina Rüscher**

Kombiprojekte

Etablierung einer Analysemethode zum Nachweis des Mykotoxins Swainsonin aus Futtermittelproben **Joana Merk** • Untersuchung der mikrobiellen Kontamination von Inhalationskammern für Katzen **Friederike Karoline Schröer** • Erstellung einer Anleitung zum korrekten Bruststich bei der Straußenschlachtung **Christina Schwenk**



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 2019

Entwicklung einer Multiplex Real-Time PCR mit Sonden zur Quantifizierung potentieller Verderbserreger von Fleisch

Divi-Sophie Sofiya Ba Trung
Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit
Betreuer: Dr. Samart Dorn-In, Eunike Bahlinger

Einleitung

Verdorbenes Fleisch ist nach VO (EG) Nr. 178/2002, Art. 14 Abs. 2b kein sicheres Lebensmittel. Diese Anforderung gilt ebenfalls für verdorbenes Fleisch, welches als Bestandteil in hitzebehandelten Fleischwaren eingesetzt wurde. Die kulturelle Anzucht von Bakterien ist die „Gold Standard“-Methode, um nachzuweisen, ob Lebensmittel von Verderbserregern kontaminiert sind und somit als nicht sicher eingestuft werden. Bei hitzebehandelten Fleischprodukten ist die kulturelle Methode kaum anwendbar, da die meisten vegetativen Keime durch Hitzeverfahren (z.B. bei der Herstellung von Brüh- und Kochwurst) bereits inaktiviert werden. Die DNA ist jedoch sehr hitzestabil, so dass die abgetöteten Verderbserreger in hitzebehandelten Lebensmittel mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen und quantifiziert werden können.

In diesem Projekt wurden anhand der Fachliteratur vier Gruppen von Verderbserregern für Fleisch aufgelistet: Lactobacillales, Pseudomonadales, Enterobacteriaceae und *Brochothrix thermosphacta*, als einziger Vertreter der Bacillales. Primerpaar und Sonden für die Real-Time PCR wurden zuvor für die vier oben genannten Keimgruppen und für allgemeine Bakterien-DNA entwickelt (Multiplex Real-Time PCR 1). Zudem wurden vier weitere Real-Time-PCR-Sonden entwickelt, mit denen innerhalb der Ordnung Lactobacillales (Milchsäurebakterien) die jeweiligen Gattungen *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* und *Streptococcus* unterschieden werden können (Multiplex Real-Time PCR 2). Alle Sonden wurden anhand der in der GenBank (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) verfügbaren 16S-rRNA-Gene der Bakterien entwickelt. Ziel des Projektes war es, die Spezifität und Sensitivität der neu entwickelten Real-Time-PCR-Sonden zu überprüfen und somit die beiden Multiplex Real-Time PCRs zu optimieren.

Material und Methoden

Abbildung 1 zeigt ein Fließschema zur Abfolge der Arbeit. Insgesamt 64 Mikroorganismen (Bakterien & Hefen, siehe Tabelle 1) und zwei Schweinefleischproben (aus der Tiefe des Fleischstücks) wurden für die Spezifität und Sensitivität der entwickelten Sonden getestet. Die Anzucht der Keime erfolgte anhand der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren (auf Grundlage von § 64 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit).

Tabelle 1: Mikroorganismen zur Validierung der Real-Time-PCR-Sonden

Ordnung	Gattung	Anzahl
Lactobacillales	<i>Carnobacterium</i> spp.	2
	<i>Leuconostoc</i> spp.	4
	<i>Enterococcus</i> spp.	4
	<i>Lactobacillus</i> spp.	5
	<i>Lactococcus</i> spp.	2
	<i>Streptococcus</i> spp.	5
Bacillales	<i>Bronchothrix</i>	3
Pseudomonadales	<i>Pseudomonas</i> spp.	5
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Yersinia</i> spp.	18
Weitere		
Andere Bakterien	<i>Clostridium</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp.	11
Hefen	<i>Candida</i> spp., <i>Kazachstania</i> spp., <i>Rhodotorula</i> spp.	5
Gesamt		64

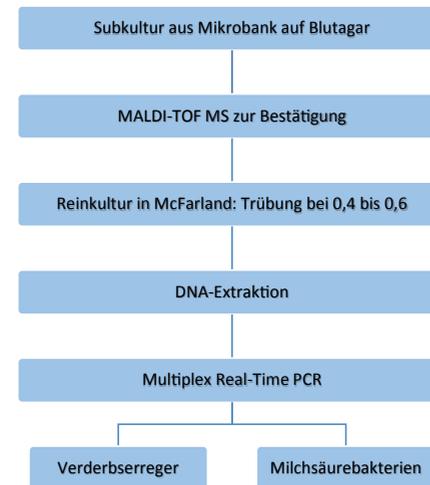


Abbildung 1: Fließschema zur Arbeitsabfolge

Ergebnisse

Insgesamt wurden neun Sonden getestet. Die Bewertung der Sonden erfolgte anhand zweier Werte, die von Lemmon und Gartner (2008) beschrieben wurden. Die Sensitivität beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass die jeweilige Sonde den gezielten Erreger bindet. Die Spezifität stellt die Wahrscheinlichkeit dar, mit der die jeweilige Sonde nicht falsch negativ andere Keime bindet.

Abbildung 2 und Abbildung 3 zeigen die Sensitivität und Spezifität aller neun getesteten Real-Time-PCR-Sonden. Die Sonde Lac864 für Milchsäurebakterien zeigt 71,1 % Sensitivität und 89,4 % Spezifität, während Sonde Etc226 für *Enterococcus* spp. 83,3 % Sensitivität und 100 % Spezifität darstellt. Alle anderen Sonden weisen sowohl für die Sensitivität als auch für die Spezifität 100 % auf.

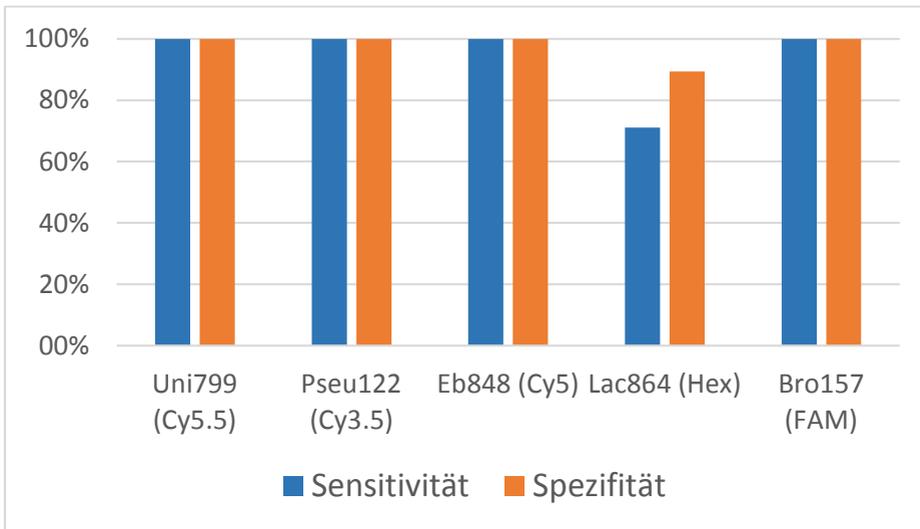


Abbildung 2: Ergebnisse der Multiplex Real-Time PCR 1 für Verderbserreger
Sonde: Uni799 (universelle Bakterien), Pseu122 (*Pseudomonas*), Eb848 (*Enterobacteriaceae*), Lac864 (Milchsäurebakterien), Bro157 (*Brochothrix thermosphacta*).

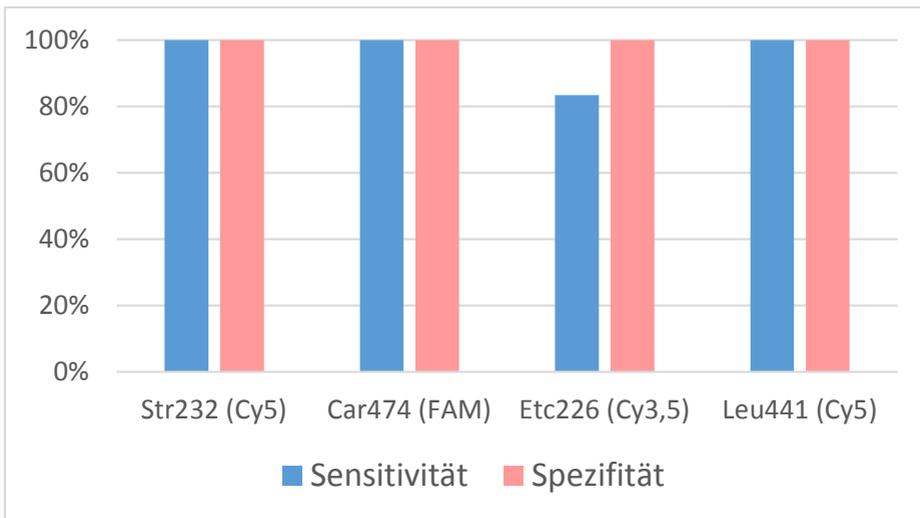


Abbildung 3: Ergebnisse der Multiplex Real-Time PCR 2 für Milchsäurebakterien
Sonde: Str232 (*Streptococcus* spp.), Car474 (*Carnobacterium* spp.), Etc226 (*Enterococcus* spp.), Leu441 (*Leuconostoc* spp.).

Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Projekt wurden insgesamt neun Sonden getestet. Sieben Sonden, jeweils für universelle Bakterien, Enterobacteriaceae, Pseudomonaden, *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium* spp., *Leuconostoc* spp. und *Streptococcus* spp. erzeugen 100 % Sensitivität und Spezifität zu den getesteten Keimen. Somit können sie weiter für die Multiplex Real-Time PCR 1 (für Verderbserreger) bzw. Multiplex Real-Time PCR 2 (für Milchsäurebakterien) verwendet werden. Zwei Sonden, jeweils für Milchsäurebakterien und für *Enterococcus* spp. wiesen geringere Sensitivität bzw. Spezifität auf. Die beiden Sonden werden weiter optimiert und ggf. neu entwickelt.

Im nächsten Schritt werden Einflussfaktoren, wie Mischmikrobiota und Matrix des verdorbenen Fleisches, auf die Effizienz der Sonden überprüft. Des Weiteren werden hitzebehandelte Fleischwaren aus Supermärkten mit den entwickelten Multiplex Real-Time PCRs untersucht. Nach erfolgreicher Entwicklung der PCR ist es beispielsweise für die Lebensmittelüberwachung möglich, in hitzebehandelten Fleischprodukten schnell und sensitiv Verderbserreger nachzuweisen und ggf. zu quantifizieren, um die Verwendung von verdorbenem Fleisch zu bestätigen oder auszuschließen.

Referenzen

Lemmon, G. H., Gardner, S. N. (2008) Predicting the sensitivity and specificity of published real-time PCR assays. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. doi:10.1186/1476-0711-7-18

Persönliche Erfahrung und Danksagung

Obwohl ich nur kurze Zeit im Labor gearbeitet habe, konnte ich wertvolle Erfahrung im Hinblick auf die Anforderungen einer Doktorarbeit sammeln. Durch dieses Projekt durfte ich neue Labormethoden entdecken und eine Arbeitsmethodik entwickeln. Meine Betreuer haben mich sehr schnell eigenständig arbeiten lassen, was mich zusätzlich motiviert hat. Ich durfte jederzeit nach Antworten oder Ratschlägen fragen. Der mikrobiologische Anteil (sowie die Anwendung der MALDI-TOF MS) war für mich neu. Die Methode zur Auswertung einer Real-Time PCR wurde mir beigebracht, das Verfahren für die Entwicklung neuer PCR-Sonden gezeigt und die Aussichten des Projektes erklärt. Ich würde jedem, der an Laborarbeit interessiert ist, wärmstens empfehlen, ein VETResearch Projekt zu absolvieren, um für sich persönlich entscheiden zu können, ob er sich den Anforderungen einer Doktorarbeit stellen möchte.

Schließlich bedanke ich mich ganz herzlich bei den Mitarbeitern vom Lehrstuhl, die alle sehr hilfsbereit waren. Ich möchte Herrn Professor Dr. Dr. habil Manfred Gareis meinen Dank aussprechen, ohne den das Projekt nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere gilt mein Dank Sebastian Schlef, für die Anwendung des MALDI-TOF MS Gerätes. Dr. Smart Dorn-In und seiner Doktorandin Eunike Bahlinger bin ich sehr dankbar für die ausgezeichnete Betreuung.

Regulation von Opioidrezeptoren beim Hund nach intra- und postoperativer Analgesie

Katharina Frey

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

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

Einleitung

“There has been considerable interest in pain management over recent years (...). There is still a tendency to base some aspects of pain management on poor quality evidence (...).”
(State of the art analgesia in dogs and cats: Bradbrook CA, Clark L., Vet J. 2018;238:76-82)

Die Schmerzerkennung und -therapie spielt in der Haustiermedizin eine immer größer werdende Rolle. Es fehlen allerdings grundlegende Untersuchungen zu speziesspezifischen Unterschieden in der Wirkung verschiedener Schmerzmittel. Eine essentielle Gruppe der Analgetika sind die Opiode, die ihre Wirkung über drei Typen von Opioidrezeptoren (δ = DOR, κ = KOR, μ = MOR) vermitteln. Die in der Tiermedizin eingesetzten Wirkstoffe unterscheiden sich dabei erheblich in ihrem pharmakologischen Profil. So stellen Levomethadon und Fentanyl volle, für den MOR selektive Agonisten dar, während Buprenorphin und Butorphanol an diesem Rezeptor als partielle Agonisten wirken.

Aus Studien zur Rezeptorregulation bei Mensch und Labornager ist bekannt, dass die spezifische Phosphorylierung verschiedener Aminosäurereste am C-Terminus des MOR zu dessen Internalisierung und anschließender Downregulation führt. Die internalisierten Rezeptoren stehen den Liganden dann nicht mehr als Zielstrukturen zur Verfügung und beeinträchtigen somit deren Funktion.

Bei der Klonierung und Sequenzierung des caninen MOR (cMOR1; wichtigste Isoform) konnten wir einige wesentliche Aminosäureabweichungen im Vergleich zu anderen Spezies feststellen, die z.B. eine deutlich höhere Affinität der Opioidanalgetika mit Morphinstruktur beim Hund bedingen. Darüber hinaus konnten wir eine für den Hund spezifische zusätzliche Phosphorylierungsstelle (S 398) identifizieren, deren Bedeutung für die Rezeptorregulation in diesem Projekt untersucht wurde. Unser Hauptfokus lag hierbei darauf, ob Fentanyl, das häufig intraoperativ gegeben wird, zur Internalisierung des Rezeptors führt und dadurch die postoperative Analgesie mit Buprenorphin beeinflusst. Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da die Wirkung des partiellen Agonisten Buprenorphin von der Rezeptordichte abhängt.

Aus diesem Grund haben wir die Oberflächenrezeptoren nach Behandlung mit den verschiedenen Liganden im Zell-ELISA gemessen. Anschließend haben wir die Phosphorylierung des cMOR1 an S 398 mit Hilfe eines speziell hierfür generierten phosphospezifischen Antikörpers immunzytochemisch untersucht. Die funktionellen Konsequenzen der Rezeptorregulation nach Vorbehandlung mit Fentanyl haben wir mittels der rezeptorvermittelten Phosphorylierung der MAPK im Westernblot gemessen.

Experimentelles Vorgehen und Ergebnisse

Um Informationen über die Rezeptorinternalisierung zu erhalten, haben wir die Oberflächenrezeptoren in Zell-ELISA bestimmt. Zunächst haben wir HEK293 Zellen, die den HA-getaggten cMOR1 exprimieren, in poly-L-Lysin beschichteten 12-Well Platten (2 x 10⁵ Zellen/Vertiefung) kultiviert. Die Rezeptoren wurden mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop für eine Stunde markiert und anschließend für jeweils 1 Stunde mit den Liganden (Fentanyl, Morphin, Butorphanol, Buprenorphin) behandelt. In diesem Schritt internalisieren die Rezeptoren mit den Antikörpern je nach Wirkeigenschaften. Die Zellen wurden nach 3 Waschschrritten (PBS) mit 4 % PFA Lösung fixiert und die an der Oberfläche verbliebenen antikörpermarkierten Rezeptoren nach weiteren 3 Waschschrritten mit einem zweiten, Peroxidase gekoppelten Antikörper in einer Farbreaktion sichtbar gemacht. Die Messung erfolgte im Photometer, die Auswertung mit Excel (Microsoft). Hierbei wurde die Kontrolle auf 100 % gesetzt und die Abnahme der Oberflächenrezeptoren nach Behandlung berechnet. Weiterführend haben wir die Zeitabhängigkeit der Internalisierung von Fentanyl (nach 15/30/60 Minuten) und die Recovery des Rezeptors in Anwesenheit von Buprenorphin (ebenfalls nach 15/30/60 Minuten) bestimmt.

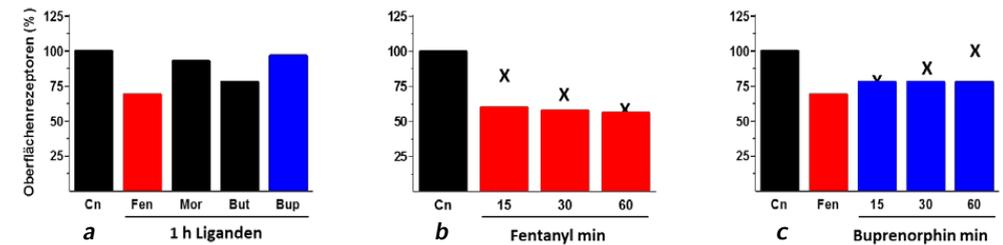


Abbildung 1: Darstellung a) der Rezeptorinternalisierung durch die verschiedenen Liganden. b) des Zeitverlaufs der Abnahme an Oberflächenrezeptoren nach Fentanylgabe. c) der Recovery des Rezeptors in Anwesenheit von Buprenorphin (Kreuze markieren Vergleichswerte des MOR1 der Ratte).

Fentanyl führte zu einer etwa 30-40 prozentigen Abnahme der Oberflächenrezeptoren, Morphin und Buprenorphin internalisierten den Rezeptor dagegen nicht. Nach Behandlung mit Butorphanol verringerten sich die Rezeptoren um 20 %. Im Zeitverlauf konnten wir bereits nach 15 Minuten eine maximale Abnahme der Oberflächenrezeptoren nach Fentanylgabe beim Hund beobachten. Für den MOR1 der Ratte ist in der Literatur eine maximale Internalisierung erst nach 30 - 60 Minuten beschrieben. Eine Recovery der Rezeptoren nach Fentanylgabe konnte in Anwesenheit von Buprenorphin im Gegensatz zur Literatur auch nach 60 Minuten nicht beobachtet werden (Abbildung 1).

Um den Einfluss der spezifischen Phosphorylierungsstelle S 398 näher zu untersuchen, wurden die Zellen mit in Kaninchen selbst hergestellten, spezifischen Antikörpern immunzytochemisch angefärbt. Hierbei wurden sie auf Deckgläschen ausplattiert und für 60 Minuten mit Fentanyl behandelt. Mit unbehandelten Kontrollzellen wurde analog verfahren. Nach 3 Waschschrritten (PBS) wurden die Zellen mit 4 % PFA Lösung fixiert, mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert und mit 0,1 % BSA geblockt. Anschließend wurden die Zellen für 1 Stunde entweder mit einem Antikörper gegen den cMOR1 oder Phosphoserin 398 inkubiert. Die spezifische Antikörperbindung wurde mit dem zweiten, FITC versehenen Antikörper markiert und im Keyence Mikroskop bei 80-facher Vergrößerung sichtbar gemacht (Abbildung 2).

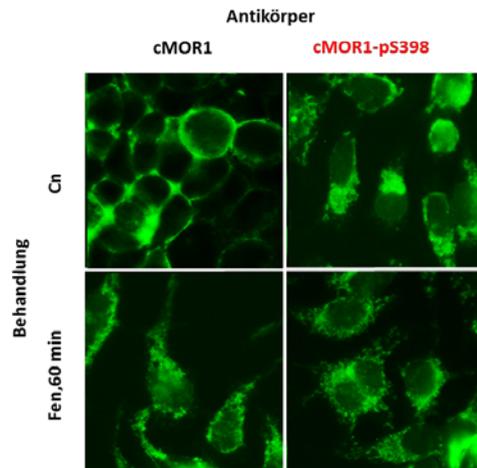


Abbildung 2: Rezeptoren in der Immunfluoreszenz. Die Rezeptoren wurden ohne und nach 60-minütiger Fentanylbehandlung (1 μ M; 1 h) mit einem gegen den cMOR oder das phosphorylierte S 398 des cMOR gerichteten Antikörpers in der Immunfluoreszenz sichtbar gemacht.

Mit dem gegen cMOR1 gerichteten Antikörper konnten wir die Rezeptoren in der Kontrolle an der Zelloberfläche nachweisen. Die Behandlung mit Fentanyl führte hierbei zu einer Umverteilung der Rezeptoren von der Zellmembran in intrazelluläre Vesikel (Internalisierung). Markiert man die Zellen mit dem pS398 spezifischen Antikörper, so sieht man auch in unbehandelten Kontrollen die Rezeptoren hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert. Nach 60 Minuten Fentanylbehandlung konnten die phosphorylierten Rezeptoren nur noch im Zellinneren nachgewiesen werden.

Um funktionelle Konsequenzen der Rezeptorinternalisierung zu bestimmen, haben wir die rezeptorvermittelte Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) untersucht. Hierzu wurden die Zellen auf poly-L-Lysin beschichteten 12-Well Platten (2 x 10⁵ Zellen/Vertiefung) verwendet und wie bei der Immunfluoreszenz behandelt. Nach der Vorbehandlung folgten 5 Waschschrte (PBS) und anschließend eine akute Aktivierung der MAPK durch Fentanyl, Morphin und Buprenorphin für 5 Minuten bei 37 °C. Dies geschah in Abwesenheit von FKS im Medium (DMEH). Die Zellen wurden in Probenpuffer solubilisiert und die Phosphorylierung der MAPK mit einem phosphospezifischen Antikörper im Westernblot bestimmt.

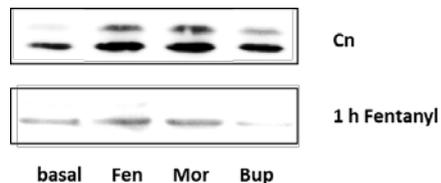


Abbildung 3: Rezeptorvermittelte Phosphorylierung der MAPK durch Fentanyl, Morphin und Buprenorphin ohne und mit Vorbehandlung mit Fentanyl (1 μ M; 1 h).

Aus Abbildung 3 ist ersichtlich, dass Fentanyl, Morphin und Buprenorphin in der Lage sind, die MAPK in Kontrollzellen zu aktivieren. Hierbei zeigt sich für Buprenorphin ein deutlich schwächerer Effekt im Vergleich zu den übrigen Liganden. Nach einer einstündigen Behandlung mit Fentanyl nimmt die basale MAPK Aktivität der Zellen ab. Darüber hinaus verlieren

Fentanyl und Morphin ihre Eigenschaft, die MAPK voll zu stimulieren. Für Buprenorphin ist nach Vorbehandlung der Zellen mit Fentanyl kein Effekt mehr messbar.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit Fentanyl die Wirksamkeit des partiellen Agonisten Buprenorphin durch Phosphorylierung an S 398 und Internalisierung des Rezeptors stark verringert. Die Abnahme der Oberflächenrezeptoren erfolgt beim cMOR1 im Vergleich zu publizierten Daten der Ratte deutlich schneller und ist bereits nach 15 Minuten maximal ausgeprägt. Die beim Hund einzigartige Phosphorylierungsstelle am C-Terminus (S 398) könnte möglicherweise die Rezeptorinternalisierung beschleunigen. Aufgrund der Phosphorylierung und Internalisierung des Rezeptors nach Fentanylbehandlung verliert Buprenorphin seine Fähigkeit, intrazelluläre Signalkaskaden zu aktivieren. Die vorgestellten *in-vitro*-Daten hinterfragen den Einsatz von Buprenorphin als postoperatives Analgetikum und bilden die Basis für eine kritische klinische Evaluierung gängiger Anästhesieschemata.

Persönliche Erfahrungen

Da ich letztes Jahr bereits am VETResearch-Projekt teilnehmen durfte, freute es mich sehr, dass ich dieses Jahr die Chance erhielt, dieses weiterzuführen.

Ich hatte so die Möglichkeit, einen intensiven Einblick in den Laboralltag zu erhalten, welcher den meisten Veterinärmedizinstudenten leider verwehrt bleibt. Es war mir möglich, meine vom Vorjahr erarbeiteten, wissenschaftlichen Grundkenntnisse und Fähigkeiten weiter zu vertiefen und zu verbessern.

Das VETResearch-Projekt stellt in meinen Augen eine großartige Chance für Nachwuchstierärzte dar, die gerne mal in das wissenschaftliche Arbeiten hineinschnuppern wollen oder sich eine Zukunft im Labor vorstellen können. Ich rate, das Projekt mit einem Praktikum in der Pharmakologie zu verbinden, um das Thema möglichst zu vertiefen.

Mein großer Dank geht an die AG Ammer. Besonders möchte ich hierbei Prof. Dr. Ammer, Herrn Dr. Muehlhaupt und Frau Koutnik für ihr herzliches und überaus freundliches Engagement, ihre Geduld und Hilfe danken. Das Projekt hat mir sehr viel Spaß und Freude bereitet.

Danksagung

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

Einfluss von Lebensmittelkomponenten auf die toxische Aktivität von *Bacillus cereus*

Monika Heidrich

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

In den letzten Jahren hat sich immer deutlicher gezeigt, dass *Bacillus cereus* einer der wichtigsten Erreger von lebensmittelassoziierten Erkrankungen ist. Der EFSA-Report von 2013 z.B. zeigt, dass die Anzahl der durch *B. cereus* verursachten Lebensmittelvergiftungen innerhalb der EU im Jahr 2011 im Vergleich zum Vorjahr um 122 % anstieg. Da *B. cereus* in Deutschland nicht zu den meldepflichtigen bakteriellen Erregern zählt, liegt die Dunkelziffer der Erkrankungen vermutlich sehr viel höher.

Das Risiko, das von Lebensmittelproben ausgeht, die mit *B. cereus* kontaminiert sind, ist sehr schwer einzuschätzen. Zum einen handelt es sich um einen ubiquitären Bodenkeim, der trotz bester Hygienestandards in vielen Lebensmitteln nicht vollständig vermieden werden kann. Außerdem unterscheidet sich das Toxizitätspotential verschiedener *B. cereus* Stämme stark. Dabei reicht das Spektrum von Stämmen, die als Futtermittel-„Probiotika“ eingesetzt werden, bis hin zu stark toxischen Stämmen, die bereits für Todesfälle verantwortlich waren. Bei enteropathogenen Stämmen, die hauptsächlich Diarrhö auslösen, liegt die zusätzliche Schwierigkeit darin, dass die Toxinbildung nicht im Lebensmittel, sondern erst im Darm erfolgt. Für eine zuverlässige Risikobewertung muss also der gesamte Prozess von der Aufnahme des Lebensmittels bis hin zur Toxinproduktion im Darm mit berücksichtigt werden.

Auch die mit aufgenommenen Lebensmittel können entscheidend zur Toxizität beitragen. Obwohl *B. cereus* häufig in Milch nachgewiesen wird, sind Milch-assoziierte *B. cereus* Lebensmittelvergiftungen kaum bekannt. Eigene Vorarbeiten zeigten, dass Milch und verschiedene Milchprodukte die zytotoxische Aktivität gegenüber Darmepithelzellen hemmen können. Die deutlichste Hemmung wurde hierbei von einem Bio Folgemilchpulver für Kleinkinder erzielt.

Ziel des vorliegenden Projekts war es, die hierfür verantwortlichen Einzelkomponenten des Milchpulvers zu identifizieren. Hierbei stellten sich vor allem die Vitamine C, B5 und A heraus.



LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Einfluss von Lebensmittelkomponenten auf die toxische Aktivität von *Bacillus cereus*



M. Heidrich, N. Jeßberger und E. Märktbauer
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schönleutnerstr. 8, 85764 Oberschleißheim. E-Mail: Milchhygiene@mh.vetmed.uni-muenchen.de

EINLEITUNG

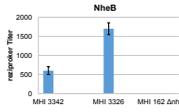
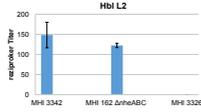
Bacillus cereus ist ein ubiquitäres, sporenbildendes, Gram-positives Bakterium, das in einer Vielzahl von Lebensmitteln nachgewiesen werden kann. Es gilt als Erreger zweier verschiedener Arten gastrointestinaler Erkrankungen, der emetischen und der Diarrhö-Form [1]. Letztere wird durch enteropathogene Stämme ausgelöst. Hierzu müssen zunächst Sporen mit kontaminierter Nahrung aufgenommen werden [2]. Diese überleben die Magenpassage, keimen im Darm aus und produzieren anschließend lokal hohe Mengen an Enterotoxinen, welche das Darmepithel angreifen, indem sie Poren bilden. Hauptverantwortlich sind zwei Enterotoxine, das Hämolyysin BL (Hbl) sowie das nicht-hämolytische Enterotoxin (Nhe). Hierbei ist das Nhe in fast allen, das Hbl hingegen nur in ca. 50% der Stämme enthalten. Vorversuche ergaben bereits, dass die toxische Aktivität von *B. cereus* durch Zugabe von verschiedenen Lebensmitteln verringert werden kann. Die deutlichsten Effekte zeigte hierbei Folgemilchpulver, welches aus einer Vielzahl an Komponenten wie Magermilchpulver, Süßmolkenpulver, Salzen und Vitaminen besteht. Welche dieser Komponenten für die Neutralisierung der Toxinwirkung verantwortlich ist, wurde in dieser Arbeit untersucht.

INGESETZTE LEBENSMITTELKOMponentEN

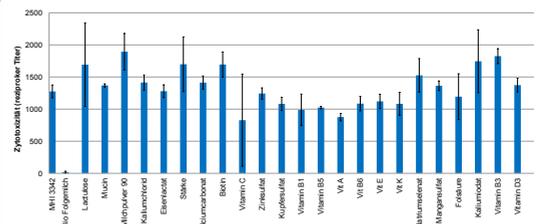
Substanz	End-Konz. im WST	Einfluss auf Toxizität
Folgemilchpulver	3,925 mg/ml	gehemmt
Stärke	9,06 µg/ml	erhöht
Calciumcarbonat	5 µg/ml	annähernd gleichbleibend
Vitamin C	364 µg/ml	stark erniedrigt
Kaliumchlorid	1,9 mg/ml	annähernd gleichbleibend
Eisenlactat	9,77 µg/ml	gleichbleibend
Vitamin E	1,19 mg/ml	leicht erniedrigt
Zinksulfat	50,88 µg/ml	gleichbleibend
Vitamin B5	1,24 mg/ml	erniedrigt
Kupfersulfat	2 µg/ml	annähernd gleichbleibend
Vitamin A	3,91 µg/ml	erniedrigt
Vitamin B1	316 µg/ml	leicht erniedrigt
Vitamin B6	1,319 mg/ml	leicht erniedrigt
Mangansulfat	0,625 µg/ml	annähernd gleichbleibend
Kaliumiodat	788 µg/ml	erhöht
Folsäure (Vit. B9, B11)	125 µg/ml	annähernd gleichbleibend
Vitamin K	615 µg/ml	leicht erniedrigt
Natriumselenat	4,14 µg/ml	erhöht
Biotin	5 µg/ml	erhöht
Vitamin D3	3,91 µg/ml	annähernd gleichbleibend
Milchpulver 90	5 mg/ml	erhöht
Lactulose	2,5 mg/ml	erhöht
Vitamin B3	313 µg/ml	erhöht
(Mucin)	12,5 µg/ml	gleichbleibend

HERSTELLUNG VON TOXINHALTIGEN *B. CEREUS* ÜBERSTÄNDEN

CGY-Medium wurden mit je einer Kolonie der Stämme MHI 3342 (Nhe+Hbl), MHI 3326 (Nhe) und MHI 162 Δ nheABC beimpft und über Nacht bei 32°C im Wasserbad inkubiert. Frische CGY-Medien wurden mit den Übernachtkulturen auf OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft, nach weiteren 6 Stunden abzentrifugiert und nach Zugabe von EDTA sterilfiltriert. Mittels Sandwich-ELISA wurde nachgewiesen, dass die Stämme ausreichend Toxin produzieren.

ZYTOTOXIZITÄT GEGENÜBER CACO-2 ZELLEN



SCHLUSSFOLGERUNG

- Vitamin C verringert die Toxizität, ist also somit in Teilen mitverantwortlich für die starke Toxinhemmung in der Folgemilch
- Vitamin A verringert ebenfalls die Toxizität
- Stärke, Lactulose, Biotin, Natriumselenat, Kaliumiodat, Vitamin B3 sowie das ebenfalls getestete Milchpulver 90 erhöhen die Toxizität

ZUR ERMITTLUNG DER ZYTOTOXIZITÄT WURDEN KOLONKARZINOMZELLEN VERWENDET. HIERZU WURDE ZUNÄCHST IN EINE 96 WEILL PLATTE MEDIUM VORGELEGT UND EINE SERIELLE VERDÜNNUNGSREIHE DES ÜBERSTANDES VON MHI 3342 ANGELEGT. IN JEDES WEILL WURDEN 20.000 CaCo-2-ZELLEN ZUGEGEBEN UND FÜR CA. 22 STUNDEN INKUBIERT. NACH ZUGABE VON WST-1 FOLGTE EINE WEITERE STUNDE INKUBATION. VIABLE ZELLEN MIT INTAKTER ATMUNGSKETTE KÖNNEN DURCH DIE UMSETZUNG DES SCHWACH ROT GEFÄRBTEN TETRAZOLIUMSALZES WST-1 IN DAS DUNKELROTE FORMAZAN IM SPEKTRALPHOTOMETER NACHGEWIESEN WERDEN. DER REZIPROKE TITER ENTSPRICHT DER TOXINVERDÜNNUNG, BEI DER NACH 24 STUNDEN 50 % DER ZIELZELLEN ABGETÖTET WURDEN.

REFERENZEN

[1] Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A. and Granum, P.E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 579-606.
[2] Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C., and Schmitt, P. (2004). Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J. Appl. Microbiol.* 37: 214-219

Das IGF-Vorhaben 18677 N der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn wird über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Charakterisierung der Eigenschaften von *Salmonella*-Stämmen aus pflanzlicher und tierischer Herkunft

Katharina Hunt

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit
Betreuerin: Dr. Irene Esteban Cuesta

Einleitung

In einer vorhergehenden Studie bezüglich der endogenen, mikrobiellen Kontamination von Melonen mit unverletzter Schale konnten zwei *Salmonella*-Stämme aus Galia Melonen isoliert werden. Diese wurden als *Salmonella* Infantis und *Salmonella* Cholerasuis var. Kunzendorf identifiziert.

Von Interesse war nun die mögliche Adaption pflanzlicher Stämme an pflanzliche Lebensmittel, um sich in diesen zu internalisieren.

Nach den Angaben des Bundesinstituts für Risikobewertung zählen Salmonellen zu den häufigsten Infektionserregern bei Lebensmitteln. In den letzten Jahren konnten 90 % der lebensmittelbedingten Infektionen auf Salmonellen zurückgeführt werden.

Material und Methoden (stark vereinfacht)

Mittels quantitativer Methode wurde das Wachstum von zwei *Salmonella*-Stämmen aus pflanzlicher Herkunft (Galia Melonen) und den gleichen Serovaren aus tierischer Herkunft (Wildschwein und Huhn) bei unterschiedlichen Zuckerkonzentrationen, pH-Werten und Säuren sowie in verschiedenen Bouillons verglichen.

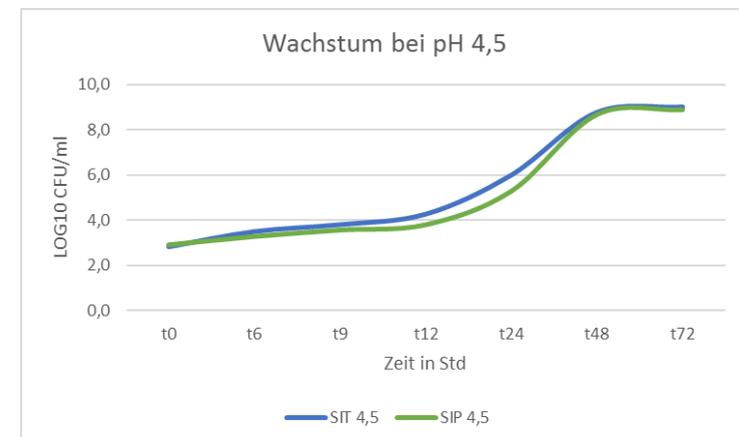
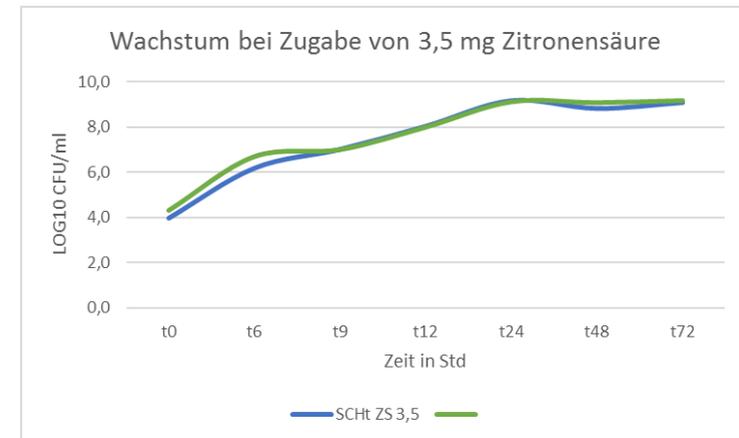
Ausgehend von einer *Salmonella*-Anreicherung in Peptonwasser mit bekannter Salmonellen-Anzahl, wurden weitere Verdünnungsstufen hergestellt und auf Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose (BPLS) Agar gespaltet und anschließend bebrütet.

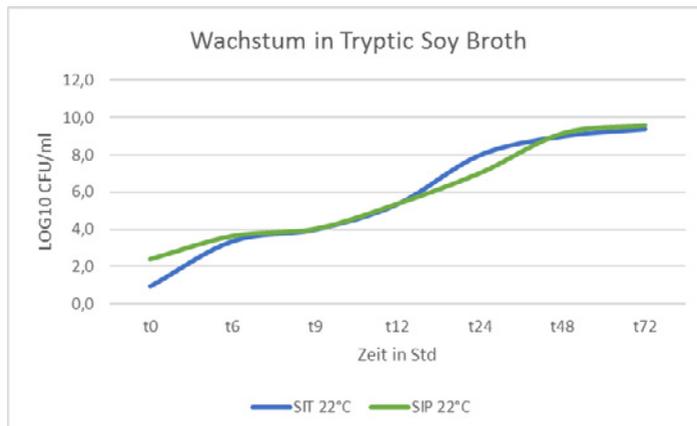
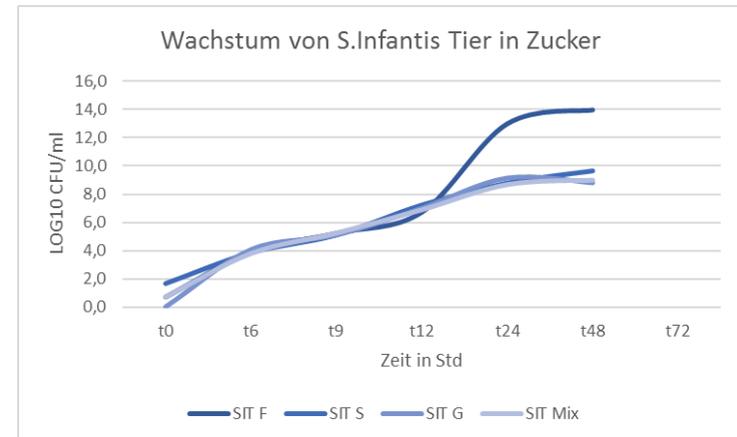
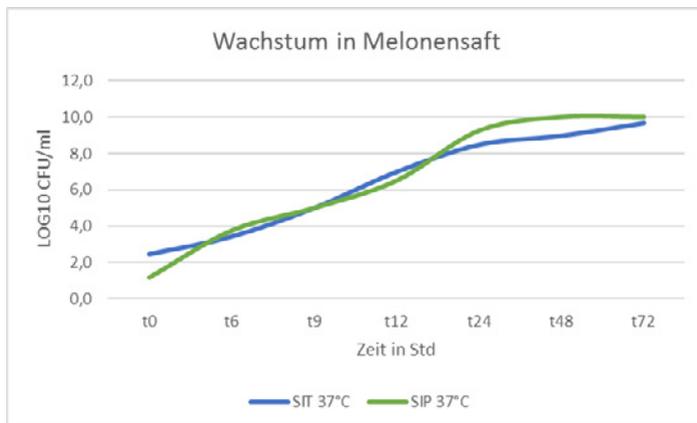
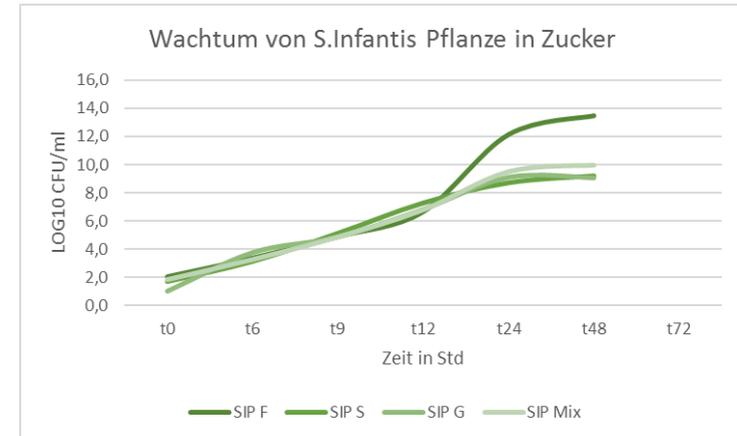
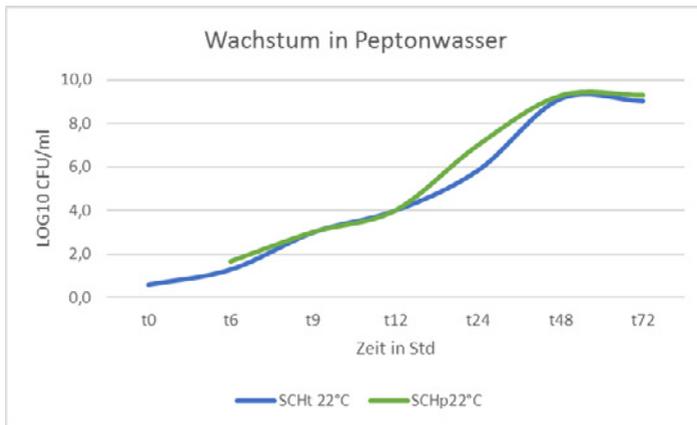
Die pH-Werte wurden mittels pH-Meter eingestellt und die unterschiedlichen Säuren- und Zuckermengen in die Bouillons eingewogen. Bei den Bouillons handelte es sich um Tryptic Soy Broth (TSB), gepuffertes Peptonwasser (BPW) und steril entnommenen Melonensaft aus Galia Melonen.

Ergebnisse und Ausblick

Zwischen den *Salmonella*-Stämmen tierischer und pflanzlicher Herkunft konnte kein bedeutsamer Unterschied der Wachstumskurven festgestellt werden. Als Beispiel sind mehrere der Wachstumskurven dargestellt. Anhand des Wachstumsvermögens kann daher keine bedeutende Adaptation zu der pflanzlichen Umgebung abgeleitet werden. Weitere Differenzierungen der vier *Salmonella*-Stämme mittels MALDI-TOF, PFGE und FT-IR werden noch durchgeführt.

Sollten sich keine grundlegenden Unterschiede ergeben, könnte dies zu dem Schluss führen, dass eine direkte Kontamination von Pflanzen und pflanzlichen Lebensmitteln ohne weitere Adaptionsschritte stattfinden kann.





Persönliche Erfahrung

Während des Studiums wurde mir klar, dass meine Interessen in der Infektionsmedizin, sowie auch in der Lebensmittelsicherheit liegen. Dank dem VETResearch Projekt hatte ich die Möglichkeit, das wissenschaftliche Arbeiten in beiden Bereichen kennenzulernen. Obwohl ich zuvor keine Kenntnisse in der Mikrobiologie hatte, wurde mir am Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit die Möglichkeit gegeben, diese zu erlernen. Das Arbeiten im Labor hat mir sehr viel Spaß gemacht, auch wenn manche Tage sehr lang und arbeitsintensiv waren. Erfolge, aber auch die Komplikationen gehören zum wissenschaftlichen Arbeiten, welche sehr aufschluss- und lehrreich waren. Ich bin dankbar für die Fähigkeiten, die ich mir aneignen konnte und kann ein VETResearch Projekt jedem empfehlen, der an der Forschung interessiert ist.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Dr. Irene Esteban Cuesta, die mich während des Projektes betreut und unterstützt hat sowie bei Herrn Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis, der das Projekt am Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit erst möglich gemacht hat. Vor allem möchte ich mich nochmal bei Verena Hohenester und Hanna Dietz bedanken, die mir jederzeit bei Fragen bezüglich der Handhabung im Labor behilflich waren. Außerdem noch einen Dank an die Mitarbeiter vom Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit, die mich sehr herzlich empfangen haben.

Referenzen

Esteban Cuesta, I., et al. (2018) Endogenous microbial contamination of melons (*Cucumis melo*) from international trade: an underestimated risk for the consumer? *J Sci. Food Agric.* 2018 Oct;98(13):5074-5081. doi: 10.1002/jsfa.9045

BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung. A-Z Index: Bedeutung der Salmonellen als Krankheitserreger, (Stand 05.02.2019) https://www.bfr.bund.de/de/bedeutung_der_salmonellen_als_krankheitserreger-537.html

Einfluss der probiotischen Bakterienstämme auf die Virulenz von *Cronobacter sakazakii*

Emma Charlotte Kaeder

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

Cronobacter sakazakii ist ein gram-negatives, stäbchenförmiges, fakultativ anaerobes Bakterium aus der Familie der *Enterobacteriaceae*, welches ubiquitär ist und bereits aus verschiedenen Quellen isoliert werden konnte. Durch sein Vorkommen in Trockenmilchprodukten stellt *C. sakazakii* eine lebensbedrohliche Gefahr vor allem für Neugeborene und Säuglinge dar, da eine Infektion zu seltenen, aber schwer verlaufenden Meningitiden, Bakteriämien und nekrotisierende Enterocolitiden führt. Zahlreiche Nachweismethoden mit unterschiedlich hoher Sensitivität ermöglichen jedoch heutzutage einen schnellen Nachweis von *Cronobacter* spp. in Lebensmittel- und Umweltproben.

Um das Risiko einer Infektion zu verringern, werden auch Produkte mit einem Zusatz von probiotischen Mikroorganismen angeboten, welche bei Zufuhr in angemessener Menge die Gesundheit fördern sollen. Bisher gibt es jedoch keine klinischen Studien, die die prophylaktische Wirksamkeit bzw. die Wirkungsmechanismen von Probiotika gegenüber einer *C. sakazakii*-Infektion belegen und charakterisieren. Vorversuche ergaben, dass das *in vitro* Wachstum von *C. sakazakii* in Co-Kultivierung mit verschiedenen probiotischen Stämmen vermindert werden kann. Der inhibitorische Effekt konnte, im Hinblick auf die prophylaktische Wirksamkeit von Probiotika, auch mit sterilen Überständen von Probiotika nachgewiesen werden.



Abbildung 1: Co-Infektion von Darmepithelzellen (Caco-2) mit *C. sakazakii* ES5 und verschiedenen *Lactobacillus*-Stämmen.

Das Ziel der Arbeiten war es daher, herauszufinden, ob Probiotika die Adhäsion und / oder die Invasivität von *C. sakazakii* vermindern und auf welche Weise die Wirtszelle vor dem Eindringen des Pathogens geschützt wird. Dazu wurde *C. sakazakii* ES5-Stamm mittels Co-Infektion (*gentamicin protection assay*) mit ausgewählten probiotischen Stämmen auf seine Kolonisationsfähigkeit in die humanen Darmepithelzellen Caco-2 untersucht (Abbildung1).

Die Untersuchung der Invasivität von *C. sakazakii* ES5 in Co-Infektion mit verschiedenen probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen ergab, dass unabhängig vom probiotischen Stamm die Invasion von *C. sakazakii* ES5 in Darmepithelzellen (Caco-2) inhibiert wird. Die Adhäsion von *Cronobacter*-Zellen wurde dagegen nicht beeinflusst. Aus den vorliegenden Daten lässt sich somit eindeutig schließen, dass Probiotika ein vielversprechendes Mittel gegenüber einer *C. sakazakii*-Infektion darstellen könnten. Dafür sollen weiter mittels Immunfluoreszenz die Wirkungsmechanismen von Probiotika als auch die Pathogenitätsmechanismen von *C. sakazakii* ES5 während einer Infektion im Zellkultursystem näher charakterisiert werden.

Screening von Nahrungsergänzungsmitteln auf toxische Pyrrolizidinalkaloide

Verena Kukula

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Betreuer: Dr. Christoph Gottschalk, Prof. Dr. Dr. Manfred Gareis, Florian Kaltner

Persönliche Eindrücke und Danksagung

Ursprünglich weckte ein Wahlpflichtfach am Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit mein Interesse an der Arbeit in diesem komplexen Bereich der Tiermedizin. Umso mehr freute ich mich, als es mit einem VETResearch-Projekt an diesem Lehrstuhl klappte. Meine Erwartungen an das Projekt wurden noch übertroffen. Selbstständig durfte ich mir über Monate hinweg die Arbeitsschritte selbst einteilen und auch meine Proben selbst aussuchen. Dank meines Betreuers Florian Kaltner und jedem einzelnen hilfsbereiten Mitarbeiter des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit war ich zu jeder Zeit gern im Labor. Ich habe sehr viel aus dem Projekt mitgenommen, fachlich, aber auch persönlich.

Ich möchte mich ausdrücklich bei Florian Kaltner, Dr. Christoph Gottschalk und Prof. Dr. Dr. Manfred Gareis bedanken, die es mir ermöglicht haben, bereits im Studium das wissenschaftliche Arbeiten für mich zu entdecken. Das Projekt hat mir zweifellos gezeigt, dass ich nach dem Abschluss des Studiums gerne in der Forschung bleiben möchte.



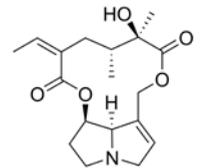
Screening von Nahrungsergänzungsmitteln auf toxische Pyrrolizidinalkaloide

V. Kukula, C. Gottschalk, M. Gareis, F. Kaltner

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

Einleitung

1,2-Dehydropyrrolizidinalkaloide (PA) und ihre N-Oxide sind eine Gruppe toxischer sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, die weltweit in ca. 6000 Arten vorkommen und zum Schutz vor Fraßfeinden gebildet werden [1]. Sie wirken hepatotoxisch, kanzerogen und mutagen [2]. Durch Beiernte PA-haltiger Pflanzen oder Eintrag in Honig über Nektar und Pollen können PA in Lebens- und Futtermittel gelangen. Nahrungsergänzungsmittel (NEM) versprechen als Nährstoffkonzentrate eine Verbesserung von Gesundheit und Wohlbefinden in Form von Tabletten, Pulvern, Säften etc. [3]. NEM aus pflanzlichen oder Bienenprodukten können mit PA kontaminiert sein; die Datenlage hierzu ist momentan als mangelhaft einzustufen. Ziel des Projekts war, ein Screening von Proben aus dem deutschen Einzel- und Internethandel auf mögliche PA-Kontaminationen vorzunehmen und aus den Ergebnissen das Risiko für den Verbraucher zu bewerten.



Struktur von Senecionin, einem typischen PA

Material und Methodik

• Probenumfang

- 49 verschiedene NEM aus Apotheken, Internetversandhandel, Drogerien und Supermärkten
- Proteinpulver, Tabletten, Säfte, Kapseln, Sirup, Presslinge



• Probenvorbereitung und -analytik

Einwaage der Probe, Zugabe des Extraktionsmittels



Behandlung im Ultraschallbad, Horizontalschüttler, Zentrifugation, Filtration mittels Faltenfilter



Extraktreinigung mit Festphasenextraktionssäulchen (Kationenaustauschermaterial)



Abdampfen, Aufnahme in Fließmittel, Membranfiltration



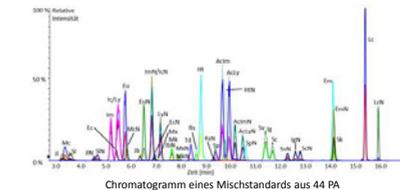
Messung per Flüssigchromatographie Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) auf 44 PA



Ergebnisse

• Auswertung

Nachweis von PA in 19 von 49 Proben
Quantifizierung mittels Standardaddition



• Risikobewertung

Auszug aus positiven Proben
(BMDL10 = 237 µg/kg KG/d [4], MOE = Margin of Exposure. Ab einem Wert < 10.000 wird von einem erhöhten Risiko gesprochen.)

Probe	Summengehalt PA [ng/g]	Aufnahme PA [ng/d], tägl. empf. Verzehrsmenge	MOE Kind (KG 16kg)	MOE Erwachsener (KG 70kg)
„Rosaxan“ Saft	0,3	10,5	360.799	1.578.497
„Smoothie Balls“ Presslinge	0,4	11,0	341.930	1.495.942
„Body Balance“ Kapseln	35,4	25,5	148.764	650.843
„Artischocke-Wacholder“ Kapseln	21,0	49,0	77.340	338.364
„Innere Ruhe“ Tabletten	36,9	59,1	64.184	280.806
„Herba-digestiv“ Tabletten	92,3	228,8	16.574	72.512

Zusammenfassung und Diskussion

- In über einem Drittel der untersuchten NEM wurden PA nachgewiesen. Alle Darreichungsformen der NEM waren gleichermaßen betroffen.
- Bei einer Probe resultierte ein MOE-Wert, der bei einem Kind in die Nähe des kritischen Bereichs von 10.000 kommt. Eine zusätzliche Aufnahme von PA aus hier nicht berücksichtigten Quellen (Honige, Tees, weitere NEMs) kann durchaus zur Unterschreitung eines MOE von 10.000 führen.
- Auf Grund der geringen Probenanzahl dürfen die Ergebnisse nicht als repräsentativ erachtet werden, sondern können nur als Überblick dienen.
- Die Resultate zeigten, dass PA in NEM ein Verbraucherrisiko darstellen können und weiterer Forschungsbedarf besteht.

Referenzen: [1] Smith und Culvenor (1981), J Nat Prod 44(2), 129-152 [2] Edgar et al. (2011), Food Add Contam A 28(3), 308-324 [3] Nahrungsergänzungsmittelverordnung [4] Stellungnahme 020/2018 des Bundesinstituts für Risikobewertung

Pyrrolizidinalkaloide: Allgemeine und weiterführende Informationen



Untersuchung von molekularen Veränderungen der TLR4-Signalkaskade in Hunden mit Epilepsie

Maria Reiber, Katharina Aulehner, Noëmi Ortmann

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Betreuer: Prof. Dr. Heidrun Potschka, Dr. Eva-Lotta von Rüden,

Dr. Fabio Gualtieri, Marta Nowakowska

Material und Methoden

Über ein Kooperationsprojekt mit der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Pathologie (Kooperationspartner Prof. Dr. Wolfgang Baumgärtner) und der Klinik für Kleintiere, Abt. Neurologie (Kooperationspartner Prof. Dr. Andrea Tipold), haben wir 3 µm dicke coronale Gehirnschnitte von 48 Hunden erhalten. Analysiert wurden vier hippocampale Subregionen, die Cornu Ammonis (CA)1- und CA3-Region, der Gyrus dentatus und der Hilus des Gyrus dentatus, sowie der Piriforme Cortex. Vor dem Schneiden wurden die Gehirne zehn Tage in Formalin 10 % fixiert und in Paraffin eingebettet.

Die Tiere wurden eingeteilt in eine Patientenkontrollgruppe CTR_{pat} (n = 18), eine experimentelle Kontrollgruppe CTR_{exp} (n = 10) und in Tiere mit struktureller (n = 12) und idiopathischer Epilepsie (n = 8). Die Patientenkontrollgruppe CTR_{pat} umfasste Klinikpatienten ohne neurologische Erkrankungen mit hoher Variabilität in Rasse und Alter. Die experimentelle Kontrollgruppe CTR_{exp} umfasste Beagles ohne neurologische Erkrankungen im Alter von 12-16 Monaten, die zuvor Teil einer parasitologischen Studie waren. Die Gruppierung der epileptischen Hunde basierte auf der klinischen Diagnose (Anamnese, neurologische Untersuchung und pathologische Bewertung), die von der Klinik für Kleintiere und dem Institut für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt wurde. Zusätzlich zu dem Einfluss der Ätiologie auf das Expressionsmuster wurde die kurzfristig zurückliegende Anfallsaktivität (Status Epilepticus oder Cluster-Anfälle) berücksichtigt.

Etablierung immunhistochemischer Färbungen für TLR4 an paraffinierten Hundehirnen

Deparaffinierung

Zur Deparaffinierung wurde Xylol als Intermedium verwendet. Es folgten die Rehydrierung mit einer Ethanolreihe in absteigender Konzentration, das Abspülen der Schnitte in Leitungswasser und ein letzter Waschschrift mit Aqua dest.

Antigen-Demaskierung

Die durch die Formalin- und Paraffinfixierung entstandenen Quervernetzungen (Maskierungen) der Epitope wurden nun rückgängig gemacht. Dies erfolgte über Hitze (heat induced epitope retrieval, HIER) mit Natriumcitrat (pH 6) im vorgeheizten Wasserbad bei 80 °C für

30 min. Dem anschließenden Abkühlen auf Eis folgten drei Waschschriffe in TBST [TBS + 0,05 % Tween-20 (P9416, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)]. Für die nachfolgenden Inkubationsschritte wurden auf dem Objektträger Umrandungen um das Gewebe herum mit einem Wachsstift aufgebracht.

Blocking und erster Antikörper – Inkubation in feuchter Kammer (250 µl je Schnitt)

Um die Ausbildung unspezifischer Bindungen zu minimieren, erfolgte zuerst die Inkubation mit Blockingpuffer (0,25 % Casein (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)) in TBS für 60 min. Nach Entfernung des Blockingpuffers wurde mit dem monoklonalen mouse-anti-TLR4 Antikörper (1:500, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Zweiter Antikörper – Inkubation in feuchter Kammer (300 µl je Schnitt)

Nach drei Waschschriffen in TBST erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, einem polyklonalen biotinylierten goat-anti-mouse Antikörper (1:500, Vector Laboratories, Burlingame, USA) bei Raumtemperatur. Nach zwei Waschschriffen in TBST wurde die Aktivität der endogenen Peroxidase blockiert durch Inkubation mit 1 % H₂O₂ in Methanol für 15 min.

ABC-Kit – Inkubation in feuchter Kammer (400 µl je Schnitt)

Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode amplifiziert das detektierte Signal und erhöht damit die Sensitivität. Dem Waschen in TBST folgte die Inkubation mit dem VECTASTAIN ABC-Peroxidase Kit, Standard Kit (VEC-PK-4000, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland) 1:100 in TBST für 60 min.

DAB-Färbung auf dem Objektträger (400 µl je Schnitt)

Nach zwei Waschschriffen in TBST und dann in TBS erfolgte die Färbung für 20-25 min mit SIGMAFAST 3,3'-Diaminobenzidintabletten (DE4418-50SET, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), gelöst in Aqua bidest. DAB (3,3'-Diaminobenzidin) wird in Gegenwart von Peroxidase und Wasserstoffperoxid oxidiert, was zur Ablagerung eines braunen, alkoholunlöslichen Niederschlags am Ort der enzymatischen Aktivität führt. Nach zwei Waschschriffen in TBS und einem Waschschrift in Aqua dest. wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaunlösung sauer nach Mayer (Roth T865, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in Aqua dest. (1:2) vorgenommen. Nach einem weiteren Waschschrift mit Aqua dest. wurden die Schnitte 15 min unter fließendem Wasser gegenläufig gefärbt. Nach dem letzten Waschschrift mit Aqua dest. wurden die Schnitte auf einer auf 50 °C erhitzten Platte getrocknet. Der Spülung mit Xylol folgte die Eindeckung mit Entellan® (107960, Merck, Darmstadt, Deutschland). Es wurden parallel Negativkontrollen ohne den ersten Antikörper angefertigt.

Quantifizierung und Bildanalyse

Bilder der vier hippocampalen Subregionen und des Piriformen Cortex wurden mit einem Olympus BH2-Lichtmikroskop mit CCD-Farbkamera (Axiocam; Zeiss, Göttingen, Deutschland) aufgenommen. Für TLR4 sollten pro Region bis zu drei Bilder mit 200-facher Vergrößerung, für Hsp70 bis zu fünf Bilder mit 400-facher Vergrößerung ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Grafiksoftware ImageJ Version 1.51 (Wayne Rasband, NIH, USA). Analysiert wurde die Expressionsintensität (optische Dichte, O. D.) sowie für Hsp70 zusätzlich die immunopositive Fläche (Fläche, in %). Aufnahme und Auswertung der Bilder erfolgten verblindet.

Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism Version 5.04 für Windows (GraphPad Prism Software, San Diego, USA) verwendet. Statistische Methoden waren die einfaktorielle univariate Varianzanalyse, gefolgt von der Bonferroni-Korrektur multipler Vergleiche. Mithilfe des Grubbs-Tests wurden Ausreißer detektiert. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Die Angabe der Daten erfolgt als Mittelwert \pm SEM (Standard Error of the Mean, Mittelwert).

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka, dass sie mir ermöglicht hat, an diesem Projekt mitarbeiten zu dürfen, und dass sie über die Lehre meine Begeisterung für dieses Thema entfacht hat. Mein Dank geht an Frau Dr. Eva-Lotta von Rüden Ph.D. und Herrn Dr. Fabio Gualtieri Ph.D. für die hervorragende Betreuung, Einarbeitung und Unterstützung während des Projekts und darüber hinaus. Ich hatte jederzeit das Gefühl, mit allen Fragen auf meine Betreuer zukommen zu dürfen. Frau Marta Nowakowska und Frau Isabel Seiffert danke ich für ihre Hilfe bei der Statistik und den Einblick in ihr Projekt. Frau Claudia Siegl und Frau Sabine Sass danke ich für die Weitergabe ihrer fachlichen Expertise im Labor. Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme und Unterstützung. Ich bin dankbar für die Unterstützung durch das Förderprogramm VETResearch.

Einleitung

Epilepsien sind charakterisiert durch rhythmische, exzessive und synchrone Entladungen von Neuronenverbänden im Gehirn. Als eine der häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen haben Epilepsien bei Hunden und Katzen und beim Menschen eine große Bedeutung. Bei rund einem Drittel der Patienten in der Tier- und Humanmedizin kann aufgrund von Pharmakoresistenz gegenüber den verfügbaren Antiepileptika keine zufriedenstellende Kontrolle und Reduktion der Anfallshäufigkeit erreicht werden.

Inflammatorische Prozesse nehmen während der Entstehung von Epilepsien eine Schlüsselrolle ein. Hitze-Schock-Proteine könnten bei diesem inflammatorischen Geschehen von zentraler Bedeutung sein. Die Familie der Hitze-Schock-Proteine Hsp70 umfasst stress-induzierbares Hsp70, das inflammatorische Reaktionen moduliert. Der aktuelle Kenntnisstand deutet darauf hin, dass die Induktion von Hsp70 bei neurologischen Insulten vorwiegend anti-inflammatorische Effekte hat.

Durch immunhistochemische Untersuchungen an post-mortem Gehirngewebe von caninen Patienten sollen detaillierte Informationen zu der erkrankungsassoziierten Regulation der Expressionsmuster von Hsp70 und Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) gewonnen werden. TLR4 ist ein möglicher Rezeptor des Hsp70. Für die gezielte Entwicklung von Targeting-Strategien ist die Gewinnung dieser Informationen unabdingbar.

Material und Methoden

Im Rahmen einer neuropathologischen Untersuchung von caninem Patientengewebe wurde das Expressionsmuster von Hsp70 und TLR4 analysiert. 48 Tiere wurden eingeteilt in zwei Kontrollgruppen (Patientenkontrollgruppe CTR_{pat} und experimentelle Kontrollgruppe CTR_{exp}) und in die Gruppe epileptischer Tiere. Es erfolgte eine Subgruppierung der epileptischen Tiere, um sowohl den Einfluss der Ätiologie der Epilepsie als auch den Einfluss von Clusteranfällen und Status Epilepticus auf das Expressionsmuster zu evaluieren.

Etablierung immunhistochemischer Färbungen

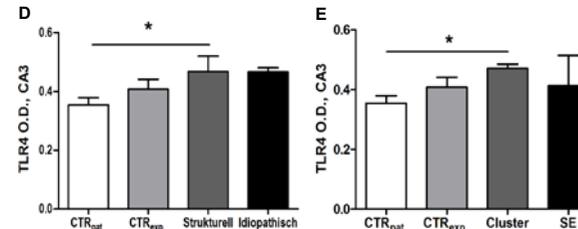
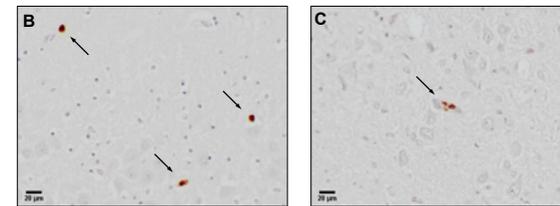
An coronalen Gehirnschnitten (3 μ m) wurden immunhistochemische Färbeprotokolle für TLR4 und Hsp70 etabliert.

Quantifizierung und Bildanalyse

Die quantitativen Analysen erfolgten im Hippocampus (Cornu ammonis (CA)1 und CA3, Gyrus dentatus und Hilus) sowie im Piriformen Cortex. Quantifiziert wurden die Expressionsintensität (optische Dichte, O. D.) von TLR4 und Hsp70 sowie die immunopositive Fläche (Fläche, in %) von Hsp70 mit der Grafiksoftware ImageJ.

Die Angabe der Daten erfolgt als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean, Mittelwert).

Ergebnisse TLR4



Wir danken Claudia Siegl, Sabine Sass, Sieglinde Fischlein und Sarah Driebusch für ihre exzellente technische Unterstützung. Die Autoren sind dankbar für die Unterstützung durch das Förderprogramm VETResearch und der DFG (PO 681/8-1).

Ergebnisse Hsp70

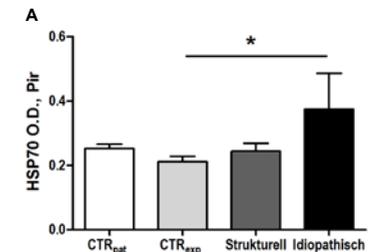


Abbildung A: Der Piriforme Cortex von Tieren mit idiopathischer Epilepsie wies eine signifikant erhöhte Expressionsintensität im Vergleich zur experimentellen Kontrollgruppe auf.

TLR4-immunopositive Zellen traten einzeln (siehe Abbildung B) oder als Zellcluster (siehe Abbildung C) auf, oft assoziiert mit kleinen Blutgefäßen oder Kapillaren.

Die CA3-Region von Tieren mit struktureller Epilepsie wies eine signifikant erhöhte Expressionsintensität im Vergleich zur Patientenkontrollgruppe auf (siehe Abbildung D). Auch in der CA3-Region von Tieren mit Clusteranfällen manifestierte sich eine signifikant erhöhte Expressionsintensität gegenüber der Patientenkontrollgruppe (siehe Abbildung E).

Zusammenfassung

- Bei caninen Epilepsien kann die Expression von Hsp70 und TLR4 erkrankungsassoziiert reguliert sein.
- Hunde mit struktureller Epilepsie zeigten eine erhöhte TLR4-Expression in der CA3-Region. Bei Tieren mit idiopathischer Epilepsie konnte eine erhöhte Expression von Hsp70 im Piriformen Cortex nachgewiesen werden.
- Die ätiologie-spezifischen Veränderungen in den inflammatorischen Signalkaskaden sind bei der Entwicklung neuer therapeutischer Targeting-Strategien zu beachten.

Untersuchungen an den pathogenen Hefepilzen *M. pachydermatis* und *C. albicans*

Amelie Rinner

Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen

Betreuer: Prof. Dr. Frank Ebel

Candida albicans ist die bekannteste und am besten untersuchte pathogene Hefe. *Malassezia pachydermatis* verursacht oberflächliche Erkrankungen beim Hund und beim Menschen, aber generell ist über diesen Erreger deutlich weniger bekannt als über *C. albicans*. Das ursprüngliche Ziel war es, *M. pachydermatis* in einigen Aspekten besser zu charakterisieren. Im Laufe des Projekts stießen wir dann auf eine sehr interessante Wirkung von *C. albicans* auf *Aspergillus* sp., die wir ebenfalls untersucht haben.

Infektionsversuche mit *M. pachydermatis* und der murinen Makrophagenzelllinie (J774)

Ziel des Versuchs ist es, zu klären, ob *M. pachydermatis* DSM6172 von den murinen Makrophagen erkannt, phagozytiert und verdaut wird.

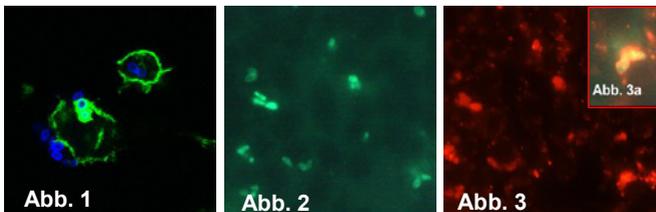
Ablauf

Ein Monolayers der murinen Zelllinie J774 wird mit *M. pachydermatis* infiziert und der Versuch wird zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Formaldehyd abgestoppt. Anschließend werden die Makrophagen mittels Triton X permeabilisiert und das Aktincytoskelett mit Phalloidin grün fluoreszierend eingefärbt. *M. pachydermatis* wird mittels Calcofluor Weiß Färbung blau fluoreszierend dargestellt (Abbildung 1).

Die Phagolysosomen lassen sich mithilfe eines Lyotrackerers, welcher saure Kompartimente einer Zelle rot einfärbt (Abbildung 3), darstellen. (Abbildung 2 FITC vormarkierte *Malassezien*)

Ergebnis

In Abbildung 1 erkennt man den Prozess der Phagozytose. Die Zelle bildet vermehrt Aktin-Filamente aus, um die Hefepilze zu umschließen. Dies stellt sich in einer vermehrten grünen Fluoreszenz dar. Zudem beweisen die rot eingefärbten Zellkompartimente im Bereich der *Malassezien*, dass Phagolysosomen ausgebildet werden und die *Malassezien* somit verdaut werden. (Abbildung 3a: bereits anverdaute *Malassezien*, Overlay von roter und grüner Fluoreszenz)



Immunfluoreszenz – Mikroskopie:

Verschiedene monoklonale Antikörper gegen Pilzzellwandkomponenten aus *A. fumigatus* werden auf Reaktivität mit *M. pachydermatis* geprüft

Ziel ist es, mehr über die Eigenschaften der Pilzzellwand von *M. pachydermatis* herauszufinden. Eine Reaktivität weisen von allen getesteten Antikörpern nur der 2 G8 und der ML217-5-8 Antikörper auf. Der 2 G8 Antikörper erkennt β -1,3-Glucan, welches bei den meisten Pilzspezies vorhanden ist, aber z.B. bei *C. albicans* überdeckt ist. Da in der Immunfluoreszenz eine gleichmäßige Färbung erkennbar ist, scheint bei *M. pachydermatis* die äußerste Polysaccharidschicht nicht so dicht zu sein, wie bei *Candida* (vgl. Abbildung 4).

Der ML217-5-8 Antikörper ist gegen ein bisher unbekanntes Glykoantigen auf *Aspergillus*-Konidien gerichtet. Auch bei *M. pachydermatis* ist offensichtlich ein entsprechendes Antigen vorhanden.

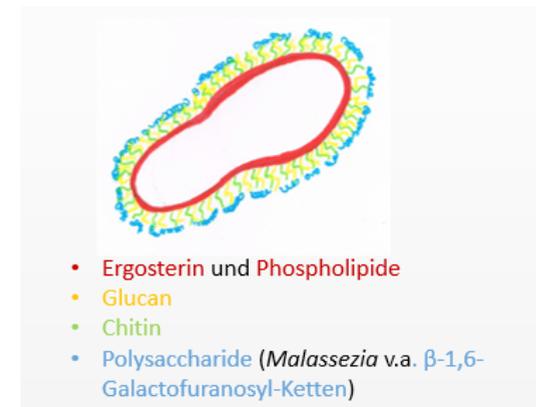
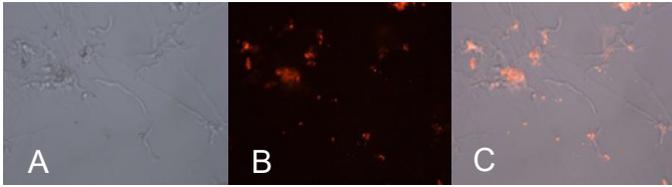
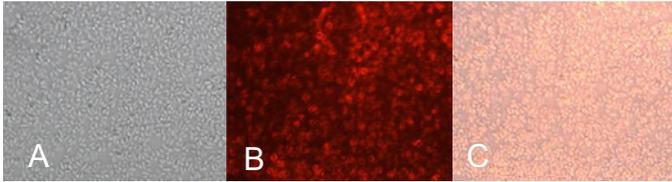
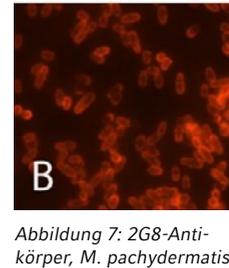
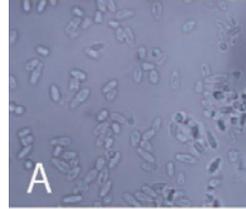


Abbildung 4: Skizze einer Pilzzellwand am Beispiel Malassezia

Anti-körper	Zielstruktur	<i>A. fumigatus</i>	<i>M. pachydermatis</i>
2G8	β -1,3-Glucan	+	+
ML217-5-8	unbekanntes Glykoantigen, welches auf <i>A. fumigatus</i> Sporen vorkommt	+	+
AB90	Proteinantigen, das auf <i>A. fumigatus</i> Hyphen vorkommt	+	-
L10-1	pilzliches Galaktomannan	+	-
AE183	bisher unbekanntes Glykoantigen, das auf <i>A. fumigatus</i> Hyphen vorkommt	+	-
C41-G11	unbekanntes Glykoantigen, das auf den Hyphen von <i>Aspergillus</i> und <i>Fusarium</i> vorkommt	+	-
AD105-29	unbekanntes Glykoantigen, das auf <i>A. fumigatus</i> Hyphen vorkommt	+	-
AD75-7-4	pilzliches Galaktomannan	+	-
AB174-A2	unbekanntes Glykoantigen, das auf <i>A. fumigatus</i> Hyphen vorkommt	+	-

A: Durchlicht - B: Fluoreszenz - C: Overlay

Abbildung 5: ML217-5-8 Antikörper, *A. fumigatus* D141Abbildung 6: ML217-5-8 Antikörper, *M. pachydermatis* DSM6172Abbildung 7: 2G8-Antikörper, *M. pachydermatis*

Überprüfung, ob der antifungale Wirkstoff Fludioxonil in der Lage ist, *M. pachydermatis* zu schädigen oder abzutöten

Wirkungsweise von Fludioxonil

Aspergillus-Spezies besitzen das *tcsC*-Gen, welches ihnen ermöglicht, in osmotisch widrigen Bedingungen Wasser einzulagern und zu überleben.

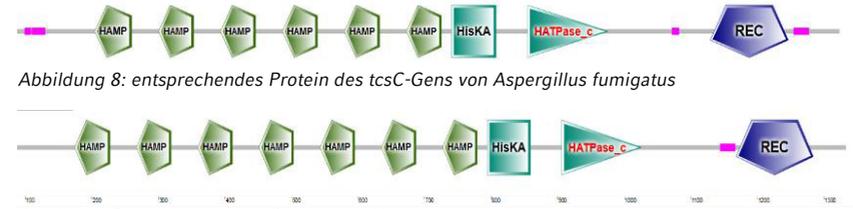
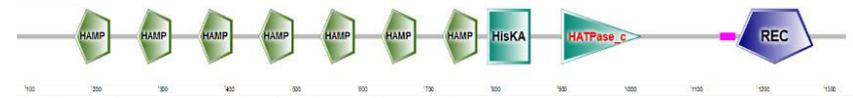
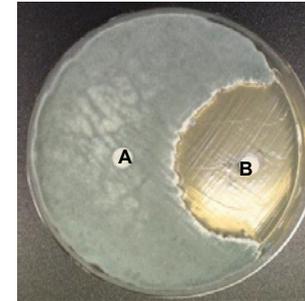
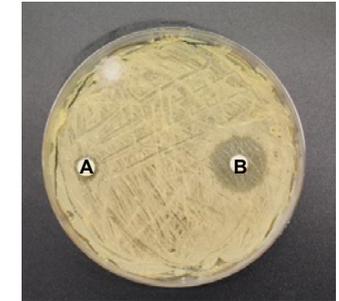
Die Wassereinlagerung wird durch die Erhöhung der Anzahl osmotisch wirksamer Teilchen im Pilz bewirkt. Das Gen codiert für das unten abgebildete Protein (Abbildung 8). Das Medikament Fludioxonil stimuliert dieses Gen, sodass es zu einer übermäßigen Wassereinlagerung und zum Platzen des Pilzes kommt. *Malassezia*-Spezies besitzen ein ähnliches Gen bzw. Protein, u.a. mit dem Unterschied, dass dieses statt sechs, sieben HAMP-Domänen besitzt (Abbildung 9).

Versuch

Auf Saboraud-Agarplatten wurden Kolonien von *A. fumigatus* D141 und *M. pachydermatis* DSM6172 mit Plättchen unterschiedlicher Fludioxonil Konzentration belegt.

Ergebnis

Trotz der Ähnlichkeit der Proteinsequenz zeigt sich im Versuch, dass Fludioxonil bei *M. pachydermatis* im Vergleich zu *Aspergillus* keine ebenso effiziente Wirkung erzielt. Ein deutlicher Hemmhof ist bei *Malassezia* erst ab einer Menge von 100 µg Wirkstoff erkennbar (Abbildung 11). Bei *A. nidulans* zeigt sich bereits bei einer Menge von 5 µg ein deutlicher Hemmhof. Fludioxonil ist aufgrund der hohen Dosierung zur Bekämpfung von *M. pachydermatis* als nicht praxisrelevant einzuschätzen.

Abbildung 8: entsprechendes Protein des *tcsC*-Gens von *Aspergillus fumigatus*Abbildung 9: entsprechendes Protein von *Malassezia globosa*Abbildung 10: *A. Fumigatus* D141,
A: Ethanol, B: 100 µg Fludioxonil in EthanolAbbildung 11: *M. Pachydermatis* DSM6172,
A: Ethanol, B: 100 µg Fludioxonil in Ethanol

Überprüfung der Wachstumshemmung von *C. albicans* auf *Aspergillus*-Spezies

Nach zufälliger Kontamination von *C. albicans* Platten mit Schimmelpilzen zeigt sich, dass das Schimmelpilzwachstum durch die Hefepilze beeinflusst wird.

Ziel des Versuchs

Werden *Aspergillus*-Spezies durch *C. albicans* und andere Hefespezies am Wachstum gehemmt und handelt es sich dabei um aktive Wirkstoffe?

Wachstumshemmung auf Agarplatten

Auf Agarplatten (Abbildung 12) zeigt sich, dass das Wachstum und die Sporulation von *A. fumigatus* makroskopisch durch *C. albicans* 5314 gehemmt wird. Zwischen eng liegenden Impfstrichen der Hefepilze bleibt *Aspergillus*-Wachstum komplett aus. Als weitere Hefestämme wurden *S. cerevisiae* DSM 1333, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. parapsilosis* DSM 4237 und *C. tropicalis* DSM 4238 auf hemmende Eigenschaften untersucht. Besonders interessant ist, dass auch die apathogene Bäckerhefe *S. cerevisiae* hemmende Eigenschaften besitzt (Abbildung 13).

Wachstumshemmung im Flüssigmedium

In einer Flüssigkultur wird ein GFP-exprimierender *A. fumigatus* Stamm auf eine *C. albicans* 5314 und eine *S. cerevisiae* DSM1333 Kultur gegeben und für 24 h inkubiert. In Abbildung 14 ist die Entwicklung von *A. fumigatus*-Sporen allein und auf einer *Candida* Kultur (C und D) gegenüber gestellt. Die *Aspergillus*-Sporen konnten sich durch den Einfluss der *Candida* Kultur innerhalb von 24 Stunden nicht entwickeln und es ist keinerlei Wachstum erkennbar. In einer Kontrolle ohne *Candida* konnten die Pilz-Sporen dagegen bereits Hyphen bilden.

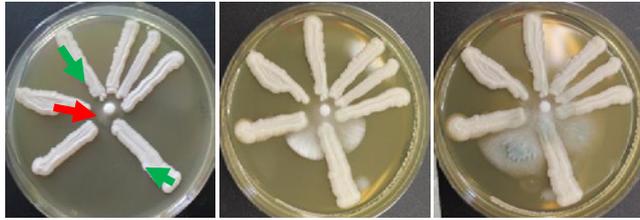


Abbildung 12: *C. albicans* 5314, *A. fumigatus* D141



Abbildung 13: *C. albicans* 5314, *A. fumigatus* D141, *S. cerevisiae* DSM1333

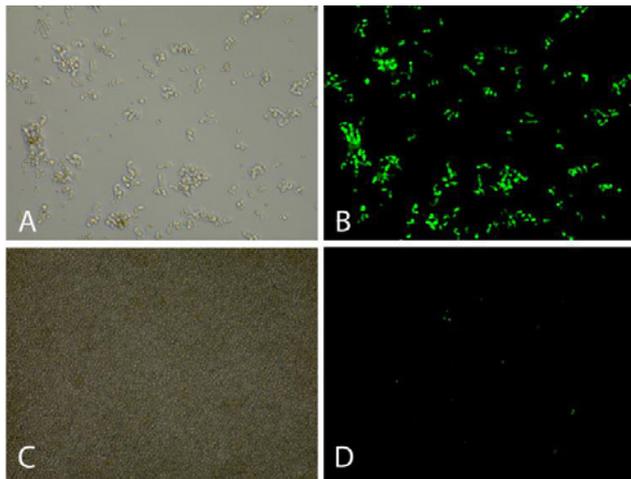


Abbildung 14: A: *A. fumigatus* Afs 135, Durchlicht; B: *A. fumigatus* Afs35, Fluoreszenz; C: *C. albicans* und *A. fumigatus* Afs35, Durchlicht; D: *C. albicans* und *A. fumigatus* Afs35 Fluoreszenz

Auswertung

In Abbildung 15 wurde die Gesamtanzahl der *Aspergillus*-Sporen zum Zeitpunkt 0 und 24 Stunden nach Infektion der jeweiligen Hefekultur ausgezählt (jeweils 25 Gesichtsfelder). Bei beiden Hefepilzkulturen nimmt die Anzahl der GFP-positiven Sporen nach 24 Stunden Inkubation ab, dies legt nahe, dass *Aspergillus* zum Teil abgetötet wird. Bei *C. albicans* ist dieser Effekt wesentlich deutlicher als bei *S. cerevisiae*.

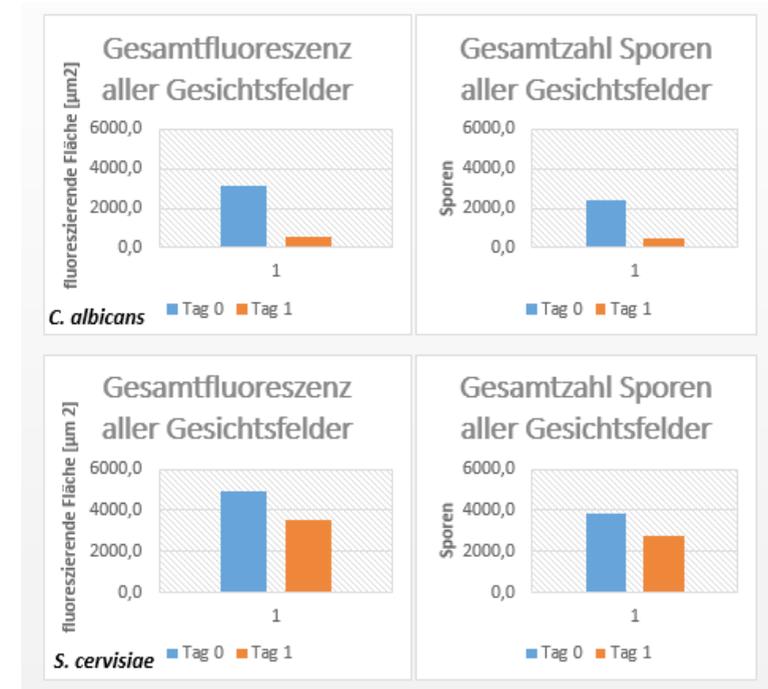


Abbildung 15

Ausschluss, dass die Wachstumshemmung auf Nährstoffverbrauch zurückgeht

In einem Versuch wurde Kulturüberstand einer *C. albicans* und einer *S. cerevisiae* Kultur abzentrifugiert. Jeweils ein Anteil des Überstands wurde mit Glucose versetzt und beide Anteile daraufhin mit *Aspergillus*-Sporen infiziert. In allen Überständen konnten sich die Sporen nicht hinreichend entwickeln, d.h. der Effekt beruht nicht auf einem Verbrauch der Glucose.

Ergebnis

Sowohl die pathogene Hefe *C. albicans*, als auch die apathogene Bäckerhefe *S. cerevisiae* scheinen aktive Wirkstoffe zu produzieren, die *Aspergillus*-Spezies an ihrer Entwicklung hindern. Dieses Ergebnis könnte in Zukunft einen therapeutischen Ansatz liefern.

Persönliche Erfahrung

Die Teilnahme am VETResearch Projekt des Instituts für Infektionsmedizin und Zoonosen der Ludwigs-Maximilians-Universität München war für mich die ideale Chance, erste Einblicke in Forschungsarbeiten unserer Universität zu erhalten. Ich finde es sehr gut, dass wir Studierende die Möglichkeit haben, uns neben dem Studium auch intensiver mit einem anderen Thema auseinanderzusetzen, das über den üblichen Studienalltag hinausgeht. Mir hat die Arbeit im mykologischen Labor sehr viel Spaß gemacht. Ich hatte stets eine sehr gute Betreuung, bei der mir alle Vorgänge gut erklärt wurden, und konnte darüber hinaus auch selbstständig arbeiten und mir erste routinierte Handgriffe im mikrobiologischen Arbeiten aneignen. An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Frank Ebel und seinen Mitarbeitern bedanken.

Statuserhebung von *Trichinella* spp. in Straußenfleisch

Christopher Wöstmann

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Betreuer: Dr. Sebastian Ulrich, Philipp-Michael Beindorf

Hintergrund

Fadenwürmer der Gattung *Trichinella* spp. sind weltweit vorkommende Nematoden. Von den derzeit acht bekannten Arten haben sieben humanpathogenes Potenzial. Eine Infektion erfolgt in der Regel über den Verzehr nicht ausreichend erhitzten Fleisches, in dem die abgekapselten Larven der Parasiten als Zysten vorliegen.

Grundsätzlich gelten alle monogastrischen Säuger sowie fleischfressenden Vögel als empfänglich. Im Jahr 2001 haben Piergili et al. gezeigt, dass Strauße experimentell mit Trichinellen infiziert werden können.

Entsprechend der Vorschrift VO (EG) 854/2004 Anh. I Abschn. IV Kap. IX Teil C müssen in der EU „Tierarten, die an Trichinose erkranken können“ systematisch auf *Trichinella* spp. untersucht werden, ehe ihr Fleisch für genusstauglich befunden werden darf. Dennoch erfolgt zum gegenwärtigen Zeitpunkt in der EU keine systematische Untersuchung von Straußenfleisch auf *Trichinella* spp.

Unter Berücksichtigung dessen sollte im Rahmen dieses VETResearch-Projektes eine Statuserhebung von Trichinellen in bayerischem Straußenfleisch durchgeführt werden, um abschätzen zu können, ob aus Verbraucherschutzgründen eine Anpassung der gängigen Praxis hin zu einer systematischen Untersuchung von Straußenfleisch auf *Trichinella* spp. angezeigt wäre.

Material und Methodik

Beprobte wurden insgesamt 49 Straußenvögel der größten bayerischen Straußenfarm, die sich auf vier Schlachtstage mit Beprobungskohorten je zwischen neun und 15 Tieren verteilen.

Einem Vorschlag von Piergili et al. folgend, wurden die Proben aus dem M. gastrocnemius der Tiere entnommen. Weiterhin wurde zur Validierung der Testsysteme jeweils ein Durchlauf mit einer Positivkontrolle trichinösen Schweinefleisches vom BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) unternommen.

Als Testsysteme kamen zum einen das klassische Magnetrührverfahren und zum anderen ein *Trichinella*-Antigen-Test-Verfahren mittels Agglutination antikörperbeschichteter Latexkügelchen zum Einsatz.

Für den Nachweis mittels Magnetrührverfahren wurden zunächst je Probe 5 g Probenmaterial zu 100 g Ansätzen zusammengefasst und das Fleisch anschließend für drei Sekunden in einem Labormixer zerkleinert. Dieses Probenmaterial wurde anschließend in salzsäure- und pepsinhaltige Verdauungslösung überführt und unter stetem Rühren des Magnetrührers für 45 Minuten verdaut (Abbildung 1). Im Anschluss daran wurde die Verdauungslösung in einen Scheidetrichter überführt, wo sie für 60 Minuten sedimentiert ist (Abbildung 2). 40 ml der sedimenthaltigen Flüssigkeit wurden daraufhin in ein Becherglas abgelassen, in dem die Flüssigkeit weitere 10 Minuten sedimentierte. Folgend wurden 30 ml Überstand aus dem Becherglas entnommen und das Sediment vorsichtig mit 30 ml Frischwasser aufgefüllt. Nachdem die zehnmündige Sedimentation sowie die Entfernung und Wiederauffüllung des Überstandes jeweils wiederholt worden waren, wurden nach einer letzten zehn Minuten dauernden Sedimentationsphase noch einmal 30 ml Überstand verworfen und das Residuum mittels Stereomikroskopie untersucht (Abbildung 3).



Abbildung 1:
Magnetrührverfahren



Abbildung 2:
Scheidetrichter



Abbildung 3:
Stereomikroskopie

Für das *Trichinella*-Antigen-Test-Verfahren wurden die Proben zunächst in gleicher Weise vorbereitet und für 45 Minuten auf dem Magnetrührer digestiert. Für das weitere Vorgehen wurde die Verdauungslösung anschließend nicht sedimentiert, sondern mittels Filtrationspumpe durch eine Filtermembran gepumpt (Abbildung 4). Diese wurde daraufhin gefaltet, in ein Flacon-Röhrchen gegeben, zerstoßen und mit Pufferlösung versetzt. Im nächsten

Schritt wurden jeweils 50 µl der gepufferten Probenlösung sowie eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle in je ein Feld der Testkarte gegeben und mit je 25 µl Latexkügelchen vermischt. Letztlich wurde die Testkarte (Abbildung 5) für zehn Minuten bei 30 rpm auf einem Schwenker platziert und das Ergebnis abgelesen.

Alle Proben wurden jeweils mit beiden Testsystemen untersucht.



Abbildung 4: Filtration



Abbildung 5: Latexagglutination

Mein großer Dank gilt hierbei insbesondere meinen Betreuern Philipp-Michael Beindorf und Dr. Sebastian Ulrich sowie natürlich dem ganzen Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit unter Leitung von Herrn Prof. Gareis dafür, dass sie dieses Projekt ermöglicht und fürsorglich begleitet haben.

Insgesamt ist, wie ich finde, das große Engagement der Mitarbeiter des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit lobend zu erwähnen, die eben nicht nur mir, sondern regelmäßig zahlreichen Studenten die Möglichkeit bieten, sich in der Arbeit an einem VETResearch-Projekt zu entfalten.

Ergebnis

Mit beiden Testsystemen konnte das Positivmaterial vom BfR als trichinenbelastet identifiziert werden, weshalb beide Systeme als valide anzusehen sind. Ebenfalls übereinstimmend wurden sämtliche 49 Feldproben von beiden Testsystemen als trichinenfrei eingestuft.

Für ein insgesamt belastbares Fazit ist jedoch eine weitergehende Untersuchung erforderlich, welches auf anderen Straußenfarmen gewonnene Proben und importiertes Straußenfleisch in der Auswertung berücksichtigt.

Persönliche Einschätzung

Ich habe es als große Bereicherung empfunden, bereits während des Studiums die Möglichkeit zu bekommen, weitgehend eigenständig dieses Projekt verfolgen und wissenschaftliches Arbeiten an der Universität erleben zu können. Dabei möchte ich ausdrücklich neben der Arbeit im Labor auch das Eingebundensein in die organisatorischen Abläufe des Projektes und letztlich auch die Präsentation der eigenverantwortlich gewonnenen Ergebnisse nennen.

Antimikrobielle Aktivität von CCL20 gegenüber bovinen Mastitis-Erregern

Veronika Erhard

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

Einleitung

Über die letzten Jahre konnte eine zunehmende Sensibilisierung in Bezug auf die Anwendung von Antibiotika verzeichnet werden. Dies gilt vor allem für ihren Einsatz bei Lebensmittel-liefernden Tieren. Aufgrund des Risikos steigender Resistenzen von Bakterien gegenüber Antibiotika und dem dadurch verbundenen Risiko möglicher Therapieengpässe, gehört es mittlerweile zur guten fachlichen Praxis, die Antibiotikagabe in der Tiermedizin weiterhin zu reduzieren. Dies wirft die Frage nach zukünftigen Alternativen als Ersatz für herkömmliche Antibiotika auf.

Endogene antimikrobielle Peptide und Proteine gelten als vielversprechende Kandidaten bei der Infektabwehr. Ihre gezielte Induktion mittels Immunmodulatoren könnte zukünftig helfen, die Abwehrlage von Kühen gegenüber Mastitiserregern zu verbessern.

Das Chemokin CCL20 besitzt neben seiner chemotaktischen Wirkung gegenüber Makrophagen und Lymphozyten [1, 3] auch antimikrobielle Aktivität. In der Literatur wird ihm eine Wirksamkeit gegenüber *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) zugeschrieben [6]. Beide Erreger gelten als bedeutende Mastitis-Pathogene bei Rindern [2, 4]. Eine weitere Studie zeigte, dass CCL20 schon sehr früh und stark bei der bovinen Mastitis im Euter und in der Zitze heraufreguliert wird [5]. Ob CCL20 auch gegenüber bovinen Isolat von Mastitis-Pathogenen wirkt, ist jedoch bisher nicht bekannt. Ziel des vorliegenden Projektes war es, die antimikrobielle Aktivität von CCL20 gegenüber den Mastitis-Erregern *E. coli*, *S. aureus* und *Streptococcus uberis* (*Sc. uberis*) *in vitro* zu untersuchen.

Material und Methoden

Die antimikrobielle Wirkung von CCL20 wurde mittels eines „Time-Kill-Assays“ untersucht. Das Prinzip beruht auf der wiederholten photometrischen Messung der optischen Dichte des Kulturmediums während der exponentiellen Wachstumsphase von Bakterien. Mittels eines Platten-Photometers (CLARIOstar®) wurde das Wachstum alle 30 Minuten über 6 Stunden bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Den jeweiligen Ansätzen wurden verschiedene Konzentrationen von CCL20 (zwischen 2,5 ng/mL und 33,5 ng/mL) hinzugegeben zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kinetik.

Die jeweiligen Versuchsansätze wurden auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Verdünnungen wurden mit LB-Medium angefertigt. Zunächst wurde das Wachstum der jeweiligen Pathogenen ohne Zusätze (Positiv-Kontrolle) und mit einem Antibiotikazusatz (Negativ-Kon-

trolle) erfasst. Die verschiedenen CCL20-Konzentrationen wurden mit und ohne Zusatz von Pathogenen angesetzt und gemessen. Des Weiteren wurde als Kontrolle nur LB-Medium ohne jegliche Zusätze gemessen. Alle Ansätze wurden in Dreifachansätzen angefertigt.

Ergebnisse

Für *Sc. uberis* zeigte sich ab einer CCL20-Konzentration von 5 µg/mL eine partielle Wachstumshemmung. Eine totale Hemmung wurde ab einer Konzentration von 10 µg/mL ermittelt (siehe Abbildung 1, oben links). Bei einer CCL20-Konzentration von 20 µg/ml ließ sich gegenüber *S. aureus* eine partielle Hemmung erkennen und bei einer Konzentration von 33,5 µg/mL eine totale Hemmung (s. Abbildung 1, oben rechts). Bei den Versuchsansätzen mit *E. coli* konnte kein Einfluss von CCL20 auf das Erregerwachstum festgestellt werden (siehe Abbildung 1, unten links).

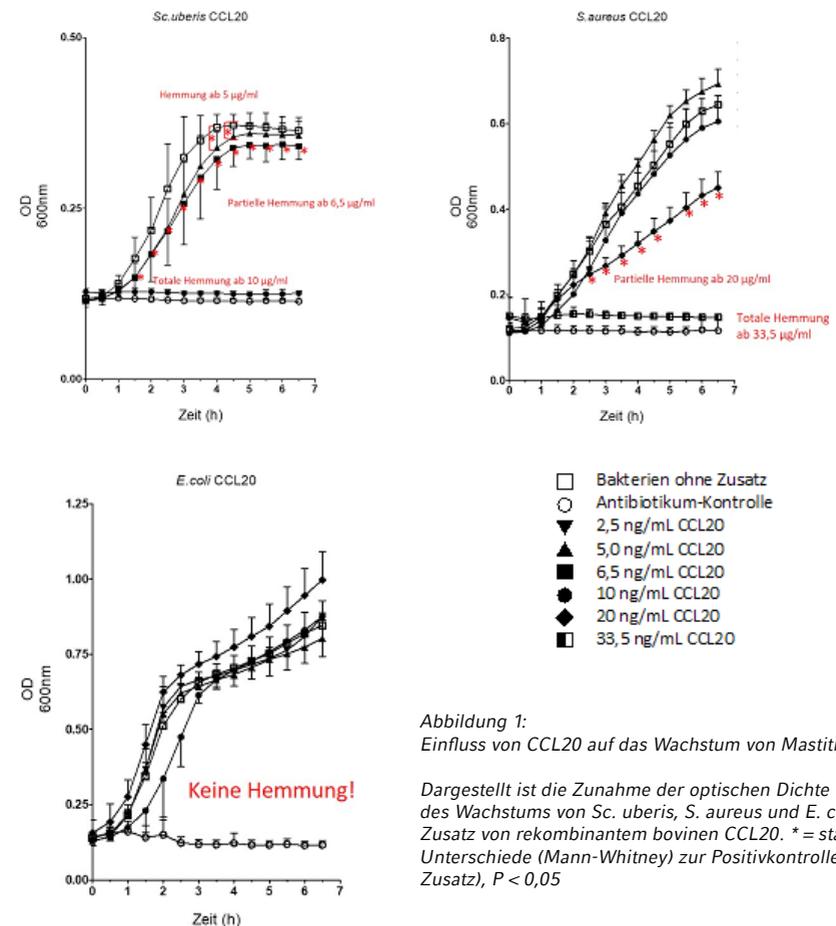


Abbildung 1:
Einfluss von CCL20 auf das Wachstum von Mastitis-Pathogenen

Dargestellt ist die Zunahme der optischen Dichte (OD) als Indikator des Wachstums von *Sc. uberis*, *S. aureus* und *E. coli* mit und ohne Zusatz von rekombinantem bovinen CCL20. * = statistisch signifikante Unterschiede (Mann-Whitney) zur Positivkontrolle (Bakterien ohne Zusatz), $P < 0,05$

Fazit

Im Rahmen dieses Projektes konnte erstmals die antimikrobielle Wirkung von CCL20 gegenüber bovinen Mastitis-Isolaten gezeigt werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass CCL20 konzentrationsabhängig gegenüber *Sc. uberis* und *S. aureus* eine antimikrobielle Wirkung zeigte. Eine Wirksamkeit gegenüber *E. coli* konnte mit den gewählten Konzentrationen nicht gezeigt werden. Es bleibt zu spekulieren, ob CCL20 in höheren Konzentration gegenüber *E. coli* eine antimikrobielle Wirksamkeit entfaltet. Ob CCL20 eine potentielle Alternative für den Einsatz von Antibiotika darstellen kann, bleibt derzeit offen. Eine parenterale Gabe wäre derzeit hinsichtlich der hohen Herstellungskosten nicht denkbar. Erste Ansätze weisen jedoch darauf hin, dass sich die lokale Expression von CCL20 im Euter durch gezielte Immunmodulation steigern lässt. Dies in weiteren Studien aufzuklären, erscheint zukunftsweisend.

Persönliche Erfahrungen und Danksagung

Durch die Teilnahme am VETResearch-Programm konnte mir ein guter Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten gewährt werden. Es hat mich sehr motiviert, für ein eigenes Projekt die Verantwortung zu tragen, Fortschritte zu sehen und anschließend die eigenen Ergebnisse vorzustellen zu dürfen.

Ich möchte mich recht herzlich für die geduldige und stetige Betreuung, Unterstützung und den Einsatz von Herrn Priv. Doz. Dr. Wolfram Petzl bedanken. Weiterhin gilt mein großer Dank der Unterstützung und den immer aufbauenden Worten von Herrn Dr. Frank Weber und Frau Sandra Kirsch. Unter anderem möchte ich mich auch noch recht herzlich bei Frau Julia Schneider und Frau Dr. Marie Meyerholz für ihre Unterstützung bei der statistischen Auswertung bedanken. Ich habe mich sehr darüber gefreut, am VETResearch-Programm teilnehmen zu dürfen.

Literaturverzeichnis

- [1] Alber G. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Selbitz HJ, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. Stuttgart: Enke Verlag 2011; 29.
- [2] Buer H, Palzer A. In: NutztierSkills – Arbeitstechniken in der Großtierpraxis: Rind, Schwein, Schaf, Ziege. Buer H, Palzer A, Hrsg. Stuttgart: Schattauer GmbH 2012; 226.
- [3] Göbel T, Kaspers B. In: Physiologie der Haustiere. von Engelhardt W, Hrsg. Stuttgart: Enke Verlag 2015; 220.
- [4] Grunert E. In: Die klinische Untersuchung des Rindes. Rosenberger G, Bgr. Dirksen G, Gründer HD, Stöber M, Hrsg. Stuttgart: Enke Verlag 2012; 541.
- [5] Petzl W, Günther J, Mühlbauer K, Seyfert HM, Schuberth HJ, Hussen J; Sauter-Louis C, Hafner-Marx A, Zerbe H. Early transcriptional events in the udder and teat after intra-mammary *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* challenge. *Innate Immunity* 2016; 22: 294-304.
- [6] Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Many chemokines including CCL20/MIP-3 α display antimicrobial activity. *Journal of Leukocyte Biology* 2003; 74: 448-455.

Wie wirken sich Alter und Kolostrum- / Nahrungsaufnahme auf den GCSF-Rezeptor bei Kälbern aus?

Isabel Jaspersen

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

Hintergrund

Der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GCSF) ist ein Peptidhormon, welches als Cytokin unter anderem bei Entzündungen vom Körper ausgeschüttet wird und die Bildung von Granulozyten angeregt. Diese Zellen sind wichtige Effektoren des Immunsystems, dessen Hauptaufgabe die Abwehr bakterieller Infektionen darstellt.

Weltweit kommt es in der Landwirtschaft zu hohen Kälberverlusten in den ersten Lebenswochen. Ein Großteil dieser Verluste ist auf Durchfallerkrankungen und Lungenentzündungen zurückzuführen. Medikamente zur Stimulation des Immunsystems unter Anwendung des CSF sind bereits auf dem Markt erhältlich zur peripartalen Mastitisprophylaxe bei Milchkühen. Denkbar ist ein positiver Effekt von GCSF auf das Immunsystem neugeborener Kälber. Die Physiologie des GCSF-Rezeptors (GCSF-R) im Magen-Darm-Trakt beim Kalb ist allerdings bisher kaum untersucht.

Probenentnahme und Probenaufbereitung

Bei n = 14 Kälbern wurden jeweils drei Magen- bzw. Darmabschnitte beprobt (Abbildung 1).

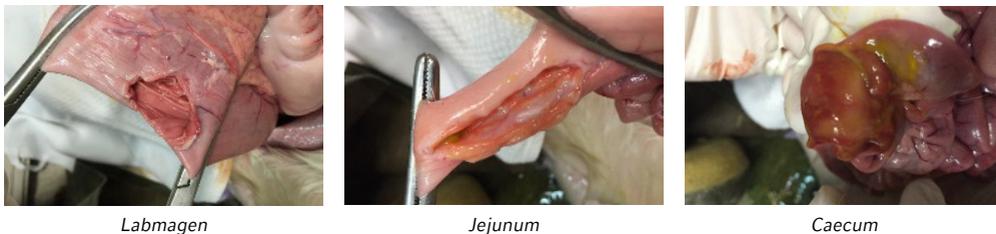


Abbildung 1: Probenentnahme an den drei Lokalisationen des Magen-Darm-Traktes eines tot geborenen Kalbes

Die Kälber waren in der Klinik für Wiederkäuer tot geboren worden, unter der Geburt gestorben oder mussten aufgrund von Lebensschwäche oder einer infausten Prognose euthanasiert werden. Das Alter der Kälber lag zwischen 0-28 Tage. Bei n = 3 tot geborenen Kälbern wurde bei der Aufbereitung der Proben eine unzureichende Qualität der mRNA festgestellt. Die übrigen Kälber (n = 11) wurden in **drei Gruppen** eingeteilt:

- „noKol“: keine Nahrungsaufnahme (n = 3)
- „Kol“: nur Kolostrum (n = 2)
- „Kol+“: Kolostrum und weitere Nahrungsaufnahme (n = 6)

Mittels „Innuspeed Lysetubes P“ und BioSen RNA-KIT (Analytik Jena AG, Jena) wurde die RNA aus den Proben extrahiert. Die RNA-Qualität wurde mit Hilfe des Experion Chips (Bio-Rad, Hercules, USA) durch Bestimmung des RQI (= RNA-Qualitätsindex zw. 1-10) überprüft. Alle Proben mit einem RQI zwischen 6,6 und 10,0 wurden verwendet, n = 3 Tiere wurden aufgrund von RQI-Werten < 6,6 von den weiteren Analysen ausgeschlossen (s.o.). Die RNA aus dem verwendbarem Probenmaterial wurde in cDNA mit dem PromegaKit (Madison, USA) umgeschrieben.

Für die relative Quantifizierung wurden folgende in der Literatur beschriebene Referenzgene (= gleichbleibend reguliertes Gen) ausgewählt:

- 18S (= ein Teil der ribosomalen RNA Untereinheit, Reist et. al 2003)
- β -Actin (= Strukturprotein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt, Bestandteil des Zytoskeletts, Anstaett et. al 2010)
- RPL19 (= ribosomales Protein L19: gehört zu den Zellorganellen, die die Proteinsynthese katalysieren, Zaros et. al 2007)
- SUZ12 (= Suppressor of zeste 12 homolog (Drosophila), Walker et. al 2009)

Die Primerpaare für die genannten Referenzgene wurden getestet und mit Hilfe des Programms „Best Keeper“ verglichen. Da 18S, RPL19 und SUZ12 die geringsten Schwankungen zwischen den CT-Werten zeigten, wurden diese drei Gene für die weiteren Analysen verwendet.

Ergebnisse

Beim Vergleich der Mittelwerte der CT-Werte wurde deutlich, dass die CT-Werte nach der Kolostrumaufnahme um 2 CT-Werte absanken. Ein geringerer Unterschied war zwischen „Kol“ und „Kol+“ zu erkennen (Unterschied 0,1 CT-Wert). Die beschriebenen Unterschiede waren nur in Jejunum und Caecum zu erkennen, nicht im Labmagen. Das Referenzgen „SUZ12“ zeigte keine Schwankungen der CT-Werte (Abbildung 2).

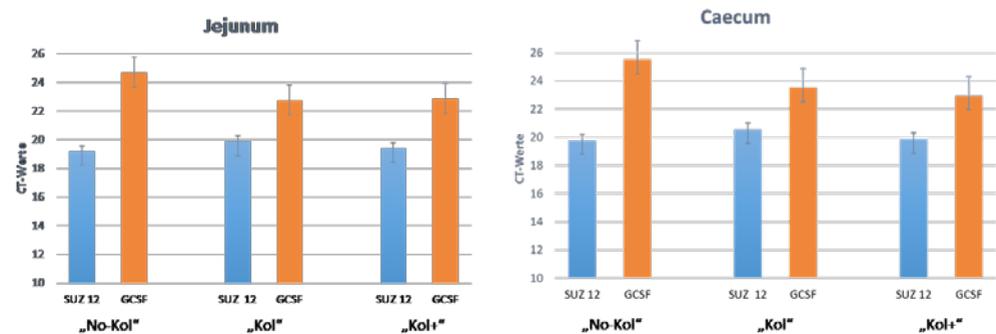


Abbildung 2: CT-Werte des GCSF-R in drei Abschnitten des Magen-Darm-Traktes von Kälbern

Mittels Delta-CT-Methode wurde die Expression des GCSF-Rezeptors in Relation zum Referenzgen SUZ12 gesetzt und zwischen den Lokalisationen sowie zwischen den Gruppen mit dem gepaarten T-Test verglichen.

Man konnte deutlich erkennen, dass bei „noKol“ die Expression des GCSF-Rezeptors zwischen den Lokalisationen vergleichbar ($P > 0,1$) und sehr niedrig war. Nach Kolostrumaufnahme allerdings erscheint die Expression des GCSF-Rezeptors im Labmagen viel geringer als im Jejunum und im Caecum. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 3).

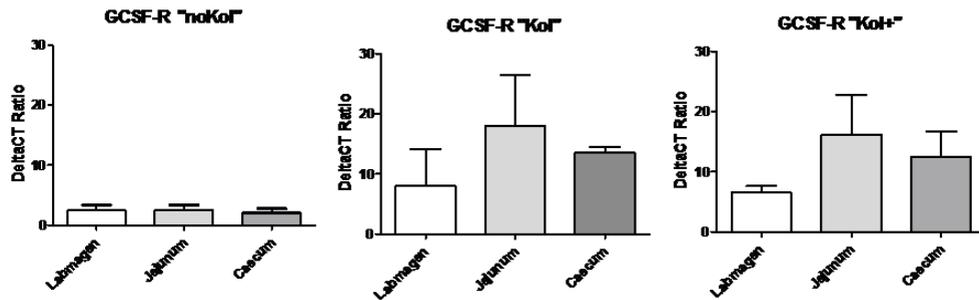


Abbildung 3: Relative Quantifizierung des GCSF-R mittels Delta-CT Methode in Relation zum Housekeeping-Gen SUZ12. Vergleich der Lokalisationen innerhalb der Fütterungsgruppen.

Innerhalb jeder Lokalisation war der GCSF-R in der Gruppe „Kol“ oder „Kol+“ höher exprimiert als in der Gruppe „noKol“ ($P < 0,1$).

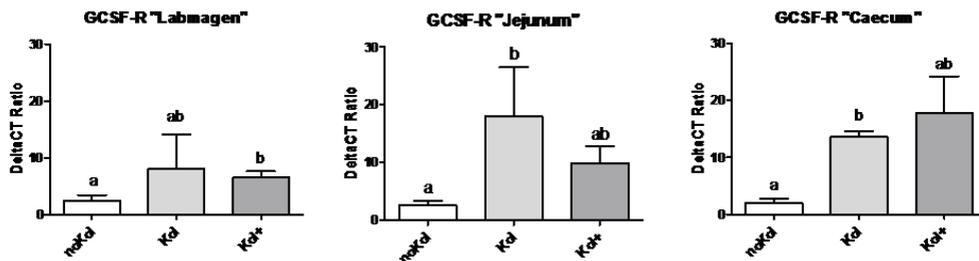


Abbildung 4: Relative Quantifizierung des GCSF-R mittels Delta-CT-Methode in Relation zum Housekeeping-Gen SUZ12. Vergleich der Fütterungsgruppen innerhalb der drei beprobten Lokalisationen Labmagen, Jejunum und Caecum.

Schlussfolgerung und Ausblick

Die Expression des GCSF-Rezeptors in der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes von Kälbern wird vermutlich durch die Aufnahme von Kolostrum induziert. Allerdings kann bei diesem Datenset ein Alterseffekt nicht ausgeschlossen werden.

Die mögliche Relevanz für die Immunkompetenz neugeborener Kälber sowie mögliche Abhängigkeiten der GCSF-R Expression von der Qualität des verabreichten Kolostrums sollten in zukünftigen Studien Beachtung finden.

Persönliche Erfahrung und Danksagung

Das VETResearch Programm bietet eine gute Möglichkeit, einen Einblick in einen der vielen Bereiche, die einem als Tierarzt offen stehen, zu bekommen. Während des Studiums liegt der Schwerpunkt auf der Ausbildung zum praktischen Tierarzt, und man hat wenig Möglichkeiten, einen Einblick in andere Bereiche des Berufes zu bekommen.

Ich freue mich sehr darüber, dass uns durch das VETResearch Programm ermöglicht wird, den Beruf des Labortierarztes näher kennenzulernen und diese Erfahrung auch als Entscheidungshilfe für die Zukunft nutzen zu können. Es hat mir sehr gefallen, den Ablauf des wissenschaftlichen Arbeitens mitzuerleben und selbstständig problemorientierte Lösungen finden zu müssen.

Ein großes Dankeschön gilt meinem Betreuer Dr. Frank Weber, der mir das Projekt ermöglicht hat, Sandra Kirsch, die mir immer zur Hilfe stand und für alle meine Fragen offen war und Dr. Marie Meyerholz, ohne die es keine statistische Auswertung gegeben hätte.

Evaluierung verschiedener Marker und Methoden zur Kalibrierung von Röntgenaufnahmen

Anastasia de Motte

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

Röntgenaufnahmen werden häufig zur Planung chirurgischer Eingriffe in der Orthopädie eingesetzt. Zur Korrektur der Vergrößerung werden dabei Röntgenmarker bekannter Größe verwendet, anhand welcher die Röntgenbilder bzw. Messungen kalibriert werden. Die Verwendung nicht kalibrierter Röntgenbilder kann sich auf den operativen Erfolg auswirken, wenn beispielsweise zu große oder zu kleine Implantate eingesetzt werden.

Ziel dieses Projektes war es, sechs unterschiedliche Röntgen-Marker, wie sie in der Kleintierchirurgie oft zum Einsatz kommen, in einem realistischen Szenario miteinander zu vergleichen und hinsichtlich verschiedener Anwendungsaspekte auszuwerten.

Aus dem Projekt geht hervor, dass die Kugelmarker zu empfehlen sind, die an einem flexiblen Segmentarm befestigt sind. Das beste Ergebnis erzielte der kommerziell erhältliche Marker (der Firma „Veterinary Instrumentation“), aber auch der selbstgebaute Marker lieferte zufriedenstellende Ergebnisse.

Auch die Verwendung einer Münze hat akzeptable Ergebnisse geliefert. Sofern kein Röntgenmarker vorhanden ist, kann daher auch eine Münze zur Kalibrierung verwendet werden. Es muss jedoch darauf geachtet werden, die korrekte Höhe mithilfe von strahlendurchlässigem Material zu unterpolstern, was sich im Projekt als zeitaufwändig und weniger korrekt herausgestellt hat.

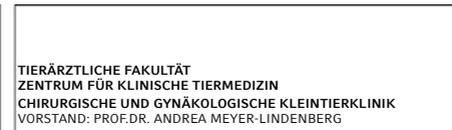
Der Metalllinealmarker ist nicht empfehlenswert, da dieser an einem dünnen Metalldraht befestigt ist, welcher bereits im Projektzeitraum durch Materialermüdung gebrochen ist. Die große Kugel war durch das hohe Eigengewicht nicht gut platzierbar und ist somit unbrauchbar.

Quellenverzeichnis

Read et al., 2012: "Assessment of on-screen measurements, magnification, and calibration in digital radiography"; JAVMA, Vol 241.

Franken et al., 2010: "A comparison of four systems for calibration when templating for total hip replacement with digital radiography"; J Bone Joint Surg, 92B: 136-41.

Thrall D., 2018: "Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology"; 7th Edition, Elsevier.



Evaluierung verschiedener Marker und Methoden zur Kalibrierung von Röntgenaufnahmen

Anastasia de Motte, Julius Klever, Dr. Andreas Brühnschwein

Einleitung

Die Röntgendiagnostik ist eines der wichtigsten Hilfsmittel zur Planung chirurgischer Eingriffe in der Orthopädie. Für die Auswahl der richtigen Implantatgröße sind präzise und genaue Längenmessungen entscheidend für den Therapieerfolg. Durch die Divergenz der Röntgenstrahlung werden Objekte im Röntgenbild umso größer dargestellt je weiter sie vom Detektor entfernt sind (Abb. 1). Um den individuellen Vergrößerungsfaktor zu bestimmen, werden Marker bekannter Größe auf Höhe des Objekts platziert. Das Verhältnis zwischen gemessener und bekannter Größe des Markers ergibt den Vergrößerungsfaktor.

Dabei kann die Länge der Marker entweder mittels digitaler manueller Längenmessung oder semi-automatisch durch computergestützte Erkennung der Form erfolgen. Andere Möglichkeiten zur Korrektur der Vergrößerung sind die Errechnung des Vergrößerungsfaktors durch Messung des Abstands zwischen Röntgenröhre und Objekt oder die Verwendung eines gemittelten Vergrößerungsfaktors.

In dieser Studie sollen verschiedene Kalibrierungstechniken und Marker bezüglich ihrer Praktikabilität während der Anwendung, aber auch hinsichtlich der Genauigkeit und Präzision untersucht werden. Die besten Methoden sollen künftig routinemäßig im Klinikalltag zum Einsatz kommen.

Material und Methoden

An sieben Hundekadavern verschiedener Größe und Rasse wurden prospektiv sechs verschiedene Marker durch drei Personen jeweils auf Höhe des Hüft- und Kniegelenks platziert (Abb. 1 und 2). Dabei wurde die Praktikabilität auf einem Score von 1 (sehr schlecht) bis 10 (sehr gut) bewertet und die benötigte Zeit gemessen. Zum Einsatz kamen drei verschiedene kommerzielle Marker mit unterschiedlicher Form sowie zwei selbstgebaute Marker verschiedener Größe und eine Zwei-Euro-Münze. Zur Platzierung auf Höhe des Gelenks wurden der Plexiglasmarker und die Zwei-Euro-Münze mit Schaumstoffplatten verschiedener Größe unterpolstert, die anderen Marker waren an flexiblen Halterungen befestigt.



Abb. 2a-f: Platzierung und Messung der Marker auf Höhe des Hüftgelenks

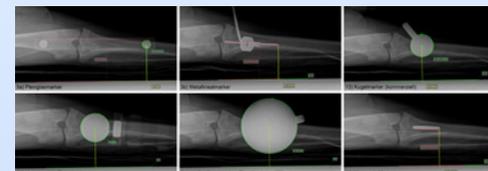


Abb. 2a-f: Platzierung und Messung der Marker auf Höhe des Kniegelenks

Im Anschluss wurde von jeder Markerplatzierung eine Röntgenaufnahme im horizontalen Strahlengang angefertigt und der Abstand zur Röntgenröhre „source to object distance“ (SOD) mittels Maßband gemessen. Um die Genauigkeit und Präzision jeder Markerplatzierung zu evaluieren wurde der Abstand des Markers zum Tisch bzw. des Gelenkmittelpunkts zum Tisch durch digitale Messungen an der mittels Zoom-Funktion vergrößerten Röntgenaufnahme ermittelt.

Die Genauigkeit der Platzierung wurde durch Errechnung der mittleren Abweichung des Markers zum definierten anatomischen Bezugspunkt bestimmt. Für die Ermittlung der Präzision der Platzierung wurde mit SPSS der Intra-Klassenkorrelationskoeffizient (ICC) berechnet. Mit dem ICC kann die Übereinstimmung von mehreren Platzierungen oder Messungen berechnet werden. Zusätzlich wurden die verschiedenen Kalibrierungstechniken (manuell, semi-automatisch, rechnerisch) mittels des Intra-Klassenkorrelationskoeffizienten hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit verglichen.

Ergebnisse

Die Auswertung der Praktikabilität der verwendeten Marker und die zur Platzierung benötigte Zeit sind in Abbildung 3.1 und 3.2, sowie Tabelle 1 dargestellt.

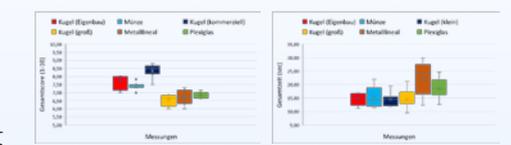


Abb. 4.1: Auswertung der Marker-Praktikabilität

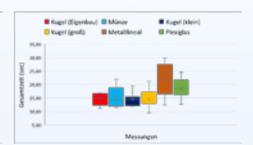


Abb. 4.2: Auswertung des Zeit-Faktors

Zusätzlich zu den oben genannten Kriterien sind in Tab. 1 und Abb. 5 die durchschnittliche Abweichung vom anatomischen Referenzpunkt in Millimeter (Genauigkeit) und die Zuverlässigkeit der Markerplatzierung (Präzision) dargestellt.

Tab. 1: Kriterien und Ranking für das Positionieren der Marker

Marker	Praktikabilität	Zeitfaktor	Präzision	Genauigkeit	Gesamt
Kugel (Kommerziell)	1 (0 Score: 8,35)	1 (0 14,57)	2 (ICC: 0,57)	2 (0 7,24mm)	1
Kugel (Eigenbau)	2 (0 Score: 7,71)	2 (0 14,81)	1 (ICC: 0,59)	4 (0 8,09mm)	2
Münze	3 (0 Score: 7,42)	3 (0 15,16)	4 (ICC: 0,437)	3 (0 7,51mm)	3
Metalllineal	5 (0 Score: 6,71)	5 (0 22,11)	5 (ICC: 0,43)	1 (0 6,07mm)	4
Plexiglas	4 (0 Score: 6,88)	4 (0 18,52)	3 (ICC: 0,52)	5 (0 8,69mm)	5
Zwei-Euro-Münze	6 (0 Score: 6,58)	1 (0 14,57)	6 (ICC: 0,11)	6 (0 9,71mm)	6



Abb. 5: Kriterien und Ranking für das Positionieren der Marker

Die Präzision der digitalen Längenmessungen der Marker auf den Röntgenbildern ergab für alle Marker einen ICC > 0,994, ohne signifikante Unterschiede.

Die semi-automatische Kalibrierung zeigt mit einem ICC von 1,0 eine äquivalente Präzision wie die manuelle Kalibrierung. Bei Überlagerung mit anatomischen Strukturen des Patienten war eine computergestützte Erkennung des Markers in 11,1% der Messungen erfolgreich.

Die Methode zur Berechnung des Vergrößerungsfaktors durch Messung der SOD zeigte mit einem ICC von 0,95 eine sehr gute Übereinstimmung mit der manuellen Markerkalibrierung.

Diskussion

Die Genauigkeit der Platzierung ergab gute Werte für alle Marker. Je nach Abstand der Röntgenröhre zum Detektor entspricht 1cm Abweichung vom anatomischen Referenzpunkt etwa 1% Abweichung von der tatsächlichen Größe.

Die guten Ergebnisse sowohl für die Präzision, als auch die Praktikabilität und den Zeitfaktor beim kommerziellen Kugelmarker sowie dem selbstgebauten Kugelmarker mit kleiner Kugel sind vermutlich auf die Befestigung an einem flexiblen Segmentarm zurückzuführen. Zu beachten ist allerdings, dass die semi-automatische Kalibrierungsmethode durch die Form bei der kommerziellen Kugel nicht möglich ist.

Die Zwei-Euro-Münze und der Plexiglasmarker zeigen in allen Kriterien akzeptable Ergebnisse. Die Lagerung auf den Schaumstoffplatten erweist sich als limitierend, da keine völlig exakte Positionierung auf Höhe des Objekts möglich ist. Der Metalllinealmarker ist zwar sehr präzise, durch die instabile Befestigung an einem Metalldraht jedoch sehr unpraktisch. Die schlechten Ergebnisse der großen Kugel sind auf die Instabilität durch das hohe Gewicht zurückzuführen, sowie die Schwierigkeit den Mittelpunkt exakt auf Höhe der anatomischen Struktur zu platzieren.

Die Messung der Marker auf dem Röntgenbild zeigt eine exzellente Präzision für die manuelle als auch die semi-automatische Kalibrierung. Daher sind beide Messmethoden als gleichwertig anzusehen. Die semi-automatische Kalibrierung ist jedoch dadurch limitiert, dass eine überlagerungsfreie Projektion nötig ist. Die Berechnung des Vergrößerungsfaktors mittels des gemessenen SOD ist genauso zuverlässig ist wie die Markerkalibrierung.

Schlussfolgerung

Mit Ausnahme der großen Kugel liefern alle Marker zufriedenstellende Ergebnisse im Praxisalltag. Der von uns getestete kommerziell erhältliche Kugelmarker liefert die besten Ergebnisse bezüglich Praktikabilität und Zuverlässigkeit im Praxisalltag.

Nachweis und Charakterisierung von Circoviren bei Rabenkrähen

Pia Pickelmann

Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische
Betreuerin: PD Dr. Monika Rinder

Einleitung

Im Patientengut der Vogelklinik sehen wir vor allem im Frühjahr junge Rabenkrähen mit Befiederungsstörungen, das heißt, deren Federkleid ist entweder auffällig zerzaust und matt oder weist Depigmentierungen auf. Da Befiederungsstörungen bei Psittaziden häufig mit einer Circovirus-Infektion (Psittacine Beak and Feather Disease) einhergehen, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei Rabenkrähen ähnlich verhalten könnte. Ob es Anzeichen für einen Zusammenhang zwischen den klinischen Symptomen einer Befiederungsstörung und einer Circovirus-Infektion besteht, sollte im Rahmen dieses Projekts untersucht werden.

Ein weiterer Aspekt war die nähere Differenzierung und Charakterisierung des Circovirus bei Rabenkrähen mithilfe einer Vollgenomsequenzierung. Derzeit sind 29 verschiedene Circovirus-Arten anerkannt, von denen 11 bei Vögeln auftreten. Circoviren sind unbehüllte DNA-Viren mit einem einzelsträngigen zirkulären Genom einer Größe von etwa 2 kb, die sich besonders durch eine hohe Tenazität und Mutationsrate auszeichnen. Erste Untersuchungen eines kleinen Genomfragmentes hatten gezeigt, dass sich Circoviren aus Rabenkrähen keiner bislang bekannten Circovirus-Art zuordnen.

Material und Methoden

Zunächst wurden alle Rabenkrähen, die 2017 und 2018 in die Klinik gebracht worden sind, klinisch untersucht, mit besonderem Augenmerk auf den Gefiederzustand. Im Rahmen der klinischen Untersuchung wurden Tupferproben aus der Kloake genommen, die auch dazu verwendet wurden, um das Virus nachzuweisen. Bei euthanasierten Tieren haben wir zusätzlich Organproben entnommen.

Aus diesen Proben wurde dann die DNA mithilfe des DNeasy Blood and Tissue Kits (Qiagen, Hilden) extrahiert. Hierbei wurde das Material zunächst enzymatisch verdaut, die DNA an eine Silikamatrix-Säule gebunden, schließlich gewaschen und bei der Elution nochmals zentrifugiert.

Nach der DNA-Extraktion erfolgte die weitere Untersuchung mit der Breitspektrum-nested-PCR nach Halami et al (2008), die auf das Replikasegen des Virus gerichtet ist. Durch die Verschachtelung wird die DNA zweimal amplifiziert, wodurch sich die Erfolgswahrscheinlichkeit erhöht. Gleichzeitig macht es aber auch das Verfahren kontaminationsanfälliger. Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden die extrahierten DNA-Proben mit sogenannten

Mastermischen gemischt, die jeweils Taq-Polymerase, einen Puffer, Nukleotide und Primer enthalten. Für die Ermittlung weiterer Abschnitte des Genoms wurden jeweils verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen, neu konstruierten Primern verwendet, da die gesuchte Sequenz bei Circoviren aus Rabenkrähen noch unbekannt ist. Bei der Auswahl der Primerregionen haben wir uns an konservierten Bereichen von bereits bekannten Circovirus-Genomsequenzen orientiert.

Die Amplifikationsprodukte wurden dann im weiteren Verlauf durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt und die entstandenen Banden unter UV-Licht beurteilt. Bei der Gelelektrophorese läuft ein Größenstandard (DNA-Leiter) mit, damit die Bandenlänge der PCR-Produkte sofort abgelesen werden kann. Anschließend wurden jeweils die Banden aus dem Gel ausgeschnitten, die der durch die Primer vorgegebenen Länge entsprachen.

Um die Produkte sequenzieren zu können, wurden sie zunächst mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel extrahiert und dann zur Sequenzierung an GATC Eurofins Genomics (Ebersberg) geschickt. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden dann für phylogenetische Analysen unter Verwendung der Programme Muscle und Neighbour-Joining (enthalten im Software-Paket Mega X) verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

In die Studie aufgenommen wurden 15 Rabenkrähen aus dem Jahr 2017 und 23 Rabenkrähen von 2018. Bei der klinischen Untersuchung zeigten sich Befiederungsstörungen (Abbildung 1) bei acht der 15 Krähen von 2017 und bei sechs der 24 Rabenkrähen von 2018. Dies entspricht einer Häufigkeit von 37 %.



Abbildung 1: Junge Rabenkrähe mit Befiederungsstörungen

Vier von 15 getesteten Rabenkrähen aus dem Jahr 2017 waren Circovirus-positiv. Bei drei von diesen Vögeln (Patientennummern 47193, 47243, 49331-T2) wurden fast identische Circovirus-Sequenzen nachgewiesen, während bei einer Rabenkrähe aus dem Jahr 2017 (Patientennummer 47613) ein davon abweichender Sequenztyp festgestellt wurde. Bei diesem Vogel war zwar der Kloakentupfer positiv, jedoch das Organmaterial negativ. Hier stellt sich die Frage, ob es sich möglicherweise um ein Rabenkrähen-assoziiertes Circovirus handelt, das über ein mit Circoviren infiziertes Beutetier aufgenommen und nur passagiert wurde. Im Jahr 2018 wurde eines von 24 Tieren (Patientennummer 51273) für Vogel-Circoviren positiv getestet. Die ermittelte partielle rep-Gen-Sequenz war denen aus den drei Vögeln von 2017 sehr ähnlich. Bei einem Rabenkrähen-Patienten (Nummer 51433) wurden Circoviren festgestellt, die anhand ihrer Sequenz als Porcines Circovirus 2 identifiziert wurden. Hierbei handelte es sich vermutlich um ein nur über den Magen-Darm-Trakt passagiertes Virus.

Nur bei zwei der fünf Vogel-Circovirus-positiven Krähen (40 %) wurden Veränderungen im Gefieder nachgewiesen. Die infizierten Tiere zeigten im Vergleich mit den nicht-infizierten Rabenkrähen also kein gehäuftes Auftreten von Befiederungsstörungen. Ein direkter Zusammenhang zwischen den Befiederungsstörungen und einer Infektion mit Circoviren bei Rabenkrähen konnte daher nicht gefolgert werden. Weitere Differentialdiagnosen wie Parasitosen, Mangelernährung oder eine Fehlfütterung müssen daher als Ursache für die weißen Federn und die anderen Befiederungsstörungen in Betracht gezogen werden.

Die phylogenetischen Analysen ergaben, dass die Circovirus-Sequenzen aus den drei positiven Tieren von 2017 und aus einer Rabenkrähe von 2018 einander sehr ähnlich waren und sich deutlich von anderen Circoviren abgrenzten (Abbildung 2). Auch unter Einbeziehung eines 900 bp großen Genomfragmentes ergab sich, dass das Starling Circovirus das am nächsten verwandte Virus war (paarweise Identität etwa 80 %). Somit stützen die Ergebnisse die Annahme einer neuen Circovirus-Art bei Rabenkrähen.

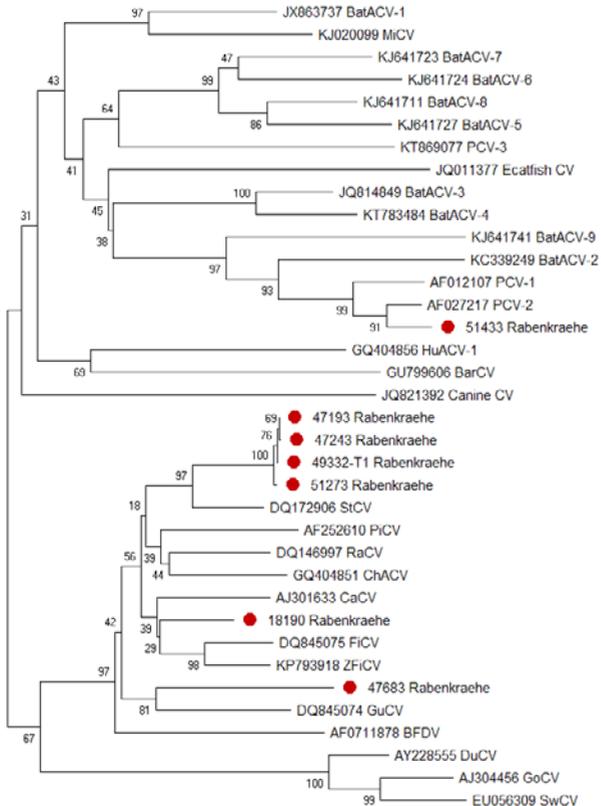


Abbildung 2: Phylogenetische Beziehungen der Sequenzen von Viren aus Rabenkrähen (dargestellt mit ihrer Patientennummer, markiert mit roten Punkten) zu anderen Circovirusarten

Ausblick

Dieses Projekt liefert die Grundlage für weitere Forschungen zu Circoviren bei Rabenkrähen. Zunächst einmal wurden Befiederungsstörungen als klinische Manifestation nicht bestätigt. Nun stellt sich die Frage, ob dieses Virus bei Rabenkrähen andere Schädigungen besitzt, zum Beispiel eine Immunsuppression, wie sie bei anderen Circovirus-Arten bekannt ist. Hinweisse darauf würden sich zum Beispiel aus dem Vorliegen von Einschlusskörperchen in der Bursa fabricii oder einer Reduktion der Apoptoserate in lymphatischen Organen ergeben.

Des Weiteren arbeiten wir weiter an der Vollgenomsequenzierung. Eine Charakterisierung des gesamten Genoms ist Voraussetzung für eine Anerkennung einer neuen Circovirus-Spezies. Vom International Committee on Taxonomy of Viruses wurde als Kriterium zur Art-abgrenzung eine Identität der Gesamtgenom-Nukleotidsequenz von weniger als 80 % im Vergleich zu bereits bekannten Circovirus-Spezies festgelegt.

Auf der Grundlage von Sequenzinformationen weiterer Virusstämme wäre außerdem eine Real-Time PCR zum Nachweis der Circoviren bei Rabenkrähen wünschenswert, da diese spezifischer und weniger kontaminationsanfällig ist.

Wichtig wären auch Untersuchungen zur Ermittlung der klinischen Relevanz der Befiederungsstörungen, vor allem der Depigmentierungen, und ihre Bedeutung in Bezug auf Wildtierpopulationsaspekte („Fremdlingsbild“).

Literaturreferenz

Halami, M. Y., Nieper, H., Müller, H., & Johne, R. (2008). Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. *Virus Res*, 132(1-2), 208-212.

Persönliche Erfahrung

Für mich war es sehr spannend, einen Einblick in die wissenschaftliche Arbeit und vor allem in die Laborarbeit zu erhalten. Sehr beeindruckend und interessant ist auch die Tatsache, von der klinischen Untersuchung, über die Komplexität der Virusanalyse bis hin zur Entdeckung eines neuen Virus dabei zu sein und in jeden Bereich einmal hineinschnuppern zu können. Ohne dieses Projekt wäre dies nicht möglich gewesen, daher kann ich nur jedem empfehlen, an einem VETResearch-Projekt teilzunehmen.

Abschließend möchte ich mich bei dem gesamten Team der Vogelklinik und vor allem bei PD Dr. Monika Rinder bedanken, ohne deren Erklärungen, Hilfe und Mitarbeit dies alles nicht möglich gewesen wäre.

Einfluss von subklinischer Endometritis auf die Expression der Typ-I Interferon Rezeptor Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2

Angela Pitz

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

Hintergrund

Im Frühstadium der Trächtigkeit sezernieren mononukleäre Trophoblastenzellen des Konzeptus Interferon tau als Signal zur Erkennung der Trächtigkeit durch den maternalen Organismus. Dadurch wird die Expression der Oxytocin Rezeptoren im Uterus des Muttertieres und somit die PGF2 alpha Synthese gehemmt. Somit bleibt die Luteolyse des Corpus luteum aus und die Trächtigkeit wird aufrechterhalten.

Mehr als 20 % der jährlichen Abgänge aus Milchviehbetrieben stehen im Zusammenhang mit Fruchtbarkeitsproblemen. Als eine Ursache für herabgesetzte Fruchtbarkeit und frühe embryonale Mortalität ist die subklinische Endometritis beschrieben, eine Entzündung der innersten Schicht des Uterus ohne klinische Symptome. Um eine adäquate Signaltransduktion auszulösen, muss Interferon tau an den Typ-I Interferon Rezeptor binden. Dieser besteht aus zwei Untereinheiten: IFNAR1 und IFNAR2.

Im Rahmen dieses Projektes sollte die Expressionsrate von IFNAR1 und IFNAR2 vergleichend in Endometriumsbiopsien von klinisch gesunden Tieren bzw. Tieren mit subklinischer Endometritis untersucht werden. Sollten im Falle einer subklinischen Endometritis die Interferon tau Rezeptoren nicht genügend exprimiert werden, könnte dies die embryo-maternale Kommunikation stören, da das vom Embryo sezernierte Interferon tau nicht in ausreichender Menge an IFNAR1/2 binden kann und die nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade nicht adäquat angesteuert werden kann.

Material und Methoden

Mit Hilfe einer Real-Time PCR, die im Vergleich zur konventionellen PCR zusätzlich über Fluoreszenzmessung eine Quantifizierung ermöglicht, wurden aus einem vorher durchgeführten Projekt von Frau Dr. Anika Helfrich Endometriumsbiopsien (von Tieren mit subklinischer Endometritis und Tieren mit gesundem Endometrium) auf das Vorhandensein exprimierter Interferon tau Rezeptoren untersucht, absolut quantifiziert und verglichen. Als Voraussetzung für die absolute Quantifizierung musste zunächst je eine Standardkurve für IFNAR1 und IFNAR2 etabliert werden.

Standardkurvenherstellung

Um die gesuchte Sequenz zu vervielfältigen, wurde eine konventionelle PCR angesetzt. Im Anschluss wurde das Produkt bzw. dessen Größe im Experion Chip (Bio-Rad, Hercules, USA) untersucht und die ermittelte Größe mit der bereits bekannten Anzahl an Basenpaaren unserer gesuchten Sequenz verglichen. Bestand kein erheblicher Größenunterschied, wurde die Zielsequenz zur Klonierung in einen Vektor eingesetzt. Über eine DNA-Ligase wurde die Sequenz zwischen das sogenannte lacZ-Gen eingefügt (siehe unten).

Im nächsten Schritt wurde das Plasmid mittels Hitzeschock (42 °C, 50 sec) in *E. coli* Bakterien eingebracht, auf LB-Agar ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Falls die Zielsequenz zwischen das oben genannte lacZ-Gen eingefügt wurde, konnten auf der Agar-Platte weiße *E. coli* Kolonien festgestellt werden, da das lacZ-Gen nicht mehr intakt war (Abbildung 1).

Im intaktem Zustand setzt das lacZ-Gen ein Chromogen um, es zeigen sich charakteristische blaue *E. coli* Kolonien. Da jedoch unsere Zielsequenz diesen intakten Zustand unterbrochen haben sollte, sollten sich die Kolonien weiß darstellen und für uns darauf hinweisend sein, dass eine erfolgreiche Integration stattgefunden hat. Nun wurden die weißen Kolonien in ein Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Plasmid extrahiert und bei der Firma Eurofins (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Mit dem linearisierten und aufgereinigten Plasmid konnte eine Verdünnungsreihe für IFNAR1 angelegt und die Standardkurve ausgetestet werden (Abbildung 2).

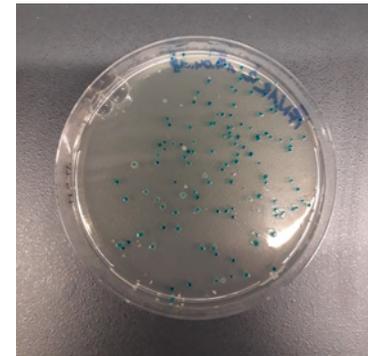


Abbildung 1: *E. coli* Bakterien nach Inkubation über Nacht auf LB-Agar. Zu erkennen sind blaue Kolonien (intaktes LacZ-Gen) sowie 2 weiße Kolonien (Zielsequenz wurde in lacZ-Gen eingefügt)

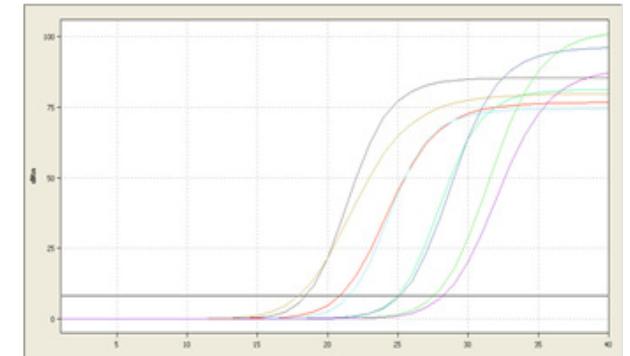


Abbildung 2: Standardkurve für Typ-I Interferon Rezeptor Untereinheit 1

Trotz diverser Versuche konnte für die zweite Rezeptoruntereinheit IFNAR2 jedoch keine Standardkurve etabliert werden. Durch die zeitliche Begrenzung des Projektes wurde lediglich mit der etablierten Standardkurve für IFNAR1 weitergearbeitet.

Im Folgenden wurde die Genexpression von IFNAR1 in den oben genannten endometrialen Biopsien bestimmt und mit Hilfe der Standardkurve absolut quantifiziert.

Ergebnisse und Ausblick

Anhand von 54 analysierten Proben ließ sich ein signifikanter Unterschied in der Expressionsrate des Rezeptors IFNAR1 zwischen Endometritis negativen Tieren (E_{neg}) und Tieren mit zytologisch positiver subklinischer Endometritis Tieren (SE_{cyto}) erkennen. Tiere mit histologisch positiver Endometritis (SE_{histo}) zeigten in Tendenz niedrigere Genexpression des IFNAR1 (Abbildung 3):

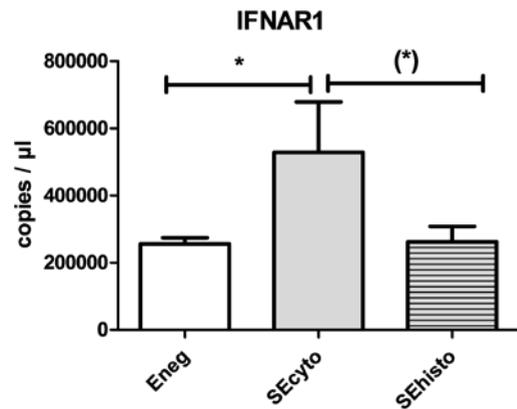


Abbildung 3: Genexpression der Typ-I Interferon Rezeptor Untereinheit 1 (IFNAR1) [copies / μ l] verglichen zwischen Endometritis negativen Tieren (E_{neg}), cytologisch Endometritis positiven Tieren (SE_{cyto}) sowie histologisch Endometritis positiven Tieren (SE_{histo}). * = $P < 0.01$, (*) = $P < 0.05$

Bei Tieren mit subklinischer Endometritis erscheint der Rezeptor hoch reguliert. Ein Grund dafür könnten lokale immunologische Prozesse sein, welche durch die subklinische Endometritis verursacht werden. Es bleibt zu vermuten, dass der Rezeptor möglicherweise durch andere Signale blockiert ist und nicht in ausreichender Weise für das korrekte Empfangen des embryonalen Signals zur Verfügung steht und somit keine adäquate embryo-maternale Kommunikation ermöglicht wird. Diese Theorie wird in weiteren Projekten überprüft und detaillierter untersucht.

Persönliche Erfahrung

Zuerst möchte ich hier gerne dem Team der Wiederkäuerklinik für die große Unterstützung bei diesem Projekt danken! Besonders geht ein herzlicher Dank an Sandra Kirsch, ohne die dieses Projekt nicht so auf die Beine hätte gestellt werden können, ebenso Dr. med. vet Marie Meyerholz. Auch ein großes Dankeschön geht an Dr. Dipl. Ing. Agr. Frank Weber. Außerdem möchte ich mich noch bei Simone Schabmeyer für ihre jederzeit motivierende Unterstützung bedanken.

Durch die Teilnahme an diesem VETResearch Projekt war es mir zum ersten Mal im Studium möglich, selbstständiges Arbeiten im Labor zu erlernen und Einblicke in den Bereich der Forschung zu erhalten. Nicht immer läuft alles wie geplant, aber mit jeder Sackgasse, in der man landet, öffnet sich ein neuer Weg. Dinge mehrfach zu probieren und Variablen zu ändern, um andere Lösungsansätze zu verfolgen oder um zu einem Ziel kommen zu können, all das ist das Spannende daran.

Dass es VETResearch Projekte gibt, ist eine große Bereicherung für die Fakultät und jeden Studenten und ich hoffe sehr, dass zukünftig noch viele weitere Studenten diesen tollen Erfahrungszuwachs und die interessanten Einblicke in Forschung und Laborarbeit haben können.

Aussagekraft verschiedener diagnostischer Methoden zur Progesteronbestimmung

Alena Katharina Rüscher

Klinik für Wiederkäufer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Betreuer: Dr. Frank Weber

Hintergrund

Die Zyklusstandfeststellung beim Rind erfolgt üblicherweise durch die rektale Palpation sowie bildgebenden Verfahren (z.B. Ultraschall). Es wird angenommen, dass ein fühl- und sichtbares Corpus luteum auch sekretorisch aktiv ist.

In einer früheren Studie zur subklinischen Endometritis der Rinderklinik wurden bei Schlachttieren die Uteri auf Funktionskörper untersucht. Bei der Entblutung wurden Blutproben gezogen und der Progesteronwert mittels Enzym-Immuno-Assay bestimmt. In einzelnen Fällen passen die klinisch erhobenen Befunde (Ultraschall, rektale Palpation) nicht mit den gemessenen Blutwerten von Progesteron zusammen.

Beprobt wurde ein Bestand von 110 Kühen.

Testverfahren

Zur Progesteronbestimmung wurden verschiedene Testverfahren angewendet, zum einen ein Radio-Immuno-Assay (RIA), zum anderen ein Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Für den ELISA wurde jeweils ein monoklonaler Antikörper aus der Ratte und ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen verwendet. Es handelt sich um einen heterogenen kompetitiven ELISA, in dem freies Progesteron aus der Probe und enzymmarkiertes Progesteron um die freien Bindungsstellen der Sekundäntikörper konkurrieren. Nach der Zugabe von Substrat kommt es zu einem Farbumschlag von blauer zu gelber Farbe, bedingt durch enzymatische Spaltung.

Der RIA basiert auf dem Nachweis radioaktiv markierter Sekundäntikörper.

Ergebnisse

Bei der Auswertung wurden die Kühe je nach Zyklusstand in verschiedene Gruppen eingeteilt. Von den 110 Kühen hatten 38 Tiere ein Follikel, 47 Tiere waren in der Lutealphase, Follikel-Theka-Zysten hatten neun Tiere und Follikel-Lutein-Zysten hatten sieben Tiere.

Die Kühe der Gruppe „unklar“ mit fünf Tieren waren palpatorisch nicht eindeutig einzuteilen, z.B. hat die Kuh während der Untersuchung gepresst. Die y-Achse zeigt die Progesteronwerte in ng/ml, die x-Achse die Kuhnummern von 1 bis 110. Ab einem Wert von über 1 ng/ml ist ein aktiver Gelbkörper anzunehmen. Die geringste Nachweisgrenze für das Hormon liegt bei 0,25 ng/ml (untere Linie).

Tiere in der Lutealphase haben ein breites Spektrum, da sich der Gelbkörper im An-, Auf- oder Abbau befinden kann. Dies spiegelt sich auch in den Werten wieder.

Anschließend wurden die Werte aus den drei Tests mit den Ultraschallbildern der Funktionskörper verglichen. In einzelnen Fällen passen die Befunde nicht zu den gemessenen Progesteronwerten.

Zwischen den Testergebnissen gibt es Divergenzen, abhängig davon, welcher Test verwendet wurde. Am besten wäre der Nachweis mittels Massenspektroskopie.

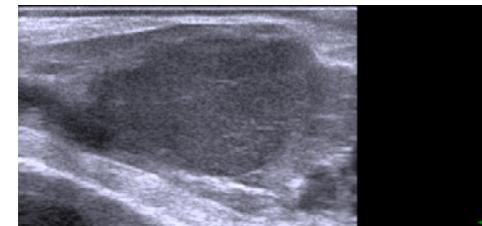
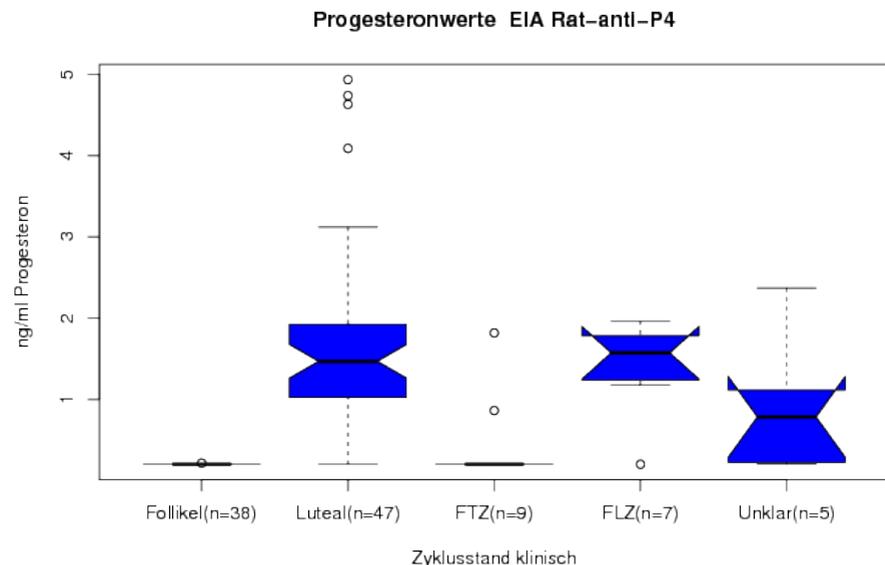


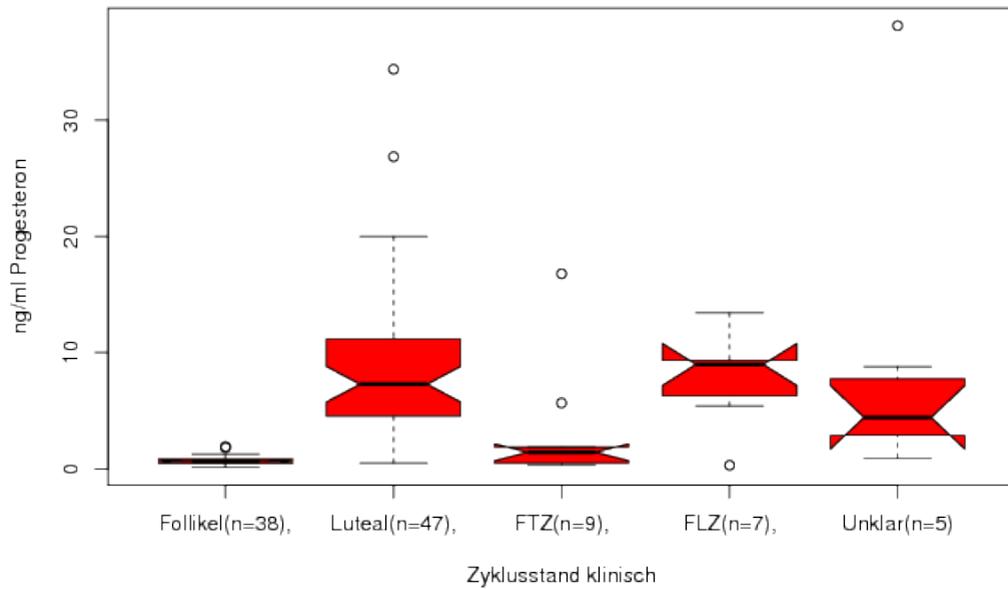
Abbildung 1: Kuh im Diöstrus
Rechtes Ovar mit Corpus luteum,
linkes Ovar kein Funktionsgebilde,
Zyklusstand: Diöstrus,
Portio ist geschlossen

Erwartung: hohe Progesteronwerte → Progesteronwerte sind jedoch in allen drei Tests sehr gering:

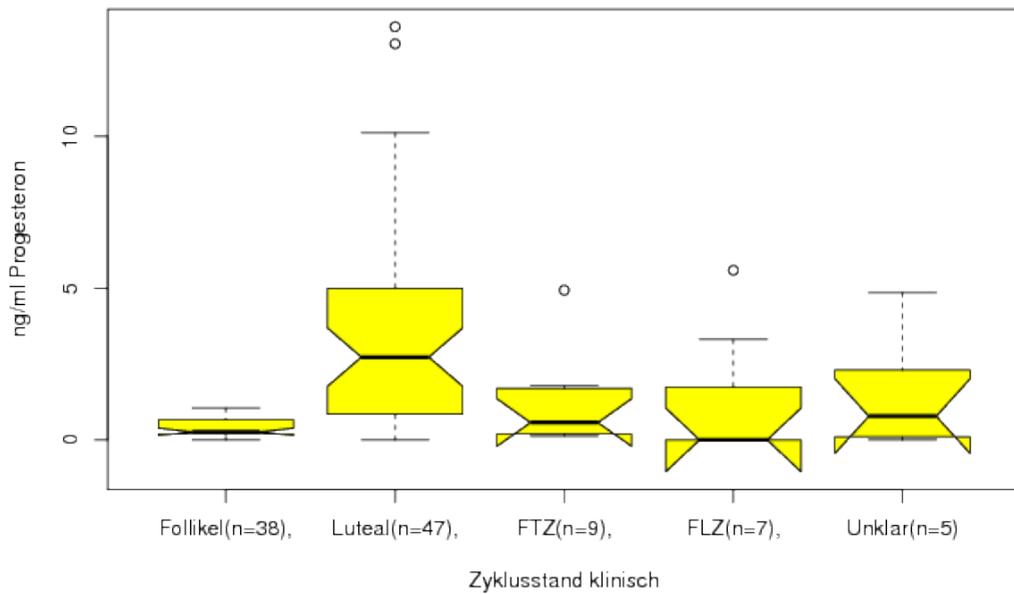
Test	ELISA Anti-rat IgG	RIA	ELISA Anti-rabbit-IgG
P4 (ng/ml)	0,2	0,49	0,2



Progesteronwerte RIA



Progesteronwerte Rabbit-anti-P4



Persönliche Erfahrung während des VETResearch Projektes

Während des Projektes hatte ich die Möglichkeit, selbstständig im Labor zu arbeiten und eigene Erfahrungen zu sammeln. Ich durfte das Projekt von der Planung bis zur Auswertung begleiten. Gelernt habe ich dabei sehr viel, von der Durchführung eines ELISAs bis hin zur Auswertung der Daten.

Ganz herzlich möchte ich mich für die tolle Unterstützung und Betreuung bei Herrn Dr. Weber sowie für die tatkräftige Hilfe im Labor bei Frau Kirsch und Frau Hartmann bedanken.

Etablierung einer Analysemethode zum Nachweis des Mykotoxins Swainsonin aus Futtermittelproben

Joana Merk

Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik¹, Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit²
Betreuer: Dr. Linda Böswald¹, Dr. Sebastian Ulrich², Dr. Christoph Gottschalk²

Einleitung

Am Lehrstuhl für Tierernährung wurden in den letzten Jahren vermehrt Pferde mit spezifischen Vergiftungssymptomen passend zum sogenannten „Slobbers-Syndrom“ vorgestellt. Die Tiere zeigten eine starke Hypersalivation, Gingivitis, Stomatitis und andere Läsionen der Maulschleimhäute, allerdings bei ungestörtem Allgemeinbefinden. Infektiöse oder toxische Ursachen wurden von den behandelnden Kollegen ausgeschlossen. Typischerweise waren mehrere, aber nicht alle Pferde eines Betriebs betroffen und die Symptome verschwanden spontan mehrere Tage bis Wochen nach Futterumstellung bzw. Einstellung des Weidegangs.

Das Slobbers-Syndrom wird in der amerikanischen Literatur (Rainey et al. 1965, Broquist 1985, Kagan 2016) mit den Mykotoxinen Slaframin und Swainsonin in Verbindung gebracht. Slaframin übt dabei parasymphomimetische Wirkungen vor allem an den muskarinergen M3-Rezeptoren aus (Chapa et al. 1995), was die exzessive Speichelbildung zur Folge hat, während Swainsonin durch Inhibition lysosomaler alpha-Mannosidasen zentralnervöse Symptome (Hypermetrie, Ataxie, Angstreaktionen) verursacht (Cheeke 1989).

Beide Indolizinalkaloide werden von dem Pilz *Rhizoctonia leguminicola* produziert. Dieser befällt Leguminosen, besonders Rotklee (*Trifolium pratense*), und verursacht dort schwärzliche Flecken und Löcher, die sogenannte „black patch disease“ (Hagler & Behlow 1981, Arnold & Smith 2015).

Fallberichte sind vor allem aus Südamerika (Borges et al. 2012, Fonteque et al. 2015) und den USA bekannt, wobei einzelne Berichte auch aus Europa stammen (Nollet et al. 2008, Wijnberg et al. 2009).

Bisher ist der Nachweis dieser Mykotoxine in Europa nicht etabliert, sodass der Verdacht auf eine Slaframin-/Swainsonin-Vergiftung nicht sicher bestätigt werden kann.



Abbildung 1: Pferd mit ausgeprägtem Speichelfluss (Foto: R. Hofmann)



Abbildung 2: Klee mit „black patch disease“ (Foto: J. Merk)

Material und Methoden

Für die Untersuchung wurden vor allem Heu- und Grasproben verwendet, entweder aus Rückstellproben des Lehrstuhls für Tierernährung (n = 4) oder aus aktuellen Einsendungen von Besitzern betroffener Tiere (n = 22 aus 18 Slobbers-Ausbrüchen). Alle Proben wurden einer Sinnenprüfung unterzogen, in der besonders auf Veränderungen des Hygienestatus geachtet wurde.

Mykologische Arbeit

Zur Untersuchung auf mögliche *Rhizoctonia* Spezies in den Futtermittelproben wurden von allen Proben ganze Pflanzenteile verwendet und jeweils auf Potato-Dextrose-Agar⁺ und Wasseragar⁺ Platten ausgelegt. Zusätzlich wurden teilweise Verdünnungsreihen der Proben verwendet. Nach Bebrütung bei 25 °C für 3-5 Tage wurden alle Platten mikroskopisch beurteilt. Interessante Isolate wurden mittels DNA-Analyse näher bestimmt.

Aus einer Probe konnte eine verwandte *Rhizoctonia solani* isoliert werden.

Bioanalytische Arbeit

Alle Proben wurden durch Trocknung und feines Vermahlen auf die anschließende Analyse vorbereitet. Die Extraktion löslicher Bestandteile aus den Futtermittelproben erfolgte mittels 2 %iger Ameisensäure und Abfiltrieren. Daraufhin wurden die Extrakte durch eine Kationenaustauschchromatografie weiter aufgereinigt, bevor alle Proben durch eine Kombination aus Flüssigkeitschromatografie und Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) auf Swainsonin hin analysiert wurden.

Ergebnisse

In der Sinnenprüfung fielen bei allen Heu- und Grasproben Veränderungen des Pflanzmaterials in Form von schwarzen/violetten Verfärbungen auf. In 8 Proben war Klee enthalten, der typische schwarze Punkte und kleine Löcher in den Blättern aufwies. Außerdem konnte bei 3 der gesammelten Proben ein Befall von Gras mit Mutterkorn, dem Sklerotium des Pilzes *Claviceps purpurea*, festgestellt werden. Eingesandte Proben von Kraftfutter und Getreide waren in der Sinnenprüfung unauffällig, sodass sie zunächst nicht in die Mykotoxin-Analytik aufgenommen wurden.

Es wurden 13 Proben nach der oben beschriebenen Methode auf Swainsonin analysiert. In zwei der Proben konnte Swainsonin nachgewiesen werden mit einer Konzentration von 128 ng/g TS und 60 ng/g TS.

Eine Analyse der am stärksten mit Mutterkorn belasteten Probe auf Ergotalkaloide (Labor Agrolab LUFA) ergab ein Wert von 118 mg/kg uS. Die Menge an Mutterkorn aus den anderen Proben reichte nicht aus, um diese ebenfalls zu untersuchen.

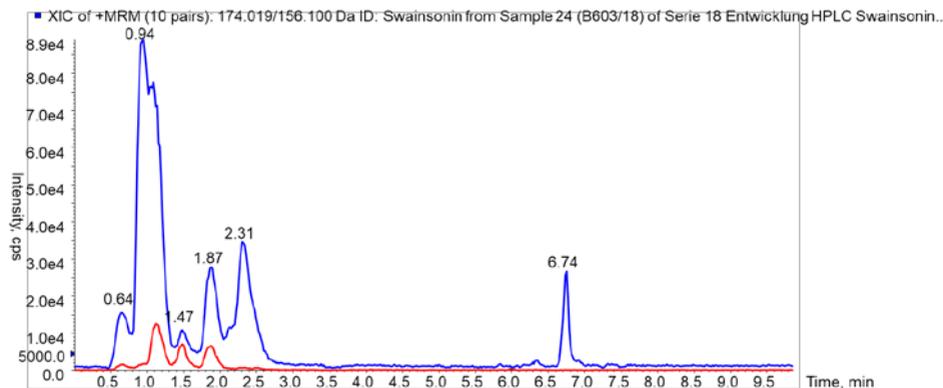


Abbildung 3: Chromatogramm einer Swainsonin-belasteten Probe: Bei einer Retentionszeit von 1,87 min zeigt sich in beiden Kurven der ionisierten Swainsonin-Fragmente (blau: 156 Da Molekülmasse, rot: 129 Da) ein deutlicher Peak

Zusammenfassung und Ausblick

Bei der Untersuchung hat sich gezeigt, dass Slobbers, verursacht durch die Mykotoxine von *R. leguminicola*, auch in Deutschland eine wichtige Differentialdiagnose darstellt bei Hyper-salivation, Stomatitis oder Schleimhautläsionen bei Pferden. Auch unklare ZNS-Symptome könnten sich durch die Wirkweise von Swainsonin auf diesen Pilz zurückführen lassen.

Zur zukünftigen Diagnostik wäre eine noch höhere Sensitivität der entwickelten Methode wünschenswert, wobei besonders die Aufreinigung der Proben effektiver gestaltet werden könnte.

Außerdem konnten die Mutterkornfunde in einigen Proben eine weitere mögliche Quelle der Vergiftungen aufzeigen. Da Ergotalkaloid-Vergiftungen sich in ähnlichen Symptomen äußern können (z.B. Aboling et al. 2016), besteht der Verdacht, dass einige der beschriebenen Fälle auch hiervon verursacht sein könnten. Dies bietet für die Zukunft ebenfalls einen Ansatzpunkt zur Diagnostik.

Persönliche Meinung

Mein Projekt hat mir nicht nur einen guten ersten Einblick in die Labordiagnostik vermitteln können, sondern ich hatte auch großen Spaß an meiner Arbeit. Spannend war für mich vor allem die Entwicklung des Projekts: Erst verschiedene Rückschläge und Ergebnisse, sowohl positive, als auch negative, haben zur Entwicklung der Methode und den Endergebnissen beigetragen und letztes Endes hat sich durch die Mutterkornfunde noch eine neue, unerwartete Richtung ergeben.

Ganz herzlich möchte ich mich bei beiden Lehrstühlen und ihren Mitarbeitern bedanken, ganz besonders bei Barbara Fritz, Helmut Ziemann und Florian Kaltner von der Lebensmit-

telsicherheit sowie bei meinen Betreuern Dr. Christoph Gottschalk und Dr. Linda Böswald für all die Unterstützung, Geduld und Hilfe bei meinem Projekt.

Insbesondere gilt mein Dank allen Patientenbesitzern, die das Projekt durch ihre Mitarbeit und Zusendungen erst in diesem Umfang ermöglicht haben.

Referenzen

- Aboling, S., Drotleff, A. M., Cappai, M. G., & Kamphues, J. (2016). Contamination with ergot bodies (*Claviceps purpurea sensulato*) of two horse pastures in Northern Germany. *Mycotoxin research*, 32(4), 207-219.
- Arnold, M., & Smith, S. (2015). Slaframine Toxicosis or "Slobbers" in Cattle and Horses. *Borges, A. S., Oliveira Filho, J. P., Simon, J. J., Palumbo, M. I. P., & Imerman, P. M. (2012). Slaframine toxicosis in Brazilian horses causing excessive salivation. Equine Veterinary Education*, 24(6), 279-283.
- Borges, A. S., Oliveira Filho, J. P., Simon, J. J., Palumbo, M. I. P., & Imerman, P. M. (2012). Slaframine toxicosis in Brazilian horses causing excessive salivation. *Equine Veterinary Education*, 24(6), 279-283.
- Broquist, H. P. (1985). The indolizidine alkaloids, slaframine and swainsonine: contaminants in animal forages. *Annual review of nutrition*, 5(1), 391-409.
- Chapa, A. M., Fernandez, J. M., Thompson, D. L., Tempelman, R. J., Berrio, L. F., Croom, W. J., & Hagler, W. M. (1995). Endocrine and metabolic response to muscarinic stimulation and inhibition in the ruminant: effects of slaframine. *Journal of animal science*, 73(12), 3673-3680.
- Cheeke, P. R. (1989). *Toxicants of plant origin: alkaloids* (Vol. 1). CRC Press.
- Fontequ, J. H., Souza, A. H., Schade, J., Muller, T. R., & Weinert, N. C. (2015). Slaframine intoxication in horse in Santa Catarina state. *Vet e Zootec*, 22, 375-9.
- Hagler, W. M., & Behlow, R. F. (1981). Salivary syndrome of slaframine in red clover hay. *Applied and environmental microbiology*, 42(6), 1067-1073.
- Kagan, I. A. (2016). Blackpatch of Clover, Cause of Slobbers Syndrome: A Review of the Disease and the Pathogen, *Rhizoctonia leguminicola*. *Frontiers in veterinary science*, 3, 3.
- Nollet, H.; Panter, K.; Vanschandevijl, K.; Lefere, L.; Stegelmeier, B.; Deprez, P. Suspected swainsonine poisoning in a Belgian horse. *Equine veterinary education* 2008, 20, 62-65.
- Wijnberg, I. D., Van Der Ven, P. J., & Gehrmann, J. F. G. (2009). Outbreak of salivary syndrome on several horse farms in the Netherlands.

Untersuchung der mikrobiellen Kontamination von Inhalationskammern für Katzen

Friederike Karoline Schröer

Medizinische Kleintierklinik¹, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen²

Betreuer: Dr. Bianka Schulz¹, Dr. Georg Wolf²

Wissenschaftlicher Hintergrund

Bei Hunden und Katzen mit chronischen Erkrankungen der unteren Atemwege (zum Beispiel felines Asthma oder chronische Bronchitis) werden häufig Aerosolvorschaltkammern („Inhalationskammern“) für die lokale Applikation von Medikamenten genutzt. Dabei handelt es sich in vielen Fällen um Glucocorticoide. Da meist eine langfristige Therapie notwendig ist, sind diese Inhalationskammern bei den Tierbesitzern dauerhaft im Einsatz. Die Hersteller empfehlen eine regelmäßige Reinigung und den Austausch der Kammern nach einem Jahr.

Studienziel

Im Rahmen dieses VETResearch Projektes sollte geprüft werden, inwiefern nach standardisierter Kontamination von Inhalationskammern eine angemessene Dekontamination realisierbar ist, welche Reinigungsmethoden dabei erfolgreich sind und ob es Unterschiede zwischen Kammern verschiedener Hersteller gibt.

Material und Methoden

Hierzu wurden die Kammern „RC Chamber“ (RC) (Cegla Medizintechnik) und „AeroKat“ (AK) (Trudell Medical International) verwendet. Da für AK nur eine Reinigungsmöglichkeit vom Hersteller vorgegeben wird, standen hier fünf Kammern für den Versuch zur Verfügung. Davon wurden vier kontaminiert, während eine als Negativkontrolle diente. Für RC werden zwei mögliche Reinigungswege genannt, weshalb insgesamt zehn Kammern zur Verfügung standen, je fünf pro Reinigungsverfahren. Davon wurden ebenfalls je vier kontaminiert und je eine als Negativkontrolle verwendet. Als Prüfkeim für die Kontamination diente *Pseudomonas aeruginosa* (siehe Abbildung. 1). *Pseudomonaden* sind gramnegative Stäbchen, die als Umweltkeime opportunistische Erreger sind und in der Human- und Tiermedizin als Krankenhauskeime bedeutsam sind.



Abbildung 1: Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* auf Müller-Hinton-Agar

Zunächst wurden die Kammern auf Keimfreiheit überprüft. Hierzu wurden direkt nach Öffnen der Verpackung Abstrichtupfer von den einzelnen Kammerbestandteilen (Maske, Adapter, Kammer) genommen und diese auf verschiedenen Nährböden ausgebracht sowie mit dem 3-Ösen Ausstrich verdünnt. Für die Kultur wurden CNA-Agar (Colistin-Nalixidinsäure-Agar), Bordetellen-Agar und Schafblut-Agar verwendet.

Die Platten wurden für drei Tage bebrütet (im Brutschrank bei ca. 37 °C), bevor das Ergebnis abgelesen werden konnte.

Im ersten Schritt der Kontamination wurde eine Verdünnungsreihe zur Bestimmung der kolonienbildenden Einheiten pro Milliliter Ausgangssuspension (CFU/ml) hergestellt (siehe Abbildung 2).

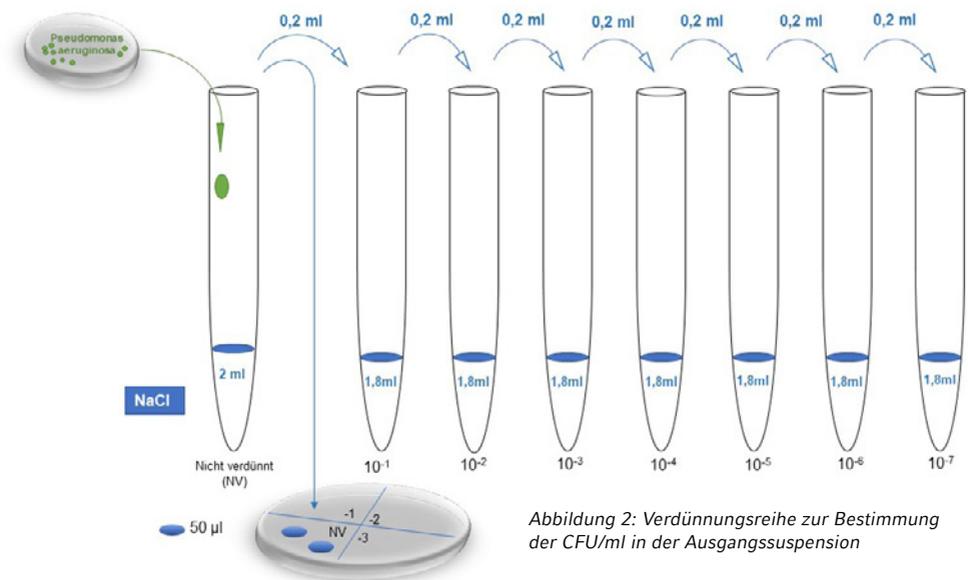


Abbildung 2: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der CFU/ml in der Ausgangssuspension

Die Agarplatten mit den Proben der einzelnen Verdünnungsstufen wurden für 24 h bebrütet, während die Ausgangssuspension (NV) direkt zur Kontamination der Kammern verwendet wurde. Für die Kontamination wurden je 50 µl der unverdünnten Bakteriensuspension aus der Verdünnungsreihe mithilfe einer Kolbenhubpipette mit steriler Pipettenspitze auf je zwei markierte Stellen pro Kammerbestandteil aufgetragen (siehe Abbildung 3).

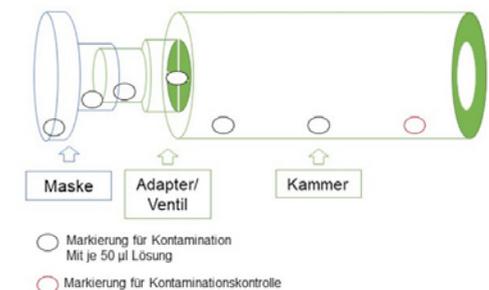


Abbildung 3: Schematische Darstellung der kontaminierten Stellen in der Inhalationskammer

Außerdem wurde in der Kammer zusätzlich eine dritte Stelle kontaminiert, die als Kontaminationskontrolle diente. Anschließend trockneten die Kammern und nach 24 h erfolgte zunächst die Probenentnahme von der Kontaminationskontrolle mittels Abstrichtupfer und direkt danach die Reinigung der Kammer. Diese Tupferprobe der Kontrollmarkierung wurde auf Müller-Hinton-Agar aufgebracht und für 24 h bebrütet, um den Erfolg der Kontamination zu gewährleisten.

Die Reinigung der Kammern erfolgte nach Herstellerangaben. Für AK wird eine Reinigung durch Einlegen der einzelnen Kammerbestandteile in lauwarmer Seifenlauge für 15 min empfohlen, dann ausschütteln und lufttrocknen. Für RC gibt es mehrere Möglichkeiten der Reinigung, wobei in dieser Studie nur zwei davon durchgeführt werden konnten, da die dritte Möglichkeit eine Reinigung in der Spülmaschine wäre, was aber unter Laborbedingungen und mit gezielter Kontamination aus hygienischen Gründen nicht durchzuführen war. RC kann entweder durch Ausspülen in kaltem Wasser und anschließendes Auskochen für 5 min in sprudelnd kochendem Wasser gereinigt werden oder in einem speziellen Beutel für die Mikrowelle (3 min bei 800 Watt), den man bis zu 20 Mal laut Hersteller wiederverwenden kann. In beiden Fällen sollten die Kammern anschließend ausgeschüttelt werden und an der Luft trocknen (kein Trockenreiben).

Nachdem die Kammern getrocknet waren, erfolgte die letzte Probenentnahme zur Überprüfung des Erfolges der Dekontamination. Hierzu wurden erneut Abstrichtupfer der einzelnen Kammerkompartimente (Maske, Adapter, Kammer) genommen und diese auf Müller-Hinton-Agar aufgebracht sowie 24 h bebrütet.

Ergebnisse

Kultivierung vor und nach Kontamination

Tabelle 1: Bakterienwachstum von *Pseudomonas aeruginosa* vor und nach Kontamination

AK	Bakterienwachstum auf Nährboden		RC	Bakterienwachstum auf Nährboden	
	vor	nach		vor	nach
1	-	+	1	-	+
2	-	+	2	-	+
3	-	+	3	-	+
4	-	+	4	-	+
5	-	Negativkontrolle	5	-	Negativkontrolle
			6	-	+
			7	-	+
			8	-	+
			9	-	+
			10	-	Negativkontrolle

Bei keiner Kammer konnte eine Kontamination nach Öffnen der Verpackung festgestellt werden (vor Kontamination). Nach der Kontamination (Abstrich von der Markierung zur Kontaminationskontrolle vor Reinigung) waren aus allen Kammern erfolgreich *Pseudomonas* isolierbar.

Kultivierung nach Reinigung

Tabelle 2: Bakterienwachstum von *Pseudomonas aeruginosa* nach Reinigung

AK	Bakterienwachstum auf Nährboden	RC	Bakterienwachstum auf Nährboden
1	-	1	-
2	-	2	-
3	-	3	-
4	-	4	-
5	Negativkontrolle	5	Negativkontrolle
		6	-
		7	-
		8	-
		9	-
		10	Negativkontrolle

Nach der Reinigung konnte bei keiner Kammer unabhängig von Produkt oder Reinigungsverfahren eine Kontamination nachgewiesen werden. Die Dekontamination war also in jedem Fall erfolgreich.

Daraufhin wurden weitere Versuche zur Dekontamination durchgeführt. Zunächst wurden RC Kammern auch (wie AK) nur in lauwarmer Seifenlauge gereinigt, anstatt sie auszukochen. Diese Methode war ebenfalls erfolgreich. Anschließend wurden AK und RC nur mit kaltem Wasser mit und ohne Spülmittel gereinigt, was nicht zu einer ausreichenden Dekontamination führte, da noch Bakterienwachstum in der Kammer nachweisbar war. Zuletzt wurden die Kammern beider Hersteller versuchsweise autoklaviert (121 °C, 1,1 bar, 25 min), was ohne Beschädigung oder Verformung der Kammerbestandteile möglich war.

Zusammenfassung

Eine angemessene Dekontamination von Inhalationskammern ist bei ordnungsgemäßer Reinigung möglich. Dadurch, dass in dieser Studie die Kammern lediglich einmalig kontaminiert und gereinigt wurden, lässt sich allerdings keine Aussage über langfristige Auswirkungen mehrmaliger Reinigung und Kontamination mit anderen oder mehreren Keimen gleichzeitig treffen. Eine Aufklärung der Besitzer über adäquate Reinigung ist besonders wichtig, da kontaminierte Inhalationskammern Ausgangspunkt für Erkrankungen der unteren Atemwege sein könnten.

Persönliche Erfahrungen

Das VETResearch Projekt durchzuführen, hat mir sehr viel Spaß gemacht und ich habe dabei viel über wissenschaftliches Arbeiten sowie die Arbeit im mikrobiologischen Labor gelernt.

Solche Forschungsprojekte kann ich künftigen Teilnehmern nur empfehlen, da man nicht nur Einblicke in Forschung und verschiedene Berufsbilder der Tiermedizin bekommt, sondern auch selbstständig und praktisch eine Studie durchführen kann, was für spätere größere Studien oder Projekte von Vorteil sein kann.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinen Betreuern bedanken, die das Projekt zum einen ermöglicht haben, und mir zum anderen das Vertrauen entgegen gebracht haben, dieses durchzuführen. Ich danke Frau Dr. Bianka Schulz und Vanessa De Simoi für ihre Unterstützung bei der Planung des Projekts und die Betreuung darüber hinaus. Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. Wolf für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung sowie den wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen im Institut für Mikrobiologie, Frau Himmler und Frau Nadler, die mich bei der Durchführung der mikrobiologischen Arbeiten unterstützt haben.

Erstellung einer Anleitung zum korrekten Bruststich bei der Straußenschlachtung

Christina Schwenk

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie¹,
Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit²

Betreuer: Prof. Dr. Johann Maierl¹, Dr. Sebastian Ulrich², Dr. Brigitte Sperner²

In Deutschland werden aktuell in etwa 2500 Strauße geschlachtet, Tendenz steigend. Die Schlachtung erfolgt meist am Erzeugerbetrieb, wobei die Durchführung überwiegend auf Erfahrungswerte gestützt ist, da eindeutige Richtlinien bisher fehlen. Um dies in Zukunft zu ändern und eine tierschutzgerechte und vereinheitlichte Vorgehensweise, vor allem im Hinblick auf die Entblutung, sicherzustellen, entstand das im Folgenden beschriebene Projekt.

Als Ausgangspunkt der Arbeit war es zuerst wichtig, herauszufinden,

- wie die Entblutung aktuell durchgeführt wird,
- ob sie schnell und tierschutzgerecht ist und
- welche Gefäße bei der Durchführung des Bruststiches eröffnet werden (Abbildung 1).

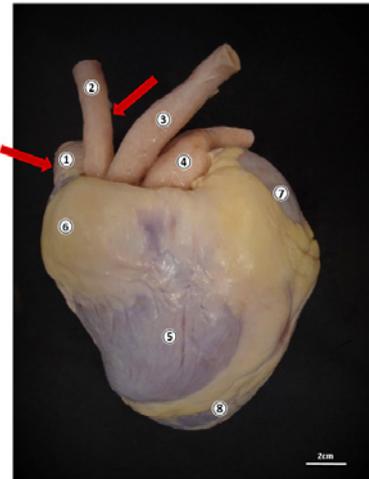


Abbildung 1: Herz eines Vogel Strauß (Ansicht von kranial)

- 1 – Aorta;
- 2 – Truncus brachiocephalicus dexter;
- 3 – Truncus brachiocephalicus sinister;
- 4 – Truncus pulmonalis;
- 5 – Ventriculus dexter;
- 6 – Atrium dextrum;
- 7 – Atrium sinistrum;
- 8 – Ventriculus sinister

Um dies herauszufinden, erfolgte zunächst ein Besuch auf einer der größten Straußenfarmen Deutschlands mit EU-zugelassener Schlachtung, bei dem die Entblutungsmethodik genau betrachtet werden konnte. Des Weiteren erfolgte eine anatomische Detailpräparation des Brusteinganges eines schlachtreifen Vogel Straußes, dessen arterielle Gefäße zuvor mit Latexmilch injiziert worden waren, um die Darstellung der herznahen Gefäße zu verbessern (Abbildung 2). Der dritte Teil des Projektes umfasste die Untersuchung und Präparation von am Schlachthof entnommenen Herzen, um die beim Bruststich durchtrennten Gefäße zu verifizieren.

Ergebnis

Anleitung als Richtlinie zur korrekten Ausführung des Bruststiches

Der Hautschnitt wird senkrecht in der Medianen über dem Brusteingang ausgeführt. Hierzu wird das Messer in einem ca. 10 cm langen Schnitt vom Sternum in Richtung Halsansatz geführt. Zur Durchtrennung der herznahen Gefäße wird nun das zweite Messer senkrecht zur Oberfläche mit halswärts gerichteter Schneide median in den Brusteingang eingeführt. Anschließend wird es um 90° gedreht, sodass die Schneide in Schnittrichtung auf die rechte Seite des Tierkörpers weist. Der Bruststich wird nun von median nach rechts lateral in einer horizontalen Viertelkreisbewegung ausgeführt (Abbildung 3).

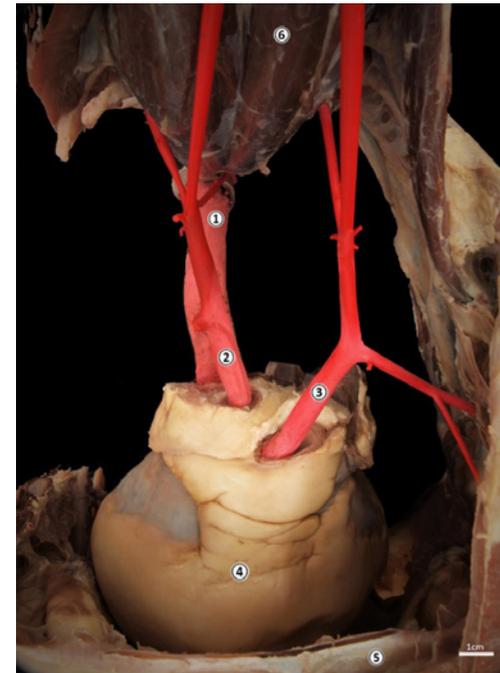


Abbildung 2: Darstellung der Blutgefäße am präparierten Herzen als Latexausguss nach Entfernung der Gefäßwände (Ansicht von kranial)

- 1 – Aorta;
- 2 – Truncus brachiocephalicus dexter;
- 3 – Truncus brachiocephalicus sinister;
- 4 – Herz;
- 5 – Sternum;
- 6 – Hals.

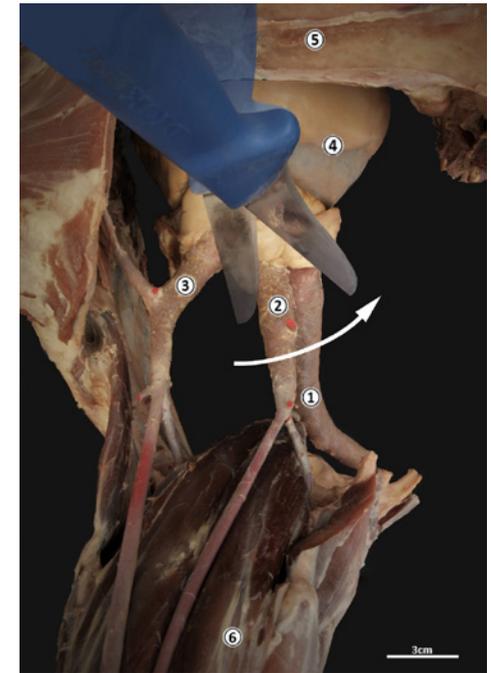


Abbildung 3: Blutgefäße am Brusteingang eines schlachtreifen Vogel Strauß (Ansicht von kranial). Der Tierkörper ist abgebildet mit nach unten hängendem Hals wie beim Schlachten.

- 1 – Aorta;
- 2 – Truncus brachiocephalicus dexter;
- 3 – Truncus brachiocephalicus sinister;
- 4 – Herz;
- 5 – Sternum;
- 6 – Hals.

Bei korrekter Durchführung kommt es zu einem schwallartigen Blutentzug, der beim Strauß wegen seiner schnellen Blutgerinnung für eine tierschutzgemäße rasche Entblutung von besonderer Wichtigkeit ist.

Beim Vergleich der am Schlachthof entnommenen Herzen mit dem mit Latexmilch injizierten Gefäßpräparat zeigte sich, dass sowohl die beim Vogel rechts verlaufende Aorta, als auch der rechte Truncus brachiocephalicus durchtrennt werden. Dadurch kommt es zu einer Eröffnung von Gefäßen mit einem Gesamtquerschnitt von etwa $4,1 \text{ cm}^2$, was zu dem erwünschten schnellen Blutentzug führt. Die Gefäßinnendurchmesser an isolierten Herzen vom Schlachthof betragen an der Aorta ca. $2,2 \text{ cm}$ und ca. $0,6 \text{ cm}$ für die beiden Trunci brachiocephalici. Es ist jedoch eine gewisse individuelle Varianz zwischen den Tieren zu berücksichtigen.

Zu beachten ist außerdem, dass es zwingend notwendig ist, die Stichrichtung nach rechts zu führen, da nur auf diese Weise die für den Vogel typische Rechtsaorta zusammen mit dem rechten Truncus brachiocephalicus eröffnet wird (Abbildung 3). Nur so ergibt sich beim schlachtreifen Vogel Strauß ein Gesamtquerschnitt der eröffneten Blutgefäße von ca. $4,1 \text{ cm}^2$ mit der für die Fleischhygiene geforderten schwallartigen Entblutung. Bei einer Stichrichtung nach links würde nur der linke Truncus brachiocephalicus durchtrennt werden mit einem Durchmesser von etwa $0,6 \text{ cm}$ und einer Querschnittsfläche von ca. $0,3 \text{ cm}^2$. Angesichts der raschen Blutgerinnung beim Strauß könnte dadurch die einwandfreie schnelle Entblutung erheblich beeinträchtigt werden. Das bedeutet, dass sowohl Links-, als auch Rechtshänder den Stich immer nach rechts ausführen müssen.

Persönliche Meinung

Insgesamt hat mir das Projekt mit seinen verschiedenen Teilaspekten sehr gut gefallen und mich um viele Erfahrungen bereichert. Besonders interessant waren zum einen die Gefäßpräparation an einem so ungewöhnlichen Tier wie dem Vogel Strauß, zum anderen der Besuch auf einer der größten Straußenfarmen Deutschlands und die Möglichkeit, dort den Schlachtvorgang hautnah mitzuerleben. Das Projekt hat mir außerdem einen schönen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten gewährt. Vor allem das Erstellen der Präparataufnahmen hat mir gezeigt, wie wichtig akkurates Arbeiten in diesem Bereich ist und wie viel Zeit und Mühe in einem Bild steckt, bevor es publiziert werden kann.

Für die einzigartigen Erfahrungen und die vielseitige Unterstützung möchte ich mich bei meinen Betreuern Herrn Prof. Dr. Johann Maierl und Herrn Dr. Sebastian Ulrich herzlich bedanken.