

Entwicklung und Verfahren zum direkten Nachweis von *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* aus Rohmilch (Herdensammelmilch- und Einzelgemelksproben)

| | |
|--------------------------|--|
| Koordinierung: | Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn |
| Forschungsstelle: | Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover Institut für Mikrobiologie Zentrum für Infektionsmedizin Prof. Dr. G.-F. Gerlach |
| Industriegruppe: | Milchindustrie-Verband e.V., Bonn |
| | Projektkoordinatorin: Dr. G. Runge Milchindustrie-Verband e.V., Bonn |
| Laufzeit: | 2003 – 2005 |
| Zuwendungssumme: | € 141.800,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI) |

Ausgangssituation:

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (MAP) ist der Erreger der Paratuberkulose (Johne'sche Krankheit) und ist prävalent in allen Wild- und Hauswiederkäuern; weltweit entstehen durch die Paratuberkulose in der Landwirtschaft große wirtschaftliche Verluste. Die Rolle des Erregers in der Pathogenese des humanen Morbus Crohn ist noch nicht geklärt. So heißt es in einer von Sachverständigen gebilligten Pressemitteilung des BGVV vom 21.9.2001: „Die Experten schätzten einen ursächlichen Zusammenhang als eher unwahrscheinlich ein. Sie hielten es aber durchaus für denkbar, dass der Erreger der Johne'schen Krankheit, das *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, das Krankheitsbild von Morbus Crohn verschlimmern und bei einem Teil der Patienten möglicherweise ein mit auslösender Faktor gewesen sein könnte. Die Fachleute waren sich einig, dass die vorliegenden Daten für eine abschließende gesundheitliche Risikoabschätzung nicht ausreichen.“ (www.verbraucherministerium.de, Tierseucheninformation). An dieser Einschätzung hat sich bis heute nichts geändert. Bekannt ist weiterhin, dass Mykobakterien bei immunsupprimierten Personen durch MAP verursacht werden können.

MAP zeichnet sich durch eine außergewöhnlich hohe Tenazität aus und kann sowohl die Käseherstellung als auch die Pasteurisierung überleben. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die MAP-Erregerlast in Milch durch die Pasteurisierung um mindestens 4 bis 5 log-Stufen reduziert wird.

Bis dato besteht die einzige Möglichkeit eines sicheren Erregernachweises in der kulturellen Anzucht von MAP; diese ist aber aufgrund des erforderlichen Zeitraums (mehrere Monate) und der Schwierigkeit der Erregerkultivierung aus Milch für Stufenkontrollen in der Milchindustrie ungeeignet. Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, Schnellverfahren für den direkten Nachweis von MAP auf Basis eines Peptidvermittelten „Capture“ aus Milch zu etablieren.

Forschungsergebnis:

Das in Vorarbeiten der Forschungsstelle aus einer Phagen-Peptid-Bibliothek isolierte Peptid aMptD wurde auf seine Eignung als diagnostischer Ligand überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass aMptD spezifisch für MAP ist und keine Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien zeigt. Zudem konnte gezeigt werden, dass aMptD mit hoher Affinität an MAP-Membranen bindet und demzufolge die Kriterien für einen

Liganden in einem diagnostischen Test erfüllt. So kann der Erreger mittels Peptid-vermittelter „Capture“-PCR, basierend auf dem MAP-spezifischen Element ISMav2, in Milch nachgewiesen werden. Die Peptid aMptD-vermittelte „Capture“-PCR ermöglichte neben dem Nachweis von nur 100 Erregern pro Milliliter künstlich kontaminierter Milch auch den reproduzierbaren Erregernachweis in Milchproben von infizierten Kühen und in Sammelmilchproben von serologisch positiven Herden. Da die Peptid-vermittelte „Capture“-PCR ausschließlich auf standardisierten Reagenzien basiert, könnte sie somit auch für die routinemäßige Untersuchung von Sammelmilchproben eingesetzt werden. Der Einsatz in der Routine-Diagnostik wird durch die grundsätzliche Automatisierbarkeit des Verfahrens unterstützt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der „Capture“-PCR mit den Ergebnissen eines Hoftanksammelmilch-ELISA korrelieren. Der Einsatz dieser beiden unabhängigen Testsysteme in einem Zwei-Stufen-Programm würde die kostengünstige Kontrolle und Überwachung der Paratuberkulose in Milchviehbeständen ermöglichen; so ergibt sich auf der Basis der durchgeführten Untersuchungen, dass die in einer kostengünstigen Voruntersuchung mittels Hoftanksammelmilch-ELISA als unverdächtig befundenen Herden mit 95 %iger Sicherheit keine starken MAP-Ausscheider enthalten; die kostenintensivere Untersuchung dieser Hoftanksammelmilch-Proben mittels PCR könnte also in diesen Herden entfallen. Weiterhin würden diese unverdächtigen Herden eine relativ sichere Quelle für den Zukauf von Tieren in Herden darstellen, die Tiere aufgrund von Paratuberkulose aussortiert haben.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Milch und Milchprodukte stellen innerhalb der EU einen erheblichen Wirtschaftsfaktor dar. So betrug der Gesamtumsatz der deutschen Milchbranche im Jahr 2004 20 Mrd. Euro und machte damit etwa 20 % des Gesamtumsatzes der Lebensmittelbranche aus. Dabei wird durch umfangreiche Eigenkontrollen sichergestellt, dass nur Milch von gesunden Tieren zur Herstellung von Konsummilch und Milchprodukten verarbeitet wird.

Weiterhin wird Milch zur routinemäßigen Untersuchung auf das Vorhandensein von Erregern anzeigepflichtiger Tierseuchen benutzt; so werden in regelmäßigen Abständen Untersuchungen auf Brucellose und Leukose an Hoftanksammel-

milch durchgeführt. Dieser Ansatz könnte mit dem vorgestellten Verfahren erweitert werden und - bei Mitarbeit der Milcherzeuger - eine wirtschaftlich durchführbare Kontrolle und Überwachung der Paratuberkulose in den Erzeugerbetrieben ermöglichen, was zu einer dauerhaften und anhaltenden Reduktion des Erregereintrags in die Umwelt führen würde. Damit würde eine Reduktion der durch die Paratuberkulose verursachten wirtschaftlichen Einbußen erreicht.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2005.
2. Stratmann, J., Dohmann, K., Heinzmann, J. und Gerlach, G.-F.: Peptide aMptD-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bulk milk samples. Appl. Environ. Microbiol. 72, ISSN 0099-2240, 5150-5158 (2006).
3. Stratmann, J. und Gerlach, G.-F.: Paratuberkulose-Erreger, Erkrankung und Diagnostik (Übersichtsartikel). Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle 12, ISSN 0945-3296, 108-113 (2005).
4. Stratmann, J., Strommenger, B., Goethe, R., Dohmann, K., Gerlach, G.-F., Stevenson, K., Li, L., Zhang, Q., Kapur, V. und Bull, T.J.: A 38-kilobase pathogenicity island specific for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* encodes cell surface proteins expressed in the host. Infect Immun. 72, 1265-1274 (2004).
5. Stratmann, J., Beyerbach, M., Strutzberg-Minder, K. und Homuth M.: Untersuchung der Tankmilch zur Diagnose der bovinen Paratuberkulose. Vet-Med Report, Sonderausgabe V7, 28. Jg. Berlin, ISSN 0934-3148 (2004).

Weiteres Informationsmaterial:

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Institut für Mikrobiologie
Zentrum für Infektionsmedizin
Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover
Tel.: 0511/ 856-7598, Fax: 0511/ 856-7697
E-Mail: gferlach@gmx.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150
E-Mail: fei@fei-bonn.de