

Nachweis und Kontrolle von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* zur Sicherung der Produktqualität in milchverarbeitenden Betrieben

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Universität München Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch Prof. Dr. Dr. Erwin Märtlbauer/Dr. Andrea Stockmaier-Didier
Forschungsstelle II:	Universität München Lehrstuhl für Tierphysiologie Prof. Dr. Cornelia Deeg
Industriegruppe(n):	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin Projektkoordinator: Rudolf Kaiser Zott SE & Co. KG, Mertingen
Laufzeit:	2015 – 2018
Zuwendungssumme:	€ 499.920,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) ist der Erreger der Paratuberkulose bei Wiederkäuern und steht im Verdacht, an der Entstehung von Morbus Crohn in Humanpatienten beteiligt zu sein. Die Paratuberkulose ist durch eine lange Latenzphase charakterisiert, in der die klinisch unauffälligen Tiere massiv Bakterien über den Kot ausscheiden. Somit steht die gesamte Herde unter einem hohen Infektionsdruck, zumal MAP über lange Zeit in der Umwelt persistieren kann. Die Milch der Tiere kann entweder direkt sekretorisch oder indirekt postsekretorisch mit MAP kontaminiert und das Bakterium so in die Lebensmittelkette eingetragen werden. Die Fähigkeit von MAP, den Pasteurisierungsprozess zu überleben, erweitert die geschilderte Problematik unter dem Aspekt der Lebensmittelsicherheit und des Verbraucherschutzes.

Derzeit sind keine zuverlässigen und schnellen Nachweis-Systeme verfügbar, um vermehrungsfähige MAP in geringen Keimzahlen im Lebensmittel nachzuweisen. Auch sind die verfügbaren, serologischen Testsysteme nicht geeignet, latent infizierte Tiere

zu erfassen oder Risikotiere zu erkennen. Daher stoßen auch die derzeit praktizierten Bekämpfungsprogramme an ihre Grenzen.

Ziel des Forschungsvorhabens war deshalb die Etablierung eines schnellen und praxistauglichen Testsystems zum Nachweis von MAP in Milch sowie zur Erkennung von Risikotieren.

Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Projekts wurden umfangreiche Proteom- und Sekretom-Datensätze von MAP erhoben. Es konnte gezeigt werden, dass das Bakterium in Milch andere Proteine exprimiert als in klassischen mikrobiologischen Kulturmedien. Zudem wurden zahlreiche Proteine detektiert, deren Expression und Sekretion erstmalig im Rahmen dieses Vorhabens bewiesen werden konnten. Gegen einen Faktor (PonA1) wurden mittels Peptidimmunisierung monoklonale Antikörper erzeugt, die zur Diagnostik eingesetzt werden können. Ebenso wurden gegen MAP gerichtete, monoklonale Antikörper und ein Antiserum generiert, das in einem indirekten ELISA eingesetzt werden kann. Da

beim Vorliegen geringer Keimzahlen in einer Probe zusätzliche Anreicherungs-schritte notwendig sind, um die Bakterien zu konzentrieren, wurden mehr als 30 Pflanzenlektine auf ihre Fähigkeit getestet, MAP zu binden. Mit dem Bananenlektin (BanLec) konnte eine Komponente identifiziert werden, die eine hohe Bindungsfähigkeit an MAP besitzt und gleichzeitig kaum eine unspezifische Bindung an Milchbestandteile aufweist. BanLec erscheint somit zur Anreicherung von MAP aus Milchproben geeignet. Als zusätzliches Diagnostikwerkzeug wurde eine Real-time-PCR etabliert, mit der 2×10^2 MAP/ml Milch nachgewiesen werden können. Eine Lebend/tot-Unterscheidung mittels PCR ist ab einem Gehalt von 25 % lebenden Zellen in der Probe möglich.

Von in vitro mit MAP infizierten Rindermakrophagen konnten ebenfalls umfangreiche Proteomdaten gewonnen werden. Auch hier zeigten sich deutlich unterschiedliche Reaktionsmuster je nachdem, ob die Makrophagen von Kontrolltieren oder von Kühen mit einem immundevarianten (ID) Phänotyp gewonnen wurden. In Makrophagen der Kontrolltiere wurden vor allem solche Faktoren hochreguliert, die mit einer Erregereliminierung assoziiert werden. In den Makrophagen der ID-Rinder werden Proteine gefunden, die eine Erregerpersistenz begünstigen. Diese Beobachtung zeigte sich auch bei der Untersuchung von Realproben aus einem MAP-positiven Bestand. Weitere Untersuchungen dieser Tiere ergaben zudem, dass die derzeit verfügbaren serodiagnostischen Systeme keine zuverlässigen Testergebnisse liefern und somit ein Innovationsbedarf auf diesem Gebiet besteht.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die deutsche Milchindustrie ist die leistungsstärkste Branche innerhalb der Lebensmittelindustrie (ca. 20 Mrd. € Umsatz jährlich, Exportwert 3,9 Mrd. €). Die stetige Erweiterung des Produktangebots (300 Neuerungen jährlich) und innovative Produktionsmethoden stellen die erzeugenden Betriebe vor erhebliche hygienische Herausforderungen hinsichtlich bakterieller Kontaminanten.

Auf Ebene der milcherzeugenden Betriebe wird die Prävalenz von MAP in Tankmilch

weltweit mit 4-22 % beziffert und stellt sich in Deutschland in einer ähnlichen Größenordnung dar. Die wirtschaftlichen Einbußen durch Leistungsabfall, Tierverluste und Remontierungskosten sind erheblich.

Über den durch MAP bundesweit entstehenden Schaden existieren keine statistischen Erhebungen, allerdings werden die wirtschaftlichen Schäden als erheblich betrachtet. Neben direkten Schäden für die landwirtschaftliche Primärproduktion kann vor allem auch eine Kontamination von Milch mit MAP nicht ausgeschlossen werden. In Hinblick auf den hohen Qualitätsstandard deutscher Milcherzeugnisse und als vorbeugende Maßnahme im Rahmen des Verbraucherschutzes ist es deshalb oberstes Ziel, den Eintrag potentieller Risikofaktoren in die Produktionskette zu vermeiden.

Die Entwicklung und Etablierung schneller und zuverlässiger Nachweissysteme tragen dazu bei, den hohen Qualitätsstandard von Milch und Milchprodukten zu sichern und zu verbessern. Die Ergebnisse des Vorhabens sichern die Wettbewerbsfähigkeit der Produktion, Verarbeitung und Vermarktung tierischer Lebensmittel und leisten einen wesentlichen Beitrag zur Sicherung bestehender und zur Schaffung neuer Arbeitsplätze in Deutschland.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2018.
2. Hobmaier, B. F.: Charakterisierung von Pflanzenlektinen bezüglich ihrer Eignung zur Anreicherung von *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* aus Milch. Dissertation Universität München (2020).
3. Kleinwort, K.J.H., Hauck, S.M., Degroote RL, Scholz A.M., Hölzel C., Märtlbauer, E. & Deeg, C.: Peripheral blood bovine lymphocytes and MAP show distinctly different proteome changes and immune pathways in host-pathogen interaction. Peer J. 2019 Nov. 25; 7:e8130. doi: 10.7717/peerj.8130. eCollection (2019).
4. Hobmaier, B.F., Lutterberg, K., Kleinwort, K.J.H., Mayer, R., Hirmer, S., Amann, B., Hölzel, C., Märtlbauer, E. & Deeg, C.: Characterization of plant lectins for their ability to isolate *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* from milk. Food

- Microbiol. 82, 231-239. doi:
10.1016/j.fm.2019.02.009. Epub (2019).
5. Feltl, E.: Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* mittels Antikörper-basierter Testsysteme. Dissertation Universität München (2019).
 6. Mayer, R.: Molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mit Fokus auf Milchproben. Dissertation Universität München, (2018).
 7. Feltl, E., Dietrich, R., Mayer, R., Bassitty, R., Hölzel, C. & Märtlbauer, E.: Antikörper-basierter Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis*. Arbeitstagung der DVG-Fachgruppe Lebensmittelhygiene, Amtstierärztlicher Dienst, Sonderausgabe, 26.09. - 29.09.2017, 145 (2017).
 8. Lutterberg, K.: Unterschiedliche Immunkapazitäten beim Rind nach polyklonaler Stimulation. Dissertation Universität München (2017).
 9. Bassitta, R. et al.: Unterscheidung zwischen *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis* (MAP) und apathogenen Mykobakterien mittels PCR-SSCP-Analyse. Arbeitstagung der DVG-Fachgruppe Lebensmittelhygiene, Amtstierärztlicher Dienst, Sonderausgabe, 27.09. – 30.09. 2016, 221 (2016).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität München
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
Schönleutner Str. 8
85764 Oberschleißheim
Tel.: +49 89 2180-78601
Fax: +49 89 2180-78602
E-Mail: e.maertlbauer@mh.vetmed.uni-muenchen.de

Universität München
Lehrstuhl für Tierphysiologie
Arbeitsgruppe Deeg
Veterinärstr. 13, 80539 München
Tel.: +49 89 2180-1630
Fax: +49 89 2180-2554
E-Mail: deeg@tiph.vetmed.uni-muenchen.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via

