

Untersuchungen zur Eignung von ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Tankmilchproben

LUTZ GEUE¹, HEIKE KÖHLER², WOLFGANG KLAWONN³, KLAUS DRÄGER³, R. GÜNTER HESS³ UND FRANZ J. CONRATHS¹

¹Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Institut für Epidemiologische Diagnostik Wusterhausen

²Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Standort Jena

³Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Fachbereich Tiermedizin, Institut für Tiergesundheit und tierärztliche Umwelthygiene Koblenz

1. Problemstellung

Die Paratuberkulose stellt in Deutschland ein zunehmendes Problem dar, das zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten führt. Deshalb ist es wünschenswert, Konzepte zu erarbeiten, auf deren Basis zumindest die Gefahr der Verschleppung der Erkrankung in bisher freie Bestände/Regionen verringert werden kann. Dabei stellt sich jedoch zugleich die zentrale Frage nach der Höhe des Durchseuchungsgrads der deutschen Rinderbestände mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Map). Um diese Frage beantworten zu können, bedarf es eines bundesweiten Monitorings zur Abschätzung der Herdenprävalenz in Milchviehherden, das jedoch nur auf der Basis von Tankmilchproben finanziell vertretbar wäre. Ob Tankmilchproben als Probenmaterial überhaupt in Frage kommen, kann jedoch erst nach einer Validierung von serologischen Tests beantwortet werden. Aus diesem Grund beauftragte BMVEL die BFAV Wusterhausen, eine Studie zur Validierung der für Milchproben zugelassenen kommerziellen ELISAs auf der Basis von Tankmilchproben vorzunehmen. Die ersten Ergebnisse dieser Studie sowie Schlussfolgerungen für weiterführende Arbeiten werden im Folgenden dargestellt.

2. Material und Methoden

2.1. Betriebe und Milchproben

In die Studie wurden 79 Milchviehbetriebe aus Rheinland-Pfalz sowie 2 schwedische Milchviehherden einbezogen. Die Einordnung der Betriebe entsprechend ihrem Paratuberkulose-Status erfolgte nach den diagnostischen Befunden der Einzeltiere aus den Beständen. Die in die Studie einbezogenen Betriebe werden seit über 4 Jahren durch das LUA Koblenz in Bezug auf Paratuberkulose diagnostisch überwacht.

Aus 44 Betrieben liegen direkte Nachweise von Map vor. Diese 44 Betriebe erhielten den Status „**Paratuberkulose-positiv**“. Ausschließlich blutserologisch positive Befunde mittels MAP-ELISA bei Einzeltieren liegen aus 26 Betrieben vor. Der Status dieser Betriebe wurde als „**Paratuberkulose-serologisch-positiv**“ definiert. Definiert negativ waren 6 Betriebe aus Rheinland-Pfalz sowie die beiden schwedischen Betriebe (Status: „**Paratuberkulose-negativ**“). Aus 4 Betrieben liegen nur Befunde mittels Ziehl-Neelsen-Färbung vor. Weil mit dieser diagnostischen Methode lediglich der Befund „säurefeste Stäbchen“ möglich ist und somit auch andere Mykobakterien angefärbt worden sein könnten, wurde diesen Betrieben der Status „**Paratuberkulose-fraglich**“ zugewiesen.

Aus den 79 Betrieben aus Rheinland-Pfalz wurden durch den Landeskontrollverband 136 Tankmilchproben im Rahmen der Milchkontrolle gezogen. Zusätzlich wurden in nahezu allen Betrieben Einzelmilchproben (mehr als 4000) gewonnen, die den Betrieben eindeutig zugeordnet werden können. Aus den beiden schwedischen Betrieben liegen nur Einzelmilchproben vor. Aus diesen Einzelmilchproben wurden definierte Poolmilchproben hergestellt.

2.2. Kommerzielle ELISA-Testkits

Es standen zwei im Handel erhältliche ELISA-Testsysteme zur Verfügung. Der durch die Firma IVD GmbH Hannover vertriebene Testkit der schwedischen Firma Svanovir (SVANOVIR Ptb-ELISA) ist ein in Deutschland zugelassenes System zum Nachweis von Antikörpern gegen Map in Blutserum und Milch von Rindern. Die Zulassung für Milch gilt für Einzeltierproben. Als zweiter diagnostischer Testkit wurde auf Wunsch des Herstellers der durch IDEXX Scandinavia (Schweden) in der Entwicklung befindliche „M.pt. Milk test kit“ in die Validierung einbezogen. IDEXX vertreibt in Deutschland bisher nur ein Testsystem zum Nachweis von Antikörpern gegen Map in Blutserum. Der in dieser Studie verwendete Milch-Testkit stellt einen Prototyp dar, der zurzeit nur für Forschungszwecke verwendet werden kann. Die Test-Durchführung erfolgte entsprechend der Anweisungen der Hersteller im Doppelansatz der Proben. Die Auswertung richtete sich ebenfalls nach den Kriterien der Hersteller.

2.3. Methoden zur Bestimmung eines cut-off

Die Beurteilung der Ergebnisse beider Tests erfolgte zunächst anhand der von den Herstellern vorgesehenen Grenzwerte (cut-offs). Da diese cut-offs jedoch für Einzelmilchproben validiert sind, wurde anschließend versucht, cut-offs für die Systeme auf Basis der Tankmilchproben zu errechnen, wobei der jeweilige Paratuberkulose-Status der Herde (des Betriebes) zugrunde gelegt wurde. Für die

Bestimmung optimierter cut-offs wurden Two Graph Receiver-Operating-Characteristic (TG-ROC)-Analysen angewendet. Zum Vergleich der Übereinstimmung der beiden ELISAs wurden Kappa-Statistiken durchgeführt.

3. Ergebnisse und Schlussfolgerungen

In die Studie konnten fast ausschließlich kleine bis mittlere Milchviehbetriebe einbezogen werden. Die Betriebsgrößen spiegeln zwangsläufig die Struktur der Rinderhaltung im Land Rheinland-Pfalz wider. Da aber vor allem in den neuen Bundesländern, aber auch in Niedersachsen teilweise wesentlich größere Betriebe existieren, sind Schlüsse, die sich aus dieser Studie ziehen lassen, in dieser Hinsicht nicht notwendigerweise zu verallgemeinern.

Die von uns in der Studie eingesetzte Probenart der Tankmilch stellt sich als ein schlecht zu definierendes Medium dar. Es variiert nicht nur die Anzahl der Einzelgemelke, die in einem solchen Tank gesammelt werden, sondern bedingt durch die unterschiedlich hohen Milchleistungen der einzelnen Kühe auch die Milchmenge je Kuh. Damit ist die Tankmilch nur sehr eingeschränkt mit den im Labor hergestellten Poolmilchproben zu vergleichen, bei denen sowohl die Anzahl als auch das Volumen der Einzelmilchproben genau definiert werden kann. Bedingt durch die unterschiedlichen Volumenanteile von Einzelgemelken und die zum Teil erheblich variierende Anzahl an Einzelmilchproben in der Tankmilch, muss auch von unterschiedlich hohen Verdünnungseffekten der nachzuweisenden Antikörper gegen Map in der Tankmilch ausgegangen werden. Da bedingt durch den Charakter und die Pathogenese der Paratuberkulose sowie den jeweiligen Infektionsstatus des Betriebes außerdem damit zu rechnen ist, dass der Anteil an Kühen, die Antikörper gegen Map in der Milch besitzen, stark schwanken kann, ist mit einem unterschiedlich hohen Verdünnungseffekt dieser Antikörper in der Tankmilch zu rechnen. Logischerweise nimmt dieser Verdünnungseffekt zu, je mehr Einzelgemelke in die Tankmilch eingehen, wenn der Anteil an Kühen, die Antikörper in der Milch ausscheiden, entsprechend gleich bleibt.

Die Ergebnisse beider ELISA sind für die Bewertung der Tankmilchproben in Bezug auf den definierten Status der jeweiligen Betriebe ernüchternd. Zieht man die Bewertungskriterien der Hersteller heran, werden zwar von beiden Testsystemen alle Tankmilchproben aus den 8 Betrieben mit dem Status „**Paratuberkulose-negativ**“ auch als negativ bewertet, Tankmilchproben aus den 44 Betrieben mit dem Status „**Paratuberkulose-positiv**“ werden jedoch nur zu einem geringen Anteil als positiv erkannt. Mit dem Svanovir-ELISA kann nur ein Betrieb (2,3%) als positiv eingeordnet werden. Bezieht man die fraglichen Ergebnisse aus 6 Betrieben mit ein, erhöht sich der Anteil auf 15,9% Paratbc-verdächtiger Betriebe (fraglich + positiv), das heißt 37 Betriebe mit dem Status „**Paratuberkulose-positiv**“ wären unerkannt geblieben. Nicht viel besser sieht die Bilanz für die Ergebnisse mit dem IDEXX-ELISA aus. Mit diesem Testsystem werden 2 Betriebe (4,6%) als positiv erkannt, fragliche Ergebnisse wurden in 6 weiteren Betrieben ermittelt. Somit beträgt der Anteil an Paratbc-verdächtigen Betrieben 18,2%, ein Ergebnis das ähnlich unbefriedigend ist wie bei dem anderen Testsystem. Allerdings werden vom IDEXX-ELISA die gleichen 6 Betriebe mit dem Status „**Paratuberkulose-positiv**“ als positiv bzw. fraglich bewertet, wie die vom Svanovir-ELISA erkannten. Von den 26 Betrieben mit dem Status „**Paratuberkulose-serologisch-positiv**“ lassen die Ergebnisse mit dem Svanovir-ELISA in den Tankmilchproben aus 5 Betrieben (19,2%) die Bewertung fraglich zu. Der IDEXX-ELISA erkennt einen Betrieb als positiv und 5 weitere Betriebe als fraglich. Somit wird ein Anteil von 23,1% der Betriebe mit dem Status „**Paratuberkulose-serologisch-positiv**“ als Paratbc-verdächtig erkannt. Geht man davon aus, dass auch Herden, bei denen nur serologische Nachweise von Para-Tbc-Antikörpern erfolgten und kein Erregernachweis stattfand, als Paratbc-infizierte Betriebe anzusehen sind, sind die Ergebnisse mit beiden ELISA-Systemen somit nicht befriedigend. Alle Tankmilchproben aus den 4 Betrieben mit dem Status „**Paratuberkulose-fraglich**“ werden von beiden Testsystemen als negativ bewertet.

Bei den Betrieben, die mehrere Tankmilchproben eingesandt hatten, zeigten die Untersuchungen, dass nicht alle Tankmilchproben eines Bestandes zwangsläufig einheitlich reagieren. Vielmehr scheint dies bei den Betrieben, in denen eine Tankmilchprobe abweichend von der negativen Bewertung reagierte, sogar eher die Ausnahme zu sein. Diese Erkenntnis deutet darauf hin, dass die Kühe, die Antikörper gegen Map bilden, heterogen im Betrieb verteilt sind oder aber nur vereinzelt vorkommen.

Das bedeutet, dass stets alle Proben eines Betriebes in die Untersuchungen einbezogen werden müssen, um überhaupt eine Chance zu haben, einen Paratuberkulose-positiven Betrieb erkennen zu können.

Weil davon auszugehen ist, dass die Test-Hersteller ihre cut-offs für Einzelmilchproben eingestellt haben, wurde versucht, die ELISAs für Tankmilchproben neu zu validieren und dabei auch für Tankmilchproben optimierte Grenzwerte (cut-offs) zu finden. Als Grundlage wurde der Paratuberkulose-Status der jeweiligen Betriebe gewählt. Die Variante, bei der nur die Betriebe mit dem Status „**Paratuberkulose-negativ**“ auch als nicht infiziert angesehen wurden und alle anderen Betriebe als Paratuberkulose-infiziert betrachtet wurden, dürfte der wahren Paratuberkulose-Situation in den untersuchten Beständen am nächsten kommen. Bei dieser Variante konnte mit dem Svanovir-ELISA eine überdeckte Fläche von ca. 0,7 in der ROC-Kurve erzielt werden. Mit dem IDEXX-ELISA wird nur ROC-Kurve-Flächen um die 0,5 berechnet. Die Fläche unter der ROC-Kurve kann als Maß für

die Leistungsfähigkeit eines Tests herangezogen werden. Je näher der Wert bei 1,0 liegt, umso besser der Test.

Die Einstellung eines brauchbaren cut-offs gestaltete sich schwierig. Wird eine hohe Spezifität beim Svanovir-ELISA zu Grunde gelegt, lässt sich keine akzeptable Sensitivität mehr erzielen. Dabei lassen sich mit einer Sensitivität von 32,3% bei einer Spezifität von 100% noch die besten Ergebnisse erreichen. Wird der cut-off nur eine Klasse tiefer angesetzt (prozentualer Probenwert < 10%), steigert man die Sensitivität zwar auf einen ebenfalls nicht akzeptablen Wert von 57%, senkt aber die Spezifität auf 67%. Das für den Svanovir-ELISA Gesagte gilt gleichermaßen auch für den IDEXX-Test. Die unbefriedigenden Ergebnisse für das Verhältnis von Sensitivität und Spezifität spiegeln sich auch in den Vorhersagewerten wieder. Auch wenn die positiven Voraussagewerte in allen Fällen hoch lagen, erreichen die negativen Voraussagewerte keine 20%, in vielen Fällen nicht einmal einen Wert von 10%.

Alle Ergebnisse dieser Studie stellen die Brauchbarkeit beider Testsysteme für die Untersuchung von Tankmilchproben in Frage. Bezieht man außerdem in die Schlussfolgerungen ein, dass für den Svanovir-ELISA bei Einzelmilchproben auch nur eine Sensitivität von ca. 60% im Vergleich zu den blutserologischen Einzeltieruntersuchungen diskutiert wird (WINTERHOFF et. al., 2002) und die blutserologischen Untersuchungen resultierend aus der Spezifität der Pathogenese dieser Erkrankung ebenfalls nur eine begrenzte Sensitivität bei Einzeltieruntersuchungen aufweisen, scheinen die zur Verfügung stehenden Testsysteme für die Herdendiagnostik aus Tankmilchproben zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht geeignet zu sein.

Der jeweilige Status der Betriebe wurde auf der Basis von Untersuchungen der vergangenen 4 Jahre vorgenommen. Wie gut dieser Status die gegenwärtige tatsächliche Paratuberkulose-Situation in den jeweiligen Betrieben widerspiegelt, kann nicht genau ausgesagt werden. Die Frage, ob durch die oben beschriebenen Bedingungen in den Tankmilchproben der Anteil von Antikörpern gegen Map in vielen Proben unter eine für die Testsysteme nicht nachweisbare Grenze verdünnt wird, oder ob in vielen Betrieben mit dem Status „**Paratuberkulose-positiv**“ bzw. „**Paratuberkulose-serologisch-positiv**“ zurzeit der Probenahme möglicherweise keine Kühe standen, die Antikörper gegen Map bildeten und dass somit der Status unberechtigt war oder ob die Testsysteme aber für eine Herdendiagnostik auf der Basis von Tankmilchproben tatsächlich einfach ungeeignet sind, kann mit dieser Studie nicht abschließend beantwortet werden und bedarf somit einer genaueren Klärung. Dazu sind weiterführende Untersuchungen unter anderem zur Paratuberkulose-Inzidenz in den einzelnen Betrieben nötig. Für solche Untersuchungen können die Einzelmilchproben, die aus fast allen Betrieben vorliegen, herangezogen werden.

Zusätzlich zu den weiterführenden Studien könnten durch die Testhersteller Überlegungen angestellt werden, wie die Sensitivität ihrer Systeme möglicherweise weiter erhöht werden kann. Dazu sollten Strategien wie z.B. die Konzentrierung von Antikörpern überprüft werden.

4. Literatur

WINTERHOFF, C., BEYERBACH, M., HOMUTH, M., STRUTZBERG, K., GERLACH, G.-F. (2002): Etablierung und Evaluation eines ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Milch. Dtsch. Tierärztl. Wschr., 109. 230-234.