

# DVG-Konsiliarlabor für *Corynebacterium pseudotuberculosis*

## Aufgaben und Herausforderungen

Reinhard Sting, Birgitta Polley, Lisa Schneider-Bühl, Jörg Rau



© Holger Axt, SHGD Freiburg



© Holger Axt, SHGD Freiburg



© Wolfram Rietschel, Pflerdeklinik Kirchheim

Abb. 1: Abszesse des *Ln. retropharyngeus lateralis* und *Ln. mandibularis* bei einer Ziege (oben), des *Ln. parotideus* eines Schafs (Mitte) und in der Haut sowie Arthritis bei einem Dromedar (unten) durch *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Am 01.07.2018 wurde das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Stuttgart von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) zum Konsiliarlabor für *Corynebacterium pseudotuberculosis* ernannt. Im Folgenden stellt es sich und seine Arbeit vor.

Seit über 20 Jahren beschäftigt sich Dr. Reinhard Sting am CVUA Stuttgart mit *Corynebacterium pseudotuberculosis* (CPS), dem Erreger der Pseudotuberkulose [1]. Zahlreiche Publikationen, Forschungsprojekte, Doktorarbeiten und die enge Zusammenarbeit mit Kolleginnen und Kollegen in vielen Ländern sowie die Tätigkeit als Gutachter für einschlägige Fachjournals machen ihn und das CVUA Stuttgart zu gefragten Ansprechpartnern rund um das Thema CPS. Die über Jahre aufgebauten Sammlungen von Seren und Bakterienisolaten wurden bei der Etablierung hauseigener und kommerzieller Tests u. a. zum serologischen Nachweis von CPS intensiv genutzt.

In der diagnostischen Abteilung des CVUA Stuttgarts arbeiten in den Bereichen Bakteriologie, Serologie, Molekularbiologie und Pathologie 10 Tierärztinnen und Tierärzte sowie 25 technische Mitarbeitende eng zusammen. Hier findet sich ein hoch engagiertes und fachlich kompetentes Team, das sich leidenschaftlich für die Qualitätssicherung der Erregerdiagnostik einsetzt und gemeinsam zur Erfüllung der Aufgaben und Ziele des Konsiliarlabors beiträgt.

## Klinischer Exkurs

Corynebakterien sind keulenförmige, grampositive Bakterien mit einem komplexen Zellwandaufbau, der ihnen ein Überleben in der Umwelt und im Wirt ermöglicht. Der Erreger der Pseudotuberkulose, *Corynebacterium (C.) pseudotuberculosis*, ist ein potenzieller Produzent des Diphtherietoxins. Er wird daher zusammen mit den Erregern der klassischen Diphtherie, *C. diphtheriae* und *C. belfantii*, sowie dem Zoonoseerreger *C. ulcerans* im European Diphtheria Surveillance Network (EDSN) überwacht.

Ein zentraler Virulenzfaktor und diagnostisch wichtiges Antigen von CPS ist das Enzym Phospholipase D (PLD). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Verbreitung des Erregers im Körper mittels Makrophagen sowie bei der Ent-

stehung von Abszessen. Auf andere Tiere wird der Erreger meistens bei Wundinfektionen übertragen. Im Verlauf der Pseudotuberkuloseerkrankung führt die Bildung der eitrigen Abszesse in den oberflächlichen und inneren Lymphknoten zum klinischen Bild der Lymphadenitis caseosa, engl. caseous lymphadenitis, CLA (**Abb. 1**). Erkrankte Tiere zeigen eine langsam fortschreitende Verschlechterung des Gesundheitszustands mit Abmagerung und Leistungsabfall, die bis zum Tode führt („thin ewe syndrome“). Eine Heilung ist praktisch nicht möglich, da die in den Abszessen eingekapselten Erreger einer Antibiotikatherapie nicht zugänglich sind. Die Pseudotuberkulose kommt weltweit vor und ist eine der wichtigsten bakteriellen Infektionskrankheiten bei kleinen Wiederkäuern sowie zunehmend auch bei Kameliden.

Nach erfolgreicher Bekämpfung der Capri- n Arthritis-Enzephalitis (CAE) der Ziegen ist es das nächste Ziel, die Pseudotuberkulose in Deutschland in den Ziegenzuchtbetrieben zu tilgen. Dies ist ein lang andauernder Prozess mit besonderen Herausforderungen an die Diagnostik, da sich in einer Herde neben klinisch erkennbar infizierten Tieren ein nicht unbedeutender Anteil subklinisch infizierter Tiere verbirgt (sog. „iceberg-disease“). Deshalb sollte zur sicheren Aussage für das Einzeltier auch immer der Status der gesamten Herde bekannt sein. Neben der klinischen Untersuchung mit Palpation der Lymphknoten ist die laborgestützte Diagnostik (Pathologie, Bakteriologie, Serologie) ein wesentliches Element einer wirksamen Pseudotuberkulosebekämpfung.

## Aufgaben des Konsiliarlabors

Seit Inkrafttreten des Tiergesundheitsgesetzes (TierGesG) im Mai 2014 müssen kommerzielle Testkits zur Untersuchung auf Pseudotuberkulose gemäß § 11 TierGesG nicht zugelassen werden, da es sich nicht um eine anzeige- oder meldepflichtige Tierkrankheit handelt. Hierdurch besteht für diese Testkits ein Bedarf an externer Qualitätssicherung, die wir als Konsiliarlabor übernehmen. Wir testen regelmäßig definierte Seren mit den verfügbaren und vorgestellten Testsystemen und sind dabei auch in engem Kontakt mit den Herstellern. So sichern wir eine gleichbleibende Qualität der kommerziellen Diagnostika. Ein im CVUA Stuttgart etablierter und validierter ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) [2,3] steht uns als zusätzliches Diagnostikum zur Verfügung.

Um auch zwischen den Laboratorien ein vergleichbares und hohes Niveau der Diagnostik zu gewährleisten, richtet das Konsiliarlabor unter der Leitung von Dr. Reinhard Sting und Dr. Birgitta Polley regelmäßig Laborvergleichsuntersuchungen (LVU) zum direkten und indirekten (serologischen) Erregernach-

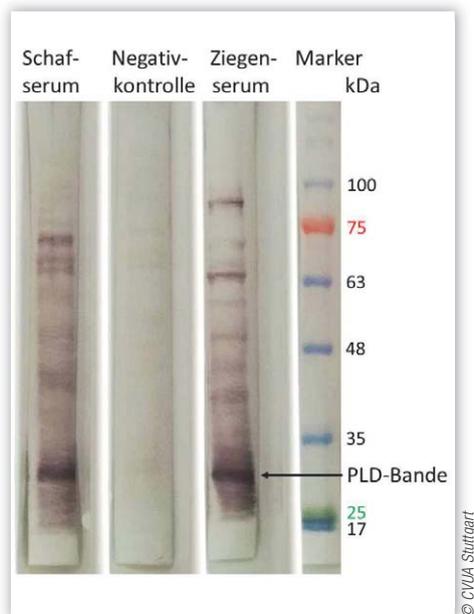


Abb. 2: Nachweis von Antikörpern gegen *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Ganzzell-extrakt) mittels Immunoblot.

weis aus. Unsere im Jahr 2019 durchgeführte erste LVU mit 22 Teilnehmern aus vier Ländern stieß auch über Deutschland hinaus auf großes Interesse. Die sehr guten und weitgehend übereinstimmenden Ergebnisse haben gezeigt, dass sowohl der direkte als auch der indirekte Nachweis von CPS in allen teilnehmenden Laboratorien fast immer sicher gelingt. Es zeigte sich, dass die verwendeten ELISA-Tests für den Nachweis von Antikörpern gegen CPS bei Schafen, Ziegen und Kameliden überwiegend gut geeignet sind. Deutlich wurde auch, dass die Identifizierung von CPS-Isolaten in fast allen Laboratorien mit hoher Sicherheit gelingt. Der breite Einsatz der MALDI-TOF MS (Matrix-assisted Laser Desorption/ionization time-of-flight Massenspektrometrie) wirkt sich hier positiv aus.

Zur Validierung oder Verifizierung stellen wir auf Anfrage gerne definiertes Referenzmaterial zur Verfügung.

## Weiterentwicklung der Diagnostik

Als labordiagnostische Grundlage der Sanierungsprogramme stehen nach wie vor serologische Tests und deren Weiterentwicklung im Vordergrund [1,2,3,4]. Die größte Herausforderung stellt hierbei die besondere Eigenschaft von CPS dar, sich intrazellulär zu vermehren. Dadurch kann es sein, dass Antikörper erst spät oder nur sehr schwach gebildet werden. Wichtig ist deshalb der sensitive und spezifische Nachweis von Antikörpern gegen CPS. Die Verwendung verschiedener ELISAs hat sich dabei in unseren Untersuchungen als sehr hilfreich erwiesen.

Auch die Immunoblot-Technik zeigt in der Pseudotuberkulosedagnostik vielversprechende Ansätze als sensitive und spezifische

Methode [1,5]. Dabei ist es möglich, Antikörperreaktionen mit spezifischen CPS-Antigenen sichtbar zu machen (**Abb. 2**). Das Verfahren wird zurzeit im Konsiliarlabor etabliert und soll zukünftig für spezielle Fragestellungen eingesetzt werden (Zuchttiere, Handel, Sanierungsbetriebe). Als Ansprechpartner bei der Abklärung unklarer serologischer Ergebnisse steht das Konsiliarlabor gerne mit dem Einsatz zusätzlicher Methoden zur Verfügung.

Darüber hinaus sind der direkte Nachweis von CPS aus Abszessmaterial und eine eindeutige Identifizierung differenzialdiagnostisch infrage kommender Bakterien wichtig. Hierbei erweist sich die MALDI-TOF MS als ein sehr hilfreiches Werkzeug (**Abb. 3**). Zur Ergänzung von kommerziellen Diagnostikdatenbanken werden eigene Referenzspektren wie auch Einzelspektren zur Validierung über einen direkten Austausch zur Verfügung gestellt. Ermöglicht wird dies durch die kostenfreie MALDI-User-Plattform „MALDI-UP“ (<https://mal-di-up.ua-bw.de>) [6].

Weiterhin sind Untersuchungen per FT-IR (Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie), Sequenzierungen des 16S rRNA- und *rpoB*-Gens sowie der Einsatz der qPCR im CVUA Stuttgart etabliert und kommen regelmäßig zur Charakterisierung von *Corynebacterium*-Isolaten zum Einsatz [7]. Zukünftig soll auch die weiterführende Charakterisierung von CPS-Isolaten mittels Vollgenomsequenzierung etabliert werden. Im CVUA Stuttgart ist durch die enge Zusammenarbeit der verschiedenen Abteilungen und Bereiche ein großes diagnostisches Angebot realisiert.

## Aufbau einer zentralen und umfangreichen Isolate- und Serumsammlung

Über die Jahre hinweg konnte am CVUA Stuttgart durch die zahlreich eingesandten Proben eine große Sammlung von Seren und Isolaten aufgebaut werden. Sie steht nun für Referenz- und Kontrollmaterial bei der Routinediagnostik und bei Laborvergleichsuntersuchungen zur Verfügung. Neben CPS-Isolaten und -Seren unterschiedlicher Herkunft (Tierart, Region) gibt es auch eine umfangreiche Sammlung von weiteren verschiedenen Corynebakterien und verwandten Bakteriengattungen zur Weiterentwicklung u. a. der CPS-Differenzialdiagnostik mithilfe molekularbiologischer und spektroskopischer Methoden.

## Fachliche Beratung

Ergänzt werden die Aufgaben des Konsiliarlabors durch die beratende Tätigkeit für Tierärzte, Tiergesundheitsdienste, Tierhalter und Zuchtverbände rund um die Diagnostik der Pseudotuberkulose und die Sanierung von Herden.

So haben der Schafherdengesundheitsdienst Baden-Württemberg, die Universität Hohenheim und der Ziegenzuchtverband

Baden-Württemberg zusammen mit dem CVUA Stuttgart bereits vor der Ernennung zum Konsiliarlabor eine Richtlinie zur Bekämpfung der Pseudotuberkulose in Ziegenbeständen erstellt, die seit 2016 in Kraft ist und die Grundlage der Pseudotuberkulosebekämpfung in Baden-Württemberg bildet [4].

### Ausblick

Für eine erfolgreiche Arbeit als Konsiliarlabor für *Corynebacterium pseudotuberculosis* sind wir auf die Hilfe von und die Zusammenarbeit mit der Tierärzteschaft angewiesen. Uns ist daher der Dialog mit praktizierenden Tierärzten, Untersuchungslaboratorien, Tiergesundheitsdiensten, Veterinärämtern und Tierhaltern sehr wichtig.

Die Einsendung von Blutproben, von CPS-Isolaten und ungewöhnlichen Bakterienisolaten für Abklärungsuntersuchungen ist uns daher sehr willkommen. Besonders wertvoll sind Abszessmaterial und Serumproben desselben Tieres. Dankbar sind wir auch für Zusendungen von CPS-Isolaten und Seren für den weiteren Ausbau der Isolate- und Serum-sammlung. Bei Fragen wenden Sie sich gerne an uns.

### Danksagung

Wir danken Claudia Geiger für ihre ausgezeichnete Arbeit bei der Umsetzung der Immunoblot-Technik. Juliane Rieger danken wir für die hervorragende Arbeit bei der Etablierung eines Inhouse-ELISA sowie für ihren umfangreichen Beitrag bei der Erstellung dieses Artikels.

### Literatur

[1] Sting R, Steng G, Spengler D (1998): Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats using enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Med B* 45, 209–16.

[2] Sting R, Wagner B, Turan AS, Stermann M, Reule M, Eichner M, Beyer W (2012): Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats in Baden-Wuerttemberg (Germany) and seroreactions on antigens used for newly developed enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). *Berl Muench Tieraerztl Wochenschr* 125, 67–75. DOI: 10.2376/0005-9366-125-67.

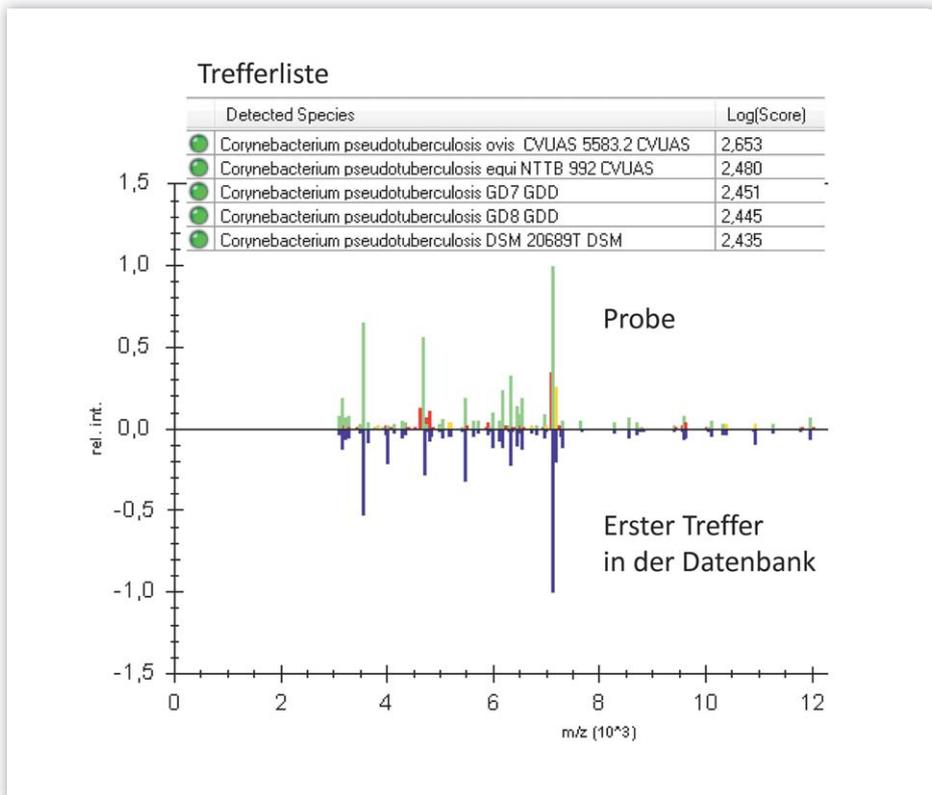


Abb. 3: MALDI-TOF MS-Mustervergleich mit Referenzspektren am Beispiel des Feldisolats „*C. pseudotuberculosis* CVUAS 3353“ (Ziege, Abszess).

[3] Sting R, Schneider-Bühl L, Wagner H, Maget J, Polley B, Bürstel D, Axt H (2017): Clinical and serological investigations on caseous lymphadenitis in goat breeding herds in Baden-Wuerttemberg. *Berl Muench Tieraerztl Wochenschr* 130, 136–143. DOI 10.2376/0005-9366-16024.

[4] Ziegenzuchtverband Baden-Württemberg (2016): Richtlinie des Ziegenzuchtverbandes Baden-Württemberg zur Bekämpfung der Pseudotuberkulose in Ziegenbeständen. [www.ziegen-bw.de](http://www.ziegen-bw.de).

[5] Hoelzle LE, Scherrer T, Muntwyler J, Wittenbrink MM, Philipp W, Hoelzle K (2013): Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. *Vet Microbiol* 164, 359–65. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.02.031.

[6] Rau J, Eisenberg T, Männig A, Wind C, Lasch R, Sting R (2016): MALDI-UP – An internet platform for the exchange of MALDI-TOF mass spectra. *Aspects of Food Control and Animal Health* 01, 1–17.

[7] Rau J, Eisenberg T, Peters M, Berger A, Kutzer P, Lassnig H, Hotzel H, Sing A, Sting R, Contzen M (2019): Reliable differentiation of a non-toxigenic tox gene bearing *Corynebacterium ulcerans* variant frequently isolated from game animals using MALDI-TOF MS. *Vet Microbiol* 237, 108399. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.108399.

### Korrespondierende Autoren

#### Dr. Reinhard Sting



Fachtierarzt für Mikrobiologie, Tel. +49 711 3426-1693, reinhard.sting@cvas.bwl.de

#### Dr. Birgitta Polley



Fachtierärztin für Mikrobiologie, Tel. +49 711 3426-1661, birgitta.polley@cvas.bwl.de