

4. Resultate

Detektionsrate und Gram-Status

Die Detektionsrate von Erregern war mit dem emma qPCR-System und Test C am höchsten (90,9% und 94,3%), gefolgt von der klassischen Mikrobiologie (79,5%). Test A und B wiesen eine deutlich geringere Nachweisfähigkeit auf (28,4% und 40,9%; siehe Abbildung 2a).

Der Anteil an Nachweisen von grampositiven Bakterien war beim emma qPCR-System, klassischer Mikrobiologie und Test C ähnlich (77,3%, 65% und 78,4%), während Test A und B deutlich weniger ergaben (28,4% und 27,3%). Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Anteilen gramnegativer Bakterien festgestellt (Test C 15,9%; klassische Mikrobiologie 14,8%, emma qPCR und Test B 13,6%). Mit Test A ist kein Nachweis gramnegativer Bakterien möglich (siehe Abbildung 2b).

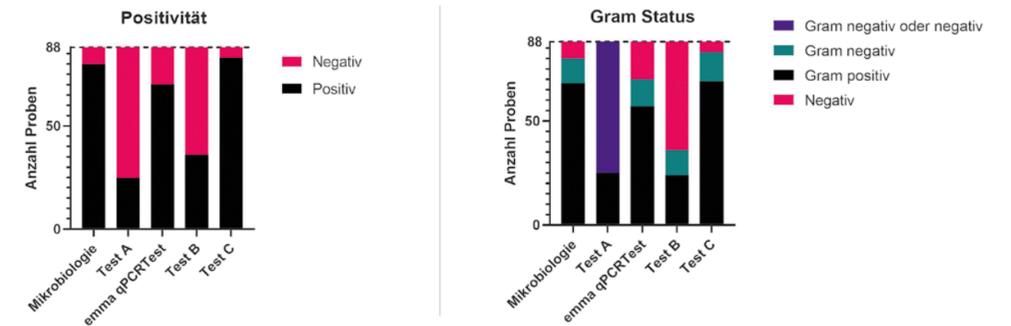


Abbildung 2 a) Detektionsraten der verschiedenen Methoden.

Die klassische Mikrobiologie, das emma qPCR-System und Test C erzielten eine deutlich höhere Detektionsrate als Test A und B.

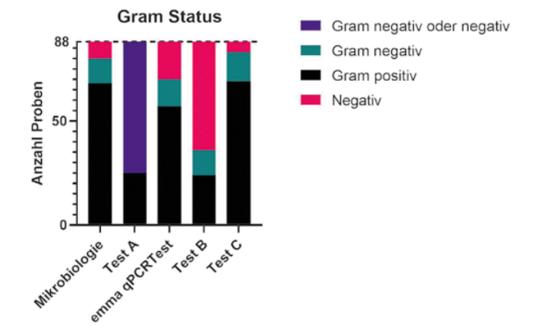


Abbildung 2 b) Gram-Status der nachgewiesenen Erreger.

Test A kann nicht zwischen negativen und gramnegativen Testergebnissen unterscheiden, während bei den übrigen vier Testmethoden kein signifikanter Unterschied im Anteil der gramnegativen Testergebnisse festgestellt wurde. Die klassische Mikrobiologie, das emma qPCR-System und Test C detektierten deutlich mehr grampositive Erreger als Test A und B.

Erregeridentifikation

Das emma qPCR-System, die klassische Mikrobiologie und Test C liefern Testergebnisse mit Erregeridentifikation. Die Nachweise von Staphylococcus aureus, Non-aureus Staphylococcus, Streptococcus spp. und coliformen Bakterien unterschieden sich nicht statistisch signifikant. Enterococcus spp. wurde in der klassischen Mikrobiologie in 4,5% der Proben und mit der emma qPCR in 1,1% nachgewiesen, wohingegen mit Test C kein Nachweis erbracht wurde. Das emma qPCR-System war der einzige Test, der Mycoplasma spp. nachweisen konnte (in 19 von 88 Proben detektiert; 21,6%).

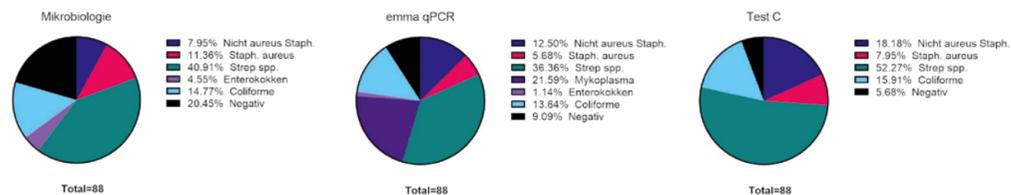


Abbildung 3: Verteilung der nachgewiesenen Erregerarten.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede beim Nachweis von Staphylococcus aureus, Nicht-Aureus-Staphylococcus, Streptococcus spp. und coliformen Bakterien festgestellt. Die emma qPCR und klassische Mikrobiologie detektierten deutlich mehr Enterococcus spp. als Test C. Das emma qPCR-System war die einzige Diagnosemethode, die Mycoplasma spp. Infektionen nachweisen konnte.

5. Diskussion der Ergebnisse

Fünf verschiedene Testmethoden mit unterschiedlichen Technologien wie qPCR, Mikrobiologie oder lateral flow wurden verglichen. Die Detektionsrate positiver Proben war mittels emma qPCR und Test C am höchsten, gefolgt von der klassischen Mikrobiologie. Test A und B zeigten eine deutlich geringere Nachweisfähigkeit. Die Nachweisrate grampositiver Erreger waren mit emma qPCR, klassischer Mikrobiologie und Test C am höchsten, während Test A und B deutlich weniger detektierten. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Nachweisrate gramnegativer Bakterien festgestellt.

Mittels emma qPCR-System, klassischer Mikrobiologie und Test C ist die Identifikation auf Speziesebene möglich. Hierbei wurden ausser bei Enterococcus spp. und Mycoplasma spp. keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt. Enterococcus spp. wurde in der klassischen Mikrobiologie häufiger nachgewiesen als mit der emma qPCR, wohingegen mit Test C kein Nachweis erbracht wurde. Der Unterschied zwischen Mikrobiologie und emma qPCR erklärt sich dadurch, dass das emma qPCR environmental Panel, welches Enterococcus spp. inkludiert, nur in 25% der Tests verwendet wurde. Das emma qPCR-System ist der einzige Test, der Mycoplasma spp. nachweisen kann, da dieser Erreger unter Routinebedingungen in der Mikrobiologie nicht wächst. Mycoplasma spp. wurde in 19 von 88 Proben (21,6%) nachgewiesen.

Diese Ergebnisse deuten auf bemerkenswerte Qualitätsunterschiede in den Ergebnissen verschiedener Mastitistests hin. Während die Tests A und B wegen fehlender Erregeridentifikation und geringerer Nachweisrate positiver Proben deutlich schlechter abschnitten, ergaben die Ergebnisse des emma qPCR-Systems, der klassischen Mikrobiologie und des Tests C nahezu gleichwertige Resultate. Diese Ergebnisse zeigen, dass der in Praxis einsetzbare qPCR Test emma mit den in Praxen etablierten mikrobiologischen Tests vergleichbare Resultate erzielt, jedoch in einem Bruchteil der Zeit.

6. Anwendung in der Praxisroutine

Alle untersuchten Testsysteme erwiesen sich als benutzerfreundlich und für die Praxisumgebung geeignet, wobei die Probenvorbereitung jeweils nur wenige Minuten in Anspruch nimmt (beispielsweise 15 Minuten für 8 Proben parallel beim emma qPCR-System). Bei den untersuchten Tests kann die optische Auswertung der Ergebnisse anfällig für Fehlinterpretationen sein, insbesondere wenn ungeschultes oder wechselndes Personal die Untersuchungen durchführt. Dieser Faktor entfällt beim emma qPCR-System, da die Auswertung einheitlich in der cloudbasierten Softwarelösung erfolgt und standardisierte Untersuchungsberichte automatisiert generiert werden.

Alle Tests mit Ausnahme des emma qPCR-Systems erfordern eine langwierige Anreicherung potenziell pathogener Bakterien, bevor ein Testergebnis vorliegt. Das ist nicht nur zeitaufwändig, sondern stellt – je nach Einsatzort der Tests – auch ein Arbeitssicherheitsrisiko dar oder kann von Kontrollbehörden bemängelt werden.

Der grösste Vorteil des emma qPCR-Systems ist die deutlich kürzere Zeit bis zum Erhalt der Ergebnisse. Während die untersuchten Tests mit Anreicherung 8 bis 24 Stunden benötigen, liefert die emma qPCR Ergebnisse in nur 90 Minuten. Dieser Zeitvorteil ermöglicht eine schnelle und gezielte Behandlung (oder nicht-Behandlung) von klinischen Mastitiden, basierend auf der Erregeridentifikation direkt in der Praxis.

Kontakt

ender diagnostics AG, Freiburgstr. 251, 3018 Bern, Schweiz

Web: www.emma.vet Mail: emma-service@enderdiagnostics.com

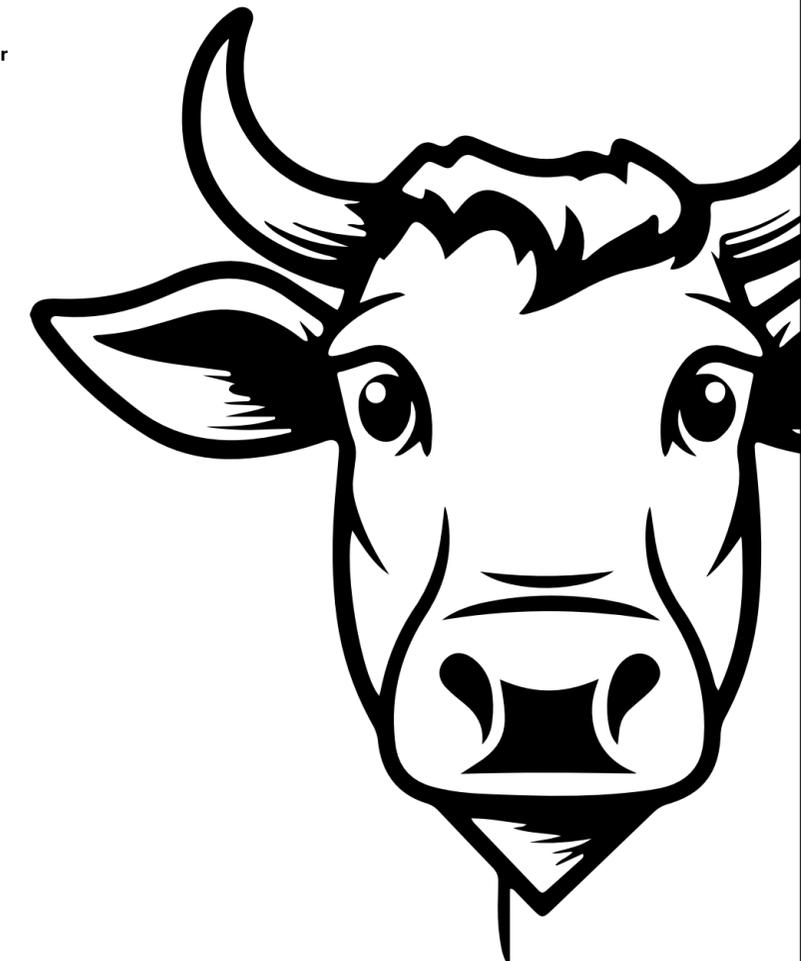
Telefon: +41 31 552 27 66 (Montag bis Freitag, von 09:00 bis 17:00 Uhr)

emma
by ender

emma qPCR – eine innovative Lösung zur Detektion klinischer Mastitiden in der Tierarztpraxis.

Christoph Kunas, Stephanie Walker

ender diagnostics ag, 2024



1. Zusammenfassung

Für die gezielte, evidenzbasierte Behandlung von klinischen Mastitiden ist eine schnelle und genaue Erregeridentifikation entscheidend. Derzeit sind mehrere Tests für den Einsatz in Tierarztpraxen oder auf Betrieben verfügbar, allerdings gibt es grosse Unterschiede hinsichtlich der Zeit bis zum Testergebnis sowie der Ergebnisqualität.

In dieser Studie wurden an 95 untersuchten Proben 5 verschiedene Testmethoden verglichen: Die emma qPCR, klassische Mikrobiologie und Test C lieferten einen konkreten Erregernachweis, wohingegen Test A und B nur den Gram-Status anzeigten und dabei eine deutlich geringere Nachweisrate aufwiesen. Die emma qPCR war mit 90 Minuten der mit Abstand schnellste Test und die einzige geeignete Methode zum Nachweis von Mycoplasma spp. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Qualitätsunterschiede zwischen den Tests und unterstreichen die Bedeutung einer geeigneten Diagnosemethode für die evidenzbasierte Therapie von Mastitiden.

2. Einleitung

Um klinische Mastitis bei Milchkühen gezielt zu behandeln, ist neben dem klinischen Bild eine schnelle und präzise Diagnostik der Erreger entscheidend. Dabei ist es gängige Praxis, parallel zur Probennahme bereits die antibiotische Erstbehandlung einzuleiten. Um diesen Ablauf umzukehren und auf Basis der Diagnostik zu behandeln, sind mehrere Tests verfügbar, die in der Tierarztpraxis oder teils auf Betrieben durchgeführt werden können. Der schnellste dieser Tests ist die innovative Diagnostiklösung emma (ender molecular multiplex approach). Er ermöglicht es Tierärzten, innerhalb von 90 Minuten ein qPCR-Resultat in der eigenen Praxis zu generieren, wobei die wichtigsten Erreger (siehe Abbildung 1) vergleichbar mit etablierter Diagnostik gefunden werden und zusätzlich Mykoplasmen detektiert werden können. Alle vor-Ort Tests einen die Vorteile, dass zusätzlicher Umsatz in der Praxis generiert werden kann und der zeitintensive Versand von Proben in spezialisierte Untersuchungslabore entfällt, womit das Diagnostikergebnis und das Wissen über das klinische Erscheinungsbild in ein und derselben Hand liegen.

In dieser Studie wurden 5 Testmethoden, die zur Diagnose von klinischen Mastitiden in Tierarztpraxen eingesetzt werden, mittels paralleler Analyse von 95 Milchproben verglichen.

3. Material und Methoden

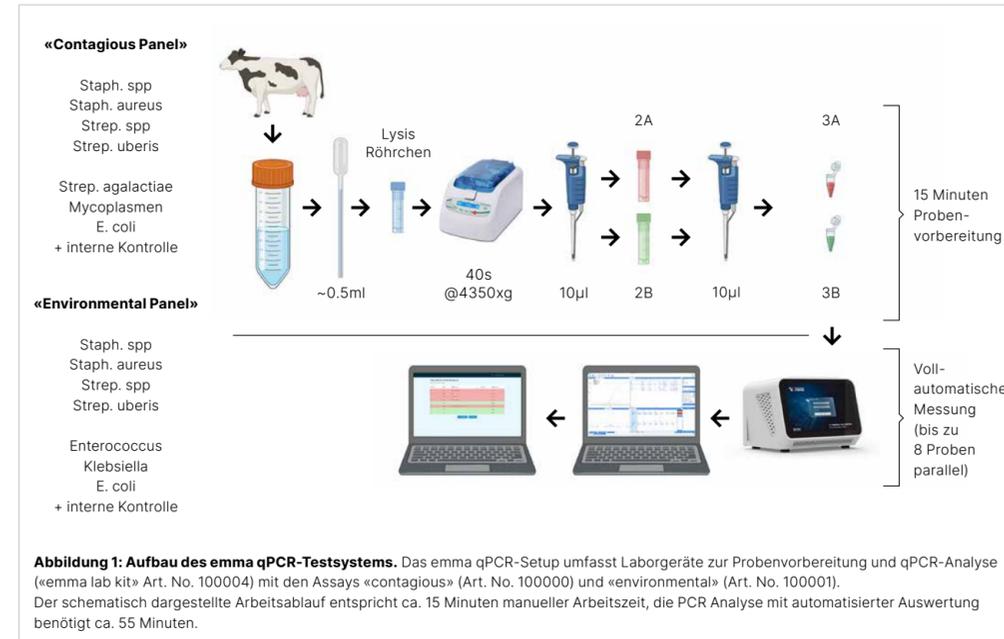
95 Milchproben von Kühen mit klinischen Mastitissymptomen wurden parallel mit dem emma qPCR-System, klassischer Mikrobiologie und drei kommerziell erhältlichen Schnelltests untersucht. Tabelle 1 liefert einen Überblick über diese Methoden.

Tabelle 1: Überblick über die Testmethoden

	Mikrobiologie	Test A	emma PCR	Test B	Test C
Testprinzip	Mikrobiologie	Lateral Flow	RT-PCR	Nährmedium	Mikrobiologie
Inkubation	24 Stunden	7,5 Stunden	Nicht erforderlich	12 Stunden	24 Stunden
Testdauer	Bis zu 72 Stunden	8 Stunden	1,5 Stunden	12 Stunden	24 Stunden
Differenzierung	Erreger / Erregergruppe	Grampositiv	Erreger / Erregergruppe	Grampositiv / gramnegativ	Erreger / Erregergruppe
Auswertung	Optisch, biochemisch	Optisch (Teststreifen)	Automatisiert, semiquantitativ	Optisch (Farbumschlag)	Optisch (Wachstum)

Emma qPCR

Die Milchprobe wurde in einem Homogenisator lysiert, gefolgt von einer qPCR mit dem Panel «environmental» oder «contagious», wobei beide unterschiedliche Bakteriengruppen abdeckten. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (IFU). Diese Panels werden vom Tierarzt vor der Probenuntersuchung basierend auf der Klinik der Kuh sowie vorherrschenden Erregersituation ausgewählt (siehe Abbildung 1). Nach 55 Minuten erfolgte die Erregeridentifizierung automatisiert durch eine standardisierte, webbasierte Auswertung.



Mikrobiologische Milchanalyse

Die Milchprobe wurde auf einer Agarplatte ausgestrichen und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Erregeridentifizierung erfolgte durch Morphologie, Gram-Färbung, Subkultivierung auf selektiv-Agar und zusätzlichen biochemischen Tests wie den Katalase-, Koagulase- und Oxidase-Test.

Test A

Die Milchprobe wurde in einem Anreicherungsmedium für 7,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschliessend wurden grampositive Erreger anhand einer Farbveränderung des Teststreifens nachgewiesen. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Test B

Die Milchprobe wurde in zwei unterschiedlichen Nährmedien 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Grampositive und gramnegative Erreger konnten anhand einer Farbveränderung des Mediums nachgewiesen werden. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Test C

Die Milchprobe wurde auf einer Agarplatte mit drei verschiedenen (selektiv-)Nährböden ausgestrichen und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Erreger wurden anhand ihres Wachstums und Morphologie auf den verschiedenen Sektoren identifiziert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Datenanalyse und Vergleiche

Sieben Proben wurden aufgrund ungültiger Ergebnisse mit dem emma qPCR-Test von der Analyse ausgeschlossen. Gemäss den Anweisungen der Arbeitsanweisung führt dieses Resultat zu einer Nachuntersuchung, welche hier aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt wurde.

In der Auswertung der Resultate wurden die Detektionsrate positiver Proben, der Gram-Status der Erreger und die Erregeridentifikation der verschiedenen Tests verglichen.

