

LOHMANN TIERZUCHT

The specialist for layer breeding



Beitrag zur Mycoplasmen-Diagnostik

Dr. Anne Bolte

BREEDING FOR SUCCESS ... TOGETHER



Warum sind Mycoplasmen von Bedeutung?

- Wirtschaftlich bedeutsame Infektionen
- Weltweite Verbreitung des Erregers
- Rechtliche Relevanz

- Mycoplasmen sind „nicht Fisch- nicht Fleisch“ :
 - keine Zellwand, kleineres Genom
 - wachsen in zellfreien Medien
- hohe Kontagiosität
- Morbidität und Mortalität variabel

Aviäre Mycoplasmen



- *Mycoplasma gallisepticum*
- *Mycoplasma synoviae*
- *Mycoplasma meleagridis*

- *Mycoplasma iowae*
- etc. pp

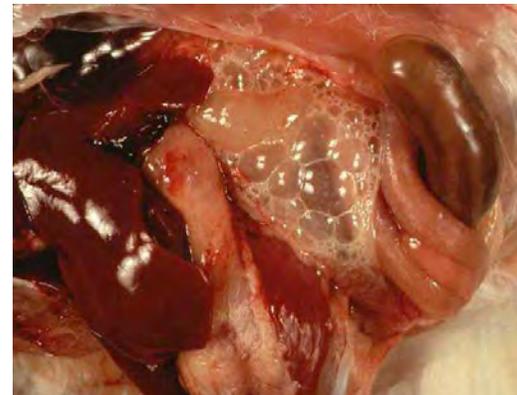
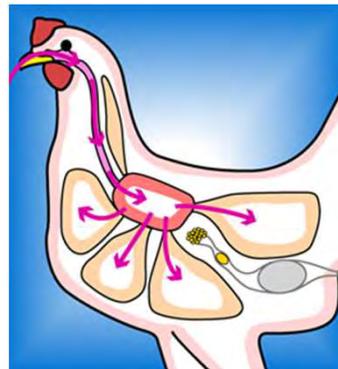
- Stämme mit verschiedener Virulenz

Mycoplasmen : Klinik

respiratorische Symptome

Luftsackentzündungen

Entwicklungsstörungen



Mycoplasmen : Klinik

Synovitis

Skelettdeformierungen

Embryomortalität, schlechte Legeleistung



Übertragung aerogen, horizontal (direkt, indirekt)

Übertragung auch über das Ei (vertikal)!

Warum sind Mycoplasmen von Bedeutung?



Zuchtgeflügel muß frei sein von Mycoplasma gallisepticum

RL 2009/158/EG

Art und Umfang der Untersuchung festgelegt:



10 x Serum in LW 10 > *ELISA Mg/Ms*

60 x Serum in LW 16 > *ELISA Mg/Ms*

60 x Serum in LW 22 > *ELISA Mg/Ms*

40 x Serum alle 4 Wochen (Produktion) > *ELISA Mg/Ms*

20 x Trachealtupfer / Woche > *PCR*



Mycoplasma-Diagnostik



Was soll Ziel der Diagnostik sein?

- „Freiheit“ von Mycoplasma ?
- Aufspüren latent infizierter Tiere?
- Nachweis Impfschutz?
- Isolat?
- Differenzierung von Impf- und Feldantigenen?

Mycoplasma Kultur

- Aufwendig, kostenintensiv
- Zeitintensiv
- Misserfolge durch Begleitflora
- Cave: antibiotisch vorbehandelte Tiere



Mycoplasma Kultur



- Frey Medium
- PPLO broth

- Z.B. Trachealtupfer: SOFORT in Medium

Kultur bis 14 Tage,

Farbumschlag,

Bestätigung per PCR (oder IFT)



Mycoplasma Serologie



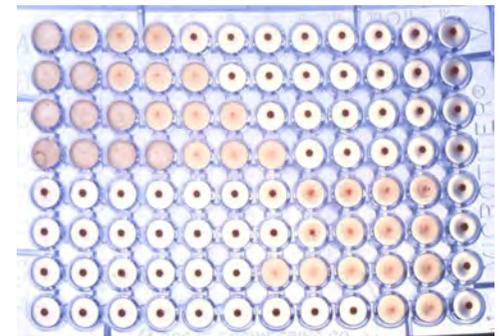
- Keine Einzeltierdiagnostik!
- Stichprobenumfänge beachten
- Verschiedene Verfahren richtig bewerten

Mycoplasma Serologie

➤ HHT

(HämagglutinationsHemmungsTest)

- Antigene nicht kommerziell erhältlich
- schlechte Sensitivität
- nicht alle Stämme werden vollständig detektiert

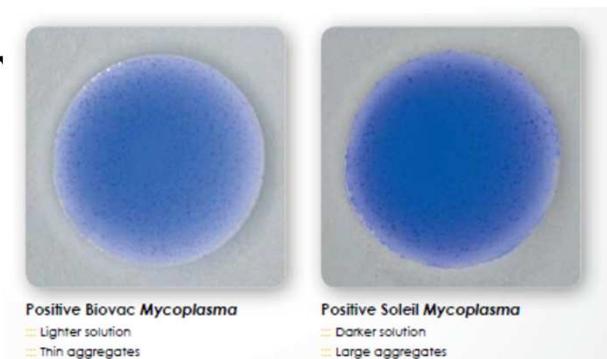


Mycoplasma Serologie

➤ SSA

(SerumSchnellAgglutination)

- Antikörper 7-10 Tage nach Infektion
- IgM und IgY
- Kommerziell erhältliche Antigene
- günstig und schnell
- Nachteil: unspezifische Reaktionen
- Verbesserung der Spezifität durch Hitzeinaktivierung der Seren



Exkurs: Fall 1



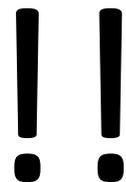
Mast-Elterntiere, Ende der Aufzuchtperiode

SSA: positiv

ELISA: negativ

Cave:

Inaktivat-Impfung Tage/Wochen vor der
Blutentnahme kann falsch positives Signal in SSA
geben



Mycoplasma Serologie

➤ ELISA

(EnzymeLinked ImmunoSorbentAssay)

- Antikörper 8-10 Tage nach Infektion,
je nach Hersteller
- IgY
- kommerziell erhältliche kits
- auch Kombinationen Mg/Ms
- automatisierbar



Exkurs: Fall 2



Geflügelfachtierarzt bringt eilig Seren ins Labor,
bittet um Nachweis von Antikörpern gegen Ms

SSA : negativ

ELISA : positiv

PCR: wiederholt positiv

SSA einige Tage später wiederholt: positiv

„Frische-Effekt“



Mycoplasma

Antikörper nach Impfung

ELISA (Quantifizierung möglich)

Baselines der Hersteller geben Richtung vor:

(Bsp. BioChek)

Vaccine type	Mean titer range		Wks after vacc to test
Mg live 6/85 (spray)	Negative	--	6-12 wks
Mg live ts-11 (eye drop)	1000-3000	+	6-12 wks
Mg F-strain (water, spray)	2000-8000	++	6-12 wks
Mg inact 2 x (Gallimune)	3000-6000	++	4-6 wks after second

Vaccine type	Mean titer range	Wks after vacc to test
Ms live MS-H (eye drop)	500-3000	6-12 wks



Mycoplasma

Molekularbiologie



- schnell
- Nachweis von lebenden und toten Mycoplasmen
- simultaner Nachweis Mg/Ms möglich
- real-time Multiplex-PCR
- Amplifizierung der DNA: *vlhA*
(variable lipoprotein and haemagglutinin gene)



Mycoplasma

Molekularbiologie



- hohe Sensitivität
- geeignet:
 - Trachealtupfer, Tupfer aus Gelenk, Oropharyngealtupfer, Konjunktiva
 - Organe (Lunge), Luftsackmembran
- weniger geeignet:
 - Kloakentupfer



Mycoplasma

Molekularbiologie



- Proben poolen:
bis zu 10 Tupfer zusammenfassen
- Art des Tupfermaterials nicht entscheidend,
jedoch saugfähig
- Ggf. FTA Karten verwenden



Mycoplasma

Molekularbiologie



➤ Differenzierung Impf- / Feldstämme:

Real-time-PCR mit Sonden:

- MS 1live
- Ms-H

- Mg ts-11
- Mg 6/85

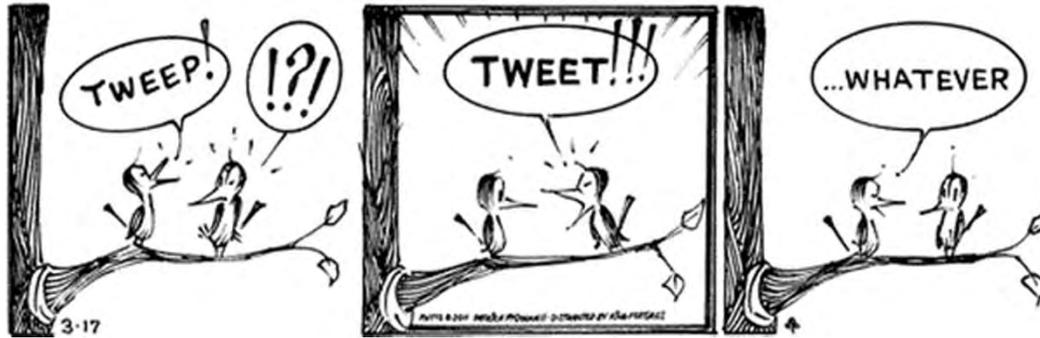
➤ Sequenzierung



ZUSAMMENFASSUNG



- Mycoplasma-Diagnostik ist Herdendiagnostik
- SerumSchnellAgglutination SSA
grundsätzlich gut geeignet,
im Hinterkopf behalten:
Frischeeffekt und Impfprogramme
- notfalls zusätzliche Absicherung mit ELISA und PCR



Danke für Ihre Aufmerksamkeit!

Dr. Anne Bolte

Fachtierärztin für Wirtschafts-, Wild- und Ziergeflügel
Fachtierärztin für Mikrobiologie

bolte@ltz.de

BREEDING FOR SUCCESS ... TOGETHER

