

Nicht-invasives Echtzeit-Monitoring der Tiergesundheit von Mastschweinen mittels automatischer Aktivitätserfassung

ausgeführt durch:



Südufer 10 | 17493 Greifswald - Insel Riems

<http://www.fli.de/>

Koordination: Dr. Timo Homeier-Bachmann

Tel: 038351/7-1505

timo.homeier@fli.de

gefördert durch: QS Wissenschaftsfonds



1. Allgemeine Angaben

Abschlussbericht über das Projekt zum 15. September 2017.

1.1 Berichtsteller

Timo Homeier-Bachmann, Dr. med. vet.
Institut für Epidemiologie
Friedrich-Loeffler-Institut (FLI),
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Südufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems
Tel.: 038351- 7 1505
Fax.: 038351 - 7 1526
E-Mail: timo.homeier@fli.de

1.2 Thema

**Nicht-invasives Echtzeit-Monitoring der Tiergesundheit von
Mastschweinen mittels automatischer Aktivitätserfassung**

1.3 Ort der Versuchsdurchführung

Die einzelnen Teile des Projektes wurden in verschiedenen Instituten des FLI durchgeführt:

IMP Institut für molekulare Pathogenese, Dr. Lutz Geue, +49 3641 804-2329
Naumburger Str. 96 a
07743 Jena

ITE Institut für Tierernährung, Dr. Andreas Berk, +49 531 58044-138,
Bundesallee 50
38116 Braunschweig

ITT Institut für Tierschutz und Tierhaltung, Dr. Lars Schrader, +49 5141 3846-101
Dörnbergstr. 25/27
29223 Celle

IMVZ Institut für molekulare Virologie und Zellbiologie, Dr. Axel Karger +49 38351 7-1247
IfE Institut für Epidemiologie, Dr. Timo Homeier, +49 38351 7-1505
Südufer 10
17493 Greifswald - Insel Riems

2. Hintergrund, Problemstellung und Stand der Forschung

Art und Umfang von Verhaltensaktivität spiegelt das Tierwohl und auch den Gesundheitsstatus eines Tieres wider. Außerdem können hierüber die Auswirkungen von Veränderungen im Management (z. B. Fütterungsumstellung, Stallklimaänderungen etc.) in Echtzeit gemessen werden. Die Erfassung von Bewegung im Raum mittels Trägheitssensoren ist im Rinderbereich eine etablierte Methode (Lahmheitsdiagnostik, Brunsterkennung). Für das Schwein liegen jedoch kaum Untersuchungen vor. Ein Modell zur Prüfung dieser Zusammenhänge beim Mastschwein ist die Gabe von Mykotoxin-belastetem Futter, was bei Schweinen zu erhöhter Aktivität am Futtertrog und gleichzeitigem Rückgang der Futteraufnahme führt. Ein leistungsfähiges Mikrobiom im Darm ist eine wesentliche Grundlage für die Gesundheit und Leistungsfähigkeit eines Tieres. Auch das Mikrobiom sollte durch Verabreichung von Mykotoxin-belastetem Futter verändert werden.

3. Ziele des Vorhabens

Ziel des Vorhabens ist zu prüfen, ob und welche Aktivitätsprofile zur Tierwohl-/Leistungsdetektion beim Schwein (im Sinne eines Syndrom Surveillance) geeignet sind. Dazu werden Trägheitssensoren verwendet, die individuelle Bewegungsdaten der Tiere liefern. Als mögliche „low-tech“ Alternative wird die Aktivität mit handelsüblichen Bewegungssensoren erfasst. Spezifische Aktivitätsparameter werden mit Indikatoren für das Tierwohl/die Leistungsfähigkeit korreliert (klinische Parameter, Mikrobiomanalyse). Die Untersuchung wird in zwei Tiergruppen vergleichend durchgeführt (mit und ohne Mykotoxin-Belastung im Futter). Mykotoxin-belastetes Futter sowie ein ansonsten identisches Futter werden vom ITE zur Verfügung gestellt.

4. Arbeitspakete

Fütterungsversuch

Im Rahmen eines Fütterungsversuches werden zwei Gruppen Mastschweine gebildet. Die Kontrollgruppe erhält ein bedarfsgerechtes Futter, die Versuchsgruppe wird mit identischem Futter aber mit entsprechenden Anteilen Mykotoxin-belasteten Getreides gefüttert. Beide Gruppen bestehen aus jeweils 16 Tieren. Der Versuch wird im üblichen Mastabschnitt von ca. 28 kg bis 120 kg Lebendmasse mit kommerziellen Masthybridschweinen mehrphasig durchgeführt.

Aktivitätserfassung

Ziel ist es, die Eignung von an individuellen Schweinen befestigten Trägheitssensoren zur Erkennung erkrankter Einzeltiere sowie die Eignung handelsüblicher Bewegungsmelder zur Erkennung von Krankheitsgeschehen in einer Gruppe von Schweinen zu prüfen. Validiert werden diese Aktivitätsdaten mit der herkömmlichen, aber sehr arbeitsaufwändigen Videoanalyse sowie durch Prüfung der Zusammenhänge zwischen Aktivitätsmustern und den Ergebnissen der klinischen und bakteriologischen Analysen.

Die frühzeitige Erkennung von Abweichungen in den Bewegungsmustern ist ein wertvolles Werkzeug für die Gesundheitskontrolle von Tierbeständen. Ziel ist es, die Detektion mittels telemetrischer Bewegungsdaten in Echtzeit zu ermöglichen. Es werden Parameter für eine

automatisierte Überwachung ermittelt, die eine unmittelbare Einleitung von Gegenmaßnahmen ermöglichen.

Mikrobiomanalyse

Der Einfluss der Fütterung aber auch von Stress spiegelt sich in Veränderungen im Mikrobiom von Schweinen wieder. Die Dynamik des Mikrobioms wird schnell und vergleichsweise kostengünstig über die Analyse von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen von PCR-Fragmenten analysiert. Weiterhin wird geprüft, ob sich die MALDI-TOF Massenspektrometrie auch zur Charakterisierung von Mikrobiota im Darm eignet.

5. Ergebnisse der Arbeitspakete

Fütterungsversuch

Der Versuch begann am 12.07.2016 mit 32 Börgen der Hybridherkunft BHZP mit einer mittleren Lebendmasse (LM) von 28,9 kg ($\pm 1,74$ kg). Diese wurden zufällig auf zwei Abteile mit einer Fläche von je 14,5 m² zu je 16 Tieren aufgeteilt. Das Futter wurde trocken, mehlartig in jeweils einem Trockenfutterautomat ad libitum gegeben.

Der Versuch dauerte 84 bzw. 85 Tage. Danach wurden die Tiere geschlachtet. Angelegt war die Fütterung des Versuches als dreiphasige Mast. Die Futterumstellung von Anfangsmast (AM) auf Mittelmast (MM) bzw. Endmast (EM) erfolgte für beide Gruppen am 15. bzw. 36. Versuchstag.

Wasser stand den Tieren aus Nippeltränken ad libitum zur Verfügung. Das Futter war so konzipiert, dass es den Empfehlungen der GfE (2006) entsprach. Um das Verhalten der Tiere bei der Futterumstellung zu beeinflussen, wurde dies bei Umstellung auf MM von der Zusammensetzung kaum verändert, nur dem Bedarf angepasst (Tabelle 1). Allerdings wurde für den Abschnitt der MM im Futter der Gruppe 1 Mykotoxin-belasteter Mais eingesetzt, in der Gruppe 2 der entsprechende Kontrollmais. Die Belastung des Futters der Gruppe 1 betrug 5,33 mg Deoxynivalenol (DON) je kg Futter und lag damit deutlich über dem Richtwert für Schweinefutter von 0,9 mg/kg Futter (EG 576, 2006). Das Futter der Gruppe 2 lag mit 0,03 mg DON deutlich darunter. Diese Unterschiede im Futter führten zu einem Rückgang der Futteraufnahme der Tiere der Gruppe 1 im Vergleich zur Gruppe 2 von 395 g/Tier und Tag, was auch die LM-Entwicklung deutlich beeinflusste (Tabelle 2). Die Tiere wurden mit einer mittleren LM von 124,8 kg ($\pm 5,84$ kg) geschlachtet.

Bei der Umstellung auf EM-Futter wurde die Rezeptur deutlich verändert (Tabelle 1), um auch hier die Aktivitäten der Tiere bezüglich der Futteraufnahme zum Zeitpunkt der Futterumstellung zu beeinflussen.

Die Tiere wurden wöchentlich einzeln gewogen und es wurde versucht, von jedem Tier eine Spontankotprobe zur mikrobiellen Untersuchung zu gewinnen. Diese wurde sofort bei - 80 °C eingefroren. Ebenso wurde das nicht verbrauchte Futter aus dem Automaten zurückgewogen.

Auf eine statistische Auswertung wird verzichtet, da der Futtermittelverbrauch nur jeweils der Gruppe (n = 1) zugeordnet werden kann.

Der Futtermittelverbrauch der Tiere der Gruppe 1 betrug im Abschnitt der AM 1.875 g, im Abschnitt der Mittelmast 2.157 g und im Abschnitt der EM 3.877 g pro Tier und Tag. Entsprechend verbrauchten die Tiere der Gruppe 2 1828 g, 2552 g bzw. 3878 g pro Tier

und Tag. Im Mittel nahmen die Tiere der Gruppe 1 im Abschnitt der AM 962 g, im Abschnitt der MM 1.029 g und im Abschnitt der EM 1.244 g pro Tier und Tag zu. Die Tiere der Gruppe 2, die im Abschnitt der MM Mykotoxin-belastetes Futter erhielten, nahmen entsprechend 980 g, 1.189 g bzw. 1.134 g pro Tier und Tag.

Tabelle 1: Futterzusammensetzung und wertbestimmende Inhaltsstoffe (in g/kg)

	Anfangsmast (AM)	Mittelmast (MM)	Endmast (EM)
Gerste	372,5	421,0	538,5
Weizen	300,0	280,0	200,0
Mais	100,0	100,0	--
Sojaextraktionsschrot 48	160,0	135,0	50,0
Rapsextraktionsschrot	--	--	100,0
Trockenschnitzel	--	--	50,0
Sojaöl	25,0	25,0	35,0
Vitamine und Mineralstoffe	30,0	30,0	25,0
Lysin-HCl	6,0	5,0	1,5
DL-Methionin	3,0	2,0	--
L-Treonin	2,5	1,5	--
L-Tryptophan	1,0	0,5	--
ME MJ/kg	13,5	13,5	13,2
Rohprotein	169	158	148
Rohfett	45	46	55
Rofaser	38	38	56
Lysin	11,6	10,3	7,5

Tabelle 2: Futteraufnahme und Lebendmassezunahme der Versuchstiere (in g/Tier und Tag)

Versuchswoche	Futteraufnahme		Lebendmassezunahme	
	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2
1*	1.589	1.607	748	830
2*	2.161	2.049	1.271	1.129
3**	1.692	2.268	663	1.108
4**	2.448	2.857	1.070	1.370
5**	2.362	2.531	1.333	1.089
6***	3.291	4.366	1.276	1.219
7***	3.321	3.232	1.235	1.188
8***	3.536	3.500	985	955
9***	4.255	3.964	1.485	1.561
10***	4.051	3.924	1.265	1.327
11***	4.439	4.451	1.372	1.041
12***	4.245	3.727	1.092	727

* Anfangsmastfutter

** Mittelmastfutter (in der Gruppe 1 mykotoxinbelastet)

***Endmastfutter

Literatur:

GfE (2006): Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere. Nr.10. Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Schweinen. DLG-Verlag, Frankfurt am Main.

EU (2006): EMPFEHLUNG DER KOMMISSION vom 17. August 2006 betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, T-2- und HT-2-Toxin sowie von Fumonisin in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen.

Aktivitätserfassung - Bewegungsmelder

Einleitung

Schweine reagieren wie die meisten Säugetiere auf Beeinträchtigungen ihrer Gesundheit oder auf andere Stressoren mit Veränderungen ihrer Verhaltensaktivität. Da in der Gruppenhaltung von Mastschweinen meist alle Tiere einer Gruppe von infektiösen Erkrankungen betroffen sind und auch die Erkrankung eines Einzeltieres sich aufgrund der Gruppendynamik auf die Gesamtaktivität der Gruppe auswirken kann, könnte es möglich sein, ein Monitoring der Tiergesundheit auch über die Erfassung der Gesamtaktivität einer Gruppe zu erreichen. Dies wurde in diesem Projektteil getestet. Technisch wurde die Gruppenaktivität kontinuierlich mittels handelsüblicher Bewegungsmelder erfasst.

Material und Methoden

Zur Erfassung der Gesamtaktivität der Gruppe wurden handelsübliche Bewegungsmelder eingesetzt (Hersteller: GEV, Produktbezeichnung: Bewegungsmelder 12 V, LBM 120°, Typ: LBM 926), die oberhalb der Buchten so angebracht wurden, dass jeweils eine Bucht nahezu komplett erfasst werden konnte. Die von den Bewegungsmeldern ausgegebenen Daten (Spannungsänderungen) wurden auf Datenloggern (USB-3 Spannungsdatenlogger der Firma lascar electronics, mit 3,6 V Lithium-Batterie ½ AA) gespeichert, die so programmiert waren, dass in Intervallen von 10 Sekunden registriert wurde, ob eine Bewegung in der Bucht wahrgenommen wurde oder nicht (0/1). Diese Werte wurden über 10-Minuten-Intervalle aufsummiert, so dass für die Auswertung je Stunde sechs Werte vorlagen.

Ergebnisse

Eingegangen wird hier nur auf die Ergebnisse der Versuchsbucht (Mykotoxin-haltiges Futter vom 26.07.16 bis zum 15.08.16), da die Aufzeichnungen aufgrund technischer Probleme nur an wenigen Tagen ausgewertet werden konnten. An diesen Tagen waren die Werte der Kontrollbucht jedoch mit denen der Versuchsbucht vergleichbar. Aufgrund der Fragestellung wird auch nur auf den Zeitraum um die Behandlung herum eingegangen. Die Ergebnisse werden nur deskriptiv dargestellt, weil es sich um ein Pilotprojekt mit nicht ausreichender Anzahl an Versuchswiederholungen handelt.

In Abb.1 ist deutlich der circadiane Rhythmus der Aktivität in der Versuchsbucht zu erkennen, mit höheren Aktivitäten am Tag als in der Nacht. Erkennbar ist weiterhin, dass die Tagesaktivitäten in den ersten etwa 4 Tagen nach Einstellung (15.07.16) abnehmen, während die Werte nachts ab etwa der Nacht vom 27.07. auf 28.07.16 zuzunehmen

scheinen, also zwei Nächte, nachdem den Tieren mit Mykotoxin-belastetes Futter vorgelegt wurde.

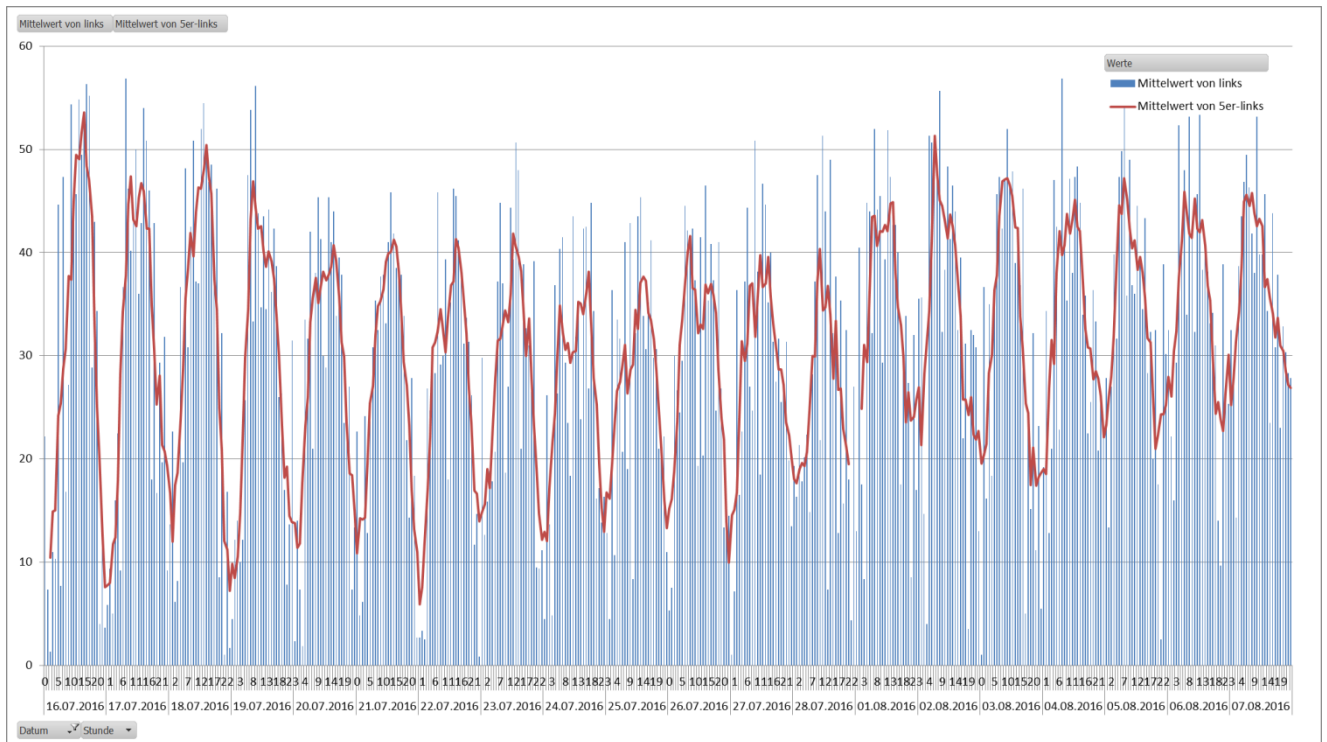


Abb. 1: Aktivitätsverlauf (dimensionslos) in der Versuchsgruppe über die ersten 23 Tage nach Einstellung (wegen technischer Probleme fehlen die Werte vom 29.07. bis 31.07.16). Die blauen Säulen zeigen die über 1h-Intervalle gemittelten Werte, die rote Linie die Glättungsfunktion (Glättung über 5 Werte) dieser Werte.

Um diese möglichen Veränderungen tagsüber und nachts deutlicher darstellen zu können, wurden die Stundenwerte jeweils je Tag zu Tages- (6-18 h) und Nachtwerten zusammengefasst und über einen längeren Zeitraum vom 16.07. bis 13.09.16 abgebildet (Abb. 2).

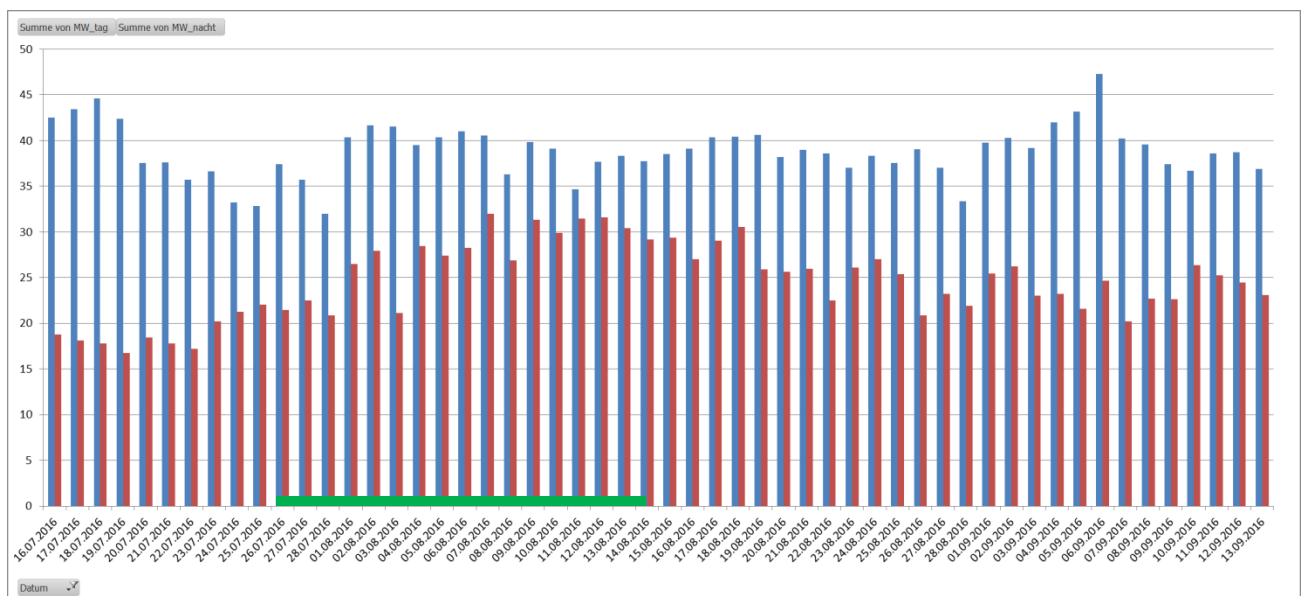


Abb. 2: Aktivitätswerte (dimensionslos) tagsüber (6 - 18 h, blaue Säulen) und nachts (rote Säulen) der Versuchsgruppe einen Tag nach Einstellung (am 15.07.16) bis zum 13.09.16 (wegen technischer Probleme fehlen die Werte vom 29.07. bis 31.07. und vom 29.08. bis 31.08.16). Der grüne Balken markiert die Tage, während derer mit Mykotoxin belastetes Futter vorgelegt wurde.

Auch bei dieser Darstellung ist zu erkennen, dass die Aktivität nachts geringer war als tagsüber und die Aktivität tagsüber an den ersten vier Tagen nach Einstellung höher erscheint, als an den Folgetagen. Bei dieser Darstellung scheint die Aktivität nachts ab etwa dem 01.08.16 höher zu liegen als an den vorhergehenden Tagen, um im Verlauf der letzten Tage im August, also nach erneuter Umstellung auf das Normalfutter, wieder abzufallen.

Diskussion

Die Ergebnisse zeigen zunächst, dass sich mit vergleichsweise kostengünstigen, handelsüblichen Bewegungsmeldern die Aktivität einer Gruppe von Schweinen erfassen und sich hieraus kurzfristige (z. B. circadiane) und langfristige Aktivitätsveränderungen über Tage und Wochen erkennen lassen. Ob die hier dargestellten Ergebnisse relevante Veränderungen anzeigen, lässt sich mit dieser Pilotuntersuchung nicht valide prüfen, da hierzu mehrere Versuchswiederholungen notwendig wären.

Möglicherweise zeigt die Abnahme der Aktivität über die ersten Tage nach der Einstellung jedoch den Gewöhnungsprozess der Tiere an die neue Umgebung und die bisher unbekanntes Gruppenmitglieder an. Die höhere Aktivität am Tag würde dann das Explorationsverhalten der Tiere und Rangauseinandersetzungen anzeigen, beides Aktivitäten, für die bekannt ist, dass sie in den ersten Tagen nach Umstellung und Umgruppierung vermehrt auftreten.

Der Anstieg der Aktivität nachts einige Tage nach Beginn der Vorlage von mit Mykotoxin-belastetem Futter könnte eine Reaktion auf dieses Futter anzeigen, von dem die Tiere deutlich geringere Mengen aufnehmen. Ursache für die erhöhte Aktivität nachts könnte eine unzureichende Sättigung der Tiere sein, durch die es nachts, d. h. in der Ruhephase, zu mehr Aktivitäten der Tiere kommt. Hierzu könnte auch passen, dass die Aktivität nachts einige Tage nach Umstellung auf das Normalfutter wieder abzufallen scheint.

Auch wenn diese Pilotuntersuchung keine validen Schlüsse zulässt, zeigt sie, dass sich weitere Untersuchungen mit mehr Versuchswiederholungen lohnen würden. Die hier offline, d.h. nach Versuchsende, ausgewerteten Daten lassen sich problemlos auch online auswerten. Mit angepassten Grenzwerten ließe sich diese Methode mit vergleichsweise geringem Aufwand in ein kostengünstiges nicht-invasives Echtzeit-Monitoring der Tiergesundheit von Mastschweinen integrieren.

Aktivitätserfassung - Beschleunigungssensoren

Einleitung

Die Tiere werden individuell mit Trägheitssensoren ausgestattet, die kontinuierlich für die drei Bewegungsachsen die jeweiligen Beschleunigungen aufzeichnen und speichern. Gleichzeitig erfolgen Videoaufzeichnungen der individuell markierten Tiere. Dies ermöglicht eine lückenlose Überwachung der individuellen Aktivität. Eine Auswertung kann somit sowohl auf Ebene der Gruppe als auch auf Einzeltierebene erfolgen. Daher ist es möglich, sowohl Einflüsse, die gleichmäßig auf den gesamten Bestand einwirken, zu

erkennen (z. B. Änderung der Qualität des Futters) als auch individuelle Veränderungen zu erfassen (z. B. Infektionskrankheiten).

Material und Methoden

Die Tiere wurden zu Versuchsbeginn mit Ohrmarken-Sensoren (SMARTBOW Eartag E093) der Firma Smartbow (Smartbow GmbH, Jutogasse 3, 4675 Weibern, AUSTRIA) ausgestattet. Die Sensoren messen die Beschleunigung in den drei Achsen des Raumes in einer Frequenz von 10 Hz und übertragen die Messwerte über zwei Empfangsgeräte (Wallpoints) an einen Server. Auf dem Server werden die Daten bis zur Auswertung gespeichert.

Für die Auswertung werden die Daten in die Software R eingelesen und analysiert. Es werden die Gesamtbeschleunigungen innerhalb von verschiedenen Zeitfenstern (1 Minute, 10 Minuten, 1 Stunde und 6 Stunden) hinsichtlich ihrer Varianz untersucht. Mittels verschiedener Schwellenwerte wird eine Klassifizierung in aktiv/inaktiv vorgenommen. Die betrachteten Schwellenwerte innerhalb des betrachteten Zeitfensters sind Standardabweichungen größer als $0,05 \times g$, $0,1 \times g$ und $0,2 \times g$. Wird innerhalb des untersuchten Zeitfensters eine Standardabweichung oberhalb des Schwellenwertes gemessen, so wird dieses Zeitfenster als aktiv gewertet.

Ergebnisse

Zu Beginn des Versuches kam es zu einigen Verlusten an Ohrmarken (insgesamt acht). In fast allen Fällen konnte die Fütterungstechnik als Ursache identifiziert werden. Bei der Futteraufnahme verhakten sich einige Tiere mit den Ohrmarken in den Futtertrögen, sodass die Ohrmarken anschließend herausgerissen wurden. Eine Modifikation der Tröge löste dieses Problem, sodass es im weiteren Verlauf des Versuchs zu keinen nennenswerten Ausfällen der Sensoren mehr kam.

Die Datenverlustrate betrug nur etwa 1 %. Insgesamt wurden während des Versuchs etwa 100 GB Beschleunigungsdaten aufgezeichnet.

Signifikante Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe konnten nicht festgestellt werden. Interessant ist, dass bei der Auswertung der Gesamtaktivität von allen Tieren beider Gruppen deutliche Trends festgestellt werden konnten. Etwa bis zum 20.08. sinkt die Aktivität kontinuierlich ab, danach steigt sie für etwa eine Woche wieder an. Am deutlichsten sichtbar wird dieses Muster bei einem Schwellenwert von $0,1 \times g$ in einem Analysezeitfenster von 6 Stunden (Abb. 3).

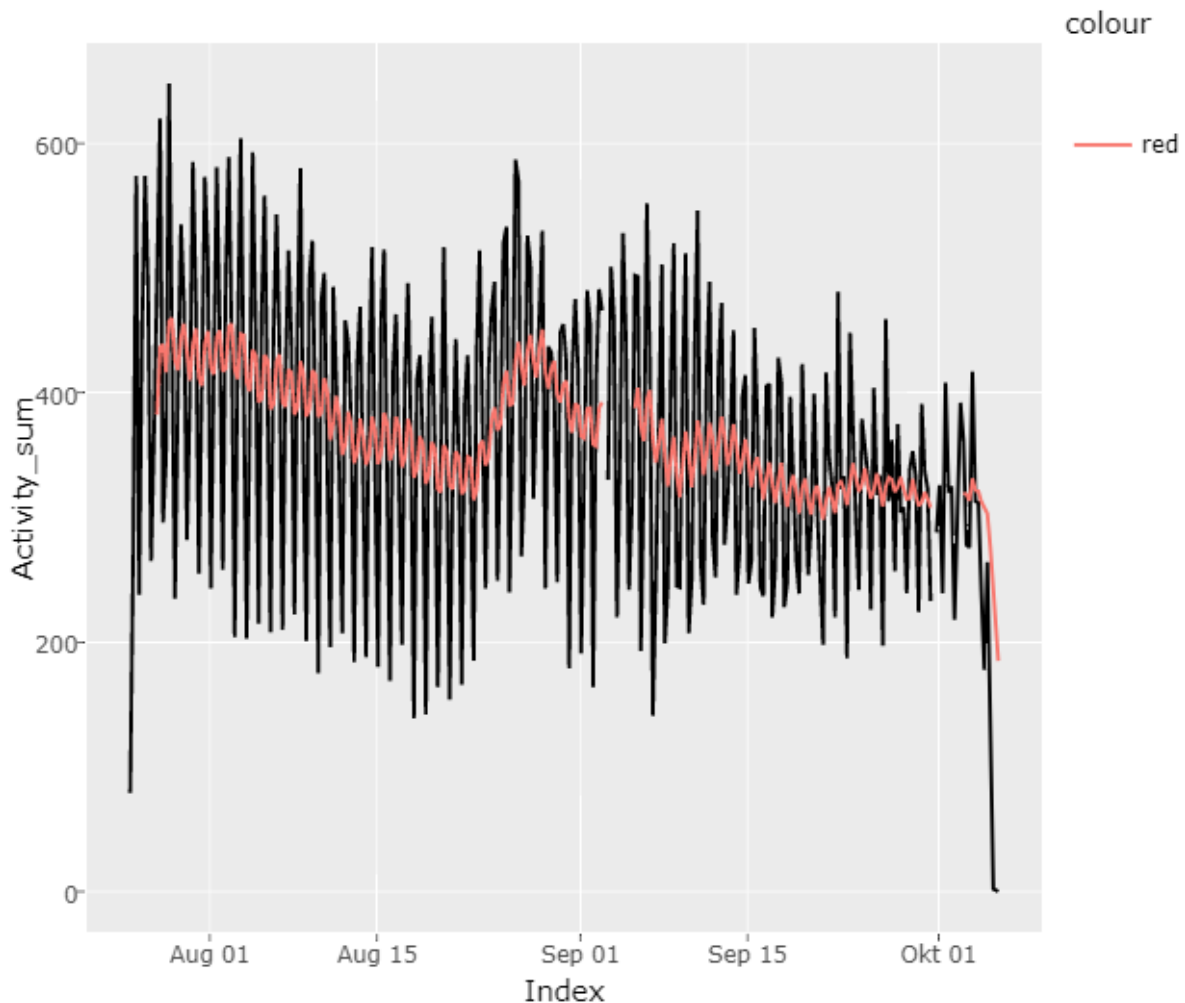


Abb. 3 In schwarz: aufsummierte Aktivität aller Tiere im Versuch innerhalb von 6-Stunden-Zeitfenstern und einem Schwellenwert für die Aktivität (d. h. Standardabweichung der Gesamtaktivität innerhalb des Zeitfensters) von $0,1 \times g$. In rot: gleitender Mittelwert der Aktivitätswerte über 100 Werte

Diskussion

Die Ohrmarken wurden von den Tieren sehr gut toleriert, lediglich zu Versuchsbeginn kam es durch inkompatible Einrichtungsgegenstände zu Verlusten von Sensoren. Nach der Behebung kam es zu keinen weiteren Verlusten. Das System zeichnete während des gesamten Versuchszeitraumes Daten auf. Die Verlustrate von Daten von etwa 1 % ist unvermeidbar und absolut unschädlich für die nachfolgende Analyse.

Die beschriebene Trendumkehr etwa am 20.08. deckt sich mit der Umstellung auf das Endmastfutter. Die andere Zusammensetzung des Endmastfutters führt unmittelbar nach der Futterumstellung zu einer relativen Verringerung der Futteraufnahme. Neben dieser geschmacklichen Komponente weist das Endmastfutter einen niedrigeren Energiegehalt auf. Beides, verringerte Futteraufnahme und niedrigerer Energiegehalt führt zu einer verstärkten Aktivität in Form einer Nahrungssuche. In der letzten Augustwoche kommt es dann erneut zu einer Trendumkehr: die Aktivität sinkt wieder und gleichzeitig steigen die Futteraufnahmen. Hier scheint es zu Adaptationen des Stoffwechsels zu kommen, der Ansatz von Fett erhöht sich, während der Proteinansatz reduziert wird. In der Folge

konnten dann mit etwa einer (oder sogar zwei) Wochen Verzögerung deutlich gesteigerte Lebendmassezunahmen ab der 9. Versuchswoche gemessen werden.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Bewegungsmelder macht deutlich, dass das sensorgestützte System ein deutlich detaillierteres Monitoring des Tierbestandes ermöglicht. Auswirkungen von Veränderungen der Futtermittel (z. B. des Energiegehaltes) können direkt in Form von geänderter Aktivität gemessen werden. Insofern ist es möglich, die Leistungsfähigkeit des Bestandes zu überwachen.

Mikrobiomanalyse - PCR-RFLP-Analyse

Einleitung und Problemstellung

Ansatz für die Untersuchungen zur Mikrobiota der Schweine war die Überlegung, dass Veränderungen im Tierwohl sich auch in der Zusammensetzung der Mikrobiota und/oder in einer Verschiebung der prozentualen Anteile verschiedener Mitglieder der Mikrobiota messen lassen könnten. Da in der Studie eine vergleichsweise große Anzahl an Tieren über einen großen Zeitraum longitudinal beprobt wurden, bot es sich an, die Dynamik in der Mikrobiota der Schweine in die Analysen einzubeziehen. Unteretzt wurden die Überlegungen auch dadurch, dass in einer der Versuchsgruppen über einen längeren Zeitraum Mykotoxin-belastetes Futter verabreicht wurde. Methodisch kam die PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polyphormismen-Analyse (PCR-RFLP-Analyse) mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen zur Anwendung. Die erhaltenen Restriktionsmuster wurden dokumentiert, einheitliche Matrizes erzeugt, genetische Distanzen bestimmt und anschließend Clusteranalysen durchgeführt.

Material und Methoden

In die Untersuchungen wurden 32 Schweine einbezogen, die in zwei Untersuchungsgruppen von jeweils 16 Tieren pro Gruppe unterteilt wurden. Die Tiere wurden in Schweine-Versuchstierställen des FLI am Standort Braunschweig gehalten. Von allen Tieren wurden Kotproben rektal im wöchentlichen Rhythmus entnommen. Dazu wurde das wöchentliche Wiegen der Tiere genutzt, so dass jede Probe auch eindeutig dem jeweiligen Schwein zugeordnet werden konnte. Insgesamt standen Proben von 13 Untersuchungszeitpunkten (vom 12.07.2016 bis zum 04.10.2016) für jedes Schwein (Lebendmasse-Bereich von ca. 29 kg bis 125 kg) zur Verfügung. Lediglich zwei Schweine schieden vorzeitig aus dem Versuch aus. Bei diesen Tieren fehlen Proben von einigen Untersuchungszeitpunkten. Von der dritten bis zur fünften Untersuchungswoche wurde der Gruppe 1 Mykotoxin-belastetes Mastfutter verabreicht. Die Lagerung der Kotproben erfolgte bei -80 °C.

Die DNA wurde von allen Kotproben mittels kommerzieller Präparationskits (ZR Fecal DNA MiniPrep, Zymo Research, Irvine, CA, USA) nach den Vorgaben des Herstellers extrahiert. Die Qualität der DNA wurde nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel (1 %) optisch beurteilt (Abb. 4), die DNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop 1000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt.

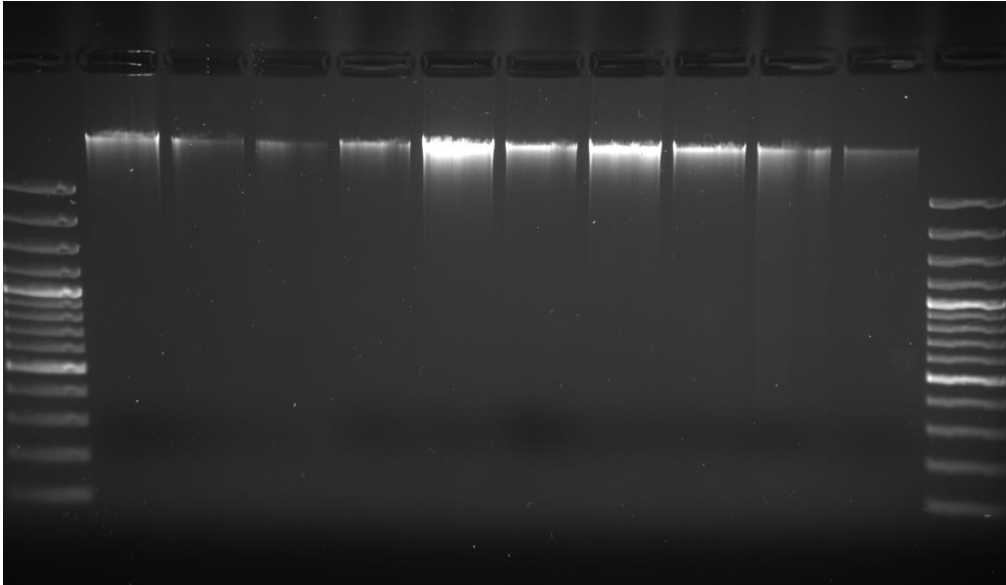


Abb. 4: Agarose-Gelelektrophorese von ausgewählten DNA-Präparationen aus dem Kot der Versuchsschweine (Tiere 1 – 10).

Die Analyse der DNA-Proben erfolgte nach Castillo *et al.* [1]. Ein 580 bp Fragment der 16S-rRNA wurde aus jeder DNA mittels PCR amplifiziert, wobei Primer eingesetzt wurden, die spezifisch für die konservierten Sequenzen, die die variablen Regionen V3, V4 und V5 flankieren, genutzt wurden (5'-CTACGGGAGGCAGCAGT-3' [forward], 5'-CCGTCWATTCMTTGGAGTTT-3' [reverse]). Die Amplifikation erfolgte in einem 50 µl-Ansatz im Thermal Cycler CFX96 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit folgenden Bedingungen: Ein Denaturierungsschritt für 4 min bei 94 °C, anschließend 35 Zyklen mit Denaturierung bei 94 °C (1 min), Annealing bei 45 °C (1 min) mit einer Increasing-Temperatur von 0.1 °C pro Zyklus, Extension bei 72 °C (1 min 15 sec) und einem finalen Extensionsschritt bei 72 °C (15 min). Im nächsten Schritt erfolgte der Restriktionsverdau aller PCR-Fragmente (jeweils 10 µl) mit jeweils vier verschiedenen Restriktionsenzymen (*Rsal*, *HpaII*, *HhaI*, *AluI* [New England Biolabs GmbH, Frankfurt/M, Deutschland]). Der Verdau wurde für alle Enzyme in den jeweiligen Restriktionspuffern bei 37 °C für 4 Stunden durchgeführt. Für die Auftrennung der Restriktionsfragmente wurden 2 % Agarosegele genutzt. Die Ergebnisse wurden als .tif-Files im Geldokumentationssystem generiert. Die Analyse der Restriktionsmuster erfolgte mit verschiedenen Tools in BioNumerics Vers. 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) Für den paarweisen Vergleich der Restriktionsprofile und der Erstellung der Dendrogramme wurden einheitliche Matrizes mittels des Hierarchical Clustering Explorer 3.0 unter Nutzung der Manhattan Distanz erzeugt.

Ergebnisse und Diskussion

Für die PCR-RFLP wurden 4 Restriktionsenzyme ausgewählt, die in der Literatur bei analogen Studien beschrieben sind [1, 2]. In die Analyse der Restriktionsprofile wurden bei *HhaI* bis zu 16, bei *HpaII* bis zu 14, bei *Rsal* bis zu 12 und bei *AluI* bis zu 13 klar differenzierbare Banden einbezogen. Bei der Kombination der Ergebnisse für alle 4 Enzyme für jedes Schwein zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurde jeweils ein Pattern erzeugt, das zwischen 21 und 35 Banden pro Profil aufwies.

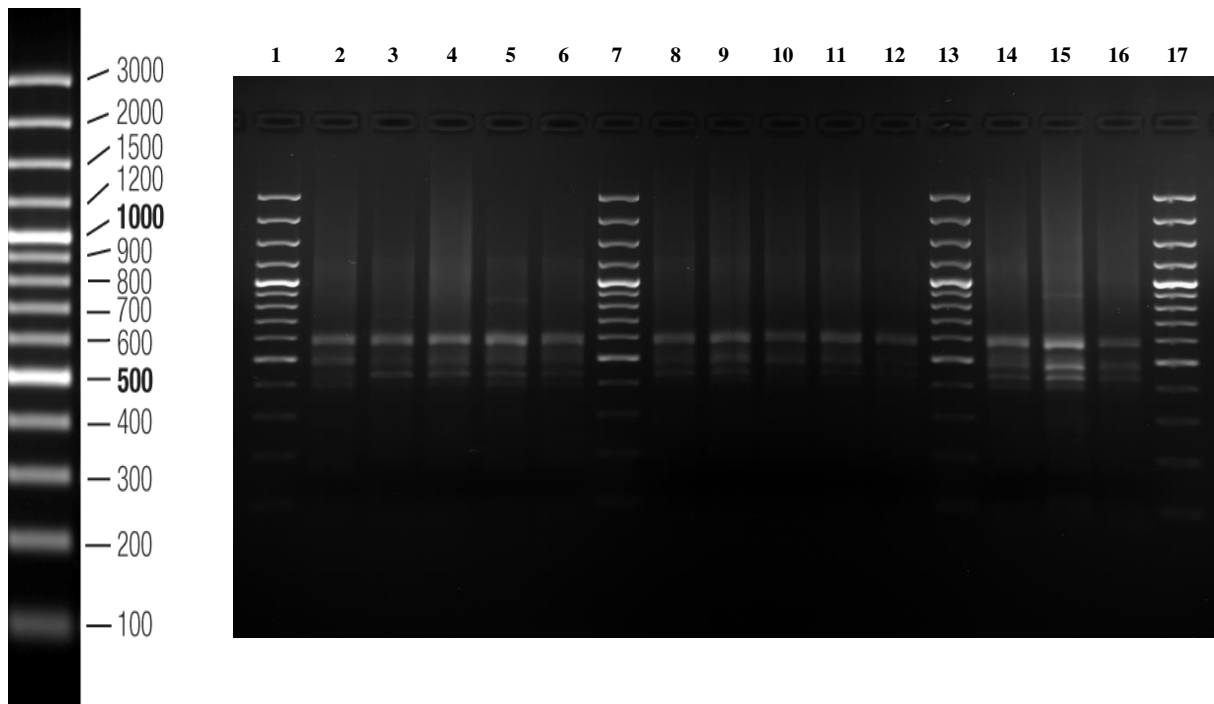


Abb. 5: Agarosegelelektrophorese der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Analyse nach AluI-Restriktionsverdau an den 13 unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten bei Tier 14 (Lane 1, 7, 13 und 17 - 100-bp-Marker, Lane 2 - Probe 12.07.16, Lane 3 - Probe 19.07.16, Lane 4 - Probe 26.07.16, Lane 5 - Probe 02.08.16, Lane 6 - Probe 09.08.16, Lane 8 - Probe 16.08.16, Lane 9 - Probe 23.08.16, Lane 10 - Probe 30.08.16, Lane 11 - Probe 06.09.16, Lane 12 - Probe 13.09.16, Lane 14 - Probe 20.09.16, Lane 15 - Probe 27.09.16, Lane 16 - Probe 04.10.16).

Die individuellen Patterns der einzelnen Schweine variierten an den 13 Untersuchungszeitpunkten nur unwesentlich (Beispiel Tier 14, Abb. 5). Die einzige Ausnahme stellt das Tier 4 dar. In diesem Fall sind in allen Restriktionsmustern deutliche Veränderungen an den drei letzten Untersuchungszeitpunkten nachweisbar. Die Cluster erreichen hier nur eine Ähnlichkeit von ca. 45 % bis 80 % (siehe Abb. 6 und Abb. 7).

Beim Vergleich der Patterns zwischen den einzelnen Tieren sind die Unterschiede ebenfalls sehr gering. Die Ähnlichkeit der Cluster liegt bei mehr als 90 %. Größere Differenzen zwischen den beiden Gruppen konnten ebenfalls nicht beobachtet werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mikrobiota bei den untersuchten Schweinen stabil zu sein scheint und auch bei gleichen Haltungs- und Fütterungsbedingungen sich über einen längeren Zeitraum kaum verändert. Selbst die über dem Richtwert liegende Belastung mit Mykotoxinen scheint keinen entscheidenden Einfluss zu haben.

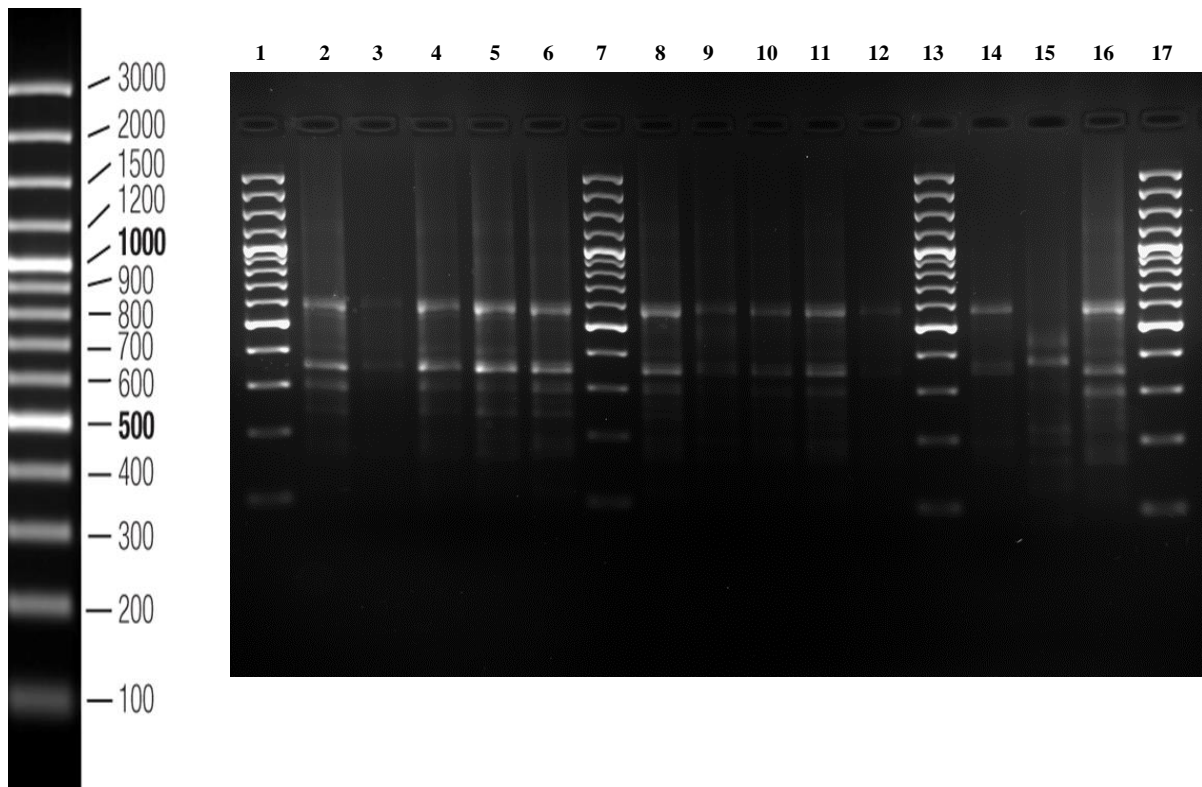


Abb. 6: Agarosegelelektrophorese der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Analyse nach HhaI-Restriktionsverdau an den 13 unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten bei Tier 4 (Lane 1, 7, 13 und 17 - 100-bp-Marker, Lane 2 - Probe 12.07.16, Lane 3 - Probe 19.07.16, Lane 4 - Probe 26.07.16, Lane 5 - Probe 02.08.16, Lane 6 - Probe 09.08.16, Lane 8 - Probe 16.08.16, Lane 9 - Probe 23.08.16, Lane 10 - Probe 30.08.16, Lane 11 - Probe 06.09.16, Lane 12 - Probe 13.09.16, Lane 14 - Probe 20.09.16, Lane 15 - Probe 27.09.16, Lane 16 - Probe 04.10.16).

Die im Tier 4 beobachteten Unterschiede in den Restriktionsmustern in den Proben aus den drei letzten Untersuchungswochen lassen sich mit keinen anderen Beobachtungen im Bewegungsmuster des Tieres korrelieren.

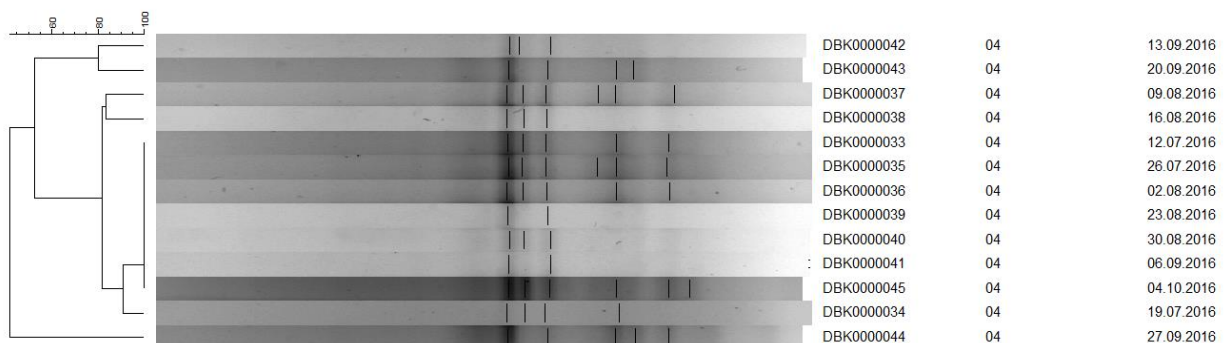


Abb. 7: Dendrogramm (unweighted pair group method with arithmetic mean [UPGMA], Manhattan distance) zeigt die genetischen Distanzen in den HpaII-Restriktionsmustern beim Tier 4 zu den 13 Untersuchungszeitpunkten.

Literatur

1. Castillo, M., *et al.*, The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. *J Anim Sci*, 2006. 84(10): p. 2725-34.
2. Stelzer, K., *et al.*, The Use of Restriction Fragment Length Polymorphism and Fluorescence in Situ Hybridization to Investigate Microbiota of Piglets after Feeding Oregano. *Food and Nutrition Sciences*, 2014. 05(17): p. 1628-1636.

Mikrobiomanalyse - MALDI-TOF MS Analyse von Kotproben

Einleitung

Die Identifizierung von Bakterien durch MALDI-TOF Massenspektrometrie hat sich in den letzten Jahren als diagnostische Standardmethode durchgesetzt. Darüber hinaus wurde in vielfältigen Publikationen gezeigt, dass die Methode nach geringfügigen Anpassungen auch für die Charakterisierung anderer ‚Biomasse‘ hervorragende Ergebnisse erzielt. So findet lineare MALDI-TOF MS inzwischen vielfältige Verwendung z. B. zur taxonomischen Einordnung von Arthropoden und Mollusken, zur Charakterisierung von Zellen des Immunsystems [1] oder auch zur Prüfung der Qualität von Lebensmitteln [2]. Die breite Verwendung MALDI-TOF MS begründet sich vor allem durch ihre hervorragende Reproduzierbarkeit, geringe Analysekosten, Hochdurchsatzfähigkeit und die hohe Flexibilität bezüglich des Analysenmaterials.

Ziel

Innerhalb des Projektes sollte die Anwendbarkeit der MALDI-TOF MS zur Detektion von Veränderung des Mikrobiomes erprobt werden. Während die Identifizierung von einzelnen Bakterienkolonien durch MALDI-TOF MS Routine ist, stellt die Charakterisierung von Gemischen von Bakterien eine Herausforderung dar [3]. Die detaillierte Erfassung möglichst vieler Bestandteile des Mikrobioms wurde deswegen nicht angestrebt, sondern vielmehr die Klärung der Frage, ob die in anderen Teilen des Projektes bereits nachgewiesenen Mikrobiomveränderungen durch MALDI-TOF Massenspektren nachvollziehbar sind und ob sich Referenzspektren generieren lassen, mit deren Hilfe Kotproben Mikrobiomen bestimmter Zusammensetzung zugeordnet werden können.

Ergebnisse

a) Material

In einem Blindversuch wurden Kotproben von drei Tieren untersucht, von denen eines nach Untersuchung von Dr. Geue im Untersuchungszeitraum deutliche Änderungen des Mikrobioms aufwies (Tier 4). Die Proben der beiden anderen Tiere (Tiere 17 und 20) waren unauffällig.

b) Bakterienpräparation aus Kotproben

Zunächst war es erforderlich, ein Protokoll zur Anreicherung von Bakterien aus Kot (4, 5) für die vorliegenden Proben anzupassen. Dabei kam es insbesondere darauf an, ausschließlich MS-kompatible Reagenzien zu verwenden. Die Anwendbarkeit des modifizierten Protokolls wurde durch eine Keimzahlbestimmung bestätigt. Aus den isolierten Bakterien konnten mit Standardmethoden [6] reproduzierbar Spektren hoher Qualität aufgenommen werden (Abb. 8).

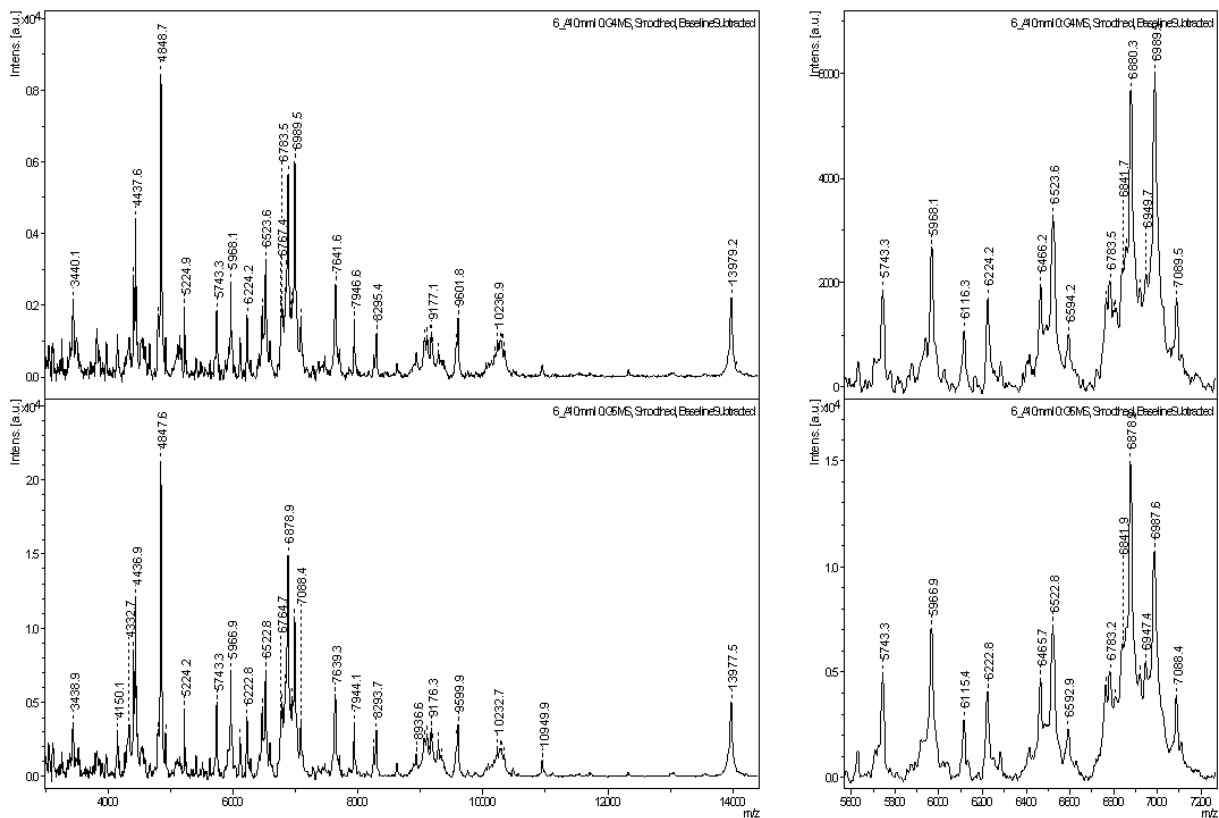


Abb. 8: Übersichtsspektren im typischen Massenbereich für lineare MALDI-TOF Massenspektren von Bakterien (links) und Detailausschnitt daraus (rechts) von zwei unabhängigen Präparationen aus der gleichen Kotprobe (Tier 1, #6). Die Präparationen liefern sehr gut reproduzierbare Spektren, eine Voraussetzung zur Generierung auswertbarer Referenzspektren.

c) Korrelation mit dem Futterwechsel

Mit der entwickelten Präparationsmethode wurden Referenzspektren der vorhandenen Proben generiert. Aufgrund der erwarteten hohen Komplexität der Spektren, ist es erforderlich, die für die Auswertung von homogenen Proben entwickelte kommerzielle Software (MALDI Biotyper, ClinProTools, beide Bruker) entsprechend anzupassen und, falls notwendig, durch eigene Skripten zu ergänzen [7]. Dennoch konnten bei den drei vorliegenden Spektrenserien interessante zeitliche Verläufe festgestellt werden, die zumindest bei Tier 4 gut mit der Futterumstellung korrelierten (Abbildung 9). Von besonderer Bedeutung scheinen dabei eine Masse um die 6.880 Da und ein Massentriplet um die 6.500 Da zu sein.

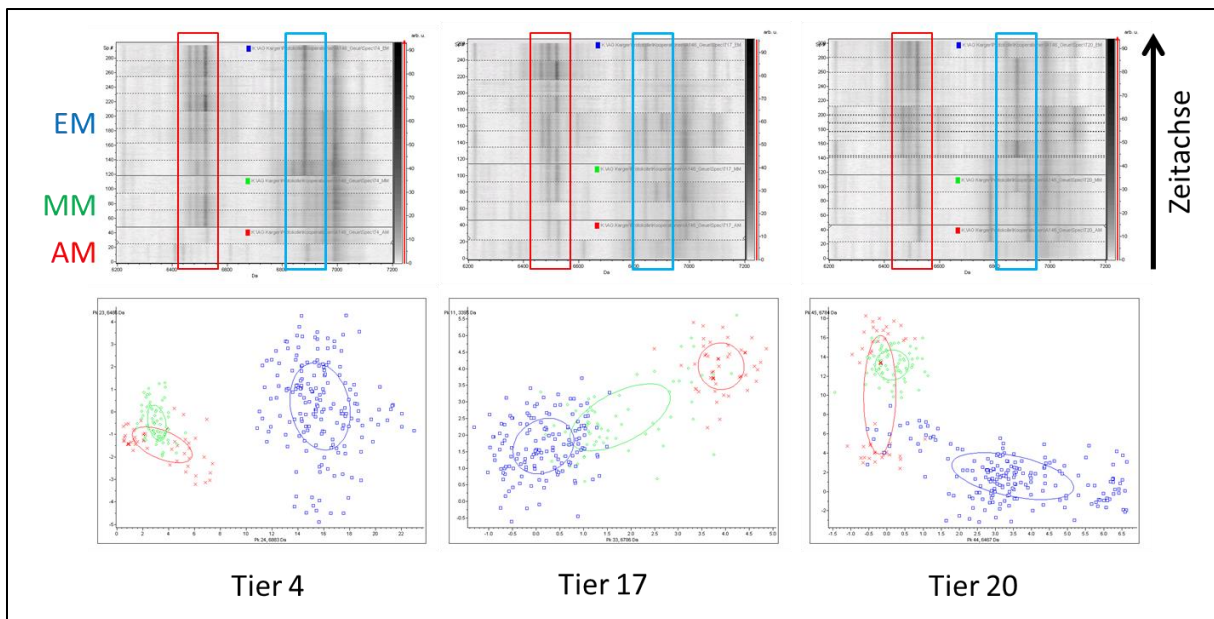


Abb. 9: In der oberen Reihe sind die Massenspektren der Tiere 4, 17 und 20 in ihrem zeitlichen Verlauf (von unten nach oben) dargestellt. Der Massenbereich (X-Achse) reicht von 6.200 Da bis 7.200 Da. Die Futterzusammensetzung (AM, MM und EM) ist links angegeben. Die rot und blau hervorgehobenen Bereiche um 6.500 Da bzw. 6.880 Da lassen den zeitlichen Verlauf der Veränderung der Spektren erkennen. In der unteren Reihe wurden die Intensitäten von zwei Massenpeaks gegeneinander aufgetragen, die die einzelnen Gruppen (AM, MM und EM) besonders gut trennen. Die Farben der einzelnen Proben entsprechen denjenigen in der oberen Reihe (rot: AM, grün: MM, blau: EM).

Diskussion

Die aus den Kotproben der drei Schweine präparierten Bakterien können zur MALDI-TOF MS verwendet werden. Die erhaltenen Spektren zeigen einen zeitlichen Verlauf, der durchaus futterbedingt sein könnte. Dafür spricht die starke Veränderung der Spektren jeweils zum Zeitpunkt der Futterumstellung bei Tier 4. Allerdings wurden diese sehr markanten Veränderungen bei den beiden anderen Tieren nicht beobachtet. Dennoch gelingt auch bei diesen durch Selektion geeigneter Massen eine Trennung in frühe (AM und MM) und späte (EM) Mastphase. Verbesserungen der Analyse durch die Anwendung von Verfahren der multivariaten Statistik scheinen möglich. Kritisch zu sehen ist die doch recht hohe Varianz der Spektren zwischen den einzelnen Tieren. Um diese zu verbessern, sind weitere Versuche zur Präparation der Bakterien notwendig.

Literatur

1. Karger A. 2016. Current developments to use linear MALDI-TOF spectra for the identification and typing of bacteria and the characterization of other cells/organisms related to infectious diseases. *Proteomics Clin Appl* doi:10.1002/prca.201600038.
2. Wieme AD, Spitaels F, Aerts M, De Bruyne K, Van Landschoot A, Vandamme P. 2014. Identification of beer-spoilage bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Int J Food Microbiol* 185:41-50.

3. Mahe P, Arzac M, Chatellier S, Monnin V, Perrot N, Mailler S, Girard V, Ramjeet M, Surre J, Lacroix B, van Belkum A, Veyrieras JB. 2014. Automatic identification of mixed bacterial species fingerprints in a MALDI-TOF mass-spectrum. *Bioinformatics* 30:1280-1286.
4. Tanca A, Palomba A, Pisanu S, Deligios M, Fraumene C, Manghina V, Pagnozzi D, Addis MF, Uzzau S. 2014. A straightforward and efficient analytical pipeline for metaproteome characterization. *Microbiome* 2:49.
5. Apajalahti JH, Sarkilahti LK, Maki BR, Heikkinen JP, Nurminen PH, Holben WE. 1998. Effective recovery of bacterial DNA and percent-guanine-plus-cytosine-based analysis of community structure in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 64:4084-4088.
6. Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, Geider K. 2008. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS ONE* 3:e2843.
7. Karger A, Ziller M, Bettin B, Mintel B, Schares S, Geue L. 2011. Determination of serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates by intact cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 77:896-905.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Aktivitätserfassung

Sowohl das Bewegungsmelder- als auch das sensorgestützte System ist zur Erfassung der Aktivität der Tiere geeignet. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Bewegungsmelder macht deutlich, dass das sensorgestützte System ein deutlich detaillierteres Monitoring des Tierbestandes ermöglicht. Auswirkungen von Veränderungen der Futtermittel (z. B. des Energiegehaltes) können direkt in Form von geänderter Aktivität gemessen werden. Insofern ist es möglich, die Leistungsfähigkeit des Bestandes zu überwachen.

Die Anzahl der Tiere, die mit Sensoren ausgestattet werden müssen, um eine Aussage auf den Zustand des Gesamtbestandes zuzulassen, wird in erster Linie durch das erwartete Ausmaß der Veränderungen beeinflusst. Im untersuchten Versuchsaufbau war es trotz Ausstattung aller Tiere mit Sensoren nicht möglich, Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe zu identifizieren. Es werden daher weitere Versuche durchgeführt, bei denen durch Infektionen stärkere Veränderungen der Aktivität herbeigeführt werden. Hierbei wird es dann möglich sein, Versuchs- von Kontrollgruppen zu unterscheiden.

Mikrobiomanalyse

Die PCR-RFLP-Analyse des Mikrobioms deutet darauf hin, dass die Mikrobiota bei den untersuchten Schweinen stabil zu sein scheint und sich auch bei gleichen Haltungs- und Fütterungsbedingungen über einen längeren Zeitraum kaum verändert. Selbst die Fütterung von Mykotoxin-belastetem Futter (DON-Gehalt deutlich über dem Richtwert) scheint keinen entscheidenden Einfluss zu haben. Im Gegensatz dazu zeigen die in der MALDI-TOF MS basierten Analyse des Mikrobioms erzeugten Spektren einen zeitlichen Verlauf, der durchaus futterbedingt sein könnte. Dafür spricht die starke Veränderung der Spektren jeweils zum Zeitpunkt der Futterumstellung bei einem Tier. Allerdings wurden

diese sehr markanten Veränderungen bei den beiden anderen Tieren nicht beobachtet. Dennoch gelingt auch bei diesen durch Selektion geeigneter Massen eine Trennung in frühe (AM und MM) und späte (EM) Mastphase.

Beide für die Mikrobiomanalyse angewendeten Methoden sind möglicherweise zu grob, um mögliche Veränderungen in der Mikrobiota nachweisen zu können bzw. erfordern noch weitere Untersuchungen und Analysen um die Aussagekraft zu verbessern. Sie sind zwar verhältnismäßig preiswert, können aber zunächst nur als Orientierung für größere Veränderungen angesehen werden.

Deutlich bessere, aber auch kostenintensivere Verfahren sind Mikrobiomanalysen auf der Basis von 16S-rRNA-Sequenzierungen. Deshalb soll vom Tier 4, bei dem mögliche Veränderungen in der Mikrobiota in den letzten Untersuchungswochen durch beide Analysemethoden identifiziert wurden, eine solche sequenzbasierte Mikrobiomanalyse angeschlossen werden. Dazu werden Proben von drei Untersuchungswochen (eine Probe vor den Veränderungen, zwei Proben aus den letzten Untersuchungswochen) mittels 16S-rRNA-Sequenzierungen analysiert.