

Diagnostisering av subklinisk paratuberkulose hos geit ved hjelp av interferon gamma testen

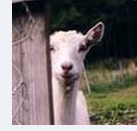
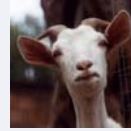
Kari Roste Lybeck, stipendiat



Optimalisering av interferon gamma testen

PhD-prosjekt

Norsk forskningsråd
Tine



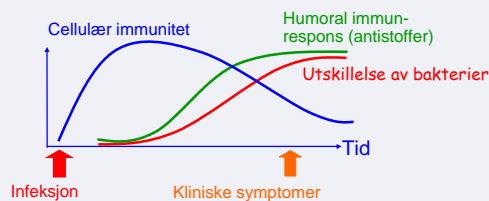
Hva vet vi?

Bruk i "Friskere geiter"

Hvordan nå målet?

Diagnostisering

- Dyr er subklinisk infisert i flere år
- Den cellulære immunresponsen utvikles først
- Fravær av antistoffer i blod og bakterier i avføring den første subklinsike fasen
- I tidlige stadier av sykdommen har tester som måler den cellulære immunresponsen høyest sensitivitet



Interferon gamma (IFN- γ)

- Cytokin produsert av T lymfocytter, natural killer celler (NK celler) og NKT celler
- Aktiverer makrofager som stimuleres til å drepe
- Svært viktig del av immunforsvaret mot mykobakterier

IFN- γ testen

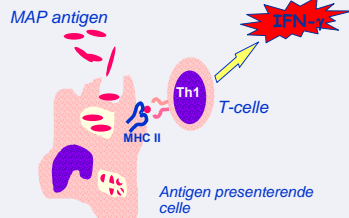
- Måler den cellulære immunresponsen
- Problem med falske positive - lav spesifisitet hos storfe
- Innledende studie på geit var lovende - mindre falske positive enn hos storfe (Storset 2005)
- Brukes i "Friskere geiter"

Testoppsett

- Blod stimuleres med antigen fra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP antigen) i 24 timer
- Paratuberkulose kan diagnostiseres fordi antigenet det stimuleres med, er spesifikt for paratuberkulose bakterien
- En ikke stimulert kontroll settes opp for hver prøve

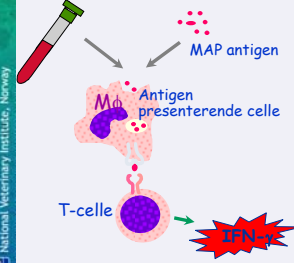


Tidligere sensibiliserte T celler kan kjenne igjen antigen som er spesifikt for en bestemt infeksjon

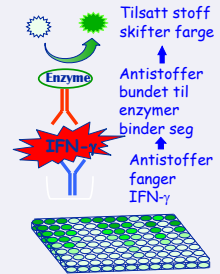


Stimulering og påvisning av IFN-γ

Blod stimuleres i laboratoriet



Påvisning ved ELISA



Utrekning og vurdering av resultater

$\Delta OD: [(OD \text{ PPD stimulerede brønner} - OD \text{ kontroll brønner}) / (OD \text{ test positiv kontroll} - OD \text{ test negativ kontroll})]$

Positiv prøve:

ΔOD verdier på 0.2 eller høyere

- Svakt positiv
- Sterkt positiv

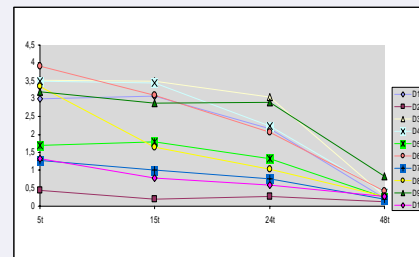
Underkjent prøve:

OD høyere enn 0.3 i ustimulerte kontrollbrønner

- Høy bakgrunn

Testen krever levende celler - blodprøver må analyseres innen 24 timer

Forsøk viser at produksjonen av IFN-γ synker dersom prøvene lagres i 48 timer. Det er også noe nedgang etter 24 timers lagring

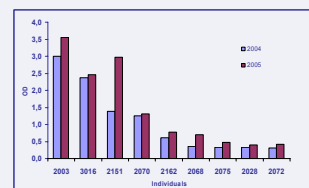


IFN-γ resultater "Friskere geiter" Positive prøver

- 2004: Testet 7 besetninger og totalt 903 geiter
- 2005: Testet 50 besetninger og totalt 2492 geiter
- Totalt 28 positive geiter
- Kun 5 positive ved retesting - Skyldes trolig kontakt med andre mykobakterier i miljøet
- Testet 206 sauer fra ni kombinerte besetninger
- 13% av sauene testet positivt
- Sau kan være en smittekilde for sanerte geitebesetninger!

Høy bakgrunn = underkjent prøve

- Produksjon av IFN-γ i ustimulerte brønner hos ca 9.9% av geitene testet i 2004 og 2005
- Mange underkjente også ved retesting
- Flere av geitene ble underkjent begge år



Testplan "Friskere geiter" 2006

Lavrisikoområder

- Testing av kje i ett år fra sesongen de snapper

Høyrisikoområder

- Testing av kje i tre år fra sesongen de snapper
- Dersom et kje er sterkt positivt, testes hele besetningen
- Dersom et kje er svakt positivt, testes mordyret

- Teste all sau i kombinasjonsbesetninger i risikoområder

Håndtering av resultatene

Underkjente

- En del av dyrene tas inn til VI for nærmere undersøkelser som del av PhD- prosjektet

Sterkt positive

- Slaktes og obduseres

Svakt positive

- Lavrisikobesetninger: Retestes om ett år
- Høyrisikobesetninger: Slaktes og obduseres

Videre arbeid

- Behov for videre undersøkelser
- Videre testing i "Friskere geiter"
 - Mer informasjon om testens sensitivitet og spesifisitet
- Følge opp enkelte besetninger med høy risiko og teste alle geiter i noen år fra 2007
 - Hvor tidlig får dyrene IFN-γ respons?
 - Hvilken generasjon bør testes?
- Delmål i PhD- prosjektet

Delmål for PhD-prosjektet

- Teste naturlig infiserte geiter
- Optimalisere transporttid og temperatur ved prøveinnsendelse
- Evaluere testen hos sau
- Undersøke årsaken til høy bakgrunnsproduksjon av IFN-γ

Årsak til høy bakgrunn

- Videre testing av dyr med høy bakgrunn
 - Paratuberkulose
 - Andre sykdommer
- Immunisering med paratuberkulose bakterien
- Identifisere celletypen som gir høy bakgrunn - NK celler ?
- Undersøke metoder for å hemme cellene som gir høy bakgrunn
- Undersøke cytokin mønstre hos geiter med høy bakgrunn

Vi håper forskingen vi gi økt forståelse av testen, og at testen vil bli nyttig i forvaltningen av paratuberkulose