

## livet - Hintergrundinformation

### Einleitung

Hochansteckende Krankheiten wie Equine Influenza oder Druse sind ein zentraler Aspekt im Hygiene- und Gesundheitsmanagement von Pferdebetrieben. Eine schnelle und genaue Bestimmung der verursachenden Pathogene kann sowohl eine Weiterverbreitung im Bestand als auch eventuell dadurch anfallende hohe Kosten für Betrieb und Besitzer vermeiden. Jedoch ist eine schnelle und vor allem zuverlässige Diagnostik im akuten Infektionsgeschehen aktuell schwierig (Cummins et al.).

Standardmäßig wird eine zu untersuchende Probe zur exakten Bestimmung des infektiösen Pathogens in ein externes Labor geschickt. Diese Analyse ist zeitintensiv, weshalb häufig die schnellere Variante der unspezifischen Medikation präferiert wird. Dies kann jedoch den Anstieg antimikrobieller Resistenzen, AMR, verstärken, welche am Weltwirtschaftsforum 2013 (WEF) als eines der langfristigen globalen Risiken anerkannt wurde.

### Infektionskrankheiten - Aktuelle Veterinärdiagnostikverfahren

Das momentane Fehlen von zuverlässigen vor Ort Tests für die Veterinärdiagnostik verstärkt diese Problematik sowohl für das Individuum, als auch für die gesamte equine Population. Zusätzlich begünstigen AMR das Fehlschlagen von unspezifischen Therapien allgemein (Weese et al.). Eine schnelle Diagnose von Infektionskrankheiten ist somit von höchster Wichtigkeit. Dies stellt eine adäquate Behandlung des betroffenen Individuums sicher und verhindert die Weiterverbreitung der Infektion auf Tiere des gleichen Bestandes (van de Sande-Bruinsma et al.).

### Diagnostik in einem Referenzlabor

Referenzlabore benutzen meist unhandliche Analysegeräte, deren Bedienung komplex ist und daher ausgebildetes Personal für die Bedienung und Interpretation der Daten benötigt (de Paz et al.). Verzögerungen der Diagnose von bis zu mehreren Tagen und damit der geeigneten Behandlung des Patienten können zusätzlich durch Faktoren wie Transport oder einer Anlieferung der Proben außerhalb der Öffnungszeiten (wie z.B. an Wochenenden) bedingt sein. Die am weitesten verbreiteten Labormethoden für die Detektion von Mikroorganismen sind Bakterienkulturen, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA; ein auf Antikörpern basiertes Nachweisverfahren) und Polymerasekettenreaktionen (Polymerase Chain Reaction – PCR), sh. Tabelle 1.

Tabelle 1: Vergleich von Standardmethoden zum Nachweis von Pathogenen in Referenzlaboren

Methode	Dauer	Ressourcen	Kosten	Sensitivität
<b>Bakterienkultur</b>	Einige Tagen bis Wochen	ausgebildete und erfahrene Labortechniker*innen	Mittel	+ / +++
<b>ELISA</b> (Antigen/Antikörper)	Stunden	ausgebildete und erfahrene Labortechniker*innen	Tief/mittel	+ / +++
<b>PCR</b> (real-time, end-point)	Stunden bis Tag	ausgebildete und erfahrene Labortechniker*innen, spezielles Gerät	Hoch	+++

## Verfügbare Point-of-Care-Diagnostik

Die derzeit am weitesten verbreiteten Tests für die vor Ort Untersuchung von Infektionskrankheiten in der Veterinärmedizin sind Teststreifen, die auf dem lateral flow Test (Seitenstrom-Immunoassay) basieren (Busin et al.). Diese beinhalten u.a. Tests für Borreliose, Ehrlichiose, Anaplasiose oder das Canine Parvovirus. Da diese auf der Detektion von Wirtsantikörpern basieren, können sie eine Infektion erst verzögert feststellen und sind somit nicht für die Diagnose von akuten Krankheitsausbrüchen geeignet (sh. Abbildung 1).

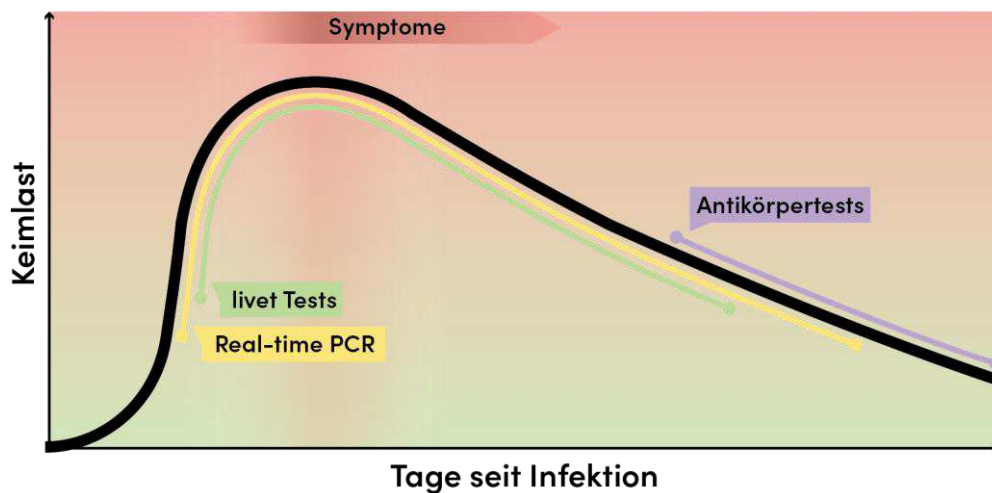


Abbildung 1: Verlauf der Keimlast während einer Infektion und die dazugehörigen diagnostischen Methoden im zeitlichen Verlauf

## Unsere Lösung

Das Gründerteam von livet kann insgesamt auf mehr als 16 Jahre Erfahrungen in Entwicklung und Implementierung mikrobiologischer Diagnostik im Bereich der Humanmedizin blicken (Institut für Infektionskrankheiten, IFIK, Universität Bern, Schweiz). Mit unserem Wissen haben wir eine neuartige isothermale Amplifikationsmethode zur Echtzeitdetektion entwickelt.

Ähnlich wie bei der traditionellen PCR amplifiziert diese isothermale Reaktion eine charakteristische Nukleinsäuresequenz mit der Hilfe von Enzymen und spezifischen Primern. Einige Beispiele für isothermale Amplifikationstechnologien sind unter anderem LAMP (loop-mediated isothermal amplification; Notomi et al.), RPA (recombinase polymerase amplification; Piepenburg et al.) oder SDA (strand displacement amplification; Walker et al.).

Eine der vielen Herausforderungen bei der isothermalen Amplifikation ist die niedrige Spezifität, welche in unspezifischen Primeranbindungen resultieren kann, und die dadurch bedingte hohe Komplexität des Primerdesigns. Dank unserer Erfahrung in isothermalen Amplifikationsmethoden konnten wir diese Probleme lösen. Um die Abwesenheit von Inhibitoren oder Pipettierfehlern sicherzustellen, ist eine interne Prozesskontrolle standardmässig in unsere Assays eingebaut. Diese wird bei Abwesenheit der gesuchten Zielsequenzen vervielfältigt. Das hierbei verwendete Enzym hat Helicase-Aktivität, weshalb kein Denaturierungsschritt bei 95 °C benötigt wird. So kann die Reaktion bei nur 65 °C auf einem einfacheren Gerät laufen.

Das Portfolio von livet umfasst aktuell Tests für *Streptococcus equi equi*, Equines Herpesvirus Typ 1 und 4 (EHV-1 und EHV-4) und Equine Influenza. Tests für weitere Pathogene folgen.

livet ag

Freiburgstrasse 251, 3018 Bern, Switzerland  
+41 (0) 31 552 07 17, info@li.vet, www.li.vet

## Zusammenfassung

Wir sind uns heute wahrscheinlich mehr denn je der Notwendigkeit von schneller und zuverlässiger Diagnostik für Infektionskrankheiten bewusst. Schnelle Diagnosen führen zu sofortigen und genau angepassten Therapien und können so zum Schutz vor Epidemien beitragen. Mit schneller und effektiver Diagnostik kann die Herausgabe von Antibiotika in großen und präventiven Mengen abgemildert werden und zielorientierte Therapeutika verabreicht werden. Dies hat eine verminderte Resistenzentwicklung als positiven Nebeneffekt zur Folge.

Bis jetzt war die Veterinärdiagnostik von langen Wartezeiten durch aufwändige Labordiagnostik oder unzuverlässige Antikörper-basierte Tests geprägt. livet bietet eine schnelle und hochzuverlässige Methode für die vor Ort Diagnose von Infektionskrankheiten bei Tieren.

## Referenzen

**Cummins** BM, Ligler FS, Walker GM. Point-of-care diagnostics for niche applications. *Biotechnol Adv.* 2016 May-Jun;34(3):161-76. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.01.005

**WEF** Global Risks 2013 – Eight Edition,  
[http://www3.weforum.org/docs/WEF\\_GlobalRisks\\_Report\\_2013.pdf](http://www3.weforum.org/docs/WEF_GlobalRisks_Report_2013.pdf)

**Weese** J., Antimicrobial resistance in companion animals, *Anim Health Res Rev.* 2008 Dec;9(2):169- 76. doi: 10.1017/S1466252308001485.

**van de Sande-Bruinsma** N, Grundmann H, Verloo D, Tiemersma E, Monen J, Goossens H, Ferech M; European Antimicrobial Resistance Surveillance System Group; European Surveillance of Antimicrobial Consumption Project Group. Antimicrobial drug use and resistance in Europe, *Emerg Infect Dis.* 2008 Nov;14(11):1722-30. doi: 10.3201/eid1411.070467

**Busin** V, Wells B, Kersaudy-Kerhoas M, Shu W, Burgess ST, Opportunities and challenges for the application of microfluidic technologies in point-of-care veterinary diagnostics, *Mol Cell Probes.* 2016 Oct;30(5):331-341. doi: 10.1016/j.mcp.2016.07.004

**de Paz** HD, Brotons P, Muñoz-Almagro C., Molecular isothermal techniques for combating infectious diseases: towards low-cost point-of-care diagnostics, *Expert Rev Mol Diagn.* 2014 Sep;14(7):827- 43. doi: 10.1586/14737159.2014.940319.

**Notomi** T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T, Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template, *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):E63.

**Piepenburg** O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA (2006) DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biol* 4(7): e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>

**Walker** GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP. Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(7):1691-1696. doi:10.1093/nar/20.7.1691