

Einsatz und die Nutzbarmachung der Multiserologie für die Informationen zur Lebensmittelkette



Meemken, D.¹; Hahne, S.²; Klein, G.¹; Blaha, T.²

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

¹Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit

²Außenstelle für Epidemiologie

Überblick



1. Was ist das Konzept der (Fleischsaft-) **Multiserologie**?
2. Wie eignet sich **Fleischsaft** als Probenmaterial für ELISA-Tests?
3. Wie kann man **serologische Bestandsprofile** nutzen?
4. Zwischenresümee
5. Studie: Entwicklung eines **schweinespezifischen Microarrays**
6. Ausblick

Konzept der (Fleischsaft-)Multiserologie

Meemken u. Blaha (2011)



1. Probenentnahme am Schlachtband



2. Gewinnung von Fleischsaft



3. Simultantest mit Microarray-Technik



Warum „Multiserologie“?

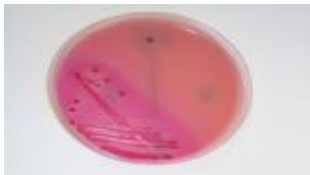


Zoonosen

Produktionskrankheiten

Tierseuchen

1. Gleichwertige Ziele des EU-Lebensmittelsicherheitskonzeptes



LM-Sicherheit

+



Tiergesundheit

+



Tierwohlbefinden

2. Forderung von serologischen Überwachungsprogrammen

- Nationale Verordnungen
- Europäische Verordnungen
- Qualitätskriterien

3. Vorteile von Simultanuntersuchungen

- Kosten- und Zeiteffizienz
- Serologische Risikoprofile

Lebensmittelqualität und -sicherheit

Serologische Überwachungsprogramme



Nationale Schweine-Salmonellenverordnung: **serologisches Monitoring (2007)**

- 60 Proben/ Jahr/ Mastbetrieb -> Kategorisierung anhand der Seroprävalenz

VO (EG) Nr. 853/2004: **Bestandteil der Lebensmittelketteninformationen**

- „Analysen im Rahmen von Zoonose- und Rückstandsüberwachung“

Scientific Opinion der EFSA (2011): **Relevante biologische Gefahren**

- *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Toxoplasma gondii* und *Trichinella* spp.

VO (EU) Nr. 219/2014: **Faktorenbewertung**

- Bei Verdacht Erweiterung des „visuellen“ Standarduntersuchungsverfahrens
- Faktorenbewertung beinhaltet u.a.:
 - „Lebensmittelketteninformationen“
 - „...zusätzliche epidemiologische Daten“

Verordnung (EU) Nr. 219/2014 vom 7. März 2014



(6) „Wenn

- die epidemiologischen oder anderen Daten aus dem Herkunftsbetrieb,
- die Informationen zur Lebensmittelkette oder
- die Ergebnisse der Schlachttieruntersuchung oder
- die Feststellung von Anomalien bei der Fleischbesichtigung

auf Risiken für a) die Gesundheit von Menschen und b) Tieren oder c) für den Tierschutz hindeuten,

sollte der **amtliche Tierarzt entscheiden** können, in welchen Fällen bei der **Fleischuntersuchung angeschnitten oder durchgetastet** werden muss, damit entschieden werden kann, ob das Fleisch genusstauglich ist.“



bzw.





Warum Proben vom Schlachthof?



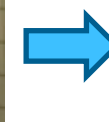
Blutentnahme **im Bestand**

- > Stress, Schmerz und Infektionsgefahr
- > ausschließlich tierärztliche Aufgabe
- > zusätzlicher personeller Aufwand



Blut bei **Entblutung** & Fleischsaft am **Schlachtband**

- > mehr Tierwohl, keine Tiergesundheitsrisiken, geringere Kosten
- > Arbeitsabläufe einstudiert durch Salmonellenmonitoring
- > kein zusätzlicher personeller Aufwand



Lebensmittelqualität und -sicherheit

Vorstudie I: Nutzbarkeit von Fleischsaft?

Meemken u. Blaha, 2011



- Vergleichende ELISA-Untersuchung von 291 Probenpaaren
- Fleischsaft vs. Serum als ELISA-Probenmaterial

	Fleischsaft vs. Serum (n=291)		
	Kappa	Sensitivität	Spezifität
<i>Salmonella</i> spp.	0.87	87%	99%
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.93	100%	91%
<i>Toxoplasma gondii</i> *	n.c.	100%	100%
<i>Trichinella</i> spp.	n.c.	100%	100%
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	0.86	91%	96%
Influenza A (H1N1)	0.66	61%	99%
Influenza A (H3N2)	0.65	55%	99%

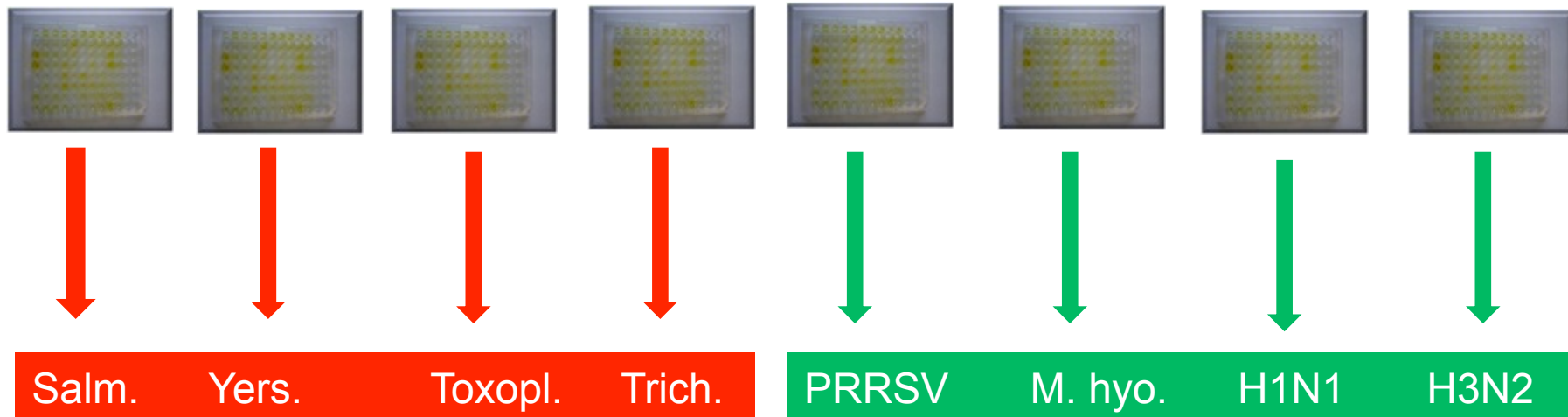
- Eignung von Fleischsaft als Probenmaterial für ELISA-Tests ✓
- 10-fach geringe Verdünnung für Fleischsaft ✓

Nutzbarkeit serologischer Bestandsprofile?



Serologische Bestandsprofile mittels single-ELISA-Tests

- 49 Schweinemastbestände in Nordwestdeutschland (250 km Umkreis)
- 60-80 Proben/ Bestand verteilt auf mind. 3 Anlieferungen (n=3323)

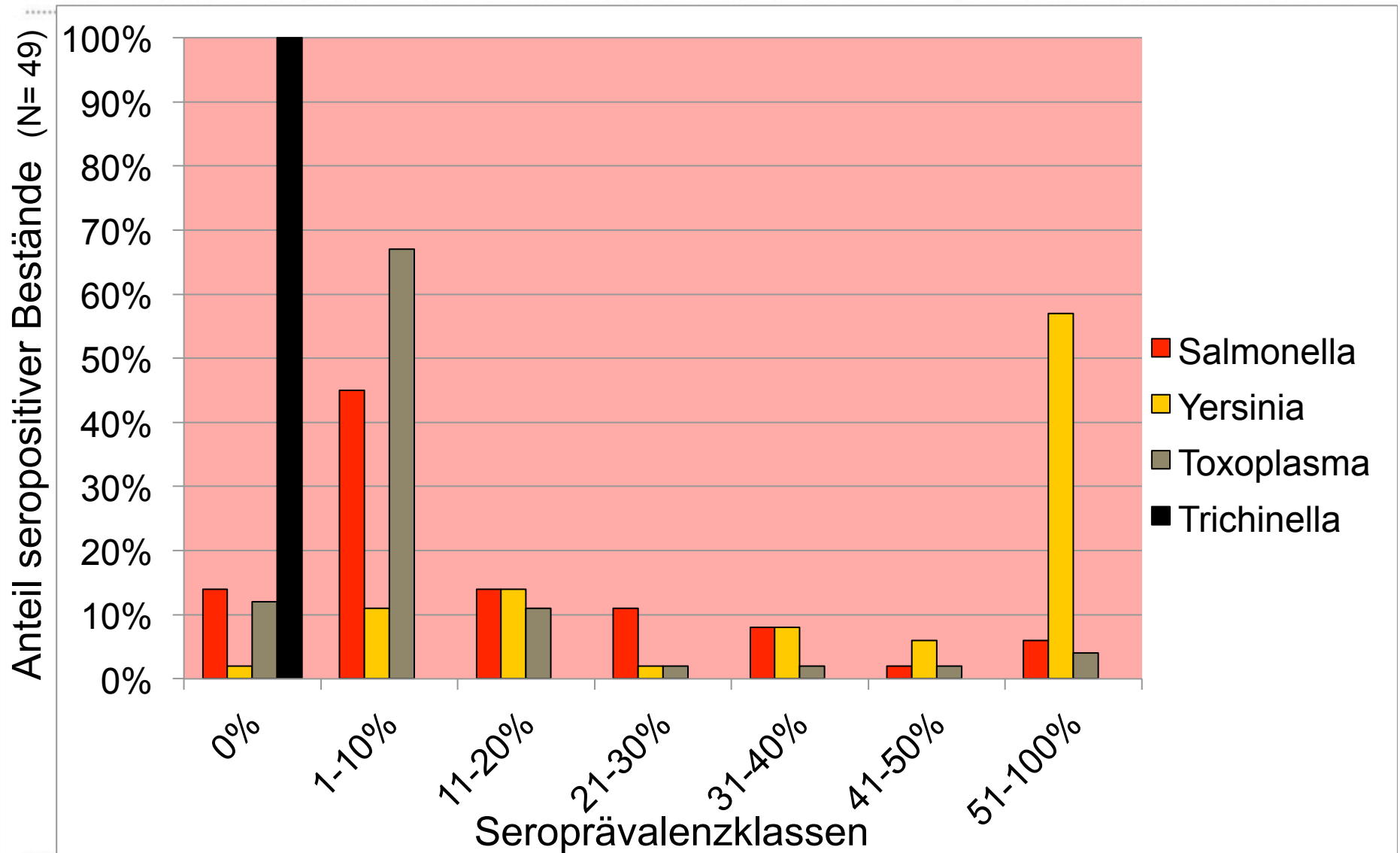


3.323 Proben x 8 ELISA-Untersuchungen= 26.584 Ergebnisse

Gefördert durch: Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen

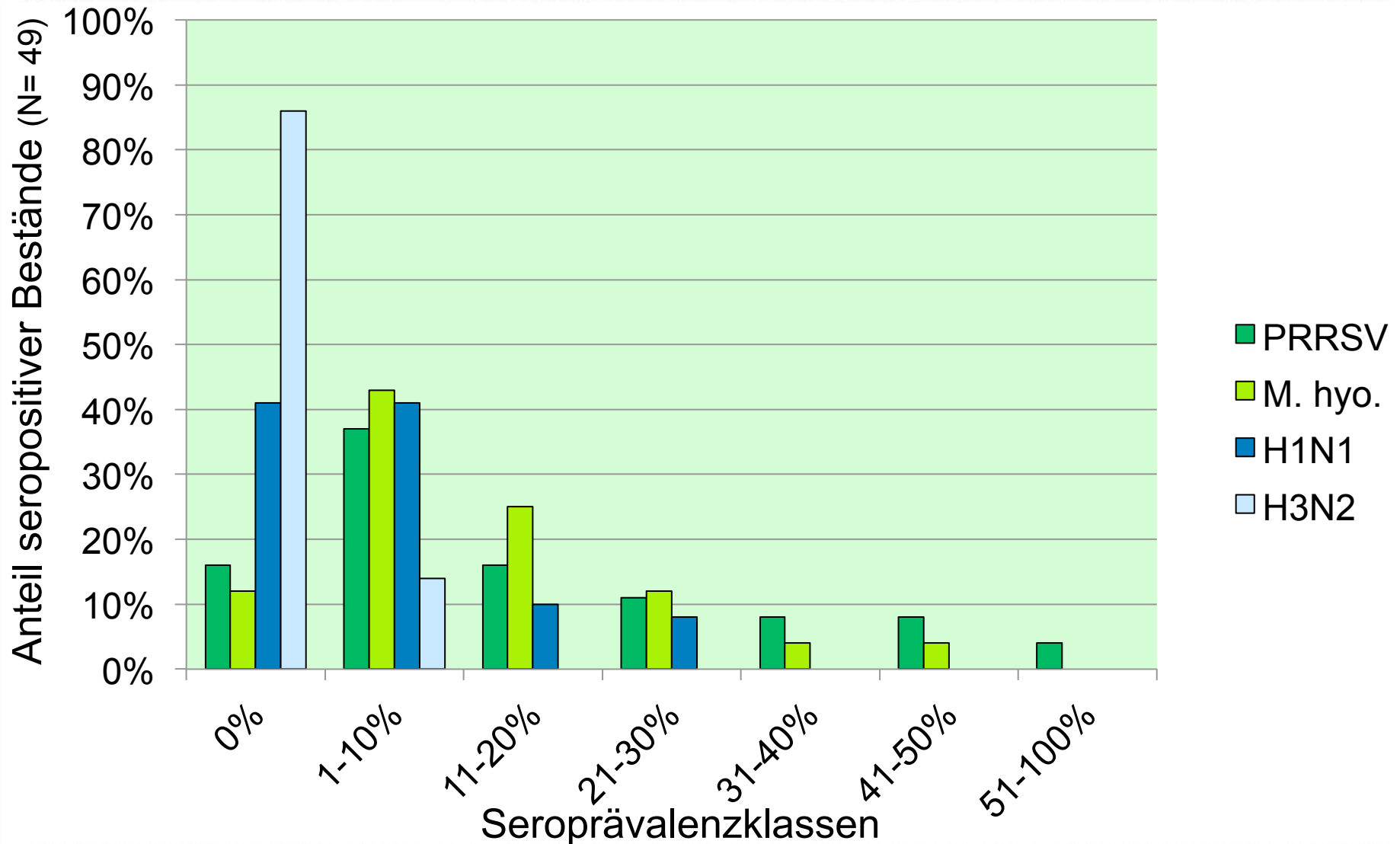
Ergebnisübersicht: Zoonosen

Bestandshäufigkeiten pro Seroprävalenzklasse

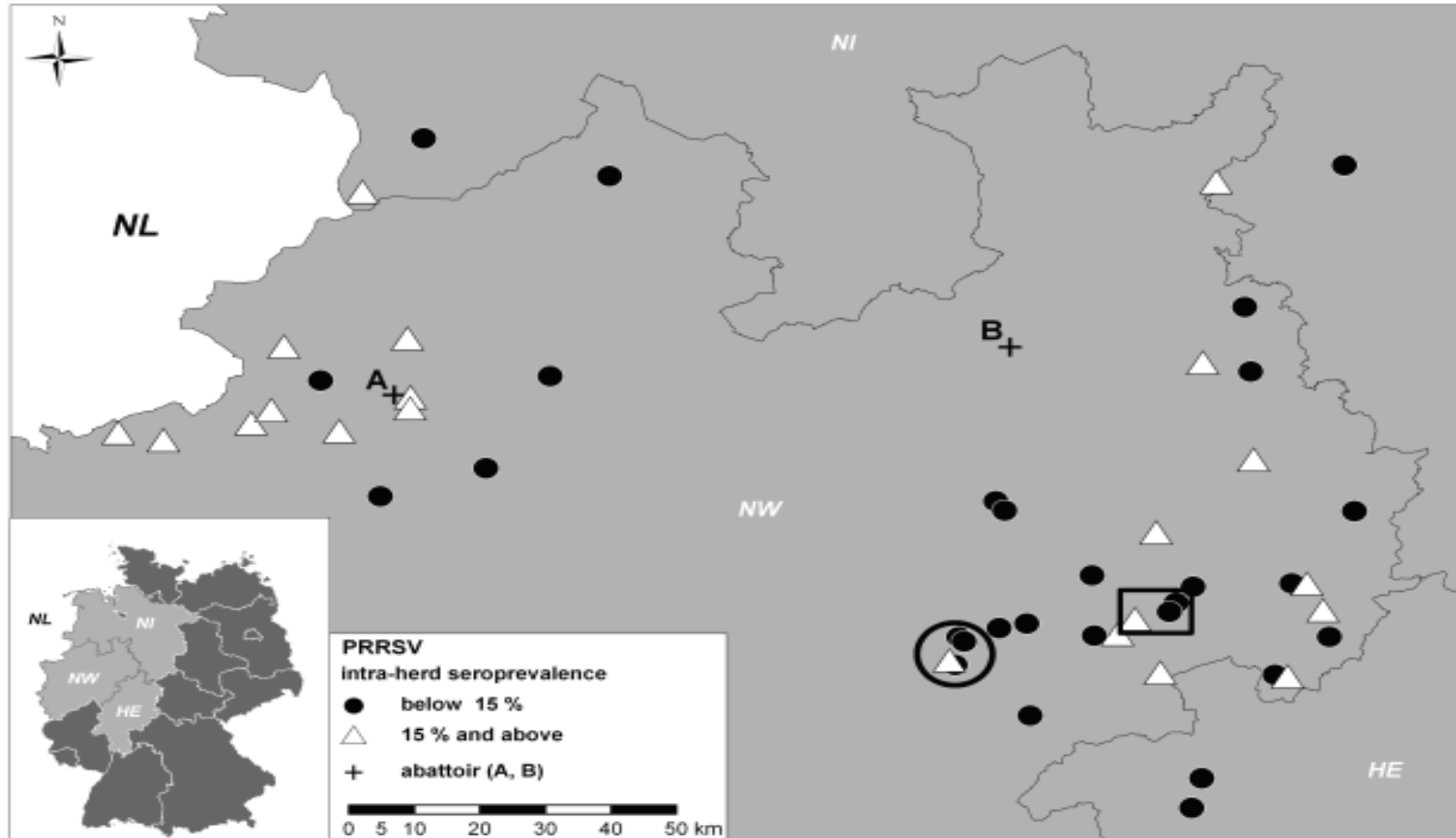


Ergebnisübersicht: Tierkrankheiten

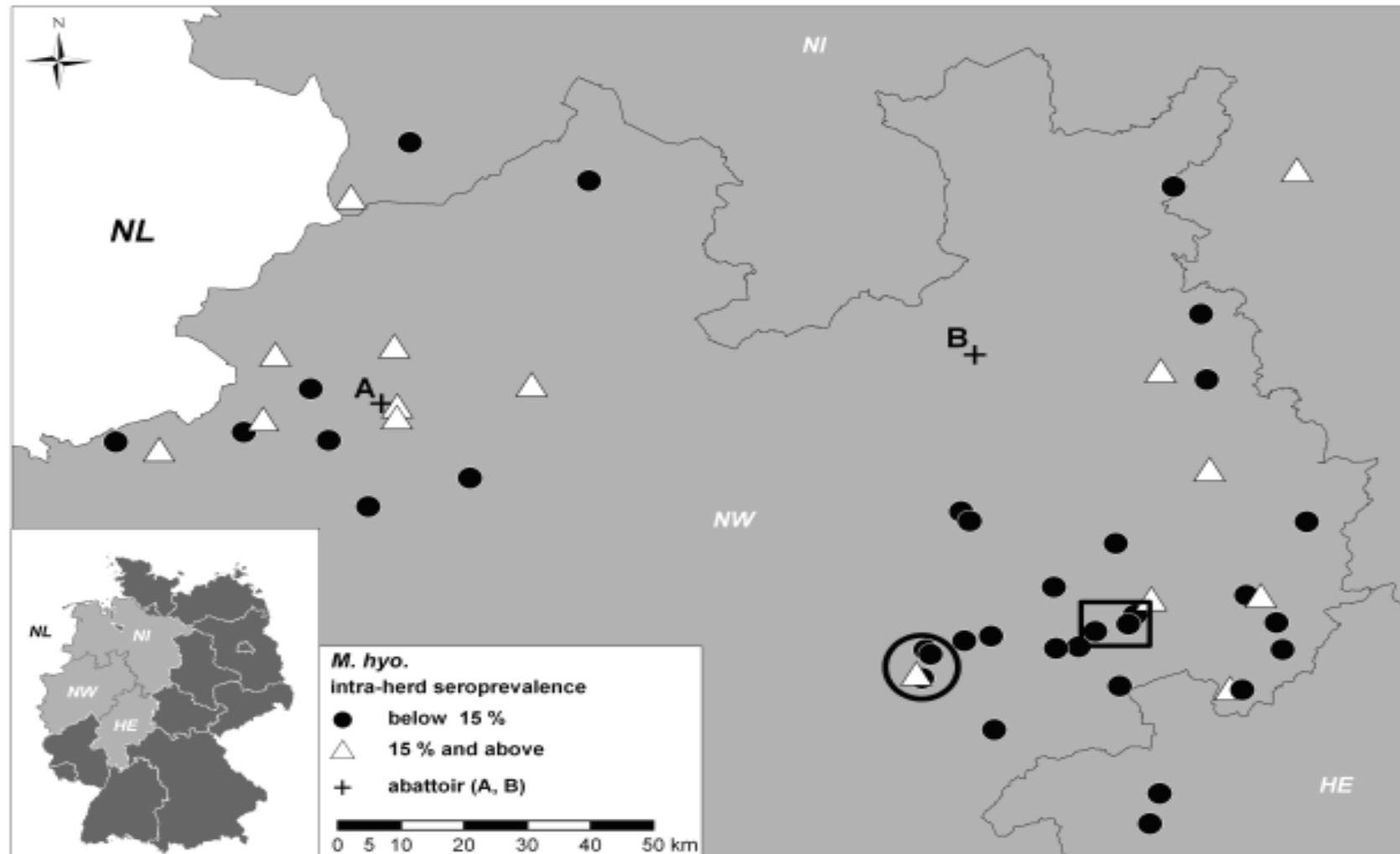
Bestandshäufigkeiten pro Seroprävalenzklasse



Unterschiede in Bestandsprofilen auch bei luftgetragenen Erregern: PRRSV

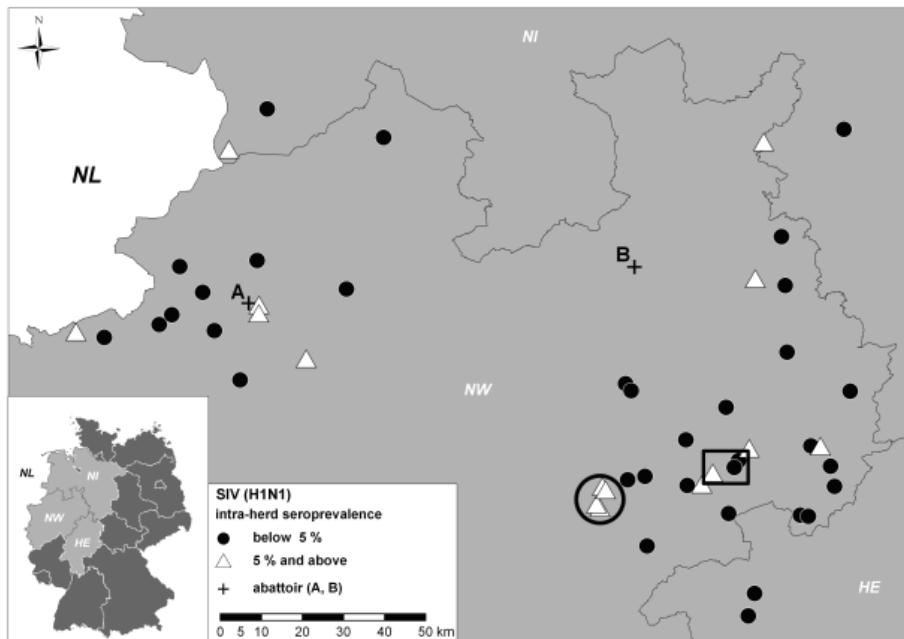


Unterschiede in Bestandsprofilen auch bei luftgetragenen Erregern: *M. hyo.*

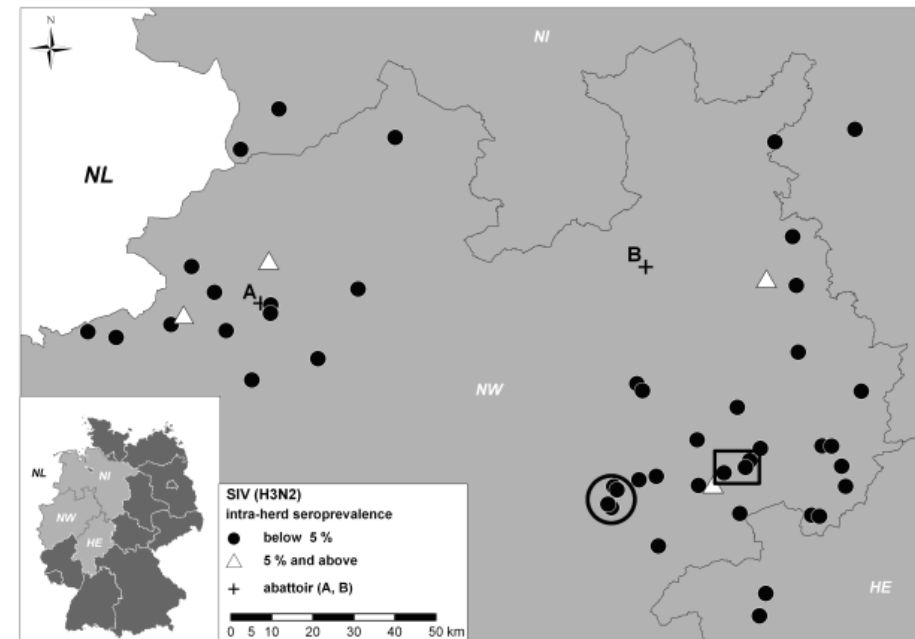


Unterschiede in Bestandsprofilen auch bei luftgetragenen Erregern: SIV

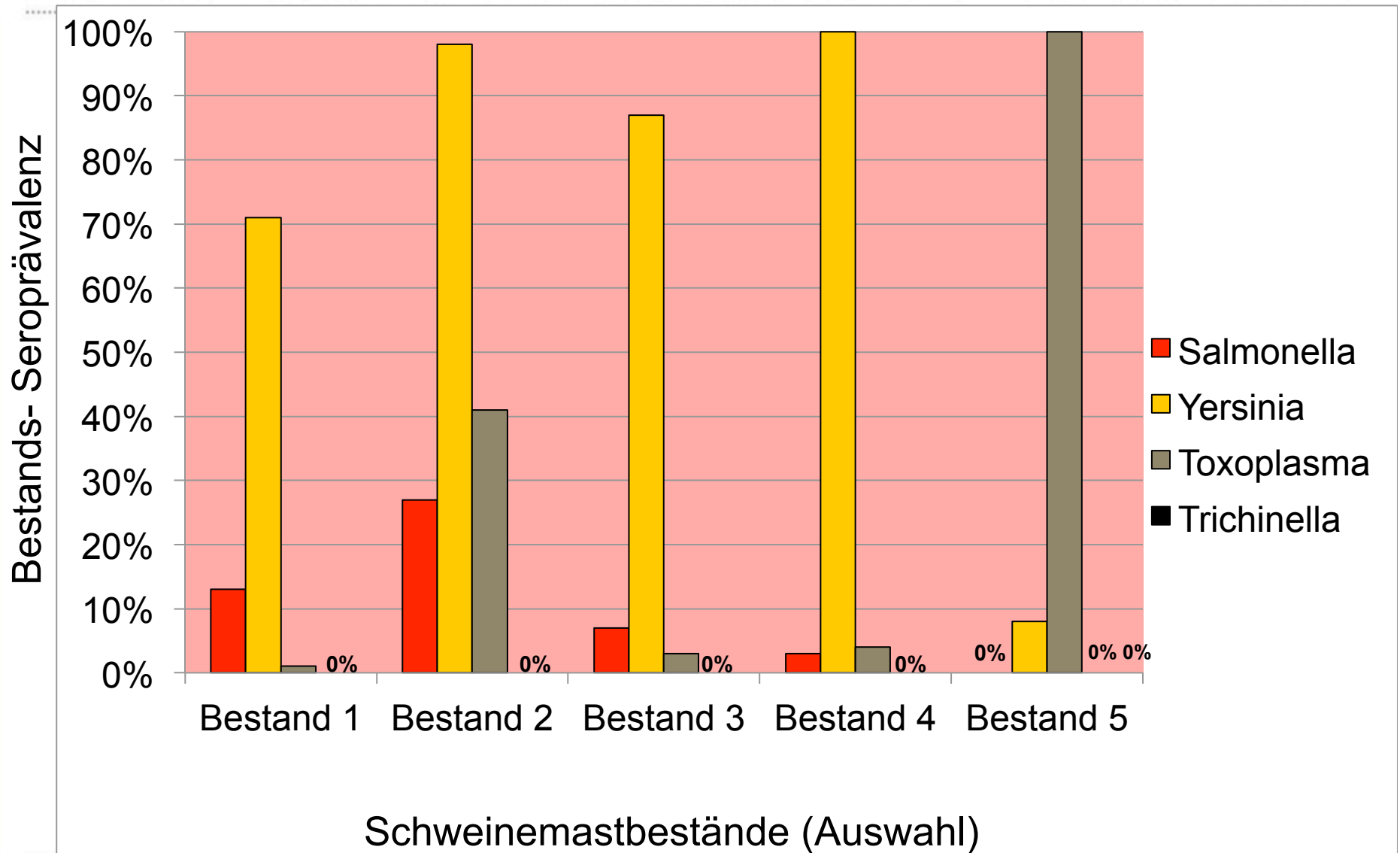
H1N1



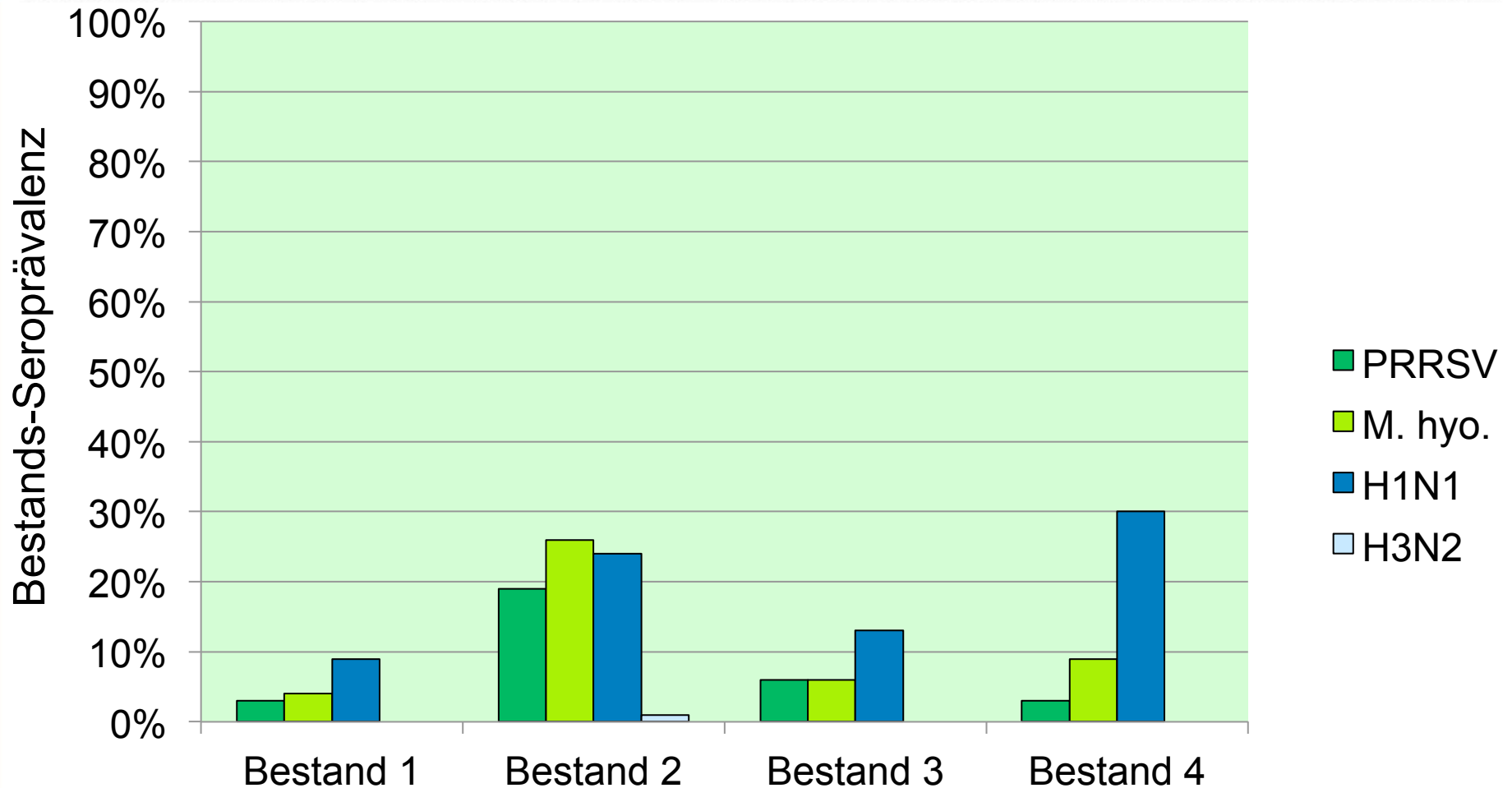
H3N2



Serologische Bestandsrisikoprofile: Lebensmittelsicherheit



Serologische Bestandsrisikoprofile: Tiergesundheit



Schweinemastbestände (Auswahl)

Zwischenresümee

- Serologische Monitoringprogramme gesetzlich eingefordert

§§§

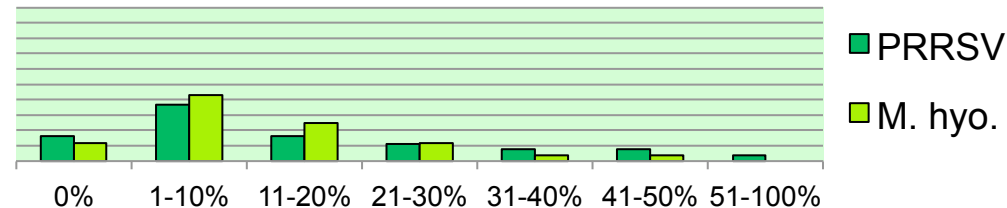
- Fleischsaft und Serum nutzbar als Probenmaterial für Serologie



&



- Impfung zum Zeitpunkt des Absetzens: kein Nachweis von Impfantikörpern



- Nutzbarkeit serologische Bestandsprofile

- **Bestandsebene:** Auslöser von Interventionsmaßnahmen im Bestand
- **Amtliche Fleischuntersuchung:** Risikobewertung
- **Schlachthofebene:** Logistische Schlachtung, Rohstoffauswahl

Ziel des Vorhabens: Multiserologie mit Microarray

Entwicklung eines „schweinespezifischen Microarrays“ zum Nachweis lebensmittelsicherheitsrelevanter und tiergesundheitsrelevanter Antikörper
d.h. 1 Tropfen Fleischsaft -> simultane Antikörperbestimmungen

Lebensmittelqualität und -sicherheit

Microarray-Tube
(3 cm x 1 cm)

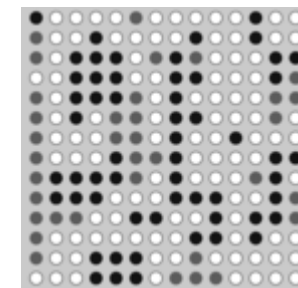


PC-gestützte Testauswertung
(Kamera, Iconoclust®)



1,5h

Testergebnis
(3 mm x 3 mm)



Arbeitsplan (I)

1a) Akquirieren „geeigneter“ Antigene für Zoonosen

- *Salmonella Typhimurium*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Toxoplasma gondii*
- *Trichinella spp.*
- Hepatitis E Virus

1b) Akquirieren „geeigneter“ Antigene für Tierkrankheiten

- *PRRSV*
- *Influenza A*
- *Salmonella cholerasuis*
- *Mycoplasma hyopneumoniae*
- *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Arbeitsplan (II)

2. „Auftragen“ der Antigene durch Spezialfirma (Alere Technologies)



3. Validierung mit Proben aus Referenzlaboren/ Infektionsversuchen



4. Testoptimierung mittels „Feldfleischsäften“

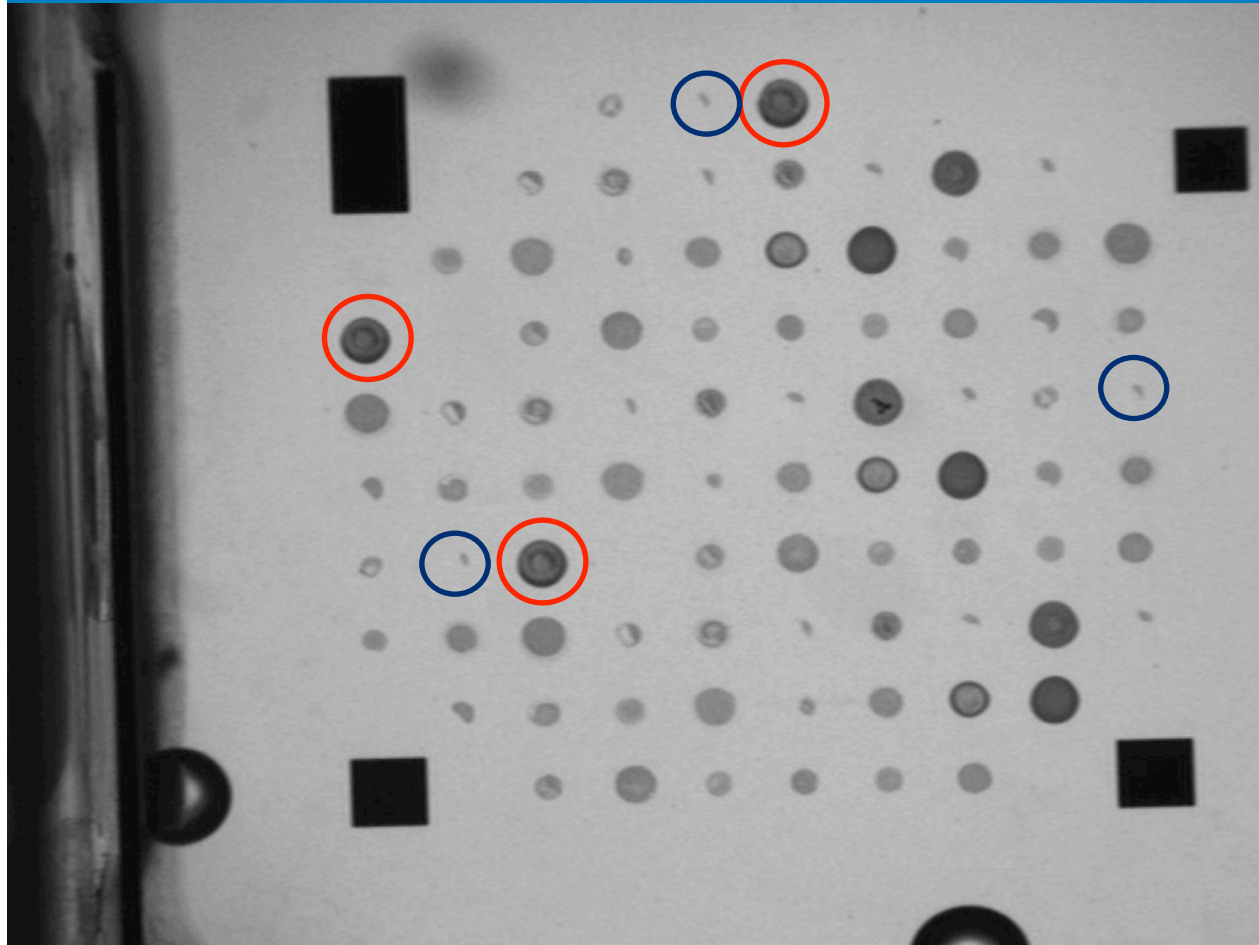


5. Festsetzung „erregerspezifischer“ Grenzwerte

Validierungsergebnisse des Mikroarrays (I)



Unspezifische Bindungen durch nicht geeignetes Konjugat



Positivkontrollen

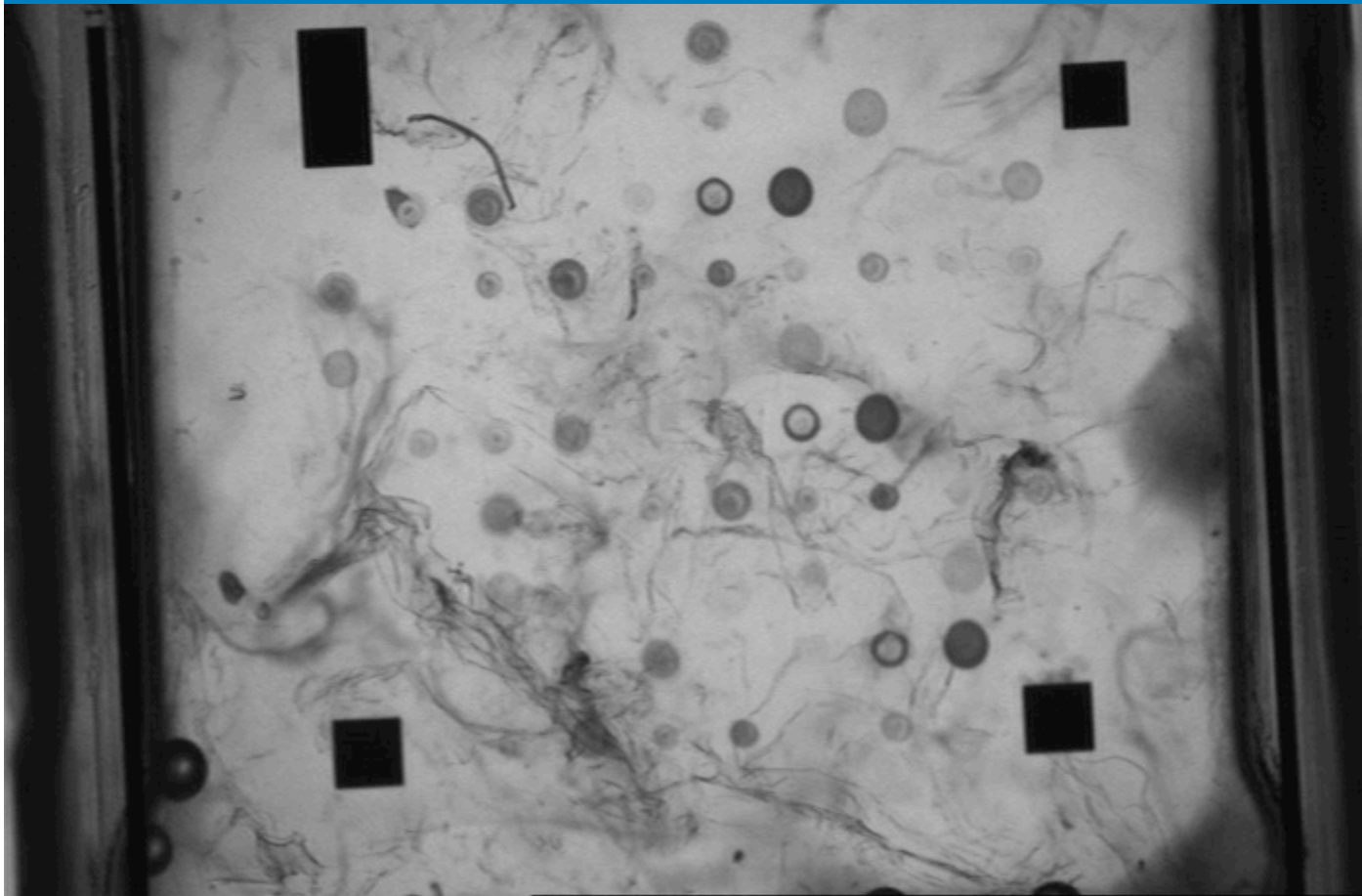


Negativkontrollen!!!

Validierungsergebnisse des Mikroarrays (II)

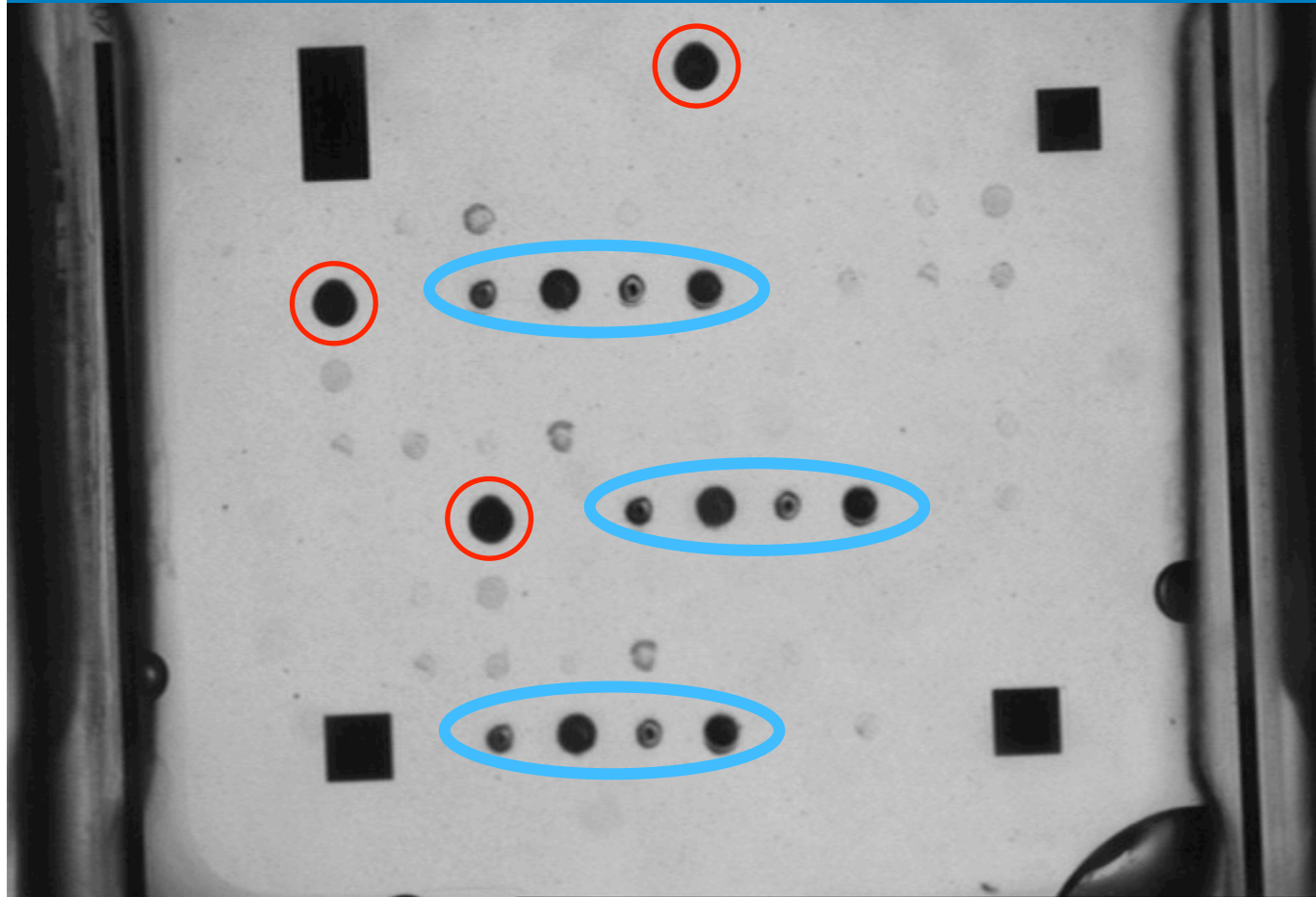


Schlierenbildung durch ungeeigneten Waschpuffer



Validierungsergebnisse des Mikroarrays (III)

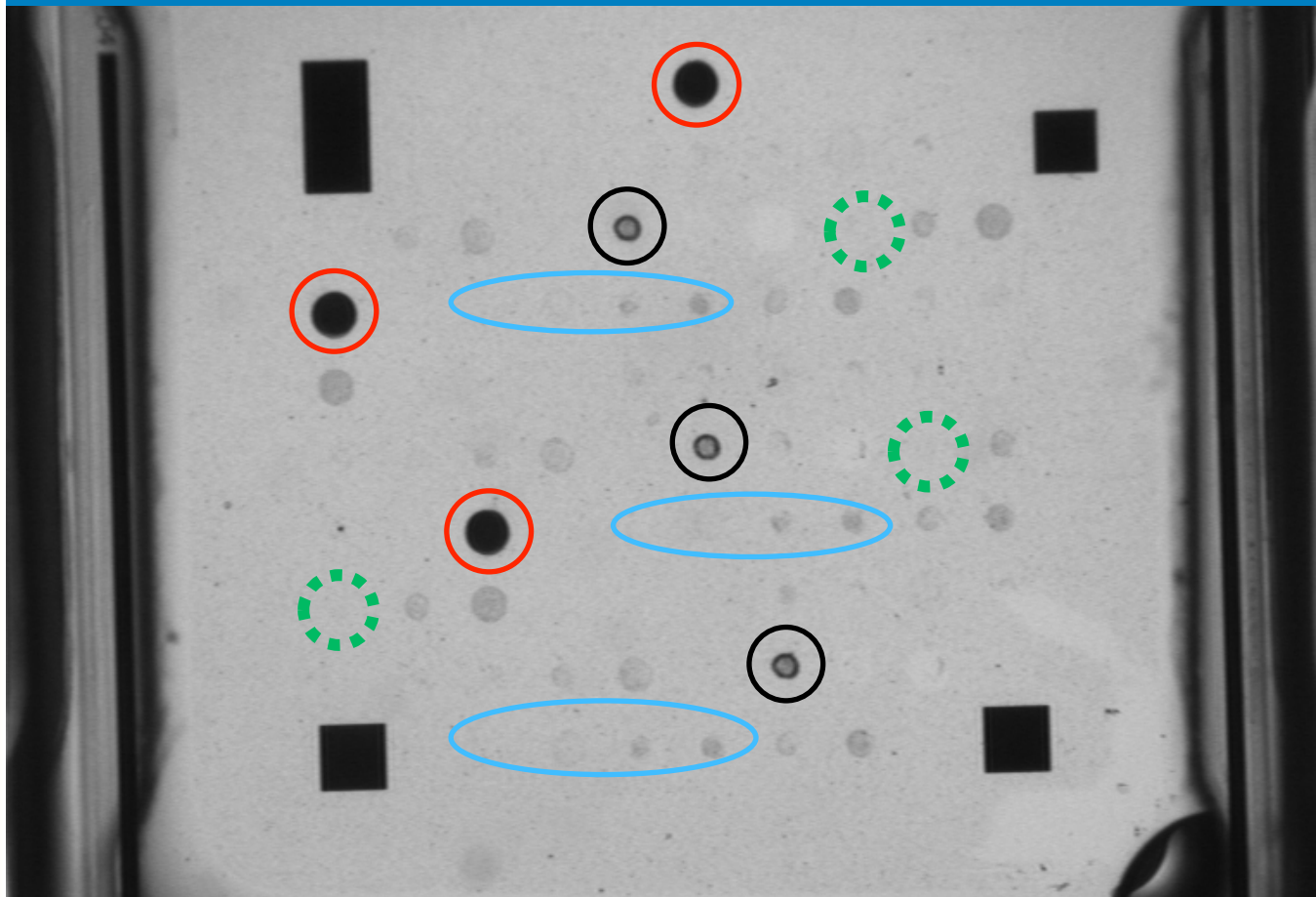
Fleischsaftprobe aus *S. Typhimurium* Infektionsversuch (Dr. Szabo, BfR)



- Positivkontrollen
- *S. Typhimurium*

Validierungsergebnisse des Mikroarrays (IV)

Feldfleischsaft mit Antikörpern gegen *Yersinia enterocolitica* & *S. Typhimurium*



○ Positivkontrollen

○ *S. Typhimurium*

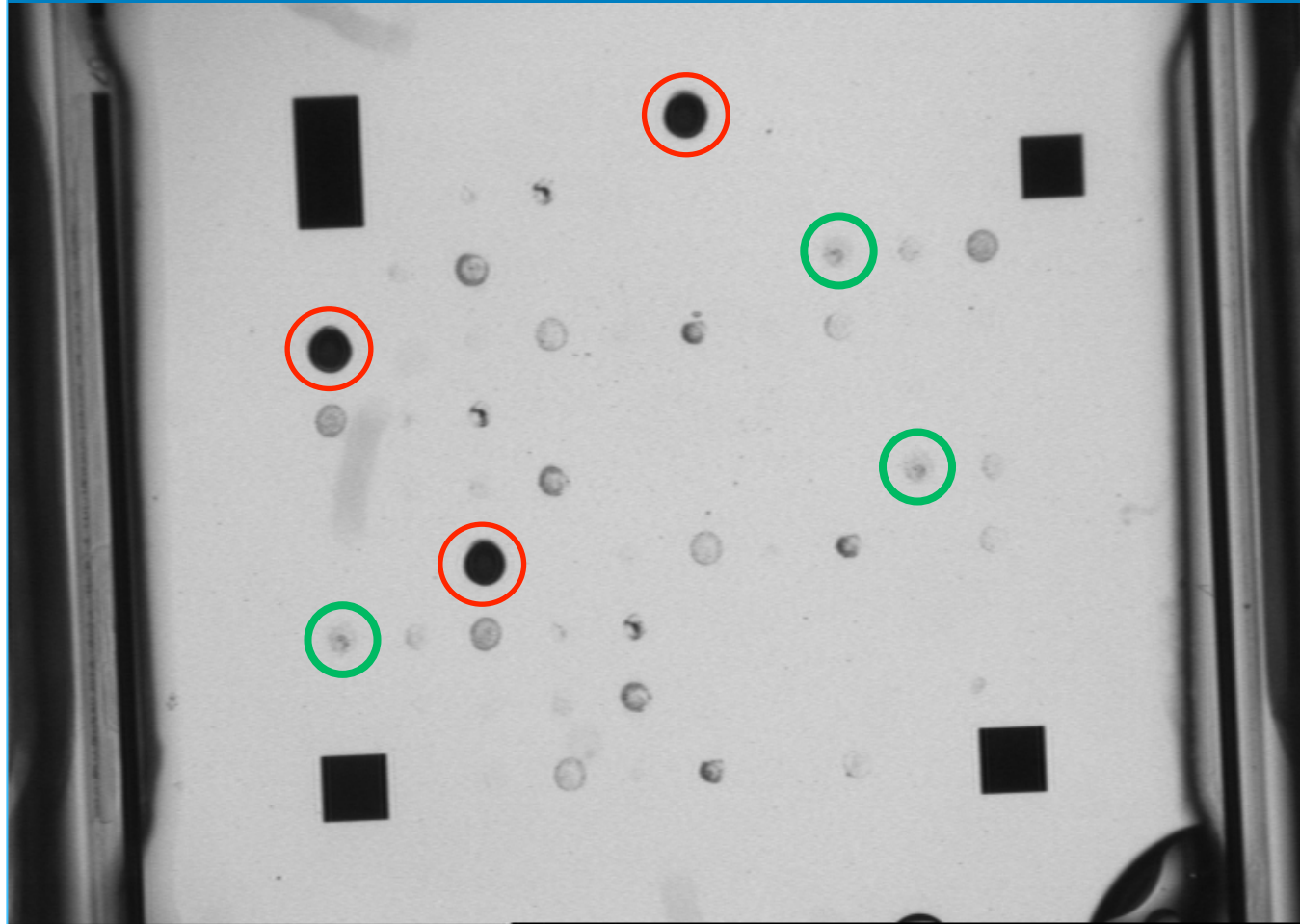
○ *Yersinia enterocolitica*

NICHT vorhanden:
○ *Trichinella*

Validierungsergebnisse des Mikroarrays (V)



Fleischsaftprobe aus Referenzlabor für Trichinella
(Dr. Nöckler, BfR)

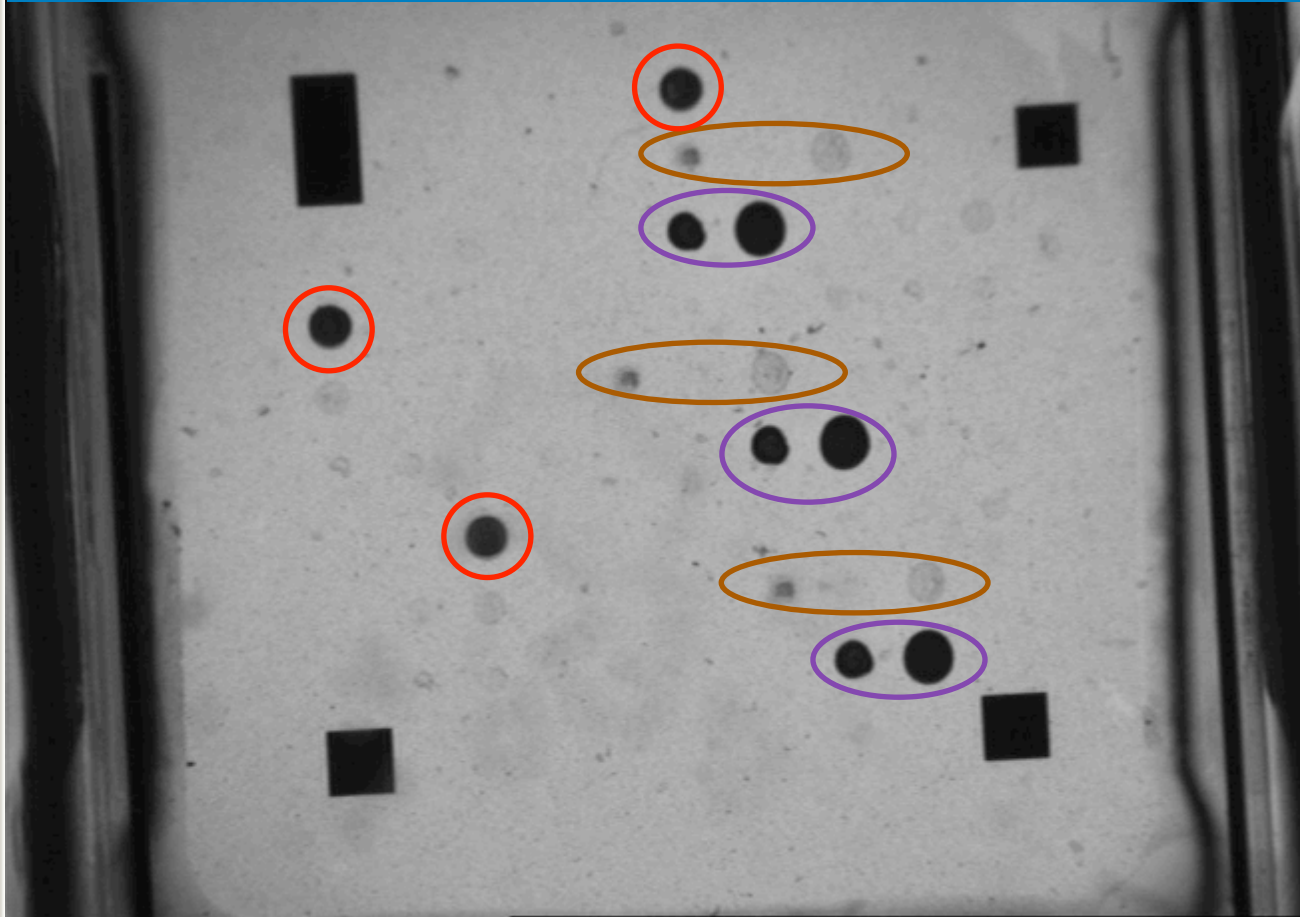


○ Positivkontrollen

○ Trichinella

Validierungsergebnisse des Mikroarrays (VI)

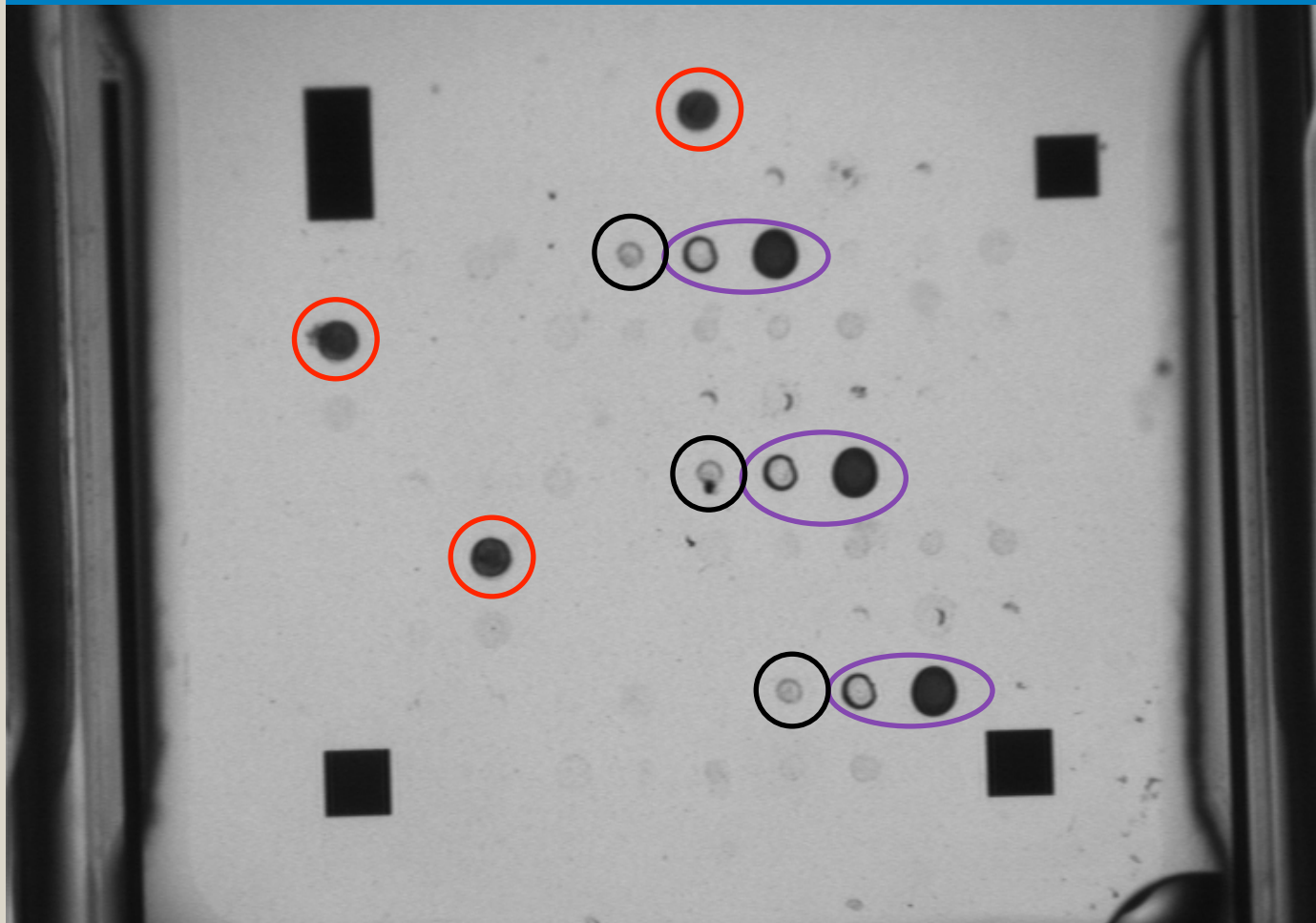
Feldfleischsaftprobe mit Antikörpern gegen Toxoplasmen & PRRSV



- Positivkontrollen
- Toxoplasma
- PRRSV (EU, US)

Validierungsergebnisse des Mikroarrays (VII)

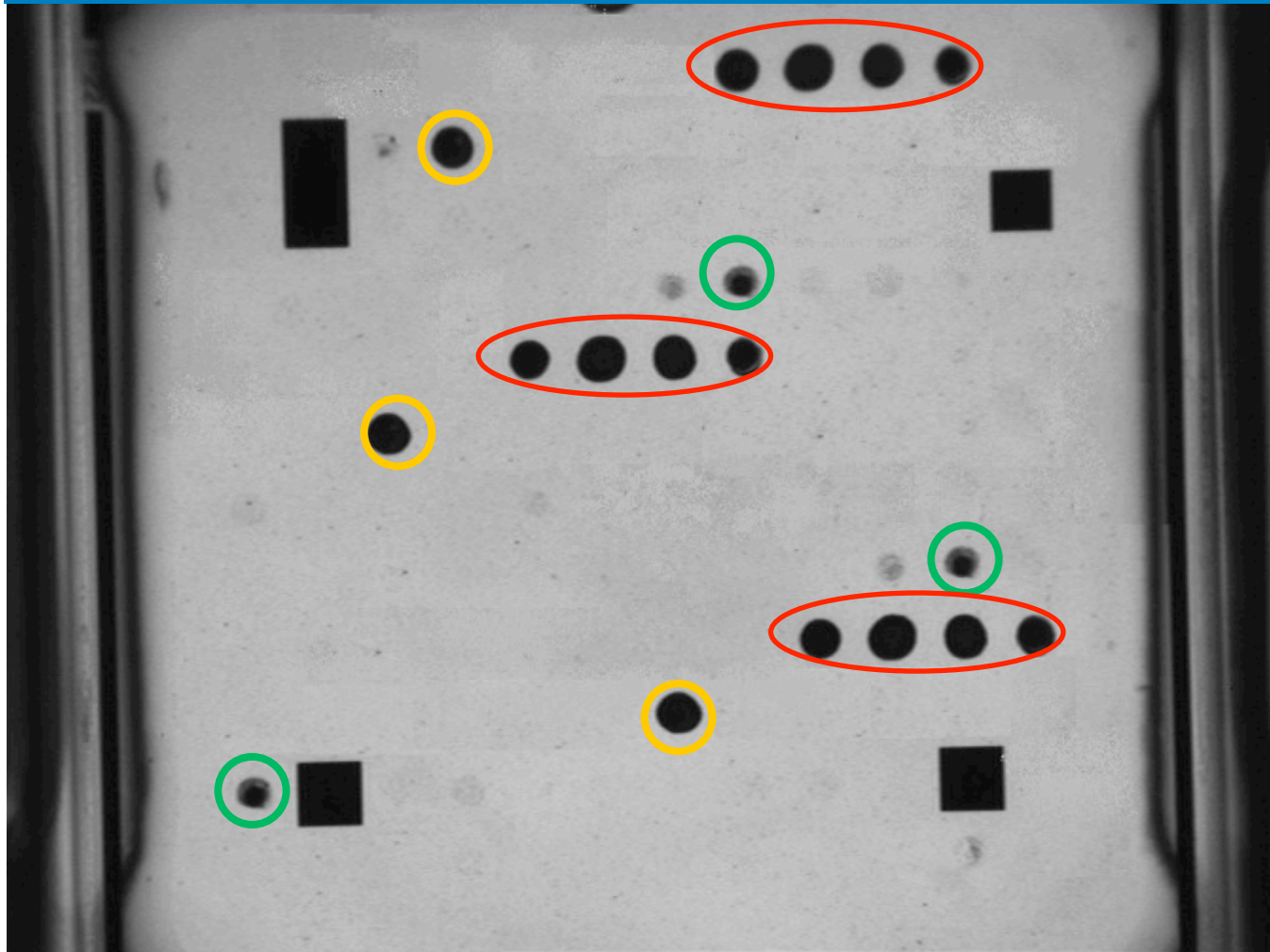
Feldfleischsaftprobe mit Antikörpern gegen
Toxoplasma gondii & *Yersinia enterocolitica*



- Positivkontrollen
- *Toxoplasma gondii*
- *Yersinia enterocolitica*

Validierungsergebnisse des Mikroarrays (VIII)

Fleischsaftprobe aus Referenzlabor für Trichinella (Dr. Nöckler, BfR)

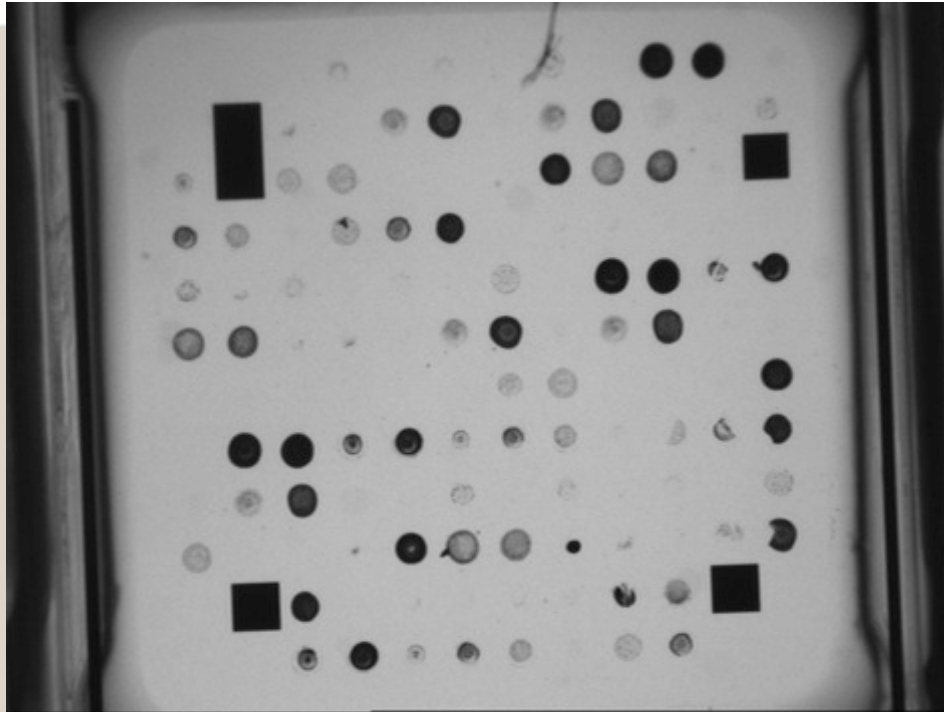


○ Positivkontrollen

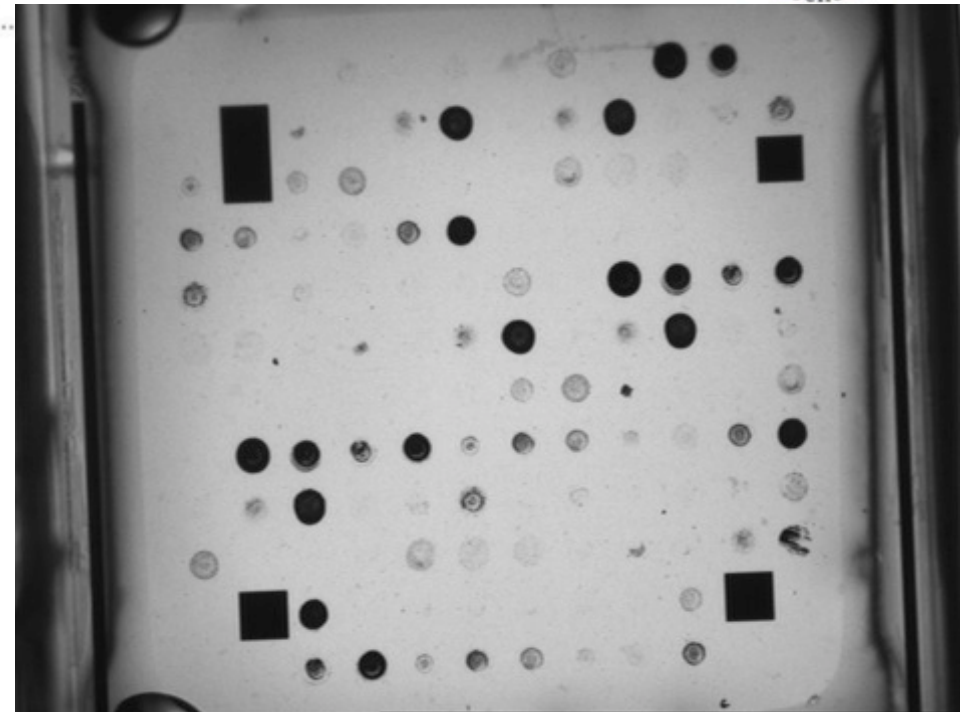
○ Trichinella

○ HEV

Validierungsergebnisse Fleischsaft vs. Blutserum vom selben Tier (IX)



Fleischsaft (Verdünnung 1:2)

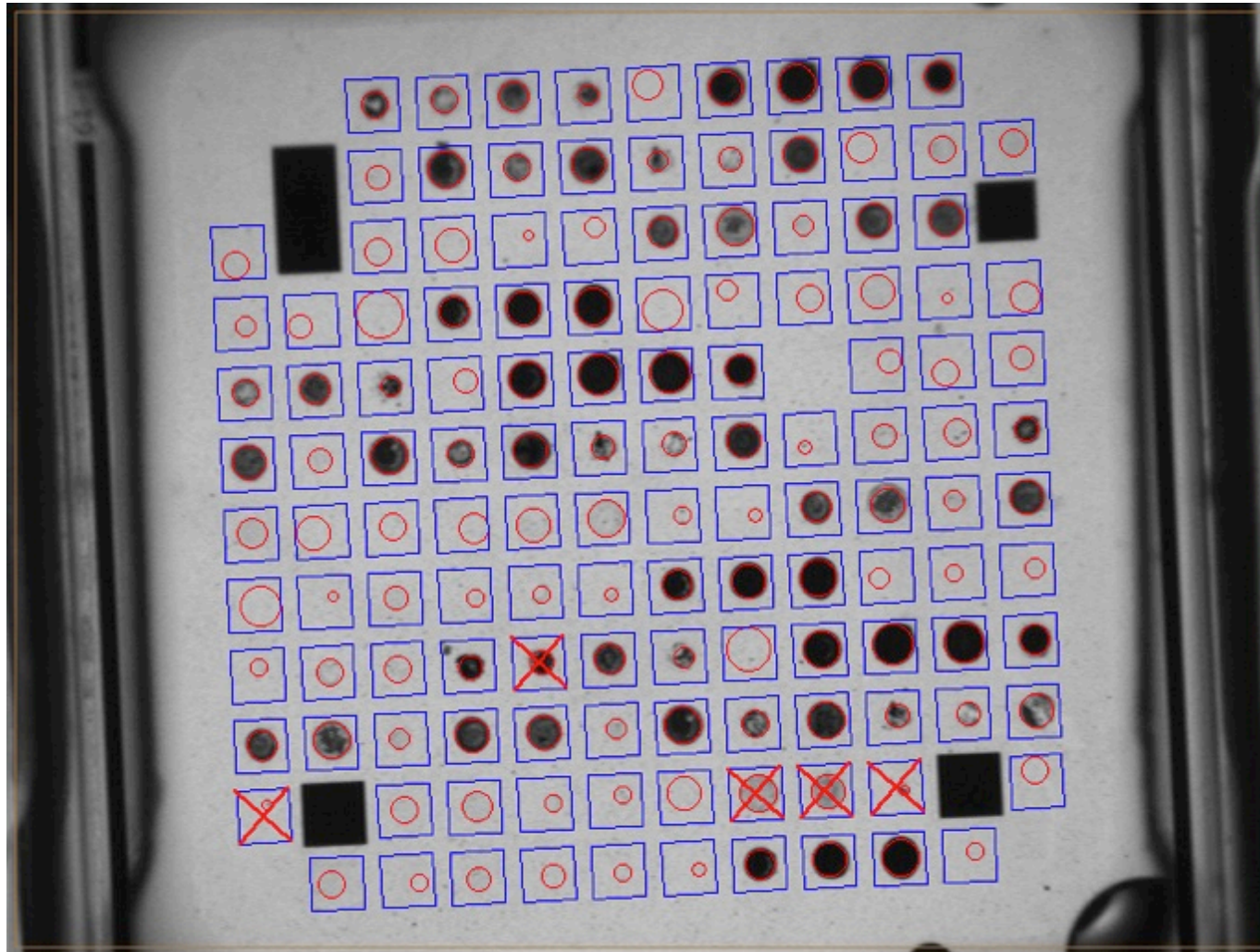


Blutserum (Verdünnung 1:20)



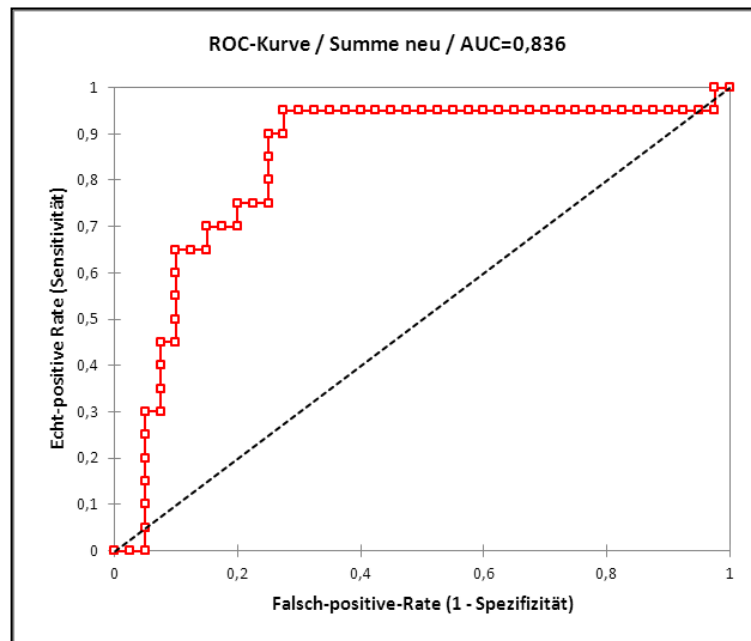
**Vergleichbare Ergebnisse
für 9 unterschiedliche Antigene**

Computergestützte Messung des Schwärzungsgrades

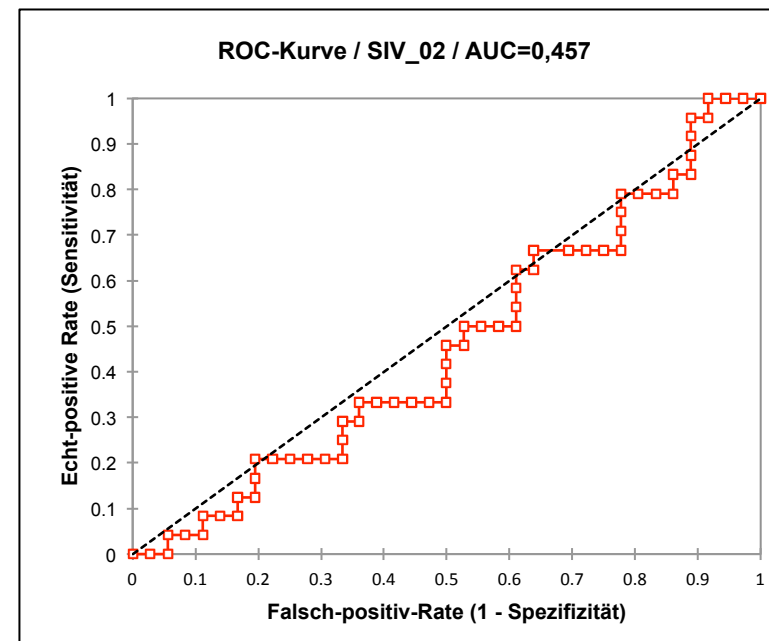


Erregerspezifische Grenzwertoptimierung mittels Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve

- Methode zur Bewertung und Optimierung von Grenzwerten
- Vergleich von Single-ELISA-Werten mit Arrayergebnissen des jeweiligen Erregers
- Ergebnis: Sensitivität und Spezifität mit optimierten Grenzwerten

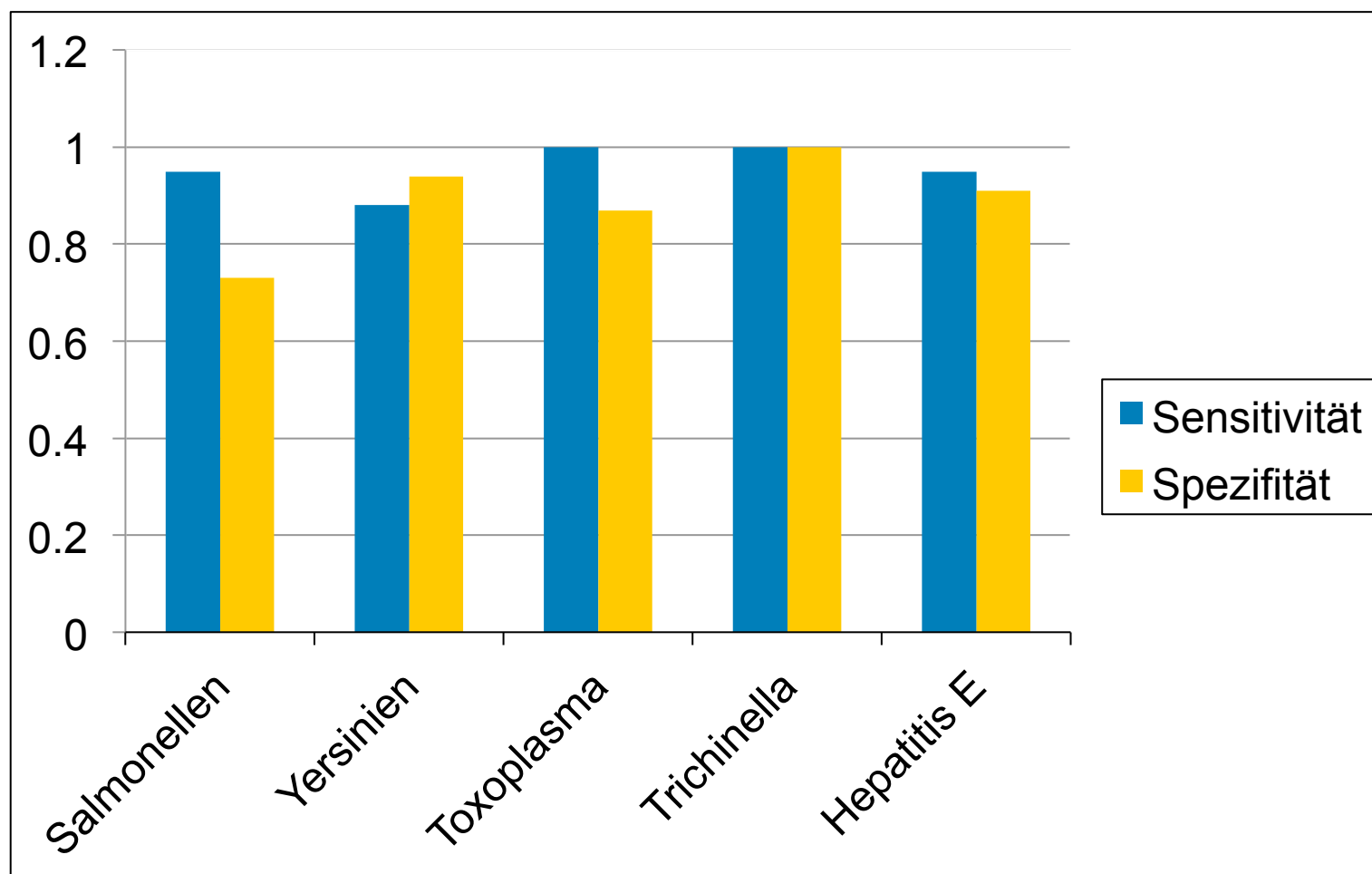


ROC- Kurve für Salmonellen

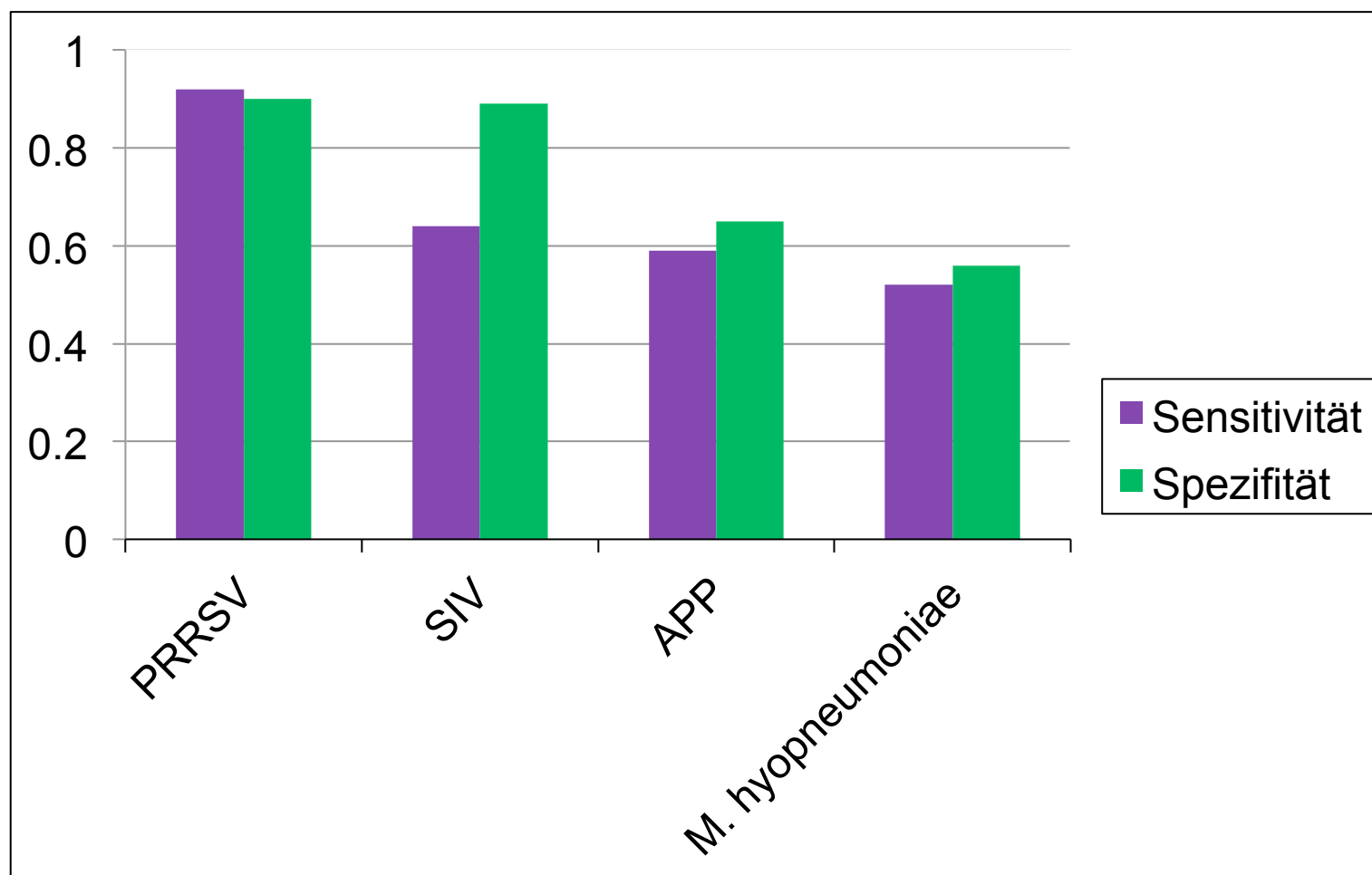


ROC- Kurve für Influenza

Ergebnisse der ROC-Analysen für Zoonoseerreger



Ergebnisse der ROC-Analysen für Produktionskrankheitserreger



Schlussfolgerungen (I)

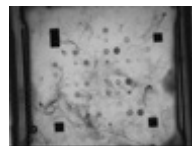
- **Fleischsaft und Blutserum als Probenmaterial für den Microarray geeignet**



&

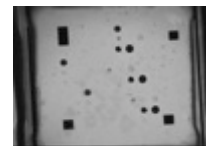


- **Validierungsergebnisse des Microarrays sehr vielversprechend**



vorher

vs.



nachher

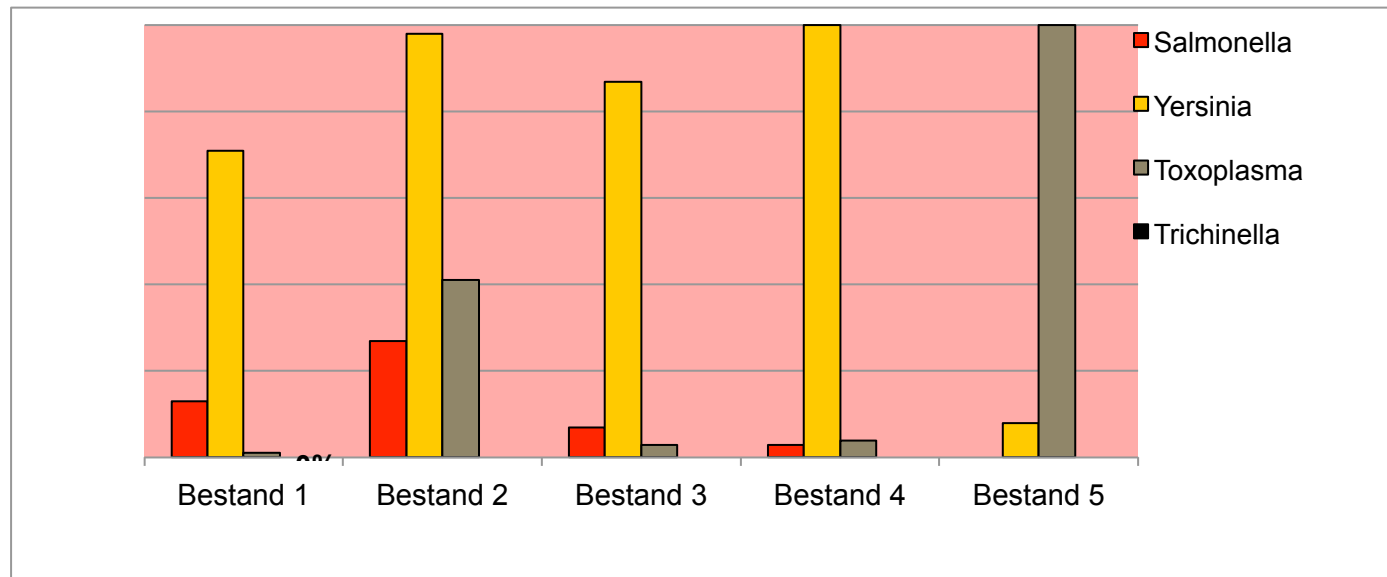
- **Festlegen von Cut-offs ist anhand der Farbintensität der Spots möglich**



Schlussfolgerungen (II)

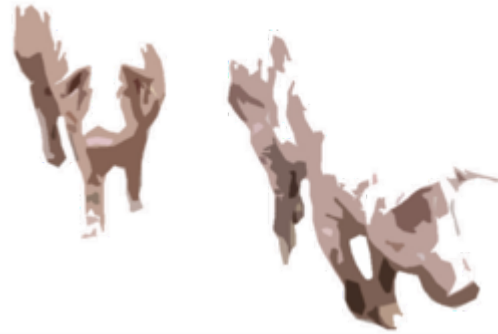
Nutzung „multiserologischer“ Bestandsprofile

- Risikoabschätzung von Beständen (Zoonosen)
- Kontinuierliche Verbesserungsprozesse (Tierkrankheiten)
- Überwachungsprogramme (Tierseuchen)



Wichtig: Die Multiserologie ist kein Instrument zur Beurteilung von einzelnen Tierkörpern, sondern dient der Risikoabschätzung auf Bestandsebene

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!



„Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestags“

„Gefördert durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), Förderkennzeichen 28011HS013“

