



Einsatz von Microarrays im Rahmen der „Fleischsaftmultiserologie“

Meemken, D.¹; Hahne, S.¹; Engemann, C.²; Gabert, J.²; Klein, G.¹; Blaha, T.¹

¹Zentrum für Tiergesundheit und Lebensmittelqualität, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

²Labor Diagnostik GmbH Leipzig, a Qiagen company

Warum „Multiserologie“?

1. Ziele des EU-Lebensmittelsicherheitskonzeptes

- Optimierung von Lebensmittelsicherheit, Tiergesundheit und Tierwohl

2. Forderung von serologischen Überwachungsprogrammen

- VO (EG) Nr. 854/2004, 1244/2007 & „Scientific opinion“ der EFSA (2011)

3. Vorteile von Simultanuntersuchungen

- Kosten- und Zeiteffizienz



LM-Sicherheit



Tiergesundheit



Tierwohlbefinden

Serologische Überwachungsprogramme

VO (EG) 854/2004: Bestandteil der Lebensmittelketteninformationen

- Analysen im Rahmen von Zoonose- und Rückstandsüberwachung

VO (EG) 1244/2007: Voraussetzung für „visuelle Fleischuntersuchung“

- Regelmäßige serologische und/ oder mikrobiologische Überwachung einer Stichprobe an Tieren auf lebensmittelsicherheitsrelevante Erreger

Scientific Opinion der EFSA (2011) über die amtliche Fleischuntersuchung

- Routinemäßige Vermeidung von Palpation und Inzision zur Reduktion von Kreuzkontaminationen
- Relevanteste biologische Gefahren sind *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp.
- Bestandskategorisierungen in Bezug auf die relevantesten Gefahren anhand von serologischen/ mikrobiologischen Screening möglich



Warum Fleischsaft?



Blutentnahme **im Bestand**

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



Blutentnahme **bei Entblutung** & Fleischsaftgewinnung **am Schlachtband**

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



Lebensmittelqualität und -sicherheit

Konzept der Fleischsaft-Multiserologie

Meemken u. Blaha (2011)



1. Probenentnahme am Schlachtband



2. Gewinnung von Fleischsaft



3. Simultantest mit Microarray-Technik



Lebensmittelqualität und -sicherheit

Ziel des Vorhabens

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)

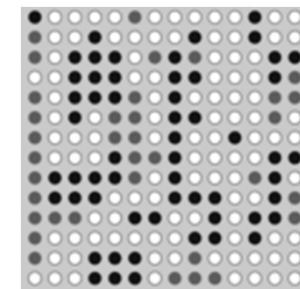


PC-gestützte Testauswertung
(Kamera, Iconoclust®)



1,5h

Testergebnis
(3 mm x 3 mm)



Arbeitsplan (I)

1a) Akquirieren „geeigneter“ Antigene für Zoonosen

- *Salmonella Typhimurium*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Toxoplasma gondii*
- *Trichinella*
- *Mykobacterium avium*

LDL/QIAGEN

- *Hepatitis E Virus*

Dr. Bächlein, Virologie, TiHo

1b) Akquirieren „geeigneter“ Antigene für Tierkrankheiten

- *PRRSV*
- *Influenza A*
- *Salmonella cholerasuis*

LDL/QIAGEN

- *Mycoplasma hyopneumoniae*

Dr. Spargser, Wien

- *Actinobacillus pleuropneumoniae*

TiHo Bakum

Arbeitsplan (II)

2. „Auftragen“ der Antigene durch Spezialfirma



3. Validierung mit Proben aus Referenzlaboren/ Infektionsversuchen



4. Testoptimierung mittels „Feldfleischsäften“

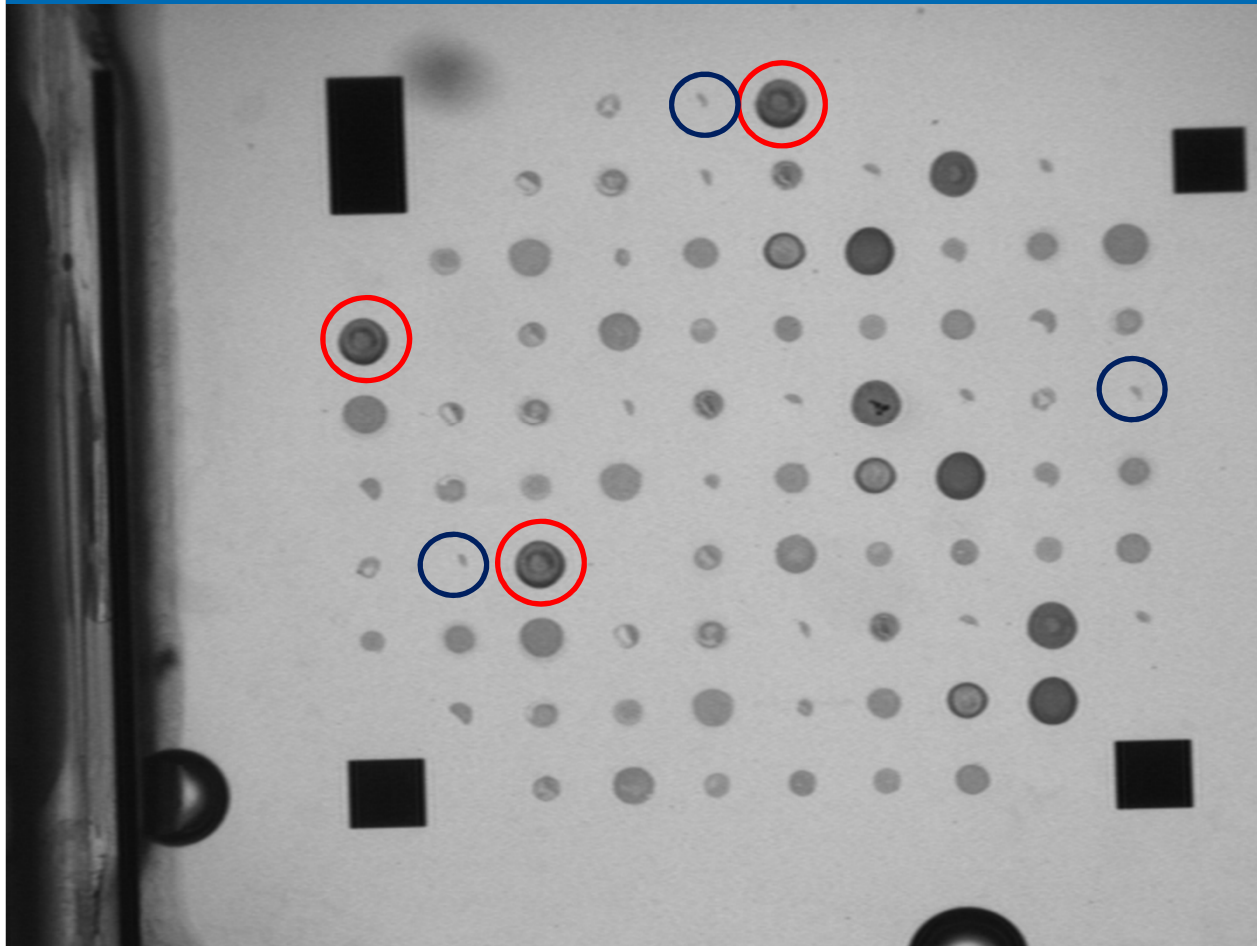


5. Festsetzung „erregerspezifischer“ Grenzwerte

Validierungsergebnisse des Mikroarrays (I)



Unspezifische Bindungen durch nicht geeignetes Konjugat



Positivkontrollen

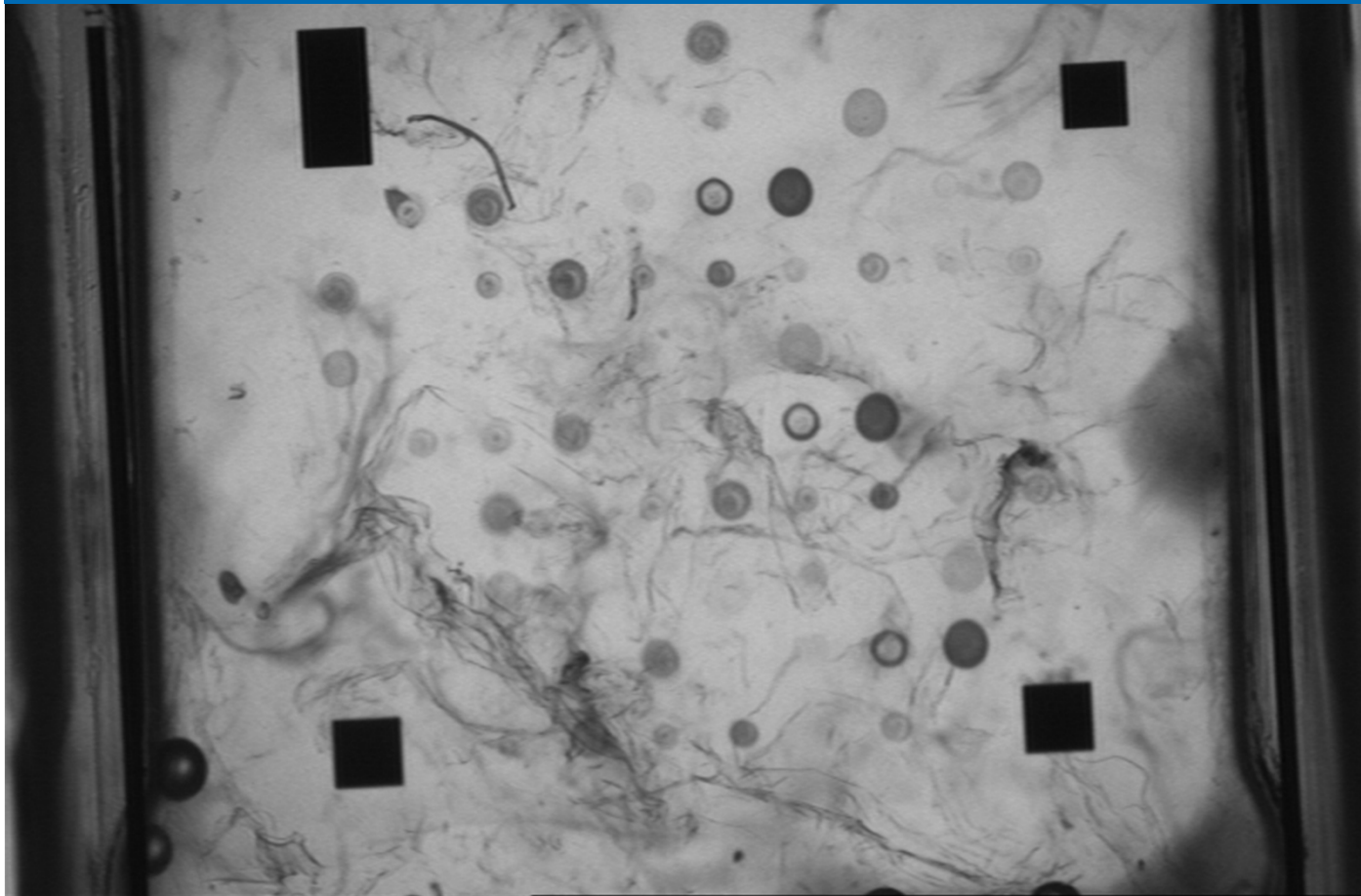


Negativkontrollen!!!

Validierungsergebnisse des Mikroarrays (II)

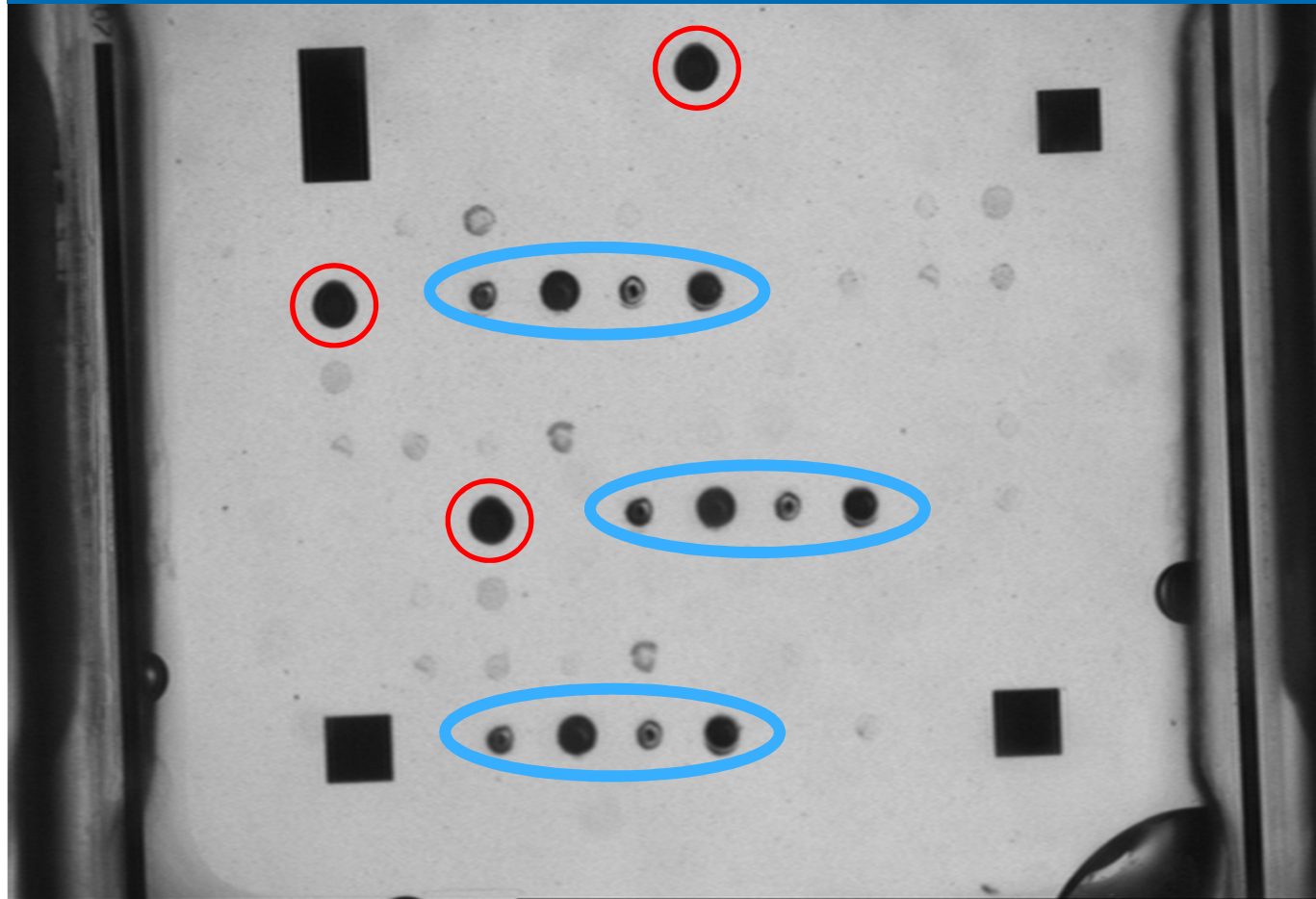


Schlierenbildung durch ungeeigneten Waschpuffer



Validierungsergebnisse des Mikroarrays (III)

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

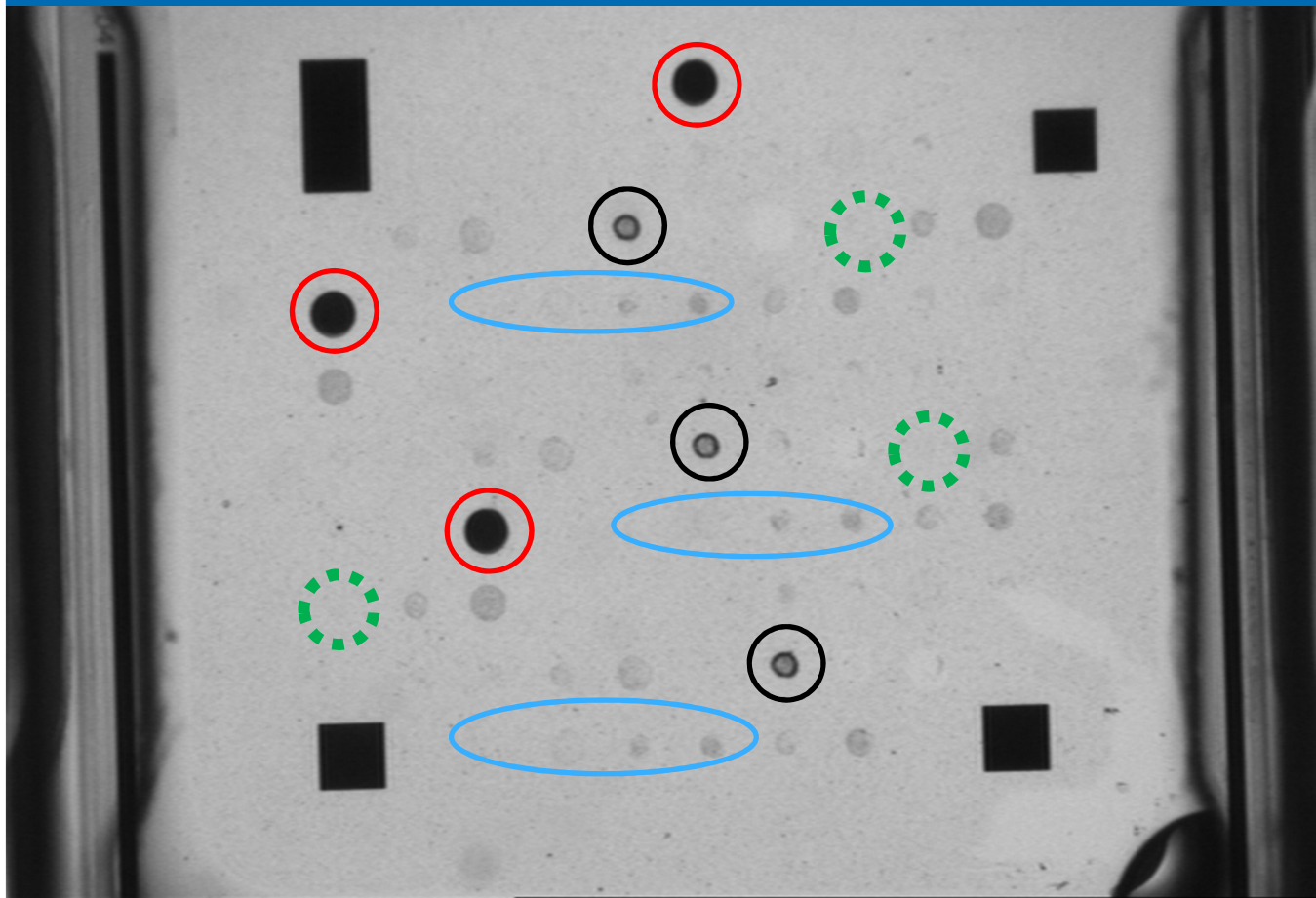


- Positivkontrollen
- *S. Typhimurium*

Validierungsergebnisse des Mikroarrays (IV)



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

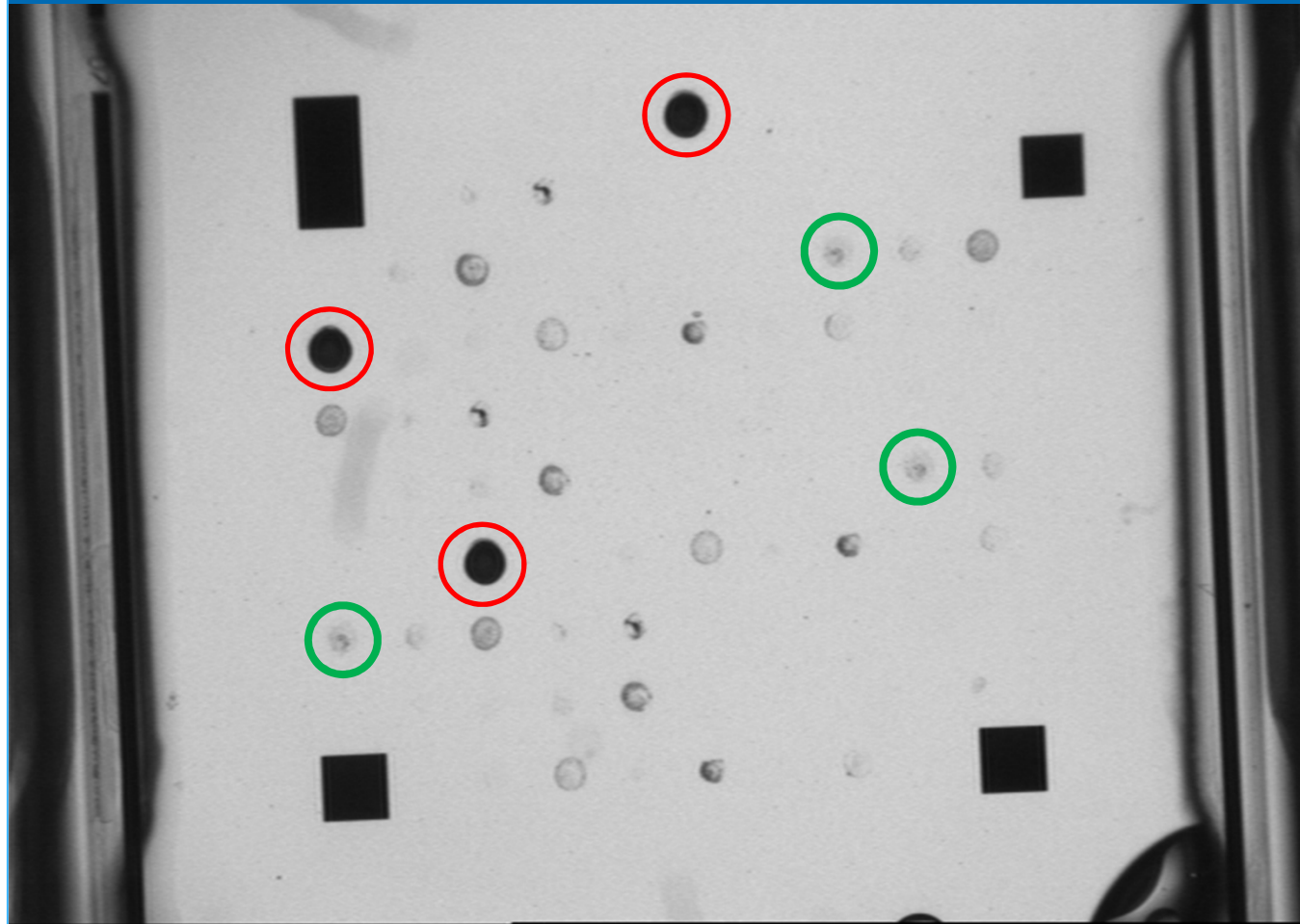


- Positivkontrollen
- *S. Typhimurium*
- *Yersinia enterocolitica*
- NICHT vorhanden:**
○ *Trichinella*

Validierungsergebnisse des Mikroarrays (V)



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



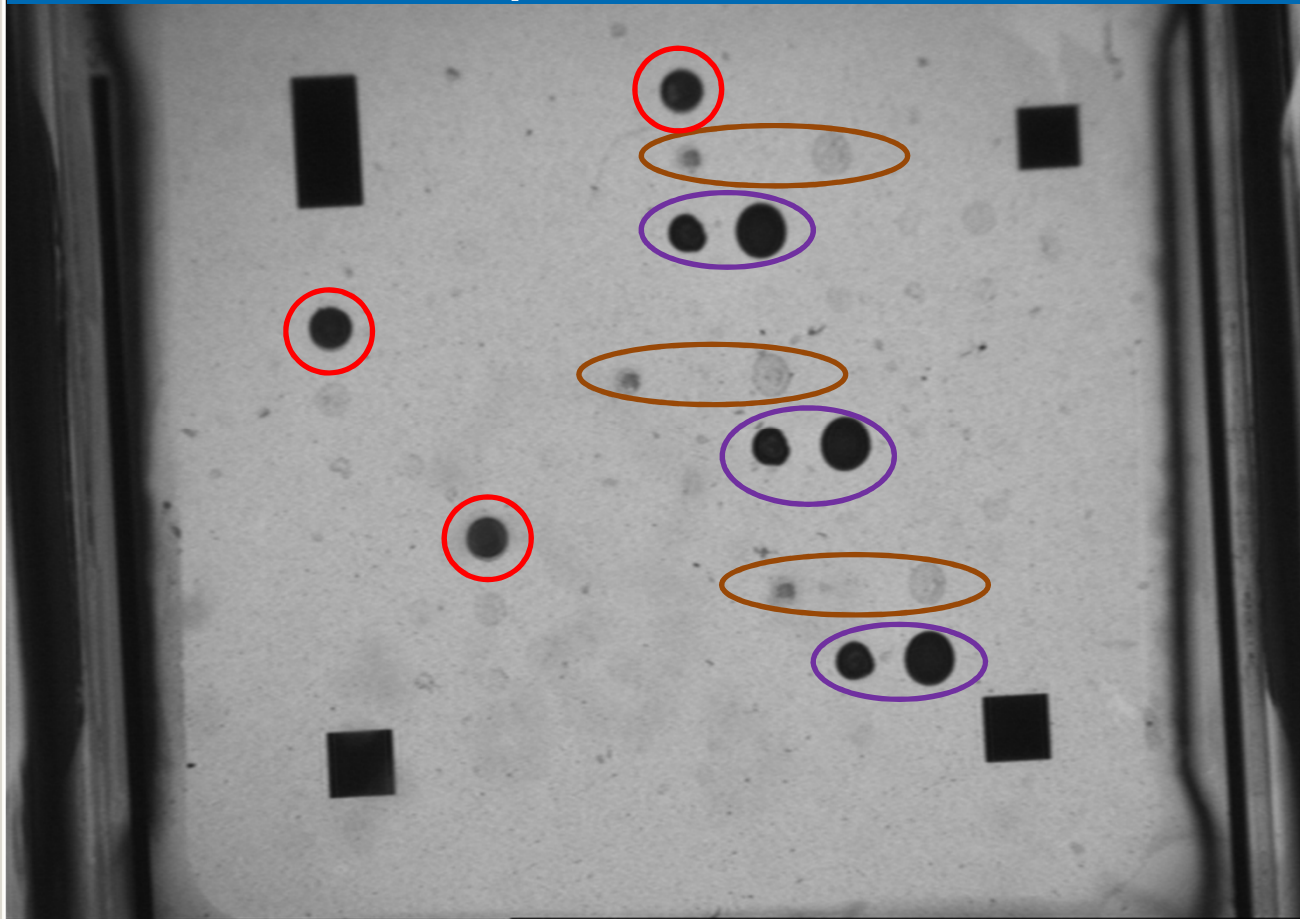
○ Positivkontrollen

○ Trichinella

Validierungsergebnisse des Mikroarrays (VI)



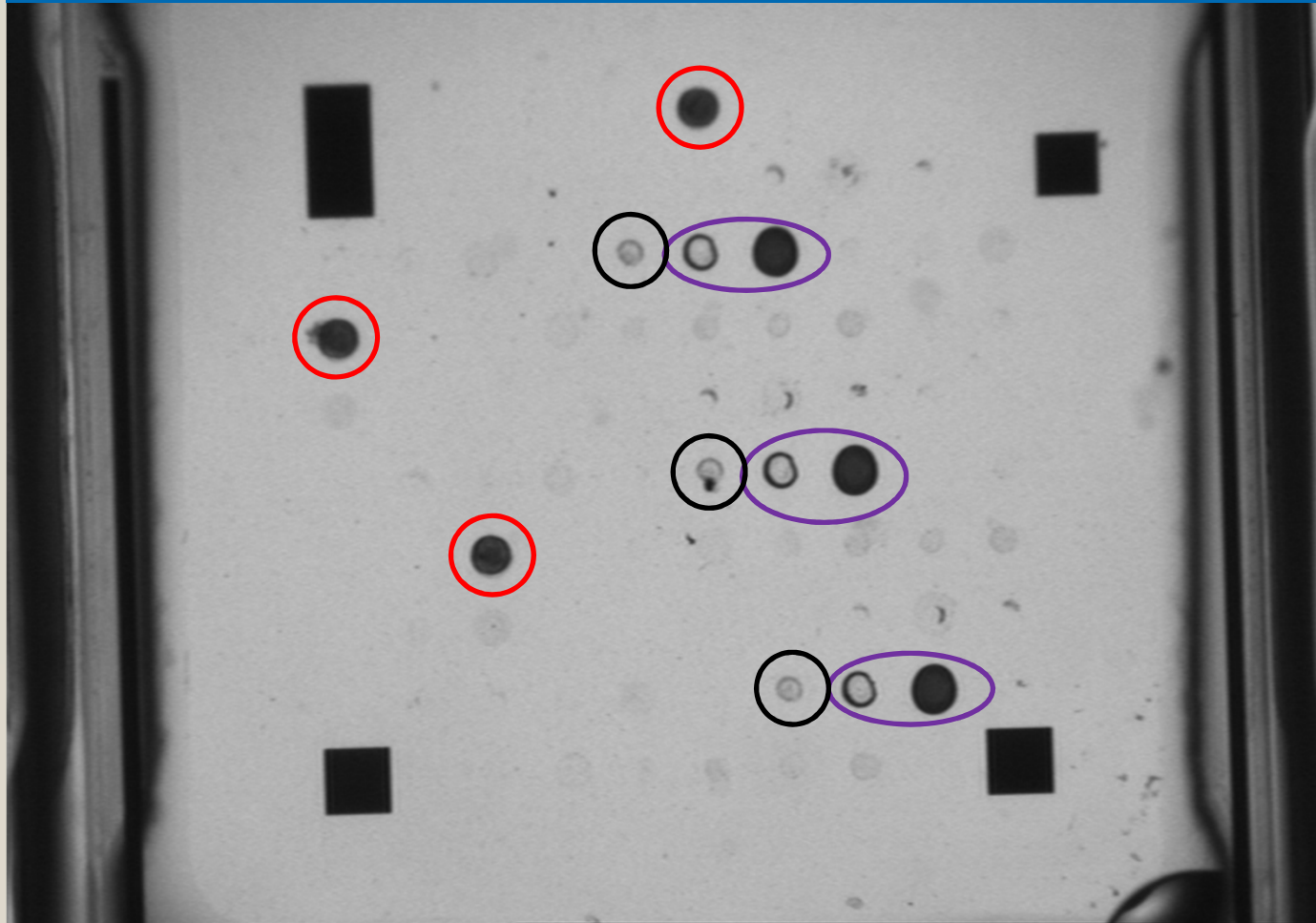
Feldfleischsaftprobe mit Antikörpern gegen Toxoplasmen & PRRSV






- Positivkontrollen
- Toxoplasma
- PRRSV (EU, US)

Validierungsergebnisse des Mikroarrays (VII)

Feldfleischsaftprobe mit Antikörpern gegen *Toxoplasma gondii* & *Yersinia enterocolitica*

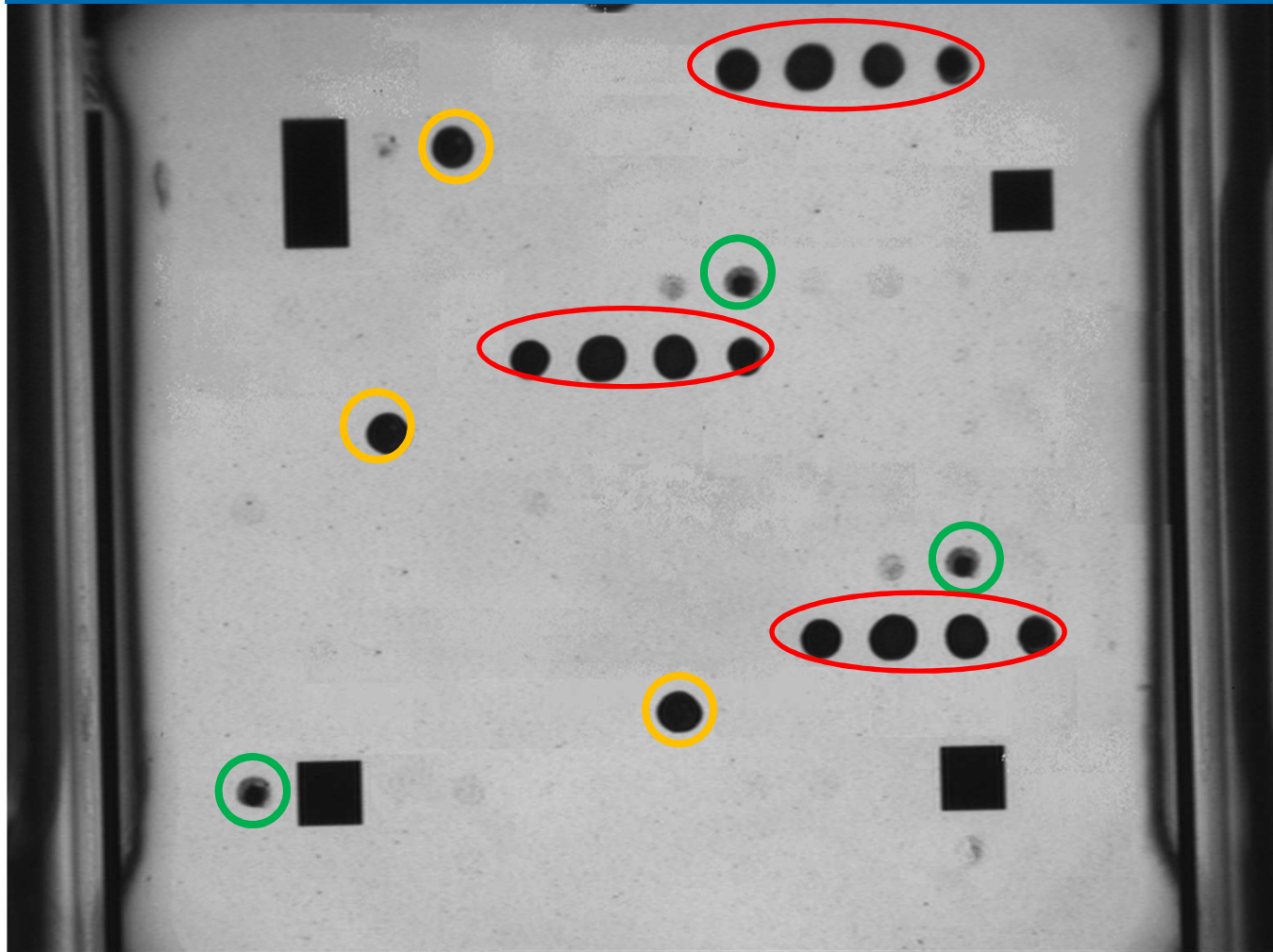


-  **Positivkontrollen**
-  ***Toxoplasma gondii***
-  ***Yersinia enterocolitica***

Validierungsergebnisse des Mikroarrays (VIII)

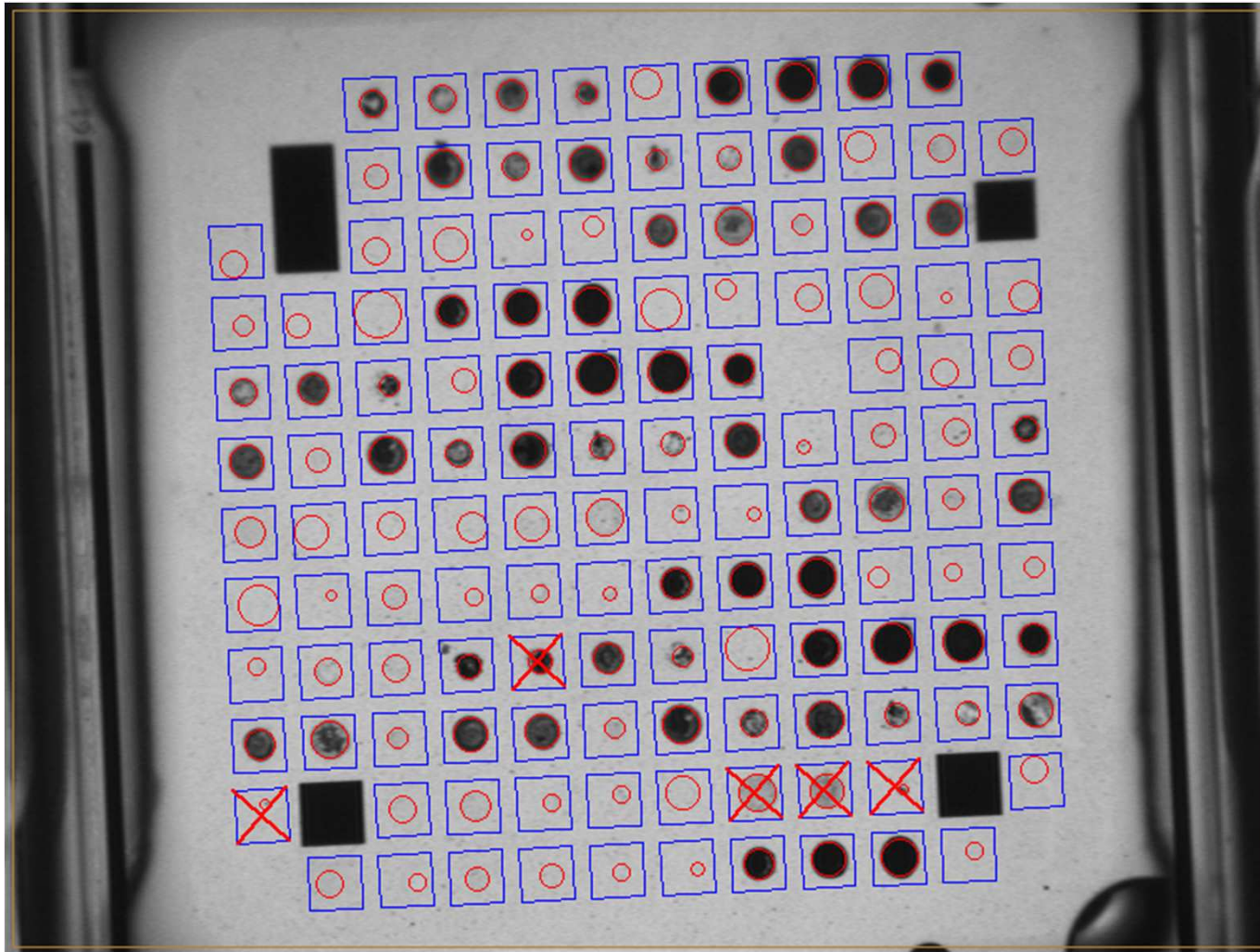


Fleischsaftprobe aus Referenzlabor für Trichinella (Dr. Nöckler, BfR)



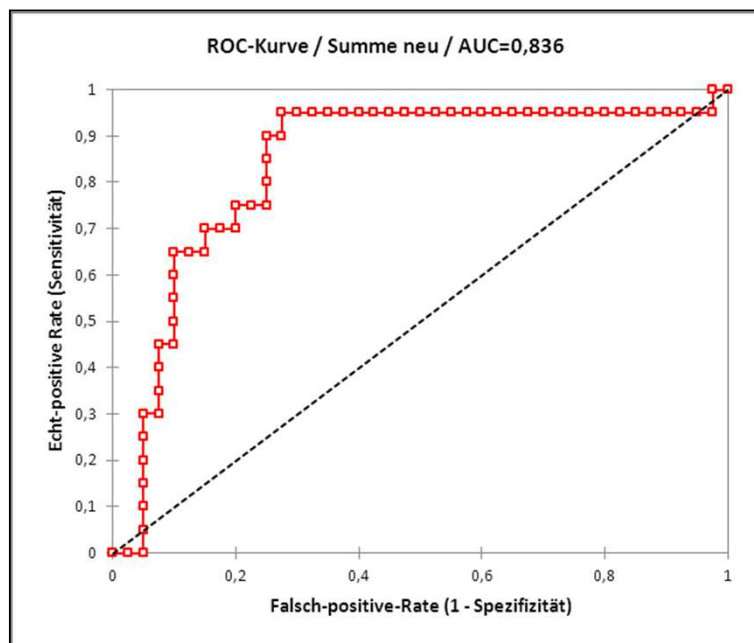
- Positivkontrollen
- Trichinella
- HEV

Computergestützte Messung des Schwärzungsgrades

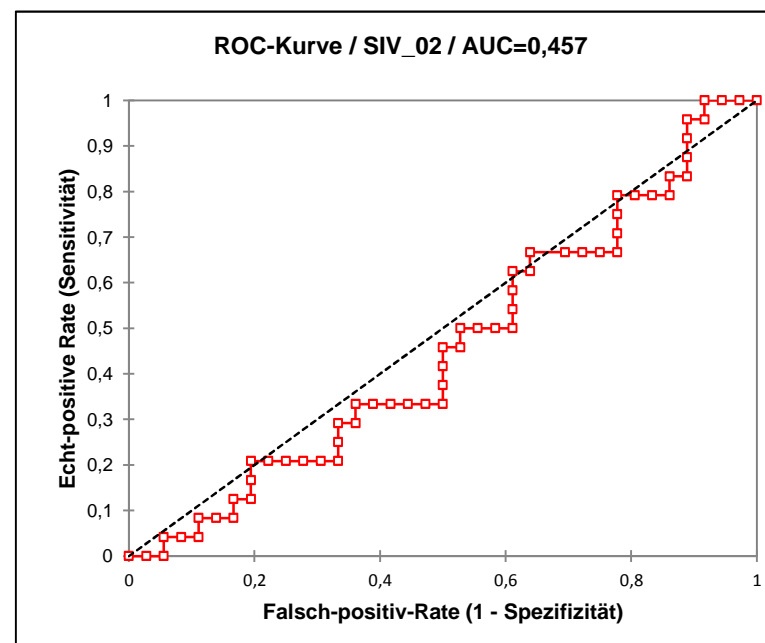


Erregerspezifische Grenzwertoptimierung mittels Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve

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

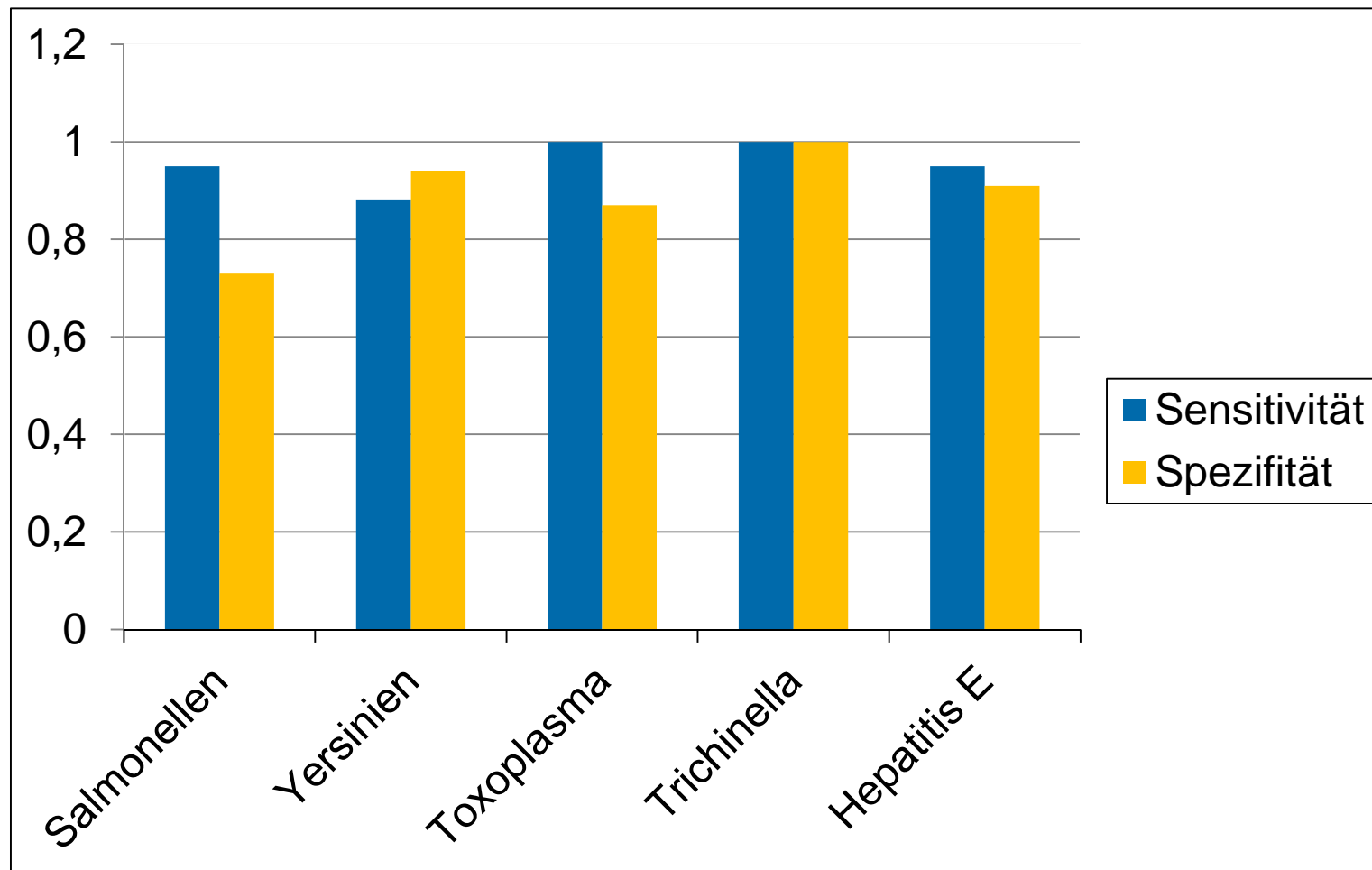


ROC- Kurve für Salmonellen



ROC- Kurve für Influenza

Ergebnisse der ROC-Analysen für Zoonoseerreger



Schlussfolgerungen (I)

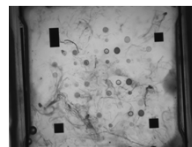
- **Fleischsaft und Blutserum als Probenmaterial für den Microarray geeignet**



&

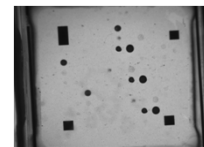


- **Validierungsergebnisse des Microarrays sehr vielversprechend**



vorher

vs.

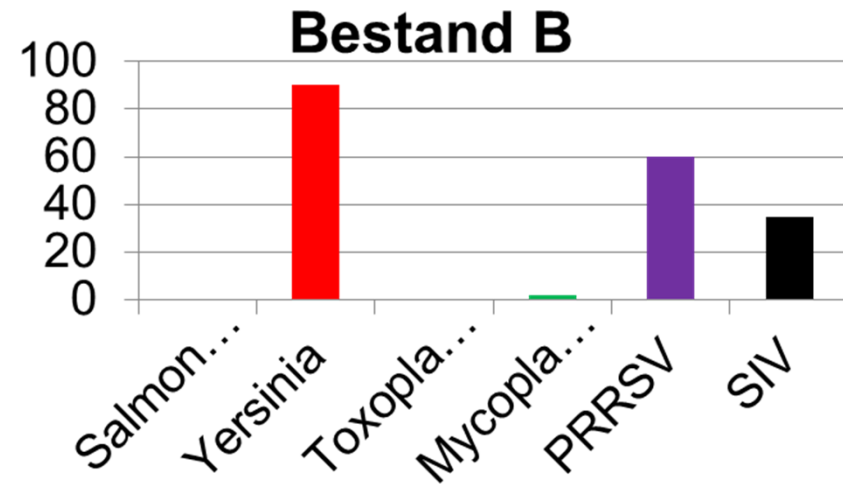
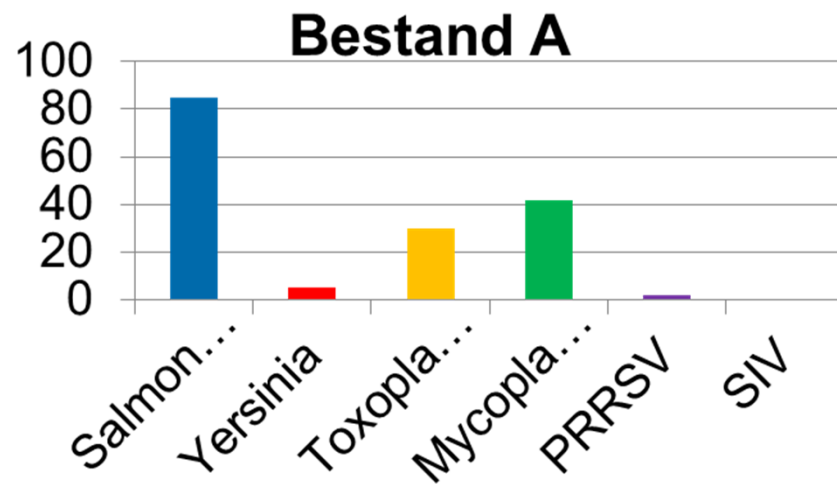


nachher

- **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“



Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft
und Verbraucherschutz



Bundesanstalt für
Landwirtschaft und Ernährung