

Abschlussbericht



**Entwicklung eines "schweinespezifischen Microarrays" als
Kontrollinstrument zum Aufbau eines multiserologischen
Monitoringsystems mit Fleischsaft als Probenmaterial zur
Minimierung pathogener/zoonotischer Erreger in der
Lebensmittelkette ("Schweinespezifischer Microarray")**

Förderkennzeichen: 2811HS013
(Laufzeit: 15.04.2012 - 31.03.2013)

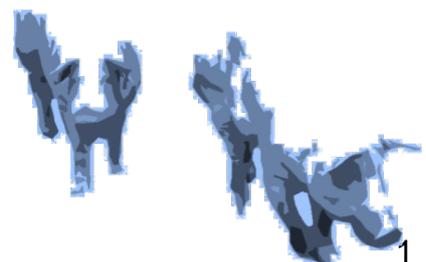
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Zentrum für Tiergesundheit und Lebensmittelqualität

Außenstelle für Epidemiologie
Büscheler Straße 9
49456 Bakum
(Prof. Dr. Thomas Blaha und Prof. Dr. Diana Meemken)

und

Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
(Prof. Dr. Günter Klein)

Wissenschaftliche Leitung: Prof. Dr. Diana Meemken
Projektbearbeitung: Tierarzt Sebastian Hahne



Inhaltsverzeichnis:

1 Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens	6
1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens	7
1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	10
1.2.1 Microarray als Testsystem.....	10
1.2.2 ELISA	122
1.2.3 Weitere Untersuchungsmethoden auf dem Gebiet der Multiserologie.....	13
1.2.4 Vor- und Nachteilen ähnlicher Verfahren gegenüber der Microarray-Technologie:.....	14
2 Material und Methode	166
2.1 Material	166
2.1.1 Probenmaterial	166
2.1.2 Antigenmaterial.....	177
2.1.3 ELISA-Test-Material	188
2.1.4 Der Microarray.....	199
2.2.5. Sonstige Materialien	20
2.2. Methode	211
2.2.1 Entwicklung eines Testprotokolles.....	211
2.2 Vergleichsuntersuchung Microarray-ELISA	233
2.3 Vergleichsuntersuchung direkter –indirekter Nachweis.....	255
3 Ergebnisse.....	277
3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse.....	288
3.1.1 Wichtige Ergebnisse der Testentwicklung	288
3.1.2 Wichtige Ergebnisse der ELISA-Microarray-Vergleichsuntersuchung. ...	299
3.1.2.1 Wichtige Ergebnisse für die „lebensmittelsicherheitsrelevanten“ Antigene.....	299
3.1.2.1.1 <i>Salmonella</i> spp.....	299
3.1.2.1.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	333
3.1.2.1.3 <i>Trichinella spiralis</i>	344
3.1.2.1.4 <i>Yersinia enterocolitica</i>	377
3.1.2.1.5 <i>Mycobacterium avium</i> ssp.....	388
3.1.2.1.6 Hepatitis E-Virus	399
3.1.2.2. Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse für die „lebensmittelsicherheitsrelevanten“ Antigene.....	40

3.1.2.3 Wichtige Ergebnisse für die „tiergesundheitsrelevante“ Antigene	40
3.1.2.3.1 Influenza A-Virus	40
3.1.2.3.2 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	422
3.1.2.3.3 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	433
3.1.2.3.4 PRRSV.....	444
3.1.2.4 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse für die „tiergesundheitsrelevanten“ Antigene	455
3.1.3 Wichtige Ergebnisse aus dem Vergleich von multiserologischen, indirekten Ergebnissen via Microarray mit direkten Nachweismethoden	466
3.1.3.1 <i>Salmonella</i> spp.	477
3.1.3.2 Influenza A-Virus	477
3.1.3.3 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	488
3.1.3.4 PRRSV	499
3.1.3.5 <i>Mycobacterium avium</i> ssp.	499
3.1.3.6 <i>Yersinia enterocolitica</i>	499
3.1.3.7 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	50
3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	51
4. Zusammenfassung	522
5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen	533
6. Literaturverzeichnis	555



Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
bzw.	beziehungsweise
d.h.	das heißt
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EU	Europäische Union
FCS	fetal calf serum
ggf.	gegebenenfalls
HRP	Horseradish peroxidase
IVD	Innovative Veterinär Diagnostik
IgG	Immunoglobulin G
LDL	Labor Diagnostik Leipzig (now a QIAGEN company)
OD	Optical Density (Optische Dichte)
TiHo	Tierärztliche Hochschule Hannover
ROC	Receiver Operating Characteristic
v.a.	vor allem
VO	Verordnung
z.B.	zum Beispiel

Teile der durch das Projekt gewonnenen Ergebnisse wurden nach Genehmigung der BLE veröffentlicht:

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

Der Microarray als simultanes, miniaturisiertes Testsystem zur Nutzung im Rahmen der "Fleischsaftmultiserologie"

In: ALPHA Informationsgesellschaft; Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft; Bundesverband der beamteten Tierärzte (Hrsg.): Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle (Sonderausgabe)

53. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene: Dreiländertagung; Programm- und Abstract-Band, Garmisch-Partenkirchen, 25.-28.09.2012;

Lampertheim: Alpha Informationsgesellschaft, 2012, S. 102
ISSN 0945-3296

Meemken, D.; Hahne, S.; Klein, G.; Bächlein, C.; Engemann, C.; Gabert, J.; Blaha, T.:

Einsatz von Microarrays im Rahmen der "Fleischsaftmultiserologie"

In: Ellerbroek, L. (Hrsg.):

Abstracts zum BfR-Symposium: Zur Weiterentwicklung der Fleischuntersuchung - Stand und Perspektiven BfR-Symposium: Zur Weiterentwicklung der Fleischuntersuchung - Stand und Perspektiven, Berlin, 07.02.2013; 2013, S. 12

1 Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Das Projekt „Entwicklung eines "schweinespezifischen Microarrays" als Kontrollinstrument zum Aufbau eines multiserologischen Monitoringsystems mit Fleischsaft als Probenmaterial zur Minimierung pathogener/ zoonotischer Erreger in der Lebensmittelkette“ hatte das Ziel, ein Testsystem zu entwickeln, mit dem verschiedene Krankheitserreger über Antikörpererkennung in Fleischsaftproben simultan detektiert werden können.

Ein wesentlicher Bestandteil der maßgeblich von der EFSA koordinierten Bemühungen zur Umsetzung der risikoorientierten Schlacht tier- und Fleischuntersuchung ist es, die Lebensmittelsicherheit beim Fleisch zu verbessern. Dabei steht die Einbeziehung aller Stufen der Lebensmittelkette (from stable to table) im Vordergrund der VO (EG) 178/2002 und des sogenannten „Hygienepaketes der EU“ (insbesondere VO (EG) 853/2004 und 854/2004).

Als Erweiterung zu der bisher üblichen „amtlich festzustellenden Genusstauglichkeit“ werden von dem europäischen Lebensmittelkonzept nunmehr zwei weitere Ziele verfolgt:

- a) Die stetige Verbesserung der Lebensmittelsicherheit durch Maßnahmen, die zusätzlich zur amtlichen Inspektion von Schlacht tier- und Schlachtkörpern zur Erkennung und Berücksichtigung von Infektionen mit Zoonoseerregern und damit zu einer Risikominimierung für den Verbraucher führen und
- b) die stetige Verbesserung der Tiergesundheit sowie die Optimierung des Tierschutzes der zur Fleischgewinnung gehaltenen Tiere.

Das wichtigste Werkzeug der sogenannten risikoorientierten Schlacht tier- und Fleischuntersuchung besteht in einer wirksamen Prozesskontrolle einschließlich der labordiagnostischen Untersuchung auf das Vorkommen von nicht visuell erfassbaren subklinischen und latenten Infektionen.

Laut VO (EG) 1244/2207 ist eine Voraussetzung zur Zulassung von Schlacht tier- und Fleischuntersuchung das Einbeziehen von mikrobiologischen und/oder serologischen Monitoringergebnissen.

In Deutschland ist bisher nur ein serologisches Monitoringprogramm, das sogenannte Salmonellenmonitoring (siehe nationale „Schweine-Salmonellen-Verordnung“), vorgeschrieben. Diese Untersuchungen können mit Blutserum, entnommen im Tierbestand frühestens 14 Tage vor der Schlachtung, oder mit Fleischsaft, entnommen von den Schlachttierkörpern im Schlachtbetrieb, durchgeführt werden. Letzteres findet in Deutschland aus Praktikabilitätsgründen die weitaus häufigere Anwendung. Ziel dieses Projektes war es nun mittels multiserologischen Untersuchungen basierend auf dem Testsystem Microarray zum einen den Nutzen der Probe „Fleischsaft“ zu erhöhen, womit dem gesamten Probengewinnungs- und -verarbeitungsprozess mehr Effizienz beizumessen wäre. Zum anderen ist es möglich, durch ein Monitoring über verschiedenen Krankheiten zu einer kontinuierlichen Verbesserung der Lebensmittelsicherheit (Zoonosen) und Tiergesundheit beizutragen.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Wie in der Vorhabenbeschreibung für das Forschungsvorhaben (Jan. 2012) aufgeführt, umfasste das Projekt einen zeitlichen Rahmen von einem Jahr. Die konkrete Projektdauer belief sich letztendlich auf einen Zeitraum von April 2012 bis März 2013.

Das Projekt „Entwicklung eines schweinespezifischen Microarrays als Kontrollinstrument zum Aufbau eines multiserologischen Monitoringsystems mit Fleischsaft als Probenmaterial zur Minimierung pathogener/ zoonotischer Erreger in der Lebensmittelkette“ ("Schweinespezifischer Microarray") wurde in fünf Arbeitsschritte eingeteilt und zeitlich an Quartale des Jahres gebunden.

Der Arbeitsplan ist so angelegt, dass in einem ersten Arbeitsschritt eine ausführliche Analyse der einschlägigen Fachliteratur unter Einbeziehung humanmedizinischer Publikationen durchgeführt werden sollte, auch um sich einen Überblick über den aktuellen Stand der Array-Technologie zu verschaffen. Des Weiteren standen das Erlernen und die Durchführung von Untersuchungen mittels des Microarray-Verfahrens im Vordergrund. Ziel war es, dass die Prinzipien und die verschiedenen Arbeitsprozesse, die für eine Durchführung und Validierung nötig sind, erlernt wurden.

Die geplante Einarbeitung in die Materie als Grundlage für ein Arbeiten mit den Microarrays sowie das Erlernen des Verfahrens ist entsprechend des Arbeitsplans erwartungsgemäß verlaufen.

Im zweiten Arbeitsschritt sollte mit Hilfe des in Arbeitsabschnitt 1 angeeigneten Wissens ein schweinespezifischer Microarray-Prototyp entwickelt werden.

Es war geplant, Antigenstrukturen und geeignete Konzentrationen ausgewählter Erreger zu akquirieren. Zudem musste ein Versuchsablauf validiert werden, mittels dem eine standardisierte Durchführung der Microarray-Versuche ermöglicht werden kann. Nach diesem Prozess sollte der Microarray in mehreren Testreihen mit Fleischsaftproben und Blutseren von Referenzlaboren und aus einem vorangegangenen Projekt, dem „NRW-Multiserologieprojekt“, validiert werden.

Diese Arbeitsschritte sollten laut Arbeitsplan bis zum Ende des dritten Quartals abgeschlossen sein.

Zum Ablauf des zweiten Arbeitsschrittes:

Für die Herstellung eines Mikroarray-Prototypen wurden zunächst bespottungsfähige Antigenstrukturen verschiedener Erreger benötigt. Unterstützt von der Firma Labor Diagnostik Leipzig (LDL, jetzt QIAGEN), die Antigene der nachfolgenden Erreger zur Verfügung gestellt hat, konnte die Firma ALERE Technologies Microarray-Chips mit diesen Antigenen herstellen.

Antigenstrukturen zu folgenden Erregern wurden für den Array-Prototyp verwendet:

Salmonella Agona,

Salmonella Typhimurium

Salmonella Cholerasuis

Yersinia enterocolitica,

Toxoplasma gondii,

Trichinella spiralis,

Mycobacterium avium ssp. hominissuis,

Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis

Porzines Reproduktives and Respiratorisches Syndrom Virus (PRRSV)-EU-Stamm,

PRRSV-US-Stamm

porzines Influenzavirus A

Mittels dieses Microarray-Prototypens konnte nun ein Versuchsablauf validiert werden (näheres dazu siehe Material und Methode).

Durch das Probenmaterial „Fleischsaft“, welches im Vergleich zu Serum, dem üblicherweise verwendeten Testmedium für Antikörpermessungen, deutliche Unterschiede in seinen Eigenschaften aufweist, nahm dieser Validierungsschritt mehr Zeit in Anspruch als bei der Planung angenommen. Letztlich konnte aber ein standardisierbarer Versuchsablauf entwickelt werden der reproduzierbare und auswertbare Ergebnisse liefert.

Durch zahlreiche Kontaktaufnahmen zu Testanbietern und wissenschaftlichen Einrichtungen konnten weitere Erreger-Antigene akquiriert werden.

Folgende weitere Antigene wurden hinzugenommen:

Hepatitis E-Virus (zur Verfügung gestellt vom Institut für Virologie TiHo Hannover)

Actinobacillus pleuropneumoniae (Außenstelle für Epidemiologie, TiHo Bakum)

Mycolasma hyopneumoniae (Veterinärmedizinische Universität Wien)

Damit konnte der Microarray in einer Versuchsreihe mit verschiedenen stark antikörperhaltigen Fleischsäften getestet werden, um einen Grenzwert zu validieren und die Möglichkeit der quantitativen Auswertung über Signalstärken nutzbar zu machen. Als Referenzmethoden wurden die Ergebnisse verfügbarer bzw. zugelassener single-ELISA-Testungen verwendet.

Der für das vierte Quartal 2012 geplante, dritte Arbeitsschritt hatte das Ziel Fleischsäfte von Schweinen aus einer Auswahl an Beständen aus dem „NRW-Multiserologieprojekt“ mit dem validierten Microarray zu testen. Dabei wurde überprüft, ob der entwickelte Prototyp zuverlässige bzw. vergleichbare Ergebnisse mit Bestandsproben liefert. Hier wurde die Auswahl der Bestände so getroffen, dass möglichst alle Erreger und das gesamte Antikörpertiterspektrum in der Probenmenge vorlagen.

In einem vierten Arbeitsschritt, der laut Plan bis ins erste Quartal 2013 andauern sollte, wurden bereits Ende November 2012 an einem Schlachthof von 100 Schlachtschweinen (10 Tiere von je 10 Beständen) Zwerchfellpfeilerproben, Serumproben sowie unterschiedliche Proben für direkte Erregernachweise, wie Lungengewebe, Mandibular- und Ileocaecallymphknoten gewonnen.

Ziel dieser Beprobung war einen Vergleich von multiserologischen, indirekten Ergebnissen via Microarray mit direkten Nachweismethoden (kulturelle und molekularbiologische Untersuchungen). Aufgrund des Nichtvorhandenseins von Antikörpern gegen *Toxoplasma gondii* in zahlreichen Serum- und Fleischsaftproben bzw. aufgrund von sehr niedrigen Seroprävalenzen, war der angedachte Tierversuch mit Mäusen nicht gerechtfertigt. Laut Einschätzung des FLI ist ein Tierversuch v.a. dann sinnvoll, wenn hohe bis sehr hohe Seroprävalenzen vorliegen. Molekularbiologische wie auch histologische Untersuchungen auf *Toxoplasma gondii* bieten hier ebenfalls keine gesicherten Aussagen über den Status eines Schlachtschweins. Deshalb wurde in Abstimmung mit der BLE darauf verzichtet. Um die Grenzwerte der einzelnen Spots für den Microarray anhand einer größeren Stichprobe abzusichern und ggf. zu optimieren, wurden ebenfalls entnommenen die Serum und/oder Fleischsaftproben mittels single-ELISA-Testungen untersucht.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

1.2.1 Microarray als Testsystem

Ziel dieser Arbeit war es, einen auf der Technologie des Microarray basierenden Test zu entwickeln, der die simultane multiserologische Untersuchung von Fleischsaftproben ermöglicht.

Bei einem Microarray handelt es sich um ein Untersuchungssystem, mit dem eine Vielzahl von Parametern parallel aus einer geringen Menge Probenmaterial bestimmt werden kann. Vor allem auf dem Gebiet der molekularbiologischen Untersuchungen kommt der Microarray zum Einsatz.

Dabei handelt es sich um genombasierte Arrays bei denen verschiedene definierte Genomfragmente (PCR-Fragmente, Oligonukleotide) nebeneinander an definierten Stellen aufgebracht werden und so als Bindungspartner für komplementäre nachzuweisende Genomabschnitte dienen.

Der innerhalb dieses Projektes verwendete Microarray-Typ gehört hingegen in die Gruppe der Protein-Microarrays, genauer zu den Antigen-Microarrays oder allgemeiner zu den Multi-Immunoassays (EKINS 1989).

Auf einer Platte von definierter Größe von 3 x 3 mm werden Strukturen nebeneinander aufgebracht. Ziel ist es immer mit Hilfe dieser Strukturen komplementäre Strukturen aus Probenmaterial zu detektieren. Je nach Beschaffenheit des aufzubringenden Materials können mehrere 100 verschiedene Strukturen in einem definierten Raster auf die Platte „gespottet“ werden.

Bei dem hier zu entwickelnden Testsystem sollen Antikörper verschiedener Erreger nachgewiesen werden. Es wurde dementsprechend versucht, die komplementären Antigenstrukturen der verschiedenen Erreger auf den Microarray zu spotten.

Auf diese Weise lassen sich mehrere 100 Antigen-Antikörper-Reaktionen gleichzeitig beobachten und quantitativ auswerten.

Die in der aufgetragenen Probe befindlichen Antikörper binden an die jeweiligen komplementären Antigene. Über eine Bindung an einen enzymmarkierten Zweitantikörper können diese Probenantikörper an ihren Bindungsstellen sichtbar gemacht werden.

Das Prinzip des Testablaufs ist vergleichbar mit dem eines nicht kompetitiven indirekten ELISA-Tests.

Stand der Technik

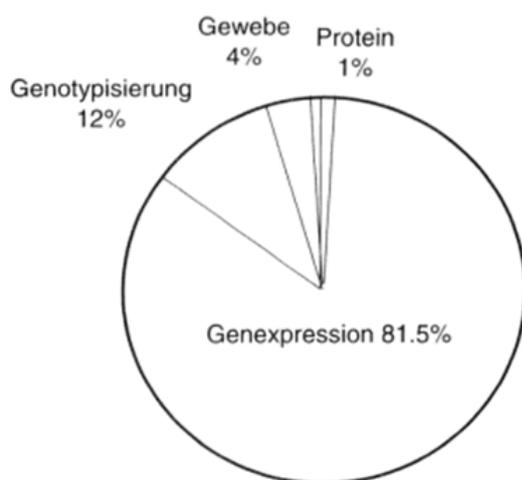


Abb. 1: Übersicht über die prozentualen Anteile an Veröffentlichungen zu Microarrays von 1995 bis 2002 (SCHENA 2003)

1.2.2 ELISA

Bei dem „enzyme-linked-immunosorbent assay“ handelt es sich um einen Test bei dem Antigen-Antikörper-Bindungen erkannt werden. Durch verschiedene Bindungsschritte können so Antikörper nachgewiesen werden. Über ein Substrat, welches durch das Enzym seine Eigenschaften ändert, kann diese Reaktion sichtbar gemacht werden. Dieses kann über Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz geschehen. Die Intensität des Signals korreliert mit der Anzahl an Antigen-Antikörper-Bindungen. Daher ist der Einsatz von ELISA-Testsystemen auch für quantitative Untersuchungen geeignet (ENGVALL u. PERLMANN 1972).

Es wird zwischen kompetitiven und nicht kompetitiven ELISA-Tests unterschieden. Bei der kompetitiven Variante konkurriert der in der Probe befindliche Antikörper mit einem enzymmarkierten Antikörper um die Bindungsstelle am Antigen. Die Signalintensität ist hier antiproportional zur Antikörpermenge in der Probe.

Des Weiteren wird zwischen indirektem, direktem und Sandwich-ELISA unterschieden. Die Unterschiede hier liegen in unterschiedlichen Zwischenschritten, die bis zur Sichtbarmachung durchgeführt werden.

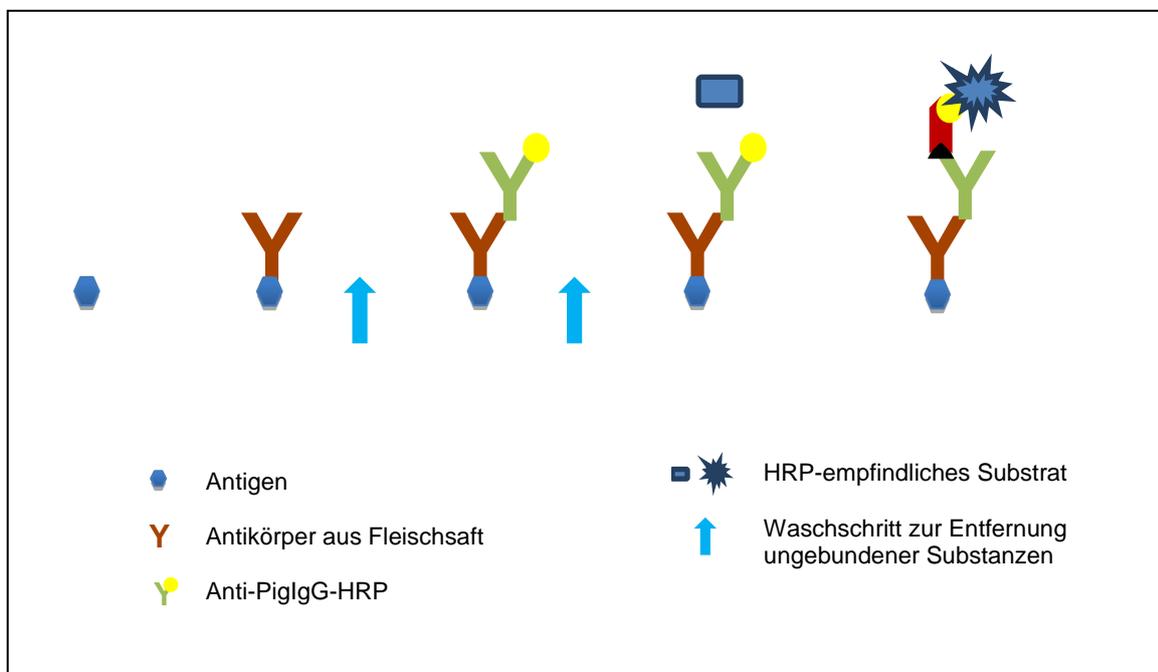


Abb. 2: Prinzip des indirekten ELISA

Bei dem nicht kompetitiven indirekten ELISA wird auf eine mit Antigen beschichtete Platte eine antikörperhaltige Probe gegeben. Die Antikörper binden an die Antigene.

Ein gegen die Antikörper gerichteter enzymmarkierter Sekundärantikörper dient als Brücke zum Substrat.

1.2.3 Weitere Untersuchungsmethoden auf dem Gebiet der Multiserologie

Neben dem in diesem Projekt verwendeten Microarray-Testsystem gibt es auch andere Möglichkeiten zur multiserologischen Testung. Diese sollen hier kurz vorgestellt werden.

Die „Luminex® xMAP-Technologie“ ist eine andere Methode, Paralleluntersuchungen durchzuführen. Mit auf diesen auf die xMAP-Technologie basierenden Tests ist es möglich, die simultane Quantifizierung von bis zu einhundert verschiedenen analytischen Parametern einer einzigen Probe zu testen. Grundlage der Technologie sind mikroskopisch kleine sphärische Polystyrolkugeln, so genannte Mikrosphären oder Beads. Diese dienen als Festphase für biochemische Nachweisreaktionen ähnlich wie die Polystyrolplatten bei ELISA-Testsystemen. Zurzeit sind einhundert verschiedene Bead-Typen verfügbar, die sich in ihrem Fluoreszenzfarbton unterscheiden, so dass theoretisch bis zu einhundert verschiedene Nachweisreaktionen simultan durchgeführt werden können. In der Humanmedizin wird die Technologie bereits zur Detektion von antiviralen Antikörpern eingesetzt, findet aber auch Einsatz zum Nachweis von bakterieller rRNA, Zytokinen oder Genfragmenten (GRUMMER et al. 2010).

Das Prinzip der Technik liegt in der Färbung der Beads mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen (Rot und Infrarot). Die Kombination dieser beiden Farbstoffe in jeweils zehn verschiedenen Konzentrationsstufen führt zu 100 spektral unterscheidbaren Schattierungen von Rot und Infrarot. Jede der daraus resultierenden Fluoreszenzintensitäten definiert eine Bead-Population. Der spezifische Nachweis der Bindung von Analyten an die Beads erfolgt über ein Detektionsmolekül (Konjugat) ähnlich dem ELISA-Prinzip. An das Konjugat ist ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, dessen spektraler Bereich sich von denen der internen roten Farbstoffe unterscheidet. So kann auch eine Quantifizierung stattfinden. Die Analyse und Auswertung der Bead-basierten Assays erfolgt mit dem Luminex®-Analysesystem.

Hierbei handelt es sich um einen ähnlichen Vorgang wie bei der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) unter Verwendung zweier unterschiedlicher Laser. Aktuell werden immer mehr Testsysteme auch für einen möglichen Einsatz in der tiermedizinischen Diagnostik entwickelt. (GRUMMER et al. 2010).

Auf der Basis der Luminex-Technologie ist z.B. ein BVD-Antikörper Test (XIA et al. 2010) entwickelt worden. Auch im Schweinesektor wurde diese Technik bereits eingesetzt. In den USA wurde zur Überprüfung der Immunantwort nach Impfung gegen das Porzine Reproductive und Respiratorisches Syndrom Virus (*PRRSV*) ein Nachweistest auf Luminex-Technologiebasis von acht verschiedenen Cytokinen beim Schwein entwickelt (LAWSON et al. 2010).

1.2.4 Vor- und Nachteilen ähnlicher Verfahren gegenüber der Microarray-Technologie:

single-ELISA

Vorteile:

Es handelt sich bei dem 1971 in Schweden entwickelten ELISA um eine (alt-) bewährte Untersuchungsmethode zum quantitativen Nachweis von Antikörpern. Da es bei Antikörperbestimmungen keinen „Gold-Standard“ gibt, wird der ELISA häufig ersatzweise herangezogen. Auf dem deutschen Markt befinden sich zahlreiche durch das Friedrich-Löffler-Institut zugelassene Tests für Schweinekrankheiten und auch Zoonosen. Aufgrund des relativ geringen Bedarfs an Laborequipment (ca. 5000 bis 8.000€) und an Know-How findet das ELISA-Verfahren flächendeckend in vielen Laboren Anwendung.

Nachteile:

Wenn nicht auf eine kostenintensive Automatisierung (ca. 60.000 bis 100.000€) umgestellt wird, ist das ELISA-Verfahren eine sehr arbeitsintensive und ressourcenbindende Untersuchungsmethode – insbesondere bei Massenuntersuchungen. Preislich liegt man pro untersuchter Probe und pro serologischem Nachweis je nach Test zwischen ca. 5 € (z.B. *Salmonella* spp. ELISA) und ca. 13 € (z.B. *Actinobacillus pleuropneumoniae* ELISA).

X-Map-Technologie

Vorteile:

Der Vorteil der X-Map-Technologie liegt v.a. darin, dass der Untersuchungsumfang je nach Kundenwunsch unkompliziert erweitert oder auch reduziert werden kann. Beim Microarrayverfahren ist eine Erweiterung des Untersuchungsumfangs nur möglich, wenn neue Arrays hergestellt werden.

Außerdem verändert eine Erweiterung des Untersuchungsumfangs nur vernachlässigbar die Untersuchungskosten – im Gegensatz zum single-ELISA-Verfahren, bei dem jede Erweiterung jeweils zusätzlich, in etwa gleich hohe Kosten verursacht.

Nachteil:

Für die Durchführung der X-Map-Technologie wird relativ kostenintensives Equipment (ca. 100.000€) benötigt, was für einen flächendeckende Einsatz insbesondere in kleinen Laboren ein Hemmnis darstellen würde.

2 Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Probenmaterial

Die Entwicklung und das Validieren des Testsystems „Microarray“ soll mit Fleischsaft als Probenmaterial durchgeführt werden.

Innerhalb eines bereits abgeschlossenen Forschungsprojektes an der Außenstelle für Epidemiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Tangemann 2012) sind Fleischsaftproben von ausgewählten Betrieben der Kreise Paderborn und Coesfeld entnommen und mittels single-ELISA-Tests untersucht worden. Diese Proben wurden für weitere Studien in der Außenstelle bei -20°C archiviert. Somit konnte auf eine Anzahl von über 3000 Fleischsäften zurückgegriffen werden, die auf Antikörpergehalte der meisten hier zu untersuchenden Erreger mittels single-ELISA-Tests (vor-)getestet wurden.

Des Weiteren wurden vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Referenzfleischsäfte und Seren käuflich erworben bzw. zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um Proben aus Infektionsversuchen mit *Salmonella Typhimurium* und *Trichinella spiralis*.

Aus Ringversuchen der QS Qualität und Sicherheit GmbH lagen außerdem lyophilisierte Fleischsaftproben mit bekannten Antikörperkonzentrationen als Referenzproben in der Außenstelle für Epidemiologie vor. Zusätzlich wurden auch Referenzseren mit bekannten Antikörperkonzentrationen gegen *Toxoplasma gondii*, bereitgestellt vom Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, zur Validierung eingesetzt.

Einhundert weitere Fleischsaft- und Serumpaare von denselben Tieren, je zehn von zehn Betrieben, wurden bei einer Probenentnahme auf dem Schlachthof Brand Qualitätsfleisch GmbH in Lohne entnommen. Diese dienten als Probenmaterial zum Erarbeiten des letzten Projektabschnittes, dem Vergleich zwischen direkten und indirekten Nachweismethoden.

Neben den Zwerchfellpfeilerproben und dem Blut („Stichblut“) wurden, wie im Projektantrag aufgeführt, auch Proben von Lunge, Tonsille, Mandibularlymphknoten, Darmlymphknoten derselben Tiere entnommen. Diese dienten als Untersuchungsmaterial für die direkten Erregernachweisverfahren.

2.1.2 Antigenmaterial

Als Ausgangsmaterial für die Bespottung der Microarrays wurden Antigene der jeweiligen Erreger ausgewählt. Diese sollten eine spezielle Reaktion des Immunsystems hervorrufen, d.h. es sollten spezifisch gegen dieses Antigen gerichtete Antikörper gebildet werden.

Mit Unterstützung der Fa. Qiagen (ehemals LDL), konnten Antigene der Erreger *Salmonella* spp., Influenza A-Virus, *PRRSV*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*, *Yersinia enterocolitica* und *Mykobacterium avium* ssp. bereitgestellt werden. Antigenmaterial vom Hepatitis E-Virus wurde vom Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover bereitgestellt, an dem Projekte zur Entwicklung eines HEV-single-ELISA-Tests durchgeführt wurden (BÄCHLEIN et al. 2011).

Die Antigene von Mykoplasmen wurden von der bakteriologischen Abteilung der Veterinärmedizinischen Universität Wien zur Verfügung gestellt.

Antigene von *Actinobacillus pleuropneumoniae* stammten aus der Außenstelle für Epidemiologie Bakum. Trotz großer und wiederholter Bemühungen konnte kein Testanbieter für Produktionskrankheiten davon überzeugt werden, Antigene zu Studienzwecken zur Verfügung zu stellen. Die dabei genannte Gründe war, dass es sich bei den in den ELISA-Tests angewendeten Antigenstrukturen um Firmengeheimnisse handelt.

2.1.3 ELISA-Test-Material

Für die einzelnen Erreger wurden folgende „ELISA-Test-Kits“ zur Referenzwertermittlung der Antikörperkonzentration eingesetzt (Tab. 1):

Tab. 1: Darstellung der verwendeten ELISA-Tests mit Hersteller- und Zulassungsangaben

Erreger	TestKit	Hersteller	Zulassung für:
<i>Salmonella</i> spp.	SALMOTYPE [®] Pig Screen	Fa. Qiagen (vorher LDL)	Fleischsaft Blutserum
<i>Toxoplasma gondii</i>	PIGTYPE [®] Toxoplasma Ab	Fa. Qiagen (vorher LDL)	Prototyp im Zulassungs- verfahren für Fleischsaft und Blutserum
<i>Trichinella spiralis</i>	PIGTYPE [®] Trichinella Ab	Fa. Qiagen (vorher LDL)	Fleischsaft Blutserum
<i>Yersinia enterocolitica</i>	PIGTYPE [®] Yopscreen	Fa. Qiagen (vorher LDL)	Fleischsaft Blutserum
<i>Mycobacterium</i> ssp.	PIGTYPE [®] Mycobacterium	Fa. Qiagen (vorher LDL)	Prototyp
Hepatitis E-Virus	PrioCHECK [®] HEV Ab porcine	Prionics AG	Fleischsaft Blutserum
Influenza A-Virus	Influenza A Virus Antibody Test Kit	IDEXX Laboratories	Blutserum
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	IDEXX M. hyo. Ab Test	IDEXX Laboratories	Blutserum
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	ID Screen [®] APP Screening Indirect	IDvet Innovative Diagnostics	Blutserum
PRRSV	IDEXX PRRS X3 Ab Test	IDEXX Laboratories	Blutserum

Über das photometrische computergestützte Auslesegerät „Tecan Sunrise“ wurden die „Optische Dichte“-Werte (OD-Werte) ermittelt. Mit Hilfe TestKit-spezifischer Auswertungsvorgaben konnten die jeweiligen OD-Werte in positive/negative Ergebnisse umgerechnet werden.

2.1.4 Der Microarray

Um die multiserologischen Untersuchungen durchführen zu können, wurden von der Firma Alere Technologies Microarray-Tubes (Abb. 3) produziert. Auf dessen Bodenfläche befindet sich ein 3 x 3 mm großer Glas-Chip auf den die verschiedenen Erregerantigene an definierten Positionen aufgebracht wurden.



Abb. 3: ArrayTube (Fa.AlereTechnologies)

Zudem wurden ein Arrayscanner zum Ablesen der Testergebnisse von der Firma Qiagen (vorher LDL) und von der Firma ALERE eine dazugehörige Auslesesoftware bereitgestellt. Zur Findung einer optimalen Antigenkonzentration für jeden Erreger wurden die Antigene in verschiedenen Antigenkonzentrationen von 0,1 mmol/μl und 0,5 mmol/μl aufgespottet. Um die Qualität der aufgespotteten Antigene untereinander zu vergleichen und um die bei der ELISA-Testung übliche Mehrfachbefundung (meistens Doppelbefundungen) anzuwenden, wurde jeder Spot dreifach auf den Array gesetzt. Zusätzlich befinden sich auf dem Microarray eine dreifache Positivkontrolle, bei welcher es sich um eine Biotinmarke handelt sowie eine dreifach gespottete Negativkontrolle, bei der nur eine Pufferlösung ohne Antigenstrukturen aufgebracht wurde. Da die Antigenkonzentrationen der einzige Punkt des Testsystems ist, an dem erregerindividuelle Veränderungen vorgenommen werden konnten, wurde während der gesamten Untersuchungen zur Validierung kritisch auf die Ergebnisse geschaut. So konnten die zu spottenden Antigenkonzentrationen weiter optimiert werden

Dieser Microarray-Prototyp wurde in einer Mindestbestellmenge von 100 Stück geliefert.

2.1.5 Sonstige Materialien

Bei der Entwicklung des Testprotokolls, d.h. eines standardisierten Testablaufs, wurden verschiedene Reagenzien angewendet und hinsichtlich der damit produzierten Ergebnisse ausgewertet.

In Anlehnung an das „Protein Binding Kit“ (ALERE technologies GmbH item number 245500100) und an die Erfahrungen der Fa. Qiagen (vorher LDL) wurden folgende Reagenzien getestet:

- **Pufferlösungen (Wasch-und Verdünnungspuffer):**

 - Salmotype PigScreen LDL

 - PigType blau LDL

 - P1 Waschpuffer Alere

 - Destilliertes Wasser

- **Fetales Kälberserum (FCS)**

 - als Zusatz zu den Waschpuffern in verschiedenen Konzentrationen

- **Konjugate:**

 - Multi-species-HRP

 - Anti-PigIgG-HRP

 - Protein-A HRP

 - Anti-PigIgG-Biotin (Bethyl)

 - Streptavidin-HRP (C3)

2.2. Methode

2.2.1 Entwicklung eines Testprotokolls

Zur Validierung des Testsystems Microarray musste ein standardisierbarer Testablauf entwickelt werden. In Anlehnung an die Funktionsweise eines ELISAs und des von der Produktionsfirma der Microarrays mitgelieferten Ablaufschemas „Protein Binding Kit“ (ALERE technologies GmbH item number 245500100), war es das Ziel, ein möglichst optimales Testprotokoll zu erstellen.

Dabei wurde so vorgegangen, dass nacheinander alle Parameter des Protokolls durchgetestet, ausgewertet und validiert wurden. Letztendlich entstand so ein Protokoll, welches konstant gut auswertbare Ergebnisse lieferte und eine Vergleichsuntersuchung mit dem ELISA erlaubte.

Angelehnt an die Erfahrungen aus verwandten serologischen Nachweismethoden zur Testung von Serum und in Rücksprache mit der Laborabteilung der Fa. Qiagen (vorher LDL) entstand folgender erster Ablaufplan (Tab. 2):

Tab. 2: Erster Ablaufplan zur Durchführung von Microarray-Untersuchungen

Schritt	Lösung	Verdünnung	Volumen	Temp.	Schütteln	Zeit
Waschen	PBST		500µl	37°	550rpm	2x5min
Blocken	Fetales Kälber Serum (FCS)	10%	100µl	37°	550rpm	15min
Waschen	PBST		500µl	37°	550rpm	2x5min
Probe	Serum	1:20	100µl	37°	400rpm	1h
Waschen	PBST		500µl	37°	550rpm	2x5min
Konjugat	Multispez./ Strep	1:500 1:5000	100µl	37°	400rpm	15min
Waschen	PBST		500µl	37°	550rpm	2x5min
Substrat	SeramunGrün		100µl	23°		10min

Aus Untersuchungen über die Antikörperkonzentrationen in Fleischsäften im Vergleich zu denen im Blut (NIELSEN et al. 1998; MOLINA et al. 2008; MEEMKEN et al. 2011) lässt sich auf ein Verhältnis Fleischsaft-Ak/Serum-Ak von 1:10 schließen. In Arbeitsanweisungen von zugelassenen, kommerziell erhältlichen ELISA-Test-Kits, die für Fleischsaft und Serum zugelassen sind, wird dieses Verhältnis ebenfalls angegeben.

Statt PBST (Phosphate Buffered Saline Tween-20) wurden die oben erwähnten unterschiedlichen Pufferlösungen nacheinander getestet.

Auch die Verdünnung der Proben wurde mit verschiedenen Pufferlösungen getestet sowie die Verdünnungsstufe selbst in Reihenuntersuchungen evaluiert.

Der Fleischsaft wurde zuerst in verschiedenen Verdünnungen, genauer 1:10, 1:5 und 1:2, getestet.

Da bei einer Verdünnung von 1:2 die Probe sehr inhomogen war und invalide Testergebnisse lieferte, welche durch „Verunreinigungen“ auf dem Arraybild zustande kamen und die das Ablesen des Schwärzungsgrades der Spots unmöglich machten, wurde der Fleischsaft vor dem Verdünnen zentrifugiert. Durch diesen Arbeitsschritt sollte der Fleischsaft von weiteren möglicherweise inhibitorisch wirkenden Bestandteilen befreit werden. Eine Testdurchführung mit einer Verdünnung des Fleischsaftes von 1:2 erwies sich durch den Zwischenschritt der Zentrifugation als geeignet.

Das Austesten der Inkubationszeiten, die die einzelnen Reagenzien auf die Arraysots bzw. die zu dem jeweiligen Zeitpunkt dort gebundenen Substanzen einwirken, war ebenfalls wichtig, um vor allem den Ablauf zu optimieren.

Ebenfalls mussten die Zeiten und die Anzahl der einzelnen Waschschrte zwischen den Inkubationen eingestellt werden.

Zur Vorbereitung der Microarrayoberfläche wurde fetales Kälberserum in einer Verdünnung von 10% genutzt. Dieses sorgt für eine Stabilisierung der Bindungsreaktion zwischen Antikörper und Antigen, indem es z.B. enzymatische Reaktionen abpuffert, selbst aber nicht mit den Antigenen interagiert.

Die Auswahl eines geeigneten Konjugats war von besonderer Bedeutung. Nur so konnten an richtigen Positionen gebundene Antikörper auch sichtbar gemacht werden. Die Konjugate müssen auf der einen Seite an den Schweine-Ak binden, auf der anderen aber auch eine enzymatische Reaktion des Substrates bewirken.

„Multi-spezies-Konjugat“, „anti-PigIgG-Konjugat“ und „Protein-A-Konjugat“ wurden als Konjugat gekoppelt mit „horseradish peroxidase“ verwendet, getestet und verglichen.

Das Protein „Streptavidin“ bindet sehr affin an Biotin und wird daher häufig als Brückenmolekül genutzt. Es sorgt für eine Bindung an den aufgespotteten Biotinmarken, welche als Positivkontrolle verwendet werden.

Die Markierung der „Erregersots“ läuft über das an die Antikörper bindende Konjugat ab. Damit die Positivkontrolle auch als solche verwendet werden konnte, war es das Ziel, die beiden Konjugate zu verknüpfen.

Statt einem „anti-PigIgG-HRP-Konjugat“ wurde ein „anti-PigIgG-Biotin-Konjugat“ (Fa. Bethyl) verwendet. So waren alle Spots, an denen Antikörper gebunden hatten, „biotinmarkiert“ und somit auf einer Ebene mit der Positivkontrolle. Durch Zugabe eines Streptavidin-HRP-Konjugats (C3 im „Protein Binding Kit“ von der Fa. ALERE) ließen sich nun Positivkontrollen und Spots einheitlich über die Substratreaktion anfärben.

Als letzter Schritt des Versuchsablaufs musste noch die Inkubationszeit des Substrats SeramunGrün, welches wichtig für die durch eine enzymatische Reaktion mit HRP herbeigeführte Farbreaktion ist, beurteilt werden.

Es stellte sich heraus, dass nach einer Zeit von 10 Minuten eine ausreichende Reaktion und damit Färbung stattgefunden hat. Somit war der Microarray zur Auswertung in dem zur Verfügung gestellten Microarray-Scanner „AR01“ bereit.

Mit Hilfe der Computersoftware „Partisan Iconoclust“ ließ sich über ein Raster die jeweilige Spotschwärzung in einen Zahlenwert umwandeln. Dabei wurde auch die Hintergrundanfärbung mit beachtet, so dass die Fehlerquelle der unspezifischen Schwärzung minimiert wurde. So ergaben sich auswertbare Werte zwischen 0 (d.h. keine Anfärbung, weil keine Antikörper in der Probe vorhanden waren) bis einem Wert von ca. 0,8 (d.h. totale Sättigung des Spots mit Antikörpern).

Auf eine mögliche Quantifizierbarkeit über die Schwärzungsgrade wird im Ergebnisteil eingegangen.

2.2 Vergleichsuntersuchung Microarray-ELISA

Zur Erprobung des entwickelten Microarray-Prototyps mit einem festgelegten Versuchsablauf wurden Fleischsaftproben aus dem abgeschlossenen Projekt „Multiserologie-NRW“ per Microarray untersucht. Ergänzend kamen Proben aus Infektionsversuchen des BfR, des Instituts für Virologie und Parasitologie sowie drei Wildschein-Fleischsaftproben zum Einsatz.

Ziel des Arbeitsschrittes war die Überprüfung, ob der entwickelte Prototyp zuverlässige Testergebnisse produziert, also Spotanfärbungen an den richtigen Positionen des Rasters entstehen.

Durch eine gezielte Auswahl an Beständen konnte das gesamte Spektrum an Antikörpertitern für jeden Erreger getestet werden.

Zur Sicherheit wurden die ausgewählten Fleischsaftproben mit den oben erwähnten zugelassenen ELISA-Test-Kits kontrolluntersucht. Die ermittelten Werte wurden als Referenzwerte angesehen, die mit den mittels Microarray gewonnenen Daten verglichen werden konnten.

Neben der Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Microarrays konnten nun auch Grenzwertermittlungen und die Aussagefähigkeit der Spotsignale über quantitative Zusammenhänge untersucht werden.

Folgende Referenzfleischsäfte konnten vom BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) zum Testen der Arrays bereitgestellt bzw. käuflich erworben werden:

Trichinella spiralis

Salmonella Typhimurium

Bei diesen Fleischsäften liegt ein gesicherter Gehalt an Antikörpern vor. Auf das Vorkommen weiterer Antikörper gegen andere Erreger wurde dieser jedoch seitens des BfR nicht getestet. Mittels der Microarray-Untersuchung ließen sich interessanterweise mögliche weitere Infektionen anhand der anderen auf dem Chip vorhandenen Erregern diagnostizieren. So konnten zum Beispiel in für *Trichinella* seropositivem Fleischsaft auch Antikörper gegen *Salmonellen* und gegen *Mycobacterium avium* nachgewiesen werden (siehe Anhang Bild 4).

Außerdem wurde Fleischsaft, beimpft mit positiven Referenzblutseren zur Validierung herangezogen. Die Testungen ergaben gute bis sehr gute Übereinstimmungen mit den „Soll-Ergebnissen“.

Durch eine Bespottung der Microarrays mit Antigenen in verschiedenen Konzentrationen, ließ sich aus den Testergebnissen die jeweils geeignetste Bespottungskonzentration feststellen.

Zur Auswertung wurde das Programm Microsoft Office Excel verwendet. Bei der Erhebung von statischen Parametern war das AddIn-Programm „XLSTAT“ sehr hilfreich.

2.3 Vergleichsuntersuchung direkter –indirekter Nachweis

Im November 2012 konnten bei Schlachtungen von jeweils zehn Mastschweinen aus zehn Beständen Proben zur vergleichenden Untersuchung von direktem und indirektem Erregernachweis gewonnen werden.

Für die indirekten Erregernachweise:

Blut zur Serumgewinnung

Zwerchfellpfeiler zur Fleischsaftgewinnung

Für die direkten Erregernachweise (kulturelle und molekularbiologische Untersuchungen):

Lungengewebe

Mandibularlymphknoten

Ileocaecallymphknoten

Tonsillengewebe

Mit diesen Proben wurden wie in Tabelle 3 erkennbar Untersuchungen auf folgende Erreger durchgeführt:

Tab. 3: Darstellung der untersuchten Erreger, Art des direkten Nachweisverfahrens und Name der durchführenden Untersuchungsstelle

Erreger	Methode zum direkten Nachweis	Untersuchungseinrichtung
<i>Salmonellen spp.</i>	Kultur, biochemische Diff.	Außenstelle Bakum, TiHo Hannover
<i>Yersinia ssp.</i>	Kultur, Kälteanreicherung	Institut für Mikrobiologie, TiHo Hannover
<i>Mykobacterium avium ssp.</i>	Kultur, Serotypisierung	Forschungszentrum Borstel
<i>PRRSV</i>	PCR	Außenstelle Bakum, TiHo Hannover
Influenza A-Virus	PCR	IVD GmbH Hannover
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	PCR	Außenstelle Bakum, TiHo Hannover
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	PCR	Außenstelle Bakum, TiHo Hannover

Die indirekten Untersuchungsergebnisse wurden mit dem entwickelten und validierten „schweinespezifischen Microarray“ erarbeitet.

Um die Grenzwerte der einzelnen Spots für den Microarray anhand einer größeren Stichprobe abzusichern und ggf. zu optimieren, wurden die Serum- und/oder Fleischsaftproben ebenfalls mittels single-ELISA-Testungen untersucht.

3 Ergebnisse

Die Entwicklung eines „schweinespezifischen“ Microarrays enthält entsprechend der Projektabschnitte zu unterteilende verschiedene Ergebnisse. Diese sollen hier kurz zusammengefasst dargestellt werden.

Die unter 2.2.1 dargestellte Entwicklung eines Testablaufs zur Untersuchung von Fleischsaftproben, kann als erfolgreich angesehen werden.

In aufeinanderfolgenden Testreihen konnten die erwähnten Reagenzien ausgetestet und der Versuchsablauf immer weiter optimiert werden.

Das Ziel, auswertbare Ergebnisse zu erzeugen, die auch reproduzierbar sind, wurde erreicht. Nur unter dieser Voraussetzung war es möglich die darauf aufbauenden Projektabschnitte durchzuführen.

Der letztendliche Probenumfang für den Vergleich zwischen den einzelnen single-ELISA-Tests und dem Microarray (2. Projektabschnitt) betrug über 250 Einzelproben. Diese wurden für jeden Erreger separat ausgewertet. Mittels deskriptiver Statistiken, „ROC (Receiver Operating Characteristic)“-Kurve zur Grenzwertbestimmung und weitergehenden statistischen Analysen wurden die Ergebnisse verglichen und ausgewertet.

Die AUC (Area under curve) der ROC-Kurve kann dabei als Maß für die Qualität des entwickelten Testes angesehen werden. Zur Interpretation der Ergebnisse ist zu wissen, dass die AUC einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen kann, wobei aber 0,5 der „schlechteste“ Wert ist. Eine ROC-Kurve nahe der Diagonalen ist das zu erwartende Ergebnis eines Zufallsprozesses, was dann der AUC von 0,5 entspricht. Ein hoher ROC-AUC-Wert bedeutet ein gutes Ergebnis.

Die Vergleichsuntersuchungen von direkten und indirekten Erregernachweisen konnte innerhalb des Projektzeitraumes bearbeitet und abgeschlossen werden. Je nach Erreger sind keine bis sehr gute Übereinstimmungen zwischen den beiden Vergleichsparametern ermittelt worden. Zur besseren Übersicht werden die Ergebnisse nach Erreger unterteilt einzeln aufgeführt und diskutiert.

Der Projektabschnitt „Vergleich von multiserologischen, indirekten Ergebnissen via Microarray mit direkten Nachweismethoden“ ist für die Erreger, welche signifikant gute Ergebnisse in der Validierung geliefert haben, sinnvoll. Um die im Microarray nicht auswertbaren indirekten Nachweise trotzdem im Ergebnisteil diskutieren zu können, wird auch auf die Ergebnisse der konventionellen Testung mittels single-ELISA zurückgegriffen. Nur so kann diese Teilaufgabe vollständig und sinnvoll bearbeitet werden.

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 Wichtige Ergebnisse der Testentwicklung

Wie bereits im Methodenteil beschrieben, wurde der Testablauf mit Fleischsaftproben bekannter Antikörperkonzentration eingestellt. Arbeitsschritt für Arbeitsschritt wurde in diversen Testreihen verändert und optimiert. Wie in Tabelle 4 dargestellt, ergab sich folgendes Ablaufschema für die Arrayversuche:

Tabelle 4: Validierter Testablauf „schweinespezifischer Microarray“

Schritt	Lösung	Verdünnung	Volumen	Temp.	Schütteln	Zeit
Waschen	P1		350µl	37°	350rpm	3x2min
Blocken	FCS	10%	100µl	37°	350rpm	15min
Probe	Fleischsaft	3min/4000rpm zentrifugiert 1:2 mit PigType blau	100µl	37°	350rpm	30min
Waschen	PigType blau		350µl	37°	350rpm	3x2min
Konjugat1	Anti-PigIgG-Biotin	1:20000	100µl	37°	350rpm	15min
Waschen	P1		500µl	37°		1x0min
Konjugat2	C3 (Streptavidin- HRP)	1:100	100µl	37°	350rpm	15min
Waschen	P1		350µl			1x2min 1x0min
Substrat	SeramunGrün		100µl	23°		10min

Der gesamte Ablauf einer multiserologischen Untersuchung via Microarray beläuft sich damit auf eine Dauer von ca. 1 Stunde und 45 Minuten. Darin enthalten sind die Vorbereitung des Microarrays für die Probe und die Zeit für Bearbeitungsschritte.

Vergleicht man die Durchführungsdauer des Microarrays mit denen von ELISAs, stellt sich das Testsystem Microarray als vergleichbar schnell dar.

In Abbildung 4 ist noch einmal schematisch dargestellt, welche Arbeitsschritte aufeinanderfolgen.

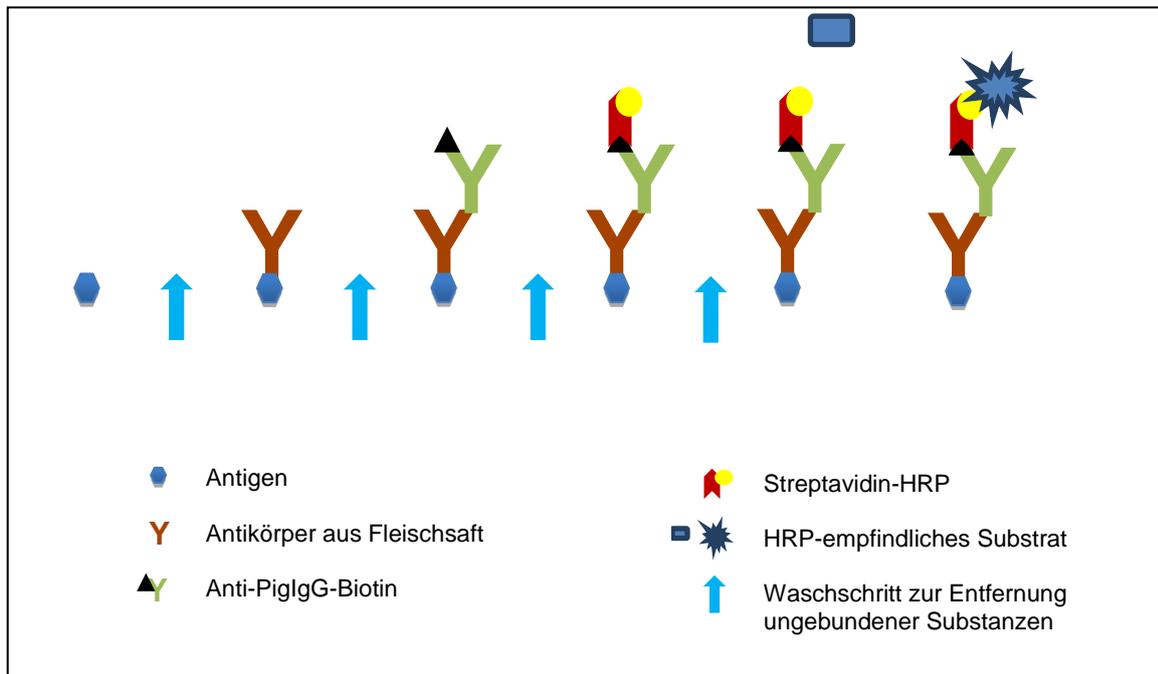


Abb.4: Schematischer Ablauf der Mircoarrayuntersuchung

3.1.2 Wichtige Ergebnisse der ELISA-Microarray-Vergleichsuntersuchung.

Es wurden Fleischsaft- und Serumproben parallel mit Hilfe der single-ELISA-Technik und des „schweinespezifischen“ Microarray untersucht. Das gesteckte Projektziel, die Validierung des Microarrays abzuschließen und eine Nachtestung von Fleischsaftproben aus dem „NRW-Multiserologieprojekt“, lieferte folgende Ergebnisse.

3.1.2.1 Wichtige Ergebnisse für die „lebensmittelsicherheitsrelevanten“ Antigene

3.1.2.1.1 *Salmonella* spp.

Der für die Untersuchung genutzte single-ELISA-Test der Fa. Qiagen (vorher LDL) SALMOTYPE®Pig Screen erfasst eine Untersuchung auf Antikörper gegen die O-Antigene 1,4,5,6,7, und 12. Damit wird serotypübergreifend auf ein Vorkommen von Antikörpern gegen Salmonellen untersucht.

Da der Microarray die Möglichkeit bietet, mehrere serologische Untersuchungen parallel durchzuführen, wurden gleichzeitig Ergebnisse für die Salmonellenstämme *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Cholerasuis*, *Salmonella Enteritidis* und *Salmonella Anatum* produziert. Um diese Ergebnisse mit denen des single-ELISAs zu vergleichen, wurde ein Mix aus diesen Stämmen gespottet. Zur Sicherheit auch hier in zwei Konzentrationen (0,1mg/ml und 0,25mg/ml). Mit Hilfe dieser Werte soll beispielhaft für alle Erreger im Folgenden die Auswertung anschaulich gemacht werden.

Die Ergebniswerte, in Zahlenform mittels „Partisan Iconoclust“ umgewandelt, wurden in einer Excel-Datenbank, welche ausschnittsweise in Tabelle 5 dargestellt ist, den ELISA-Werten zugeordnet. Auf diese Weise konnte der Prozess der Auswertung erheblich vereinfacht werden.

Tab. 5: Ausschnitt aus der angewendeten Excel-Datenbank

Probe	SALMOTYPE® Pig Screen	Bewertung ELISA	Microarray Salm_Mix_01	Microarray Salm_Mix_025
1	0,11	Negativ	0,0994995	0,049514
2	0	Negativ	0,022930667	0,017163333
3	0	Negativ	0,018030333	0,040571667
4	0	Negativ	0,047132333	0,076519333
5	0	Negativ	0,031018333	0,016815333
6	28,16	Negativ	0,091885667	0,214168667
7	8,69	Negativ	0,046388	0,226061667
8	0	Negativ	0,015695333	0,048815667
9	0,53	Negativ	0,0312425	0,054633667
10	0	Negativ	0,063915333	0,142241333
11	106,88	Positiv	0,490765333	0,75778
12	74,123	Positiv	0,776565	0,809148667
13	13,313	Negativ	0,467967	0,744356667
14	8,11	Negativ	0,065801667	0,349480333
15	100,3	Positiv	0,807145333	0,818290333
16	51,675	Positiv	0,362810667	0,582969667
17	42,207	Positiv	0,275787333	0,599957
18	4,91	Negativ	0,116439	0,240449333
19	32,03	Negativ	0,160342333	0,539871333
20	25,27	Negativ	0,092229	0,325709
...

Laut den Herstellerangaben des SALMOTYPE® Pig Screen-Tests gelten Proben mit einem OD% von ≥ 40 als positiv, wenn sie nach dem Vorbild der ersten Stufe des Dänischen und Deutschen Monitoringprogrammes für Salmonellen bewertet werden. Mit Hilfe der im Methodenteil beschriebenen ROC-Kurvenanalyse wurden die Microarraydaten beurteilt.

Die AUC (Area under curve) gibt das Maß der „Testqualität“ wieder. Innerhalb der ROC-Analyse wird jeder gemessene Wert als „theoretischer Grenzwert“ angesehen und dazu Sensitivität und Spezifität ermittelt.

Über diese Methode lässt sich auch ein Grenzwert für den Microarrayspot mit dieser Antigenkonzentration ermitteln. Der spezifische Grenzwert ist an dem Punkt mit dem größten Abstand zur Diagonalen zu setzen (siehe Abb. 5).

Bei dem Spot SalmMix025 liegt der errechnete Grenzwert bei einem Schwärzungsgrad von 0,54.

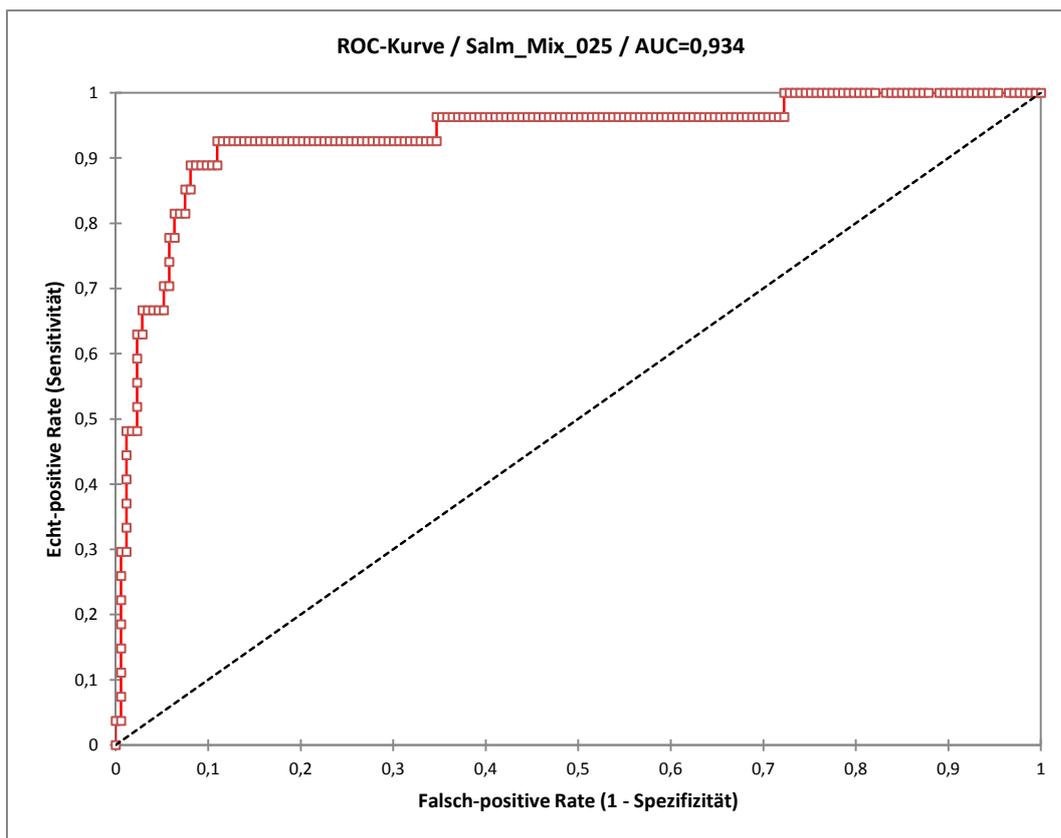


Abb. 5: ROC-Kurve SamonellaMix0,25mg/ml

Führt man die ROC-Analyse für den Spot SalmMix01 durch, so erhält man folgendes Ergebnis (Abb. 6):

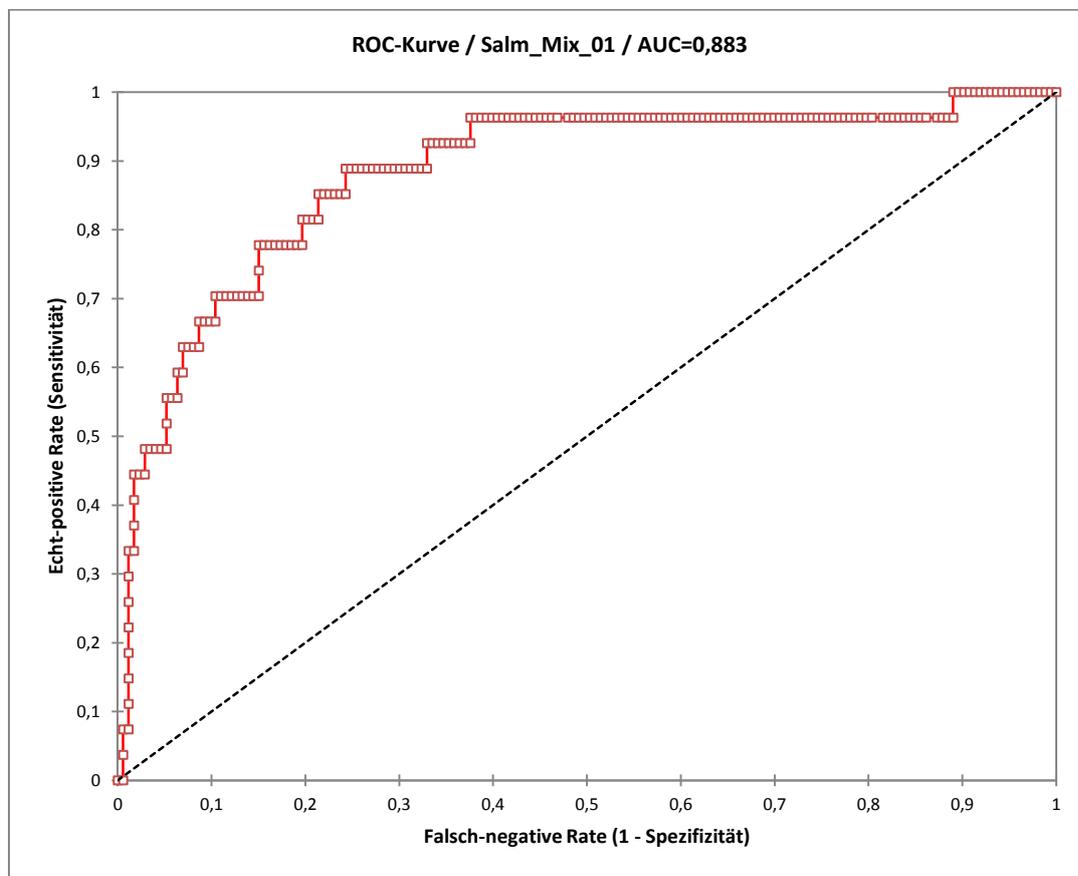


Abb. 6: ROC-Kurve SamonellaMix0,1mg/ml

Hier liegt der errechnete Grenzwert bei einem Schwärzungsgrad von 0,09, also erwartungsgemäß niedriger. Bei der „Testqualität“ gibt es aber nur geringe Unterschiede (am besten ersichtlich am Verlauf der ROC-Kurve). Die AUC hat hier Werte von 0,934 bzw. 0,883.

Die Antigenkonzentration sollte aber optimaler Weise so eingestellt werden, dass der letztendlich entstehende Grenzwert für eine Positiv/Negativ-Entscheidung im dynamischen Bereich des Tests liegt. Der Spot SalmMix0,25 ist demnach vorzuziehen.

3.1.2.1.2 *Toxoplasma gondii*

Auf Antikörper gegen den Erreger der Toxoplasmose ist mit dem single-ELISA PIGTYPE Toxoplasma Ab untersucht worden. Hier wurden insgesamt nur sehr wenige positive Fleischsaftproben gefunden. Alle hier verwendeten positiven Ergebnisse wurden aus dem großen Probenpool des „NRW-Multiserologie“-Projektes selektiert.

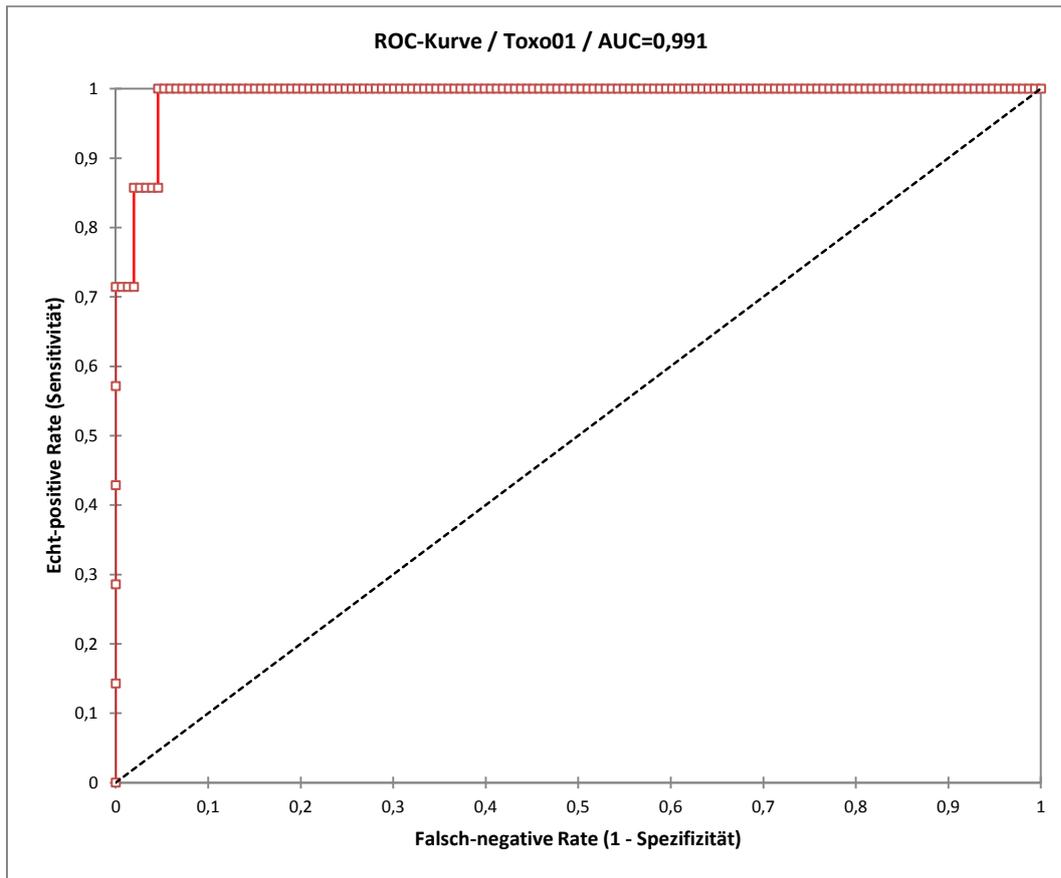


Abb. 7: ROC-Kurve Toxoplasma 0,1mg/ml

In dem Vergleich ELISA-Microarray konnten hier sehr zufriedenstellende Ergebnisse festgestellt werden.

Bei einem Grenzwert von 0,65 hat der Test eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 95,4%.

3.1.2.1.3 *Trichinella spiralis*

Sämtliche Fleischsaftproben vom Schlachthof waren negativ auf Antikörper gegen *Trichinella spiralis*. Aus diesem Grund ist eine statistische Aufarbeitung dieser Daten wenig sinnvoll. Die produzierten Ergebnisse sollen im Folgenden kurz zusammenfassend dargestellt werden.

Zur Untersuchung der Fleischsaftproben auf Trichinellenantikörper wurden für die Bespottung auf den Microarray zwei Antigene von *Trichinella spiralis* verwendet. Der einzige Unterschied zwischen ihnen war der Zeitpunkt der Antigengewinnung. Das mit „Trichinella-Spot 1“ bezeichnete Antigen war zum Untersuchungszeitpunkt bereits ca. 20 Monate alt; das mit „Trichinella-Spot 2“ bezeichnete war vor ca. vier Monaten gewonnen worden.

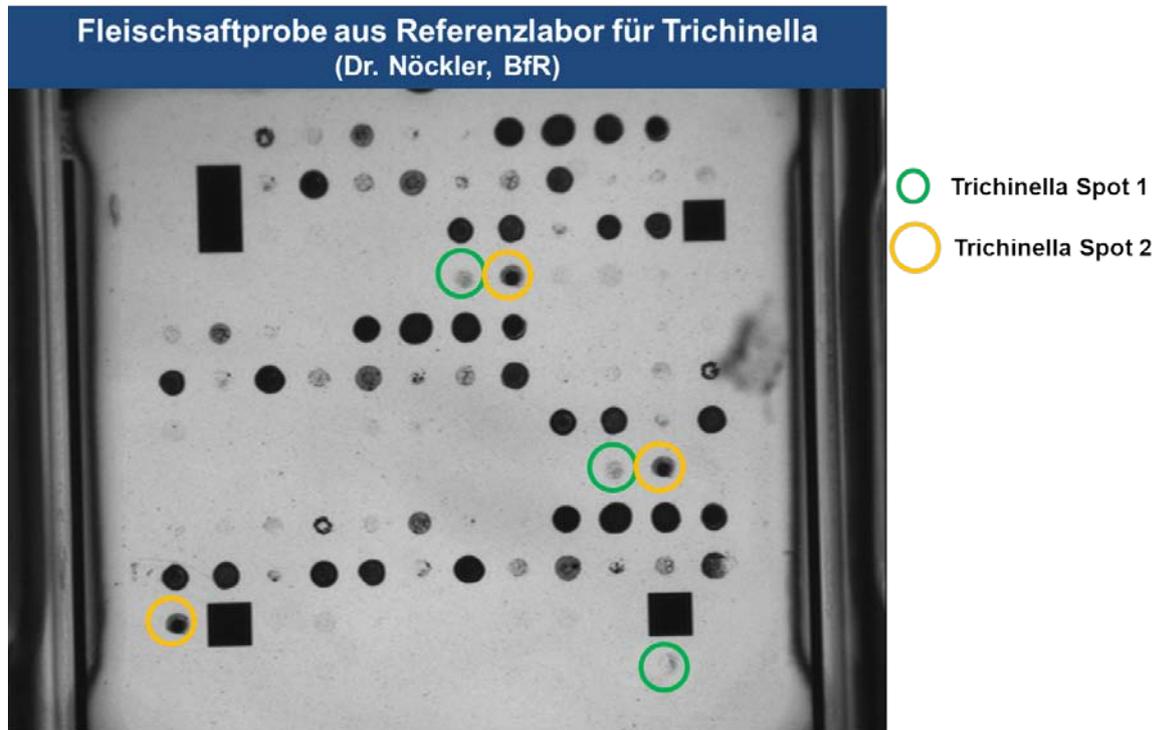
Die Proben waren sowohl im single-ELISA (PIGTYPE® Trichinella Ab) als auch in den Microarray-Untersuchungen negativ.

Aus einem Infektionsversuch des BfR konnten fünf Fleischsaftproben erworben werden. Zusätzlich wurden vom BfR drei Trichinella-positiv getestete Wildschweinfleischsaftproben bereitgestellt. Diese insgesamt acht Proben führten in den Microarray-Untersuchungen alle zu Spotschwärzungen an Trichinella-Spot 1 und Trichinella Spot 2 (Tab. 6).

Tab. 6: Darstellung der Ergebnisse der seropositiven Fleischsaftproben für Trichinella

Probennummer	Fleischsaftprobe	Antikörper-Titer	Microarray Trichinella Spot 1	Microarray Trichinella Spot 2
1	Schwein (BfR Infektionsversuch)	1:64	0,34083833	0,79514833
2	Schwein (BfR Infektionsversuch)	>1:128	0,25589333	0,80648133
3	Schwein (BfR Infektionsversuch)	1:32	0,41689	0,79990367
4	Schwein (BfR Infektionsversuch)	>1:128	0,15630233	0,80169733
5	Schwein (BfR Infektionsversuch)	1:64	0,72938967	0,83620667
6	Feldprobe Wildschwein	1:8	0,52699	0,7973
7	Feldprobe Wildschwein	1:16	0,601578	0,81505467
8	Feldprobe Wildschwein	1:16	0,71218233	0,81896567

Auffallend war, dass in allen Ergebnissen die Trichinella Spots 2 einen höheren Schwärzungsgrad haben als die Trichinella Spots 1. Das Alter der gespotteten Antigene scheint also einen Einfluss auf die Bindungsaffinität der Antikörper zu haben.



1

Abb. 8: Microarraybild einer untersuchten Fleischsaftprobe aus einem Infektionsversuch mit *Trichinella spiralis* (BfR)

Untersucht man dennoch die Ergebnisse mittels einer ROC-Analyse ergibt sich ein den ermittelten Werten entsprechend gutes Bild (Abb. 9).

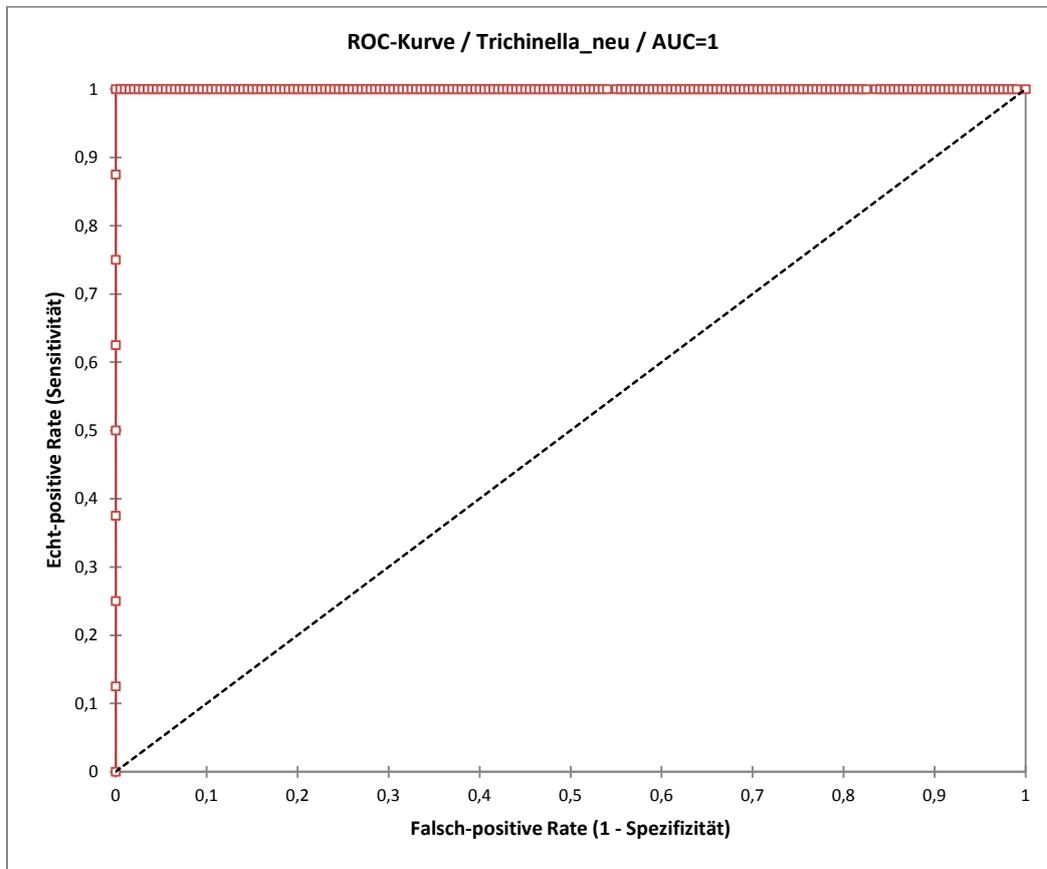


Abb. 9: ROC-Kurve Trichinella Spot 2

Mit einer AUC von 1, sowie einer Sensitivität von 100% und Spezifität von 100% würde der Grenzwert mit 0,15 dem höchsten Arraywert einer negativen Fleischsaftprobe entsprechen.

3.1.2.1.4 *Yersinia enterocolitica*

Auch bei *Yersinia enterocolitica* ergaben sich gute Ergebnisse (Abb. 10). Im single-ELISA-Test „PIGTYPE^{®Y} opscreen“ (Fa. Qiagen) wurden Ergebnisse von negativ bis stark positiv gemessen. Die AUC betrug 0,94 für den Spot mit einer Antigenkonzentration von 0,3 mg/ml.

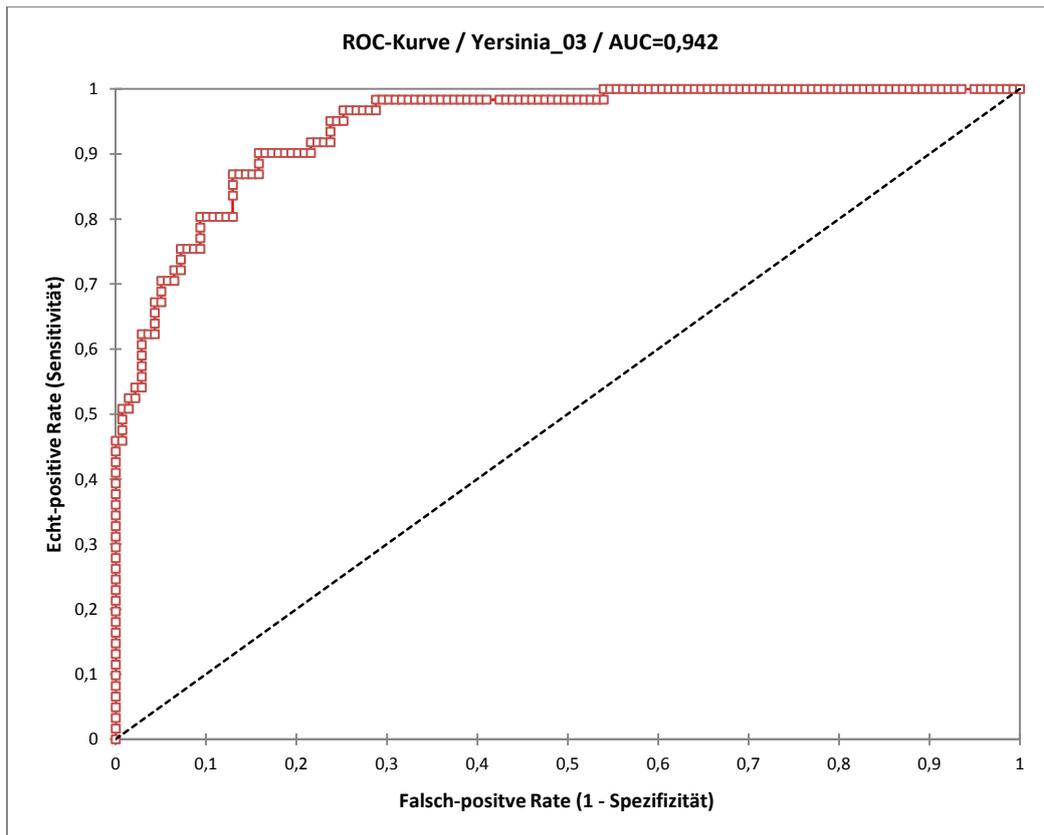


Abb. 10: ROC-Kurve Yersinia 0,3 mg/ml

Die Grenzwertoptimierung führte zu einem Grenzwert von 0,34. Die Sensitivität beträgt 90% und die Spezifität 84,2%.

3.1.2.1.5 *Mycobacterium avium* ssp.

Die Untersuchungen auf Antikörper gegen *Mycobacterium avium* ssp. wurden mit einem noch in der Entwicklung befindlichen ELISA-Prototypen durchgeführt. Die produzierten Ergebnisse sind nur unter Vorbehalt miteinander zu vergleichen, da der Referenztest noch nicht ausgereift ist. Trotzdem lassen sich in der Vergleichsuntersuchung Zusammenhänge erkennen. Es entstand diese ROC-Kurve (Abb. 11):

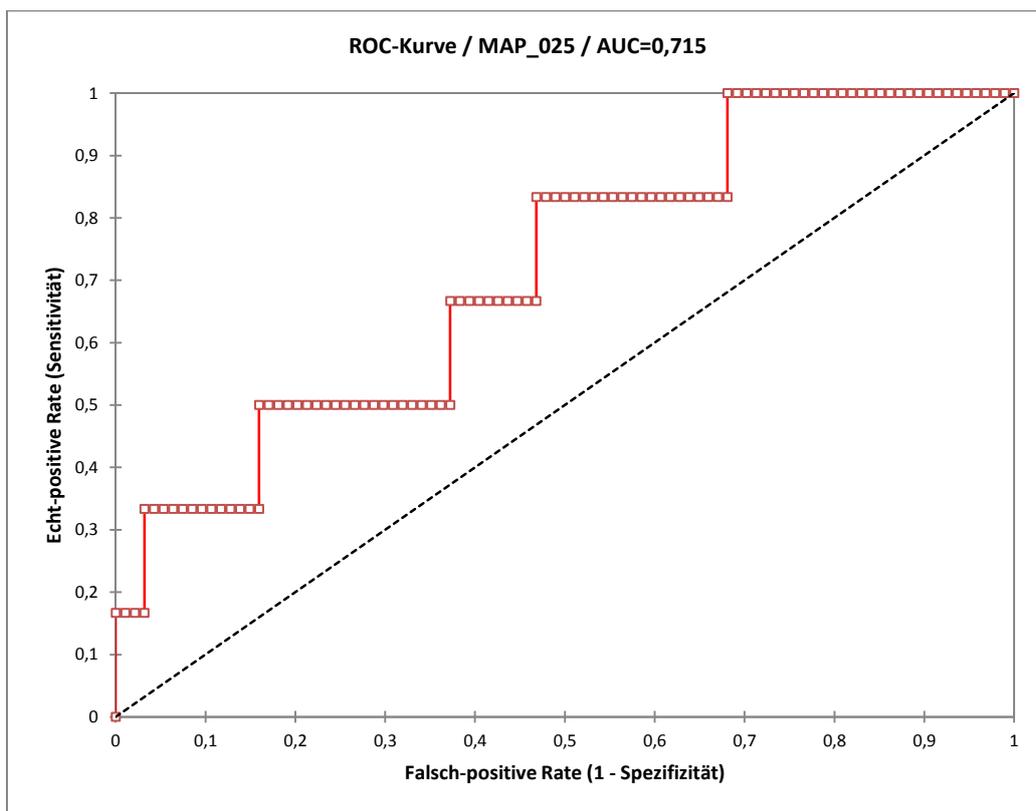


Abb. 11: ROC-Kurve *Mycobacterium avium* ssp. 0,25 mg/ml

Die AUC beträgt 0,715 und lässt eine positive Korrelation zwischen den beiden Testverfahren erkennen.

Es ergibt sich ein Grenzwert von 0,06. Daraus lässt sich schließen, dass die Antigenkonzentration hier erhöht werden muss.

Eine Bspottung mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml ergab einen Grenzwert von 0,09 und ist ebenfalls noch zu verbessern.

Die Sensitivität betrug 83,3% und die Spezifität 55% für diesen Grenzwert.

3.1.2.1.6 Hepatitis E-Virus

Das aus dem Institut für Virologie zur Verfügung gestellte Antigen von Hepatitis E-Virus lag in einer Höchstkonzentration von 0,16 mg/ml vor. Diese wurde für die Vergleichsuntersuchung verwendet. In der Analyse ergab sich folgende ROC-Kurve (Abb.12):

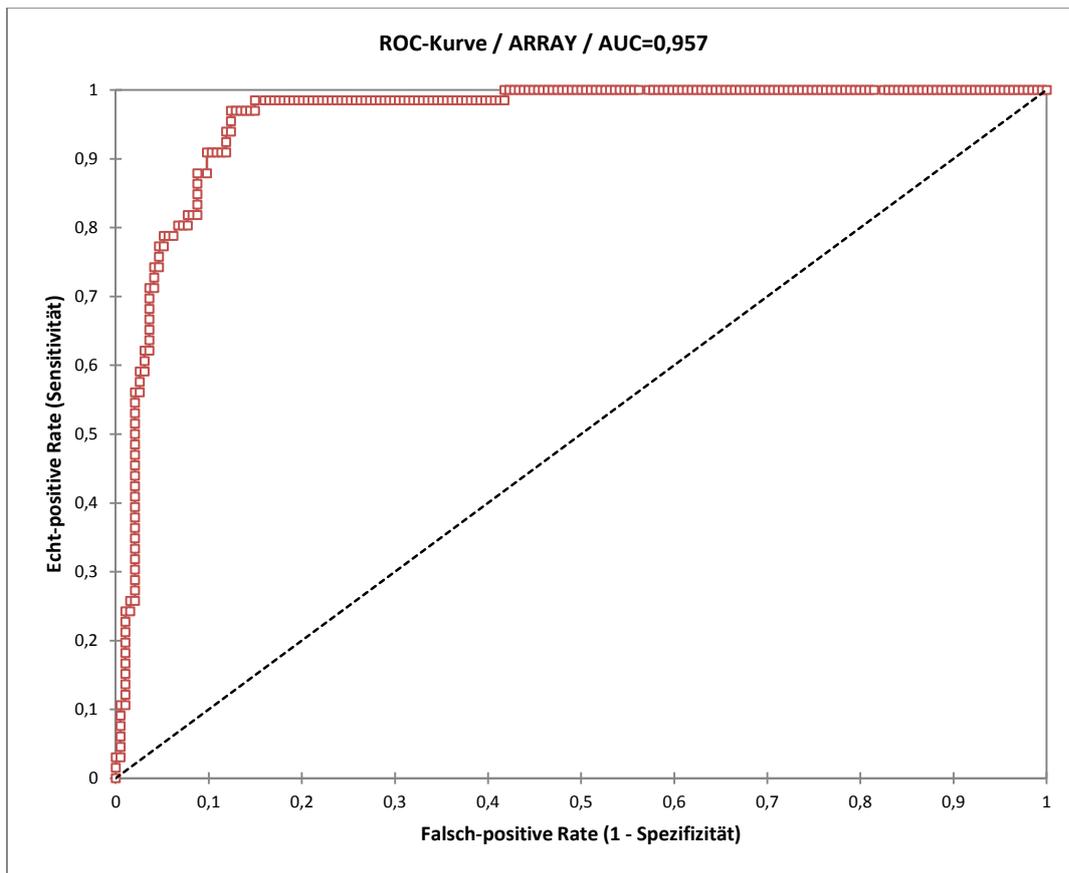


Abb. 12: ROC-Kurve Hepatitis E-Virus 0,16 mg/ml

Die AUC von 0,957 spricht für eine sehr gute Testqualität. Die Sensitivität von 97% und einer Spezifität von 88% hat der Test bei einem ermittelten Grenzwert von 0,59.

3.1.2.2. Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse für die „lebensmittelsicherheitsrelevanten“ Antigene

Insgesamt wurden in diesem Projektabschnitt die Vergleichbarkeit der Antikörperdetektion des entwickelten Microarrays mit dem Referenztestsystem single-ELISA untersucht. Es wurden sechs lebensmittelsicherheitsrelevante Zoonoseerreger untersucht. Dabei wurden bei fünf von sechs Erregern Testsicherheiten von über 90% ermittelt.

3.1.2.3 Wichtige Ergebnisse für die „tiergesundheitsrelevanten“ Antigene

3.1.2.3.1 Influenza A Virus

Für den Vergleich zwischen Influenza A-Virus Antikörpernachweisen in Fleischsaftproben ermittelt mit dem Influenza A-Virus Antibody Test Kit (Fa. IDEXX laboratories) wurden auf den Microarray Influenza A-Antigen in den Konzentrationen 0,2 mg/ml und 0,4 mg/ml aufgebracht.

Die Grenzwertoptimierung über ROC-Kurvenanalyse ergab eine Testsicherheit von 0,731 bzw. 0,663.

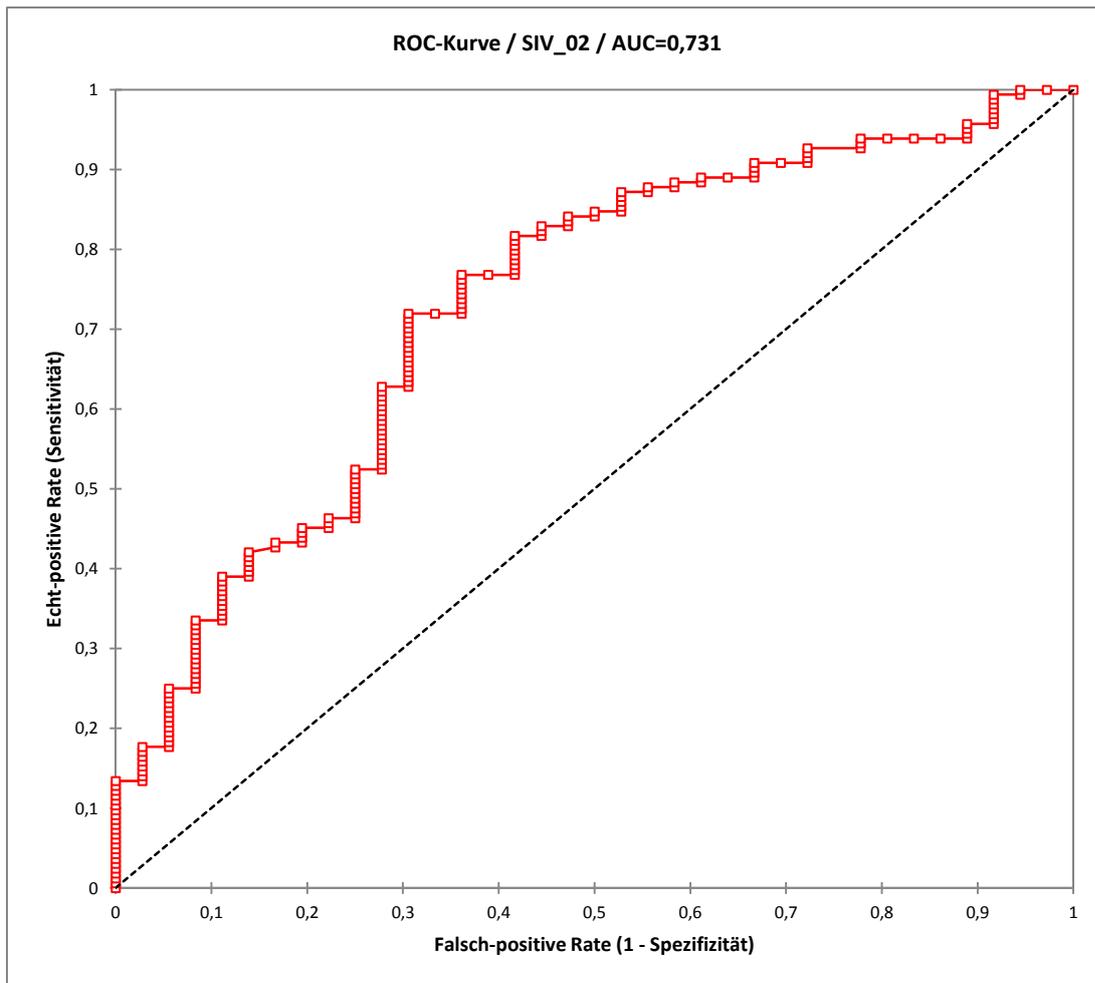


Abb. 13: ROC-Kurve Influenza-A 0,2 mg/ml

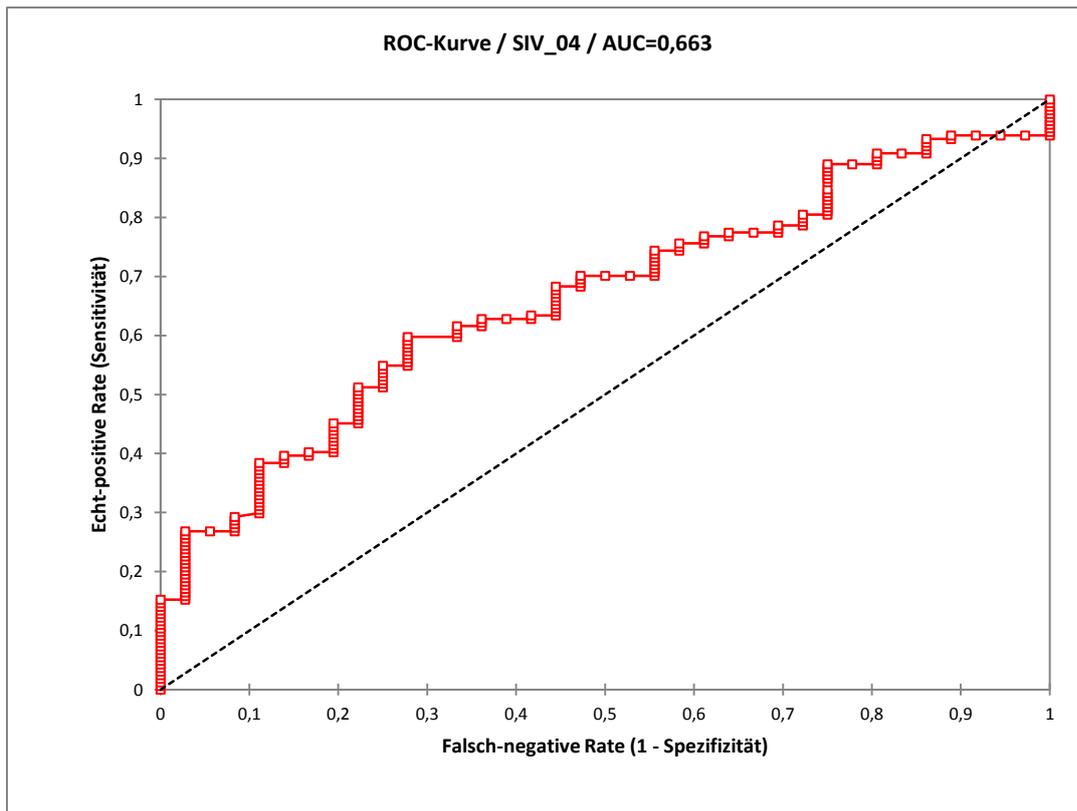


Abb. 14: ROC-Kurve Influenza-A 0,4 mg/ml

Betrachtet man die ermittelten Grenzwerte, so fällt auf, dass der Grenzwert für die niedrigere Konzentration an Influenza A-Antigen bei 0,039 liegt, was eindeutig zu niedrig ist. Der Grenzwert für die höhere Konzentration an Influenza A-Antigen liegt bei 0,78. Dieser Wert liegt oberhalb des dynamischen Bereiches. Für eine weitere Optimierung des Grenzwerts müsste die Konzentration des Influenza A-Antigens zwischen den getesteten liegen.

3.1.2.3.2 *Mycoplasma hyopneumoniae*

Die Untersuchung auf Antikörper gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* wurde mit dem single-ELISA IDEXX M. hyo. Ab Test (Fa. IDEXX laboratories) durchgeführt. Eine Validierung der Ergebnisse des Microarrays, auf welchen zwei Stämme von *Mycoplasma hyopneumoniae* separat gespottet wurden, ergab keine Zusammenhänge. Die AUC von 0,53 lässt auf einen Zufallsprozess schließen.

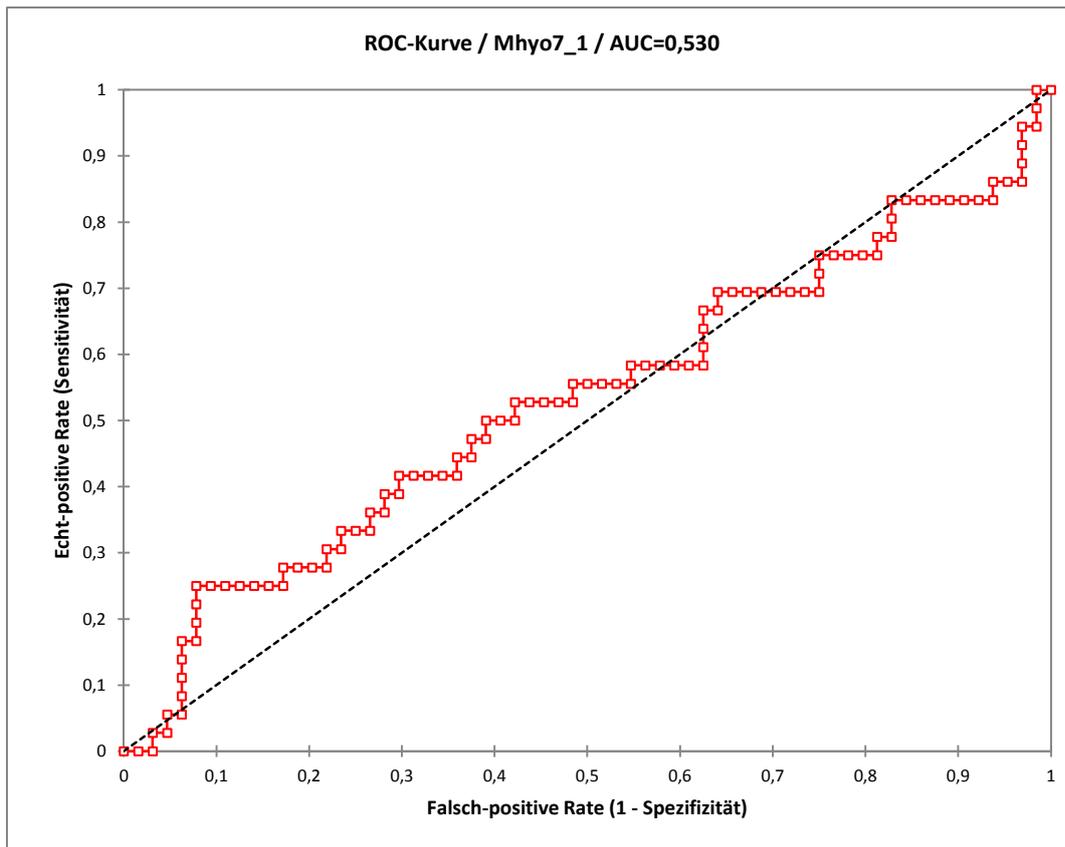


Abb. 15: ROC-Kurve *Mycoplasma hyopneumoniae*

3.1.2.3.3 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Bei dem für die Vergleichsuntersuchung verwendeten single-ELISA handelt es sich um den ID Screen® APP Screening Indirect (Fa. IDvet Innovative Diagnostics). Mit diesem Test können Antikörper gegen die Serotypen 1-12 nachgewiesen werden. Auf dem Microarray wurden einzelne Serotypen gespottet. In Konzentrationen von 0,1 mg/ml und 0,5 mg/ml wurden Serotyp 2, 7, 8 und 9 aufgetragen. Um eine einigermaßen gute Vergleichbarkeit zu schaffen, wurde ein Mittelwert der gemessenen Spotintensitäten berechnet. In der ROC-Analyse stellte sich folgendes Bild dar (Abb. 16):

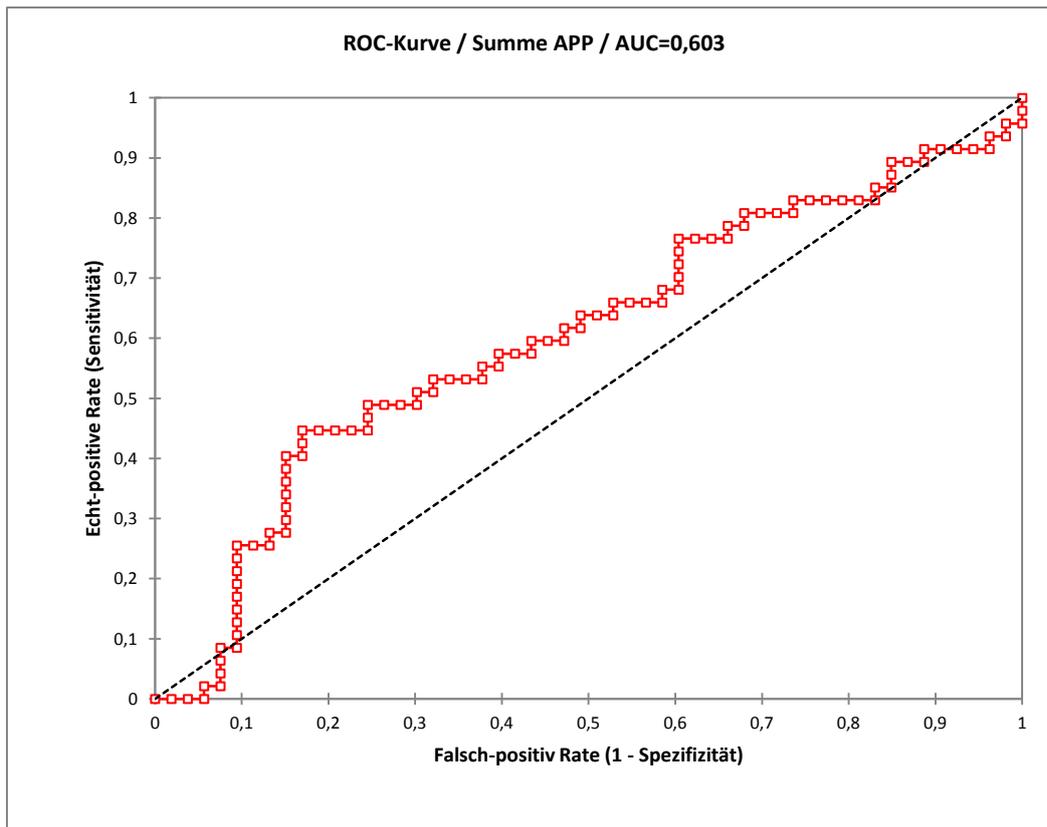


Abb. 16: ROC-Kurve Summe APP

Mit einer Sensitivität von 45% und einer Spezifität von 83% bei einem optimierten Grenzwert von 0,78 kann davon ausgegangen werden, dass die Antigene nur bedingt geeignet sind um APP-Antikörper zu detektieren. Vielmehr scheint es zu unspezifischen Bindungen zu kommen.

3.1.2.3.4 PRRSV

Die Untersuchung der auf *PRRSV*-AK wurde mit dem Test IDEXX PRRS X3 Ab Test Fa. IDEXX laboratories) durchgeführt. Dieser Test arbeitet mit polyvalenten Antigenen von *PRRSV*. Da es von Interesse ist auch die Serotypen unterscheiden zu können, wurden auf den Microarray *PRRSV*-EU-Ag und *PRRSV*-US-Ag aufgetragen. Wie bei den Salmonellen-Antigenen wurde zur Vergleichbarkeit auch hier ein *PRRSV*-Mix-Spot gespottet mit gleichen Anteilen der Serotypen.

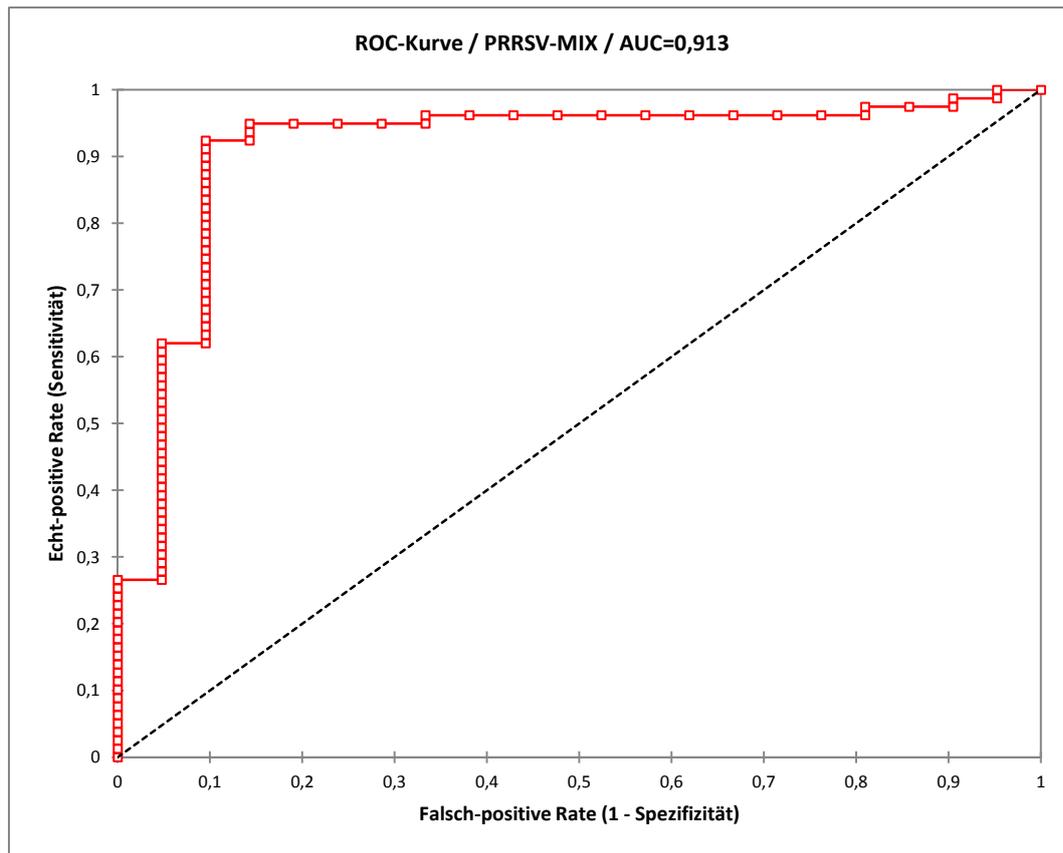


Abb. 17: ROC-Kurve *PRRSV-Mix*

Bei einem Grenzwert von 0,36 hat die Microarray-Untersuchung eine Sensitivität von 92,5 % und eine Spezifität von 90,5 %.

3.1.2.4 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse für die „tiergesundheitsrelevanten“ Antigene

Bei der Untersuchung auf Antikörper von tiergesundheitsrelevanten Erregern konnten vier Erreger auf dem Microarray verglichen werden. Neben dem Problem, dass die single-ELISA-Tests alle keine Zulassung für Fleischsaftproben hatten, war auch die Wahl des richtigen Antigens schwierig.

Die Validierung des Tests auf PRRSV-Ak ist erfolgreich verlaufen. Für die Influenza A-Virusantikörper-Nachweise muss noch eine Feineinstellung der Antigenkonzentration erfolgen. Dann sollten auch hier gute Übereinstimmungen festzustellen sein.

Die Nachweise von Antikörpern gegen *Actinobacillus pleuropneumoniae* und *Mycoplasma hyopneumoniae* bereiten allerdings derzeit noch Probleme. Aufgrund nicht geeigneter bzw. erregerspezifischer Oberflächenproteinen, welche als Antigene „präsentiert“ wurden, konnten hier derzeit keine erfolgreichen Validierungen durchgeführt werden.

3.1.3 Wichtige Ergebnisse aus dem Vergleich von multiserologischen, indirekten Ergebnissen via Microarray mit direkten Nachweismethoden

Der Vergleich zwischen Microarray-Ergebnissen und direktem Nachweis kann nur für die Erreger durchgeführt werden, die in der Validierung des Microarrays eine gute Testsicherheit hatten. Für die anderen werden Ergebnisse von single-ELISA-Untersuchungen für den Vergleich zwischen Antikörper- und Erregervorkommen herangezogen.

Tab. 7: Prävalenzen der untersuchten Erreger (100 Proben)

	Direkte Nachweismethode	Indirekte Nachweismethode
<i>Salmonella</i> spp.	12%	14%
Influenza A-Virus	0%	73% - 91%
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	71%	36%-53%
PRRSV	18%	79% - 81%
<i>Mycobacterium avium</i> ssp.	1%	6% - 96 %
<i>Yersinia enterocolitica</i>	50%	29% - 32%
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	26%	47%-49%
<i>Toxoplasma gondii</i>	Nicht durchgeführt	0% - 4%

Der Gehalt an Antikörpern wurde sowohl aus den gewonnenen Serum- als auch Fleischsaftproben ermittelt. Beide Ergebnisse sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die ermittelten Werte sind nicht vollständig deckungsgleich.

Dieses liegt vor allem daran, dass nicht alle verwendeten Test-Kits eine Zulassung für Fleischsaft hatten. Die Ergebnisse der Untersuchung auf Mykobakterien-Antikörper sind nicht zu vergleichen. Sie wurde mit einem Prototyp der Fa. QIAGEN durchgeführt, welcher noch erhebliche Probleme zu bereiten scheint.

Insgesamt handelte es sich bei den in dem letzten Projektabschnitt verwendeten Proben um einen Umfang von 100 Schlachtschweinen. Von 10 Beständen wurden jeweils 10 Proben genommen.

Zur besseren Übersicht werden die wichtigsten Ergebnisse im Folgenden nach Erreger aufgeführt und diskutiert.

3.1.3.1 *Salmonella* spp.

Der direkte Nachweis von Salmonellen wurde im Labor der Außenstelle für Epidemiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover in Bakum durchgeführt.

Dabei wurden 100 Ileocaecallymphknoten kulturell mittels Anreicherungsverfahren untersucht. Bei insgesamt 12 Lymphknoten konnte eine Infektion mit *Salmonella Typhimurium* nachgewiesen werden. Der Nachweis von Antikörpern ergab einen prozentualen Wert von 14%.

Betrachtet man die Ergebnisse bezogen auf die Bestände, so waren die Hälfte aller Betriebe in beiden Untersuchungsmethoden negativ. Die anderen Bestände hatten ein bis fünf positive Tiere.

3.1.3.2 *Influenza A-Virus*

In der direkten Untersuchung wurde ein molekularbiologischer Nachweis in Form einer PCR aus Lungengeweben durchgeführt. In keiner Lunge konnten Genomfragmente vom Influenza A-Virus nachgewiesen werden.

Das Virus ist bekanntermaßen nur eine sehr kurze Zeit im Lungengewebe nachzuweisen und daher ist eine geringe Nachweisrate auch wahrscheinlich und zu erwarten gewesen. In der indirekten Untersuchung konnte herausgefunden werden, dass 73% der Fleischsaftproben und 91% der Serumproben Antikörper gegen *Influenza A-Viren* enthielten.

Das heißt, dass eine Auseinandersetzung mit dem Erreger im Laufe des Lebens des Mastschweins stattgefunden hat. Alle Bestände wiesen antikörperpositive Tiere auf.

3.1.3.3 Mycoplasma hyopneumoniae

Bei 71 der 100 Proben konnte in der PCR spezifische Genomfragmente von *Mycoplasma hyopneumoniae* nachgewiesen werden. Zwei Bestände waren nahezu frei von positiv getesteten Lungen. Vergleichend dazu waren 36% der Fleischsäfte und 53% der Seren serologisch positiv.

In zwei Betrieben konnten keine Antikörper gefunden werden. Da hier in den PCR-Untersuchungen positive Ergebnisse festgestellt werden konnten, kann man von einem akuten Krankheitsgeschehen ausgehen. Es dauert zwei bis drei Wochen bis ein IgG-Titer als Immunantwort gegen den jeweiligen Erreger messbar ist.

In zwei anderen Beständen lag der umgekehrte Fall vor. Alle Tiere hatten Antikörper gegen Mykoplasmen. Ein direkter Nachweis war negativ. Zum einen kann es sein, dass die Antikörper von einer früheren Infektion stammen. Es kann sich aber auch um geimpfte Tiere handeln.

3.1.3.4 PRRSV

Achtzehn Prozent der Tiere waren in der PCR *PRRSV*-positiv. Im Microarray konnten ca. 80% positive Proben detektiert werden. Lediglich ein Bestand war in direktem und indirektem Nachweis negativ. In der PCR konnte auch der Stamm spezifiziert werden. Von den 18 positiven Tieren waren 2 *PRRSV*-US, 13 *PRRSV*-EU und drei *PRRSV*-US und -EU positiv.

Auch in den Microarrayuntersuchungen konnten hier Differenzierungen sichtbar gemacht werden.

3.1.3.5 *Mycobacterium avium* ssp.

Der direkte Nachweis von Mykobakterien fand in FZ Borstel (Schleswig Holstein) statt. Bei einer Probe konnte *Mycobacterium avium* ssp. *hominisuis* nachgewiesen werden.

Die Untersuchung im ELISA-Prototyp ergab bei den Serumproben eine Prävalenz von 96%, bei den Fleischsaftproben von 6%. Bei dem im direkten Nachweis positiven Tier war der Ak-Gehalt im Serum schwach positiv, im Fleischsaft negativ.

3.1.3.6 *Yersinia enterocolitica*

Fünzig Prozent der Proben waren in der im Institut für Mikrobiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover aus Tonsillengewebe durchgeführten kulturellen Untersuchung positiv. Die Untersuchung mit dem Microarray gab 29% positive Ergebnisse für Fleischsaft und 33% für Serum.

Es fällt auf, dass in jedem Bestand Yersinien nachgewiesen werden konnten. Die Bildung von Antikörpern gegen den Erreger ist in den Beständen 2, 3, 5 und 9 noch nicht vollzogen. Vermutlich ist die Infektion noch frisch.

3.1.3.7 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Der direkte Nachweis von *Actinobacillus pleuropneumoniae* wurde mittels PCR aus Lungengewebe durchgeführt. In 26% konnte spezifisches Genommaterial dieses Erregers detektiert werden. Nur ein Bestand war negativ. Die anderen hatten eine geringe bis mittlere Durchseuchung.

In der indirekten Untersuchung waren nahezu 50% der Proben positiv. Bei 75% dieser positiven Proben waren die Lungen in der PCR jedoch negativ. Das spricht dafür, dass die Auseinandersetzung mit dem Pneumonieerreger abgeschlossen ist. Es kann auch sein, dass es sich um geimpfte Tiere handelt.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Entwicklung des Testsystems „schweinespezifischer“ Microarray bietet die Möglichkeit Antikörper verschiedener Erreger simultan zu detektieren. Die Durchführung des Testes ist von seiner Länge vergleichbar derer eines single-ELISAs. Möchte man aber für mehr als nur einen Erreger serologische Befunde, so verdoppelt oder verdreifacht sich der Aufwand bei Nutzung des Microarrays nicht.

Bei der Validierung konnten für sechs von zehn Erregern, davon fünf Zoonoseerreger, Testsicherheiten von über 90% im Vergleich mit den jeweiligen single-ELISA-Tests erarbeitet werden. Für *Influenza A-Virus* und *Mycobacterium avium* ssp. ist abzusehen, dass eine ausreichend gute Testsicherheit erlangt werden kann.

Durch die Vergleichsuntersuchung mit dem ELISA konnten sehr eindeutige Ergebnisse erzielt werden. Die Ergebnisse waren zudem sehr gut reproduzierbar.

4. Zusammenfassung

Innerhalb des Projektzeitraumes von einem Jahr konnten alle geplanten und angeforderten Untersuchungen durchgeführt werden. Durch spezielle material- und probenabhängige Probleme verschoben sich lediglich die genauen Zwischenziele geringfügig.

Die Entwicklung eines multiserologischen Testsystems auf Basis von schweineassoziierten Erkrankungen konnte umgesetzt werden. Fleischsaft als Testmedium zu nutzen, war auf Grund seiner spezifischen Eigenschaften eine Herausforderung, welche aber gemeistert werden konnte.

Durch Optimierung des Ablaufs konnte die Microarray-Testdauer an die eines single-ELISAs angepasst werden.

Der drei-bis vierfache Preis, der für die Produktion des Microarrays im Vergleich zum ELISA aufgewendet werden muss, rentiert sich jedoch bereits bei validen Testergebnissen für Antikörper von drei oder mehr Erregern.

Betrachtet man dazu die gewonnenen Validierungsergebnisse, so ist zusammenfassend festzustellen, dass für den Großteil der serologischen Untersuchungen eine gute bis sehr gute Übereinstimmung zwischen Microarray und ELISA erbracht werden konnte. Stark hängt dieses von den Antigenen selbst ab. Bei den besten Ergebnissen wurden die von der Firma zur Verfügung gestellt, welche auch den entsprechenden zugelassenen single-ELISA produziert.

Bei den im letzten Projektabschnitt durchgeführten Vergleichen zwischen direktem und indirektem Erregernachweis bei 100 Schlachtschweinen aus zehn Beständen, konnten nur bedingt Zusammenhänge festgestellt werden.

Insgesamt ist ein multiserologisches Nachweisverfahren für Fleischsaftproben vom Schwein entwickelt worden, welches bereits in dieser Form Bedeutung in der Nahrungsmittelwirtschaft gewinnen könnte. Mehr und mehr wird die serologische Untersuchung in die Begutachtung des Schlachttieres und v.a. des Tierbestandes mit einbezogen. Dabei liegt der Focus vor allem auf der Einbeziehung von zoonotisch relevanten Erregern. Anhand der guten bis sehr guten Testspezifität und Sensitivität für den Nachweis von Antikörpern gegen Salmonellen, Toxoplasmen, Yersinien, Trichinellen und Hepatitis E Viren könnte der innerhalb dieses Projektes entwickelte und validierte „schweinespezifische Microarray“ schon jetzt flächendeckend im Sinne einer Risikoeinschätzung von Schweinemastbeständen verwendet werden.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

Ursprünglich geplant waren die Ziele, die auf dem untenstehenden Projektplan gebunden an Quartale als „Teilaufgaben“ in der Tabelle 8 dargestellt sind.

Tab. 8: Schematische Darstellung des Arbeitsplans

Teilaufgabe	2012 Quartal				2013 Quartal	
	1	2	3	4	1	
1. Literaturstudie, Erlernen des Microarray-Verfahrens						
2. Validierung von Microarrays in mehreren Testreihen mit Fleischsäften und Blutseren von Referenzlaboren und aus dem „NRW-Multiserologieprojekt“						
3. Nachtestung einer Auswahl an Beständen aus dem „NRW-Multiserologieprojekt“ mit Fleischsäften						
4. Vergleich von multiserologischen, indirekten Ergebnissen via Microchip mit direkten Nachweismethoden						
5. Berichtswesen, Abschlussbericht						

Teilaufgabe 1 „Literaturstudie, Erlernen des Microarray-Verfahrens“ deckt sich mit dem tatsächlich durchgeführten Arbeiten.

Teilaufgabe 2 „Validierung von Microarrays in mehreren Testreihen mit Fleischsäften und Blutseren von Referenzlaboren und aus dem NRW-Multiserologieprojekt“ war für das 2. und 3. Quartal 2012 geplant. Anhand der in Kapitel 2.2.1 dargestellten zahlreichen kleinen Veränderungen, die immer vergleichend betrachtet und bewertet werden mussten, zog sich die Validierung bis in das vierte Quartal 2012 hinein.

Teilaufgabe 3 „Nachtestung einer Auswahl an Beständen aus dem NRW-Multiserologieprojekt mit Fleischsäften“ wurde direkt anschließend durchgeführt.

Die Ergebnisse flossen in die Auswertung zur Grenzwertoptimierung mit ein. Dadurch konnte über einen größeren Stichprobenumfang für gesichere Ergebnisse gesorgt werden. Die vollständige Beendigung der Validierung und die Nachtestung der Fleischsaftproben konnte im Januar 2013 abgeschlossen werden.

Teilaufgabe 4 „Vergleich von multiserologischen, indirekten Ergebnissen via Microchip mit direkten Nachweismethoden“ begann bereits im vierten Quartal 2012 mit der Probengewinnung und Produktion von Ergebnissen direkter Nachweisuntersuchungen.

Im Anschluss wurden indirekte Ergebnisse mittels des validierten Microarrays aus den dazu passenden Proben der gleichen Tiere ermittelt.

Teilaufgabe 5 „Berichtswesen, Abschlussbericht“ konnte dann, wie im Plan aufgeführt, im ersten Quartal 2013 durchgeführt werden.

Zu den erreichten Zielen ist zu sagen, dass die Validierung des Microarrays für die Mehrzahl der in der Planung gewünschten Erreger erfolgreich durchgeführt werden konnte. Durch einige weitere Veränderungen können diesen noch andere folgen.

Weiterführend sollte auch die Untersuchung auf Serotypen einzelner Erreger nicht außer Acht gelassen werden. Wie bei der getrennten Untersuchung auf Antikörper gegen US- bzw. EU-Typ von PRRSV auf dem Microarray, oder der getrennten Untersuchung von Salmonellen-Serotyp-Antikörpern kann es von Interesse sein, die Möglichkeit simultan Ergebnisse zu gewinnen, weiter auszubauen.

Nachdem herausgefunden wurde, dass das Prinzip „Microarray-Multiserologie“ für das Schwein funktioniert und auch wirtschaftlich im Bereich der „risikoorientierten Schlachtieruntersuchung“ genutzt werden könnte, sollte auch an einen ähnlichen Test für Geflügel gedacht werden. Theoretisch wäre auch ein „Multi-Spezies-Microarray“ denkbar.

6. Literaturverzeichnis

BÄCHLEIN, C.; MEEMKEN, D; BLAHA, T.; GRUMMER, B.(2011):
Towards a novel screening approach for hepatitis E virus antibodies in pigs
In: National Research Platform for Zoonoses (Hrsg.): National Symposium on
Zoonoses Research 2011: programme and abstracts Berlin, 06.-07.10.2011; Berlin:
Nationale Forschungsplattform für Zoonosen, 2011, S. 109
http://www.zoonosen.net/DesktopModules/Bring2mind/DMX/Download.aspx?Method=attachment&Command=Core_Download&EntryId=13317&PortalId=24

EKINS, R. P. (1989):
Multi-analyte immunoassay.
Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 7, 155-168

ENGVALL, E. u. P. PERLMANN (1972):
Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies
by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.
The Journal of Immunology 109, 129-135

GRUMMER, B., T. BLAHA u. D. MEEMKEN (2010):
VETKOLLEG NUTZTIERE Ausblick auf die virologische und bakteriologische
Diagnostik von morgen.
Praktische Tierarzt, Der 91, 1100

LAWSON, S., J. LUNNEY, F. ZUCKERMANN, F. OSORIO, E. NELSON, C.
WELBON, T. CLEMENT, Y. FANG, S. WONG u. K. KULAS (2010):
Development of an 8-plex Luminex assay to detect swine cytokines for vaccine
development: assessment of immunity after porcine reproductive and respiratory
syndrome virus (PRRSV) vaccination.
Vaccine 28, 5356-5364

MEEMKEN, D.; BLAHA, T.(2011):
"Meat Juice Multi-Serology" - a tool for the continuous improvement of herd health
and food safety in the framework of the risk-based meat inspection of slaughter
pigs
In: Journal of food safety and food quality 62, 6 (2011) 192-199

MOLINA, R. M., W. CHITTICK, E. A. NELSON, J. CHRISTOPHER-HENNINGS, R.
R. ROWLAND u. J. J. ZIMMERMAN (2008):
Diagnostic performance of assays for the detection of anti-porcine reproductive and
respiratory syndrome virus antibodies in serum and muscle transudate ("meat juice")
based on samples collected under experimental conditions.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 20, 735-743

NIELSEN, B., L. EKEROTH, F. BAGER u. P. LIND (1998):
Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of Salmonella
infection in slaughter pig herds.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 10, 158-163

SCHENA, M. (2003):
Microarray analysis.
Wiley-Liss Hoboken, NJ

TANGEMANN, A.; KLEIN, G.; MEEMKEN, D.; MEERMEIER, D.; MISCHOK, D.;
GUNDLACH, S.; BLAHA, T.:
Testing and validating a monitoring system based on "meat juice multi-serology" for
optimizing food safety in pork and animal health in pigs
In: 4th European Symposium on Porcine Health Management: programme and
abstract book Bruges, Belgium, 25.-27.04.2012; Bruges: Boyen, 2012, S. P036, 130

XIA, H., L. LIU, A. NORDENGRAHN, I. KISS, M. MERZA, R. ERIKSSON, J.
BLOMBERG u. S. BELÁK (2010):
A microsphere-based immunoassay for rapid and sensitive detection of bovine viral
diarrhoea virus antibodies.
Journal of virological methods 168, 18-21