

Abschlussbericht

Operationelle Gruppe: Multiserologie via Microarray

Ein kosteneffizientes und routinetaugliches Diagnostikum zur kontinuierlichen Tiergesundheits- und Lebensmittelsicherheitsoptimierung in landwirtschaftlichen Schweinebetrieben in Niedersachsen

Registriernummer: 276 03 201 000 1121

K. Loreck¹, S. Mitrenga¹, M. Plötz¹, G. Klein^{1†}, M. Greiner^{1, 2}, D. Meemken³

¹ Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover

² Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Abteilung für Exposition, Max-Dohrn-Straße 8-10, 10589 Berlin

³ Freie Universität Berlin, Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, AG Fleischhygiene, Königsweg 67, 14163 Berlin

Projektlaufzeit: 18.05.2016 – 15.02.2020

EIP Netzwerk
Agrar & Innovation
Niedersachsen



EUROPÄISCHE UNION

Europäischer Landwirtschaftsfonds für
die Entwicklung des ländlichen Raums - ELER
Hier investiert Europa in die ländlichen Gebiete

Inhaltsverzeichnis

1	Kurzdarstellung	4
1.1	Ausgangssituation und Bedarf.....	4
1.2	Projektziel und konkrete Aufgabenstellung.....	4
1.3	Mitglieder der OG	4
1.4	Projektgebiet	5
1.5	Projektlaufzeit und Dauer	5
1.6	Budget.....	5
1.7	Ablauf des Verfahrens.....	5
1.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	6
2	Eingehende Darstellung	7
2.1	Verwendung der Zuwendung	7
2.1.1	Gegenüberstellung Geschäftsplan und tatsächlich durchgeführte Teilschritte ..	7
2.1.2	Darstellung der wichtigsten finanziellen Positionen	22
2.2	Detaillierte Erläuterung der Situation zu Projektbeginn.....	22
2.2.1	Ausgangssituation.....	22
2.2.2	Projektaufgabenstellung.....	23
2.3	Ergebnisse der OG in Bezug auf.....	24
2.3.1	Wie wurde die Zusammenarbeit im Einzelnen gestaltet?	24
2.3.2	Was war der besondere Mehrwert bei der Durchführung des Projektes als OG? 24	
2.3.3	Ist eine weitere Zusammenarbeit der Mitglieder der OG nach Abschluss des geförderten Projektes vorgesehen?.....	25
2.4	Ergebnisse des Innovationsprojektes	25
2.4.1	Zielerreichung	25
2.4.2	Abweichung zwischen Planung und Ergebnis	25
2.4.3	Projektverlauf	26
2.4.4	Beitrag des Ergebnisses zu förderpolitischen EIP-Themen	43
2.4.5	Nebenergebnisse	44
2.4.6	Arbeiten, die zu keinem Ergebnis geführt haben	44
2.4.7	Mögliche weitere Verwendung von Investitionsgütern	44
2.5	Nutzen der Ergebnisse für die Praxis	44
2.6	Verwertung und Nutzung der Ergebnisse	45
2.7	Wirtschaftliche und wissenschaftliche Anschlussfähigkeit	45
2.8	Kommunikations- und Disseminationskonzept	45
3	Literatur.....	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antigene und "Spotting-Konzentrationen" der ersten Microarray-Charge	10
Tabelle 2: Antigene und "Spotting-Konzentrationen" der zweiten Microarray-Charge	14
Tabelle 3: Antigene und "Spotting-Konzentrationen" der dritten Microarray-Charge	15
Tabelle 4: Aufgenommene und kategorisierte Schlachtbefunde der untersuchten Mastschweine.....	20
Tabelle 5: Nicht aufgenommene Schlachtbefunde.....	21
Tabelle 6: Allgemeine Bestandsinformationen.....	21
Tabelle 7: Spezielle Bestandsinformationen bezogen auf den beprobten Mastdurchgang....	21
Tabelle 8: Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen mit Serum.....	26
Tabelle 9: ELISA-Ergebnisse des Referenzproben-Panels.....	27
Tabelle 10: Testprotokoll für die Microarray-Untersuchung mit Blutserum	28
Tabelle 11: Testprotokoll für die Microarray-Untersuchung mit Fleischsaft	29
Tabelle 12: Ergebnisse der ROC-Analyse für Serum und Fleischsaft im ArrayTube Format.	32
Tabelle 13: Ergebnisse der Microarray-Untersuchungen im 96-well Format im Labor der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover	34
Tabelle 14: Ergebnisse der Microarray-Untersuchungen im 96-well Format in den projektbeteiligten Laboren	36
Tabelle 15: Ergebnisse des Laborvergleiches mit Serum	37
Tabelle 16: Ergebnisse des Laborvergleiches mit Fleischsaft.....	38
Tabelle 17: Mitteilung der Ergebnisse der serologischen Bestandsuntersuchung.....	41

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Projektplan.....	9
Abbildung 2: Gewinnung von Fleischsaftproben in barcodierten Fleischsafttrichtern	17
Abbildung 3: Referenzprobenauswahl für <i>Salmonella</i> spp.....	27
Abbildung 4: Untersuchung einer gepaarten Feldprobe.....	29
Abbildung 5: ROC-Kurven für unterschiedliche Antigen-Konzentrationen.....	30
Abbildung 7: Anteil an Tieren mit Lungenbefund unter 3600 Mastschweinen in Prozent % ..	39
Abbildung 8: Anteil an Tieren mit Brustfellbefund unter 3600 Mastschweinen in Prozent % .	39
Abbildung 9: Anteil an Tieren mit sonstigen Schlachtbefunden unter 3600 Mastschweinen in Prozent %.....	40
Abbildung 10: Anzahl positiver <i>Y. enterocolitica</i> Befunde von 60 untersuchten Tieren pro Bestand.....	42
Abbildung 11: Anzahl positiver <i>T. gondii</i> Befunde von 60 untersuchten Tieren pro Bestand.	43

1 Kurzdarstellung

1.1 Ausgangssituation und Bedarf

Der Gesundheitsstatus von Tierbeständen, insbesondere das Vorkommen von endemisch verbreiteten Zoonosen und sogenannten Produktionserkrankungen des Schweines, lässt sich mit Hilfe von Antikörperbestimmungen besser definieren als ausschließlich mit klinischen Untersuchungen. Die Entnahme von Blutseren im Tierbestand und deren Untersuchung mittels vorhandener kommerzieller single-ELISA-Tests ist jedoch aufwändig und in Summe relativ teuer. Auf Grundlage des in Deutschland vorgeschriebenen Schweine-Salmonellen-Monitorings werden Mastschweine am Schlachthof bereits routinemäßig auf Herdenebene beprobt und mittels ELISA Tests auf *Salmonella* spp. untersucht. Um diese Untersuchung auf mehr zoonotische Erreger und auf Erreger von Produktionserkrankungen auszuweiten, fehlt es bislang an einer kosteneffizienten und routinetauglichen diagnostischen Methode.

Mit einem Testsystem zur simultanen Detektion von mehreren Erregern könnten serologische Untersuchungen kosten- und zeiteffizient erfolgen und der Probenahme für das Schweine-Salmonellen-Monitoring würde ein Mehrwert zukommen. Dies würde einerseits den heutigen Anforderungen an eine Ressourcen schonende und auf Antibiotika weitgehend verzichtende Tierhaltung und andererseits den Anforderungen an eine verbraucherorientierte Produktion von hochwertigen und gesundheitlich unbedenklichen Lebensmitteln tierischen Ursprungs entsprechen (Grummer et al., 2010).

1.2 Projektziel und konkrete Aufgabenstellung

An der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover soll ein Protein-Microarray-Chip als serologisches Testsystem für Mastschweine entwickelt werden, mit dessen Hilfe die beim Schweine-Salmonellen-Monitoring gewonnenen Fleischsaft- und Blutserumproben gleichzeitig (d.h. in einem Testdurchlauf) auf das Vorkommen mehrerer Erreger untersucht werden können. In einem anschließenden Feldversuch soll die Anwendbarkeit und die Nutzbarkeit des entwickelten Microarrays an 60 am Projekt teilnehmenden Schweine-Mastbeständen erprobt werden.

1.3 Mitglieder der OG

Insgesamt waren acht Mitglieder an der OG „Multiserologie via Microarray“ beteiligt.

Darunter befanden sich zwei Erzeugergemeinschaften: Die Erzeugergemeinschaft für Qualitätsvieh im Oldenburger Münsterland eG (Bakum, stellvertretend für 40 am Projekt teilnehmende Landwirte) und die Erzeugergemeinschaft für Schlachtvieh Bösel w. V. (Garrel, stellvertretend für 20 am Projekt teilnehmende Landwirte).

Des Weiteren waren die drei Schlachtunternehmen Brand Qualitätsfleisch (Lohne), Bösel Goldschmaus (Garrel) und Vion (Emstek) Teil der OG.

Zwei weitere OG-Mitglieder waren die Diagnostiklabore des Institutes für Tiergesundheit der LUFÄ Nord-West (Oldenburg) und der LVL Lebensmittel- und VeterinÄrlabor GmbH (Emstek). Die Stiftung TierÄrztliche Hochschule Hannover entwickelte als OG-Mitglied den Microarray in den Laboren des Instituts für Lebensmittelqualität und –sicherheit und fungierte gleichzeitig als Koordinator des Projektes.

1.4 Projektgebiet

Alle beteiligten Erzeugergemeinschaften, Schweinemastbetriebe, Schlachtunternehmen und Labore befinden sich in Niedersachsen.

1.5 Projektlaufzeit und Dauer

Das Projekt wurde zum 18.05.2016 mit einer Projektlaufzeit von 3 Jahren und 3 Monaten bis zum 15.08.2019 bewilligt. Der Projektbeginn verschob sich aus verwaltungstechnischen Gründen auf den 01.07.2016. Bedingt durch Verzögerungen im Projektablauf erfolgte eine kostenneutrale Verlängerung der Projektlaufzeit bis zum 15.02.2020. Somit betrug die gesamte Projektlaufzeit 3 Jahre und 7 Monate.

1.6 Budget

Insgesamt wurde ein Zuschuss in Höhe von 443.807,00 € bewilligt. Von diesem Betrag waren 14.350,00 € für Ausgaben nach Nr. 2.1.1 der Richtlinie für Maßnahmen der laufenden Zusammenarbeit der Operationellen Gruppe und 429.457,00 € für Ausgaben nach Nr. 2.1.2 der Richtlinie für Maßnahmen der Durchführung von Innovationsprojekten vorgesehen. Investitionsausgaben gab es in diesem Projekt keine, sodass eine Förderung des Gesamtvolumens zu 100 % erfolgen konnte.

Die während der gesamten Projektlaufzeit tatsächlich geförderte Summe beträgt, inkl. des zum 15.02.2020 eingereichten Auszahlungsantrags, 413.970,41 €. Davon entfallen 10.496,35 € auf Ausgaben für Maßnahmen der laufenden Zusammenarbeit und 403.474,06 € auf Ausgaben für die Durchführung des Innovationsprojektes.

1.7 Ablauf des Verfahrens

Die OG startete ihre Projektarbeit im Juli 2016. Sie wurde dabei von Projektbeginn an von den zwei assoziierten Projektpartnern Abbott (vormals Alere Technologies GmbH, Jena) und Indical Bioscience GmbH (vormals Qiagen Leipzig GmbH, Leipzig) unterstützt.

Innerhalb der ersten Projektphase wurde anhand von ELISA-Untersuchungen ein Panel an Referenzproben für die Entwicklung des Microarrays erstellt. Der mit neuen Antigenen in Jena produzierte Microarray im ArrayTube Format, konnte anhand dieser Referenzproben in drei aufeinanderfolgenden Produktions-Chargen optimiert werden. In einem zweiten Schritt wurde die Microarray-Untersuchung vom ArrayTube auf das für die geplanten Massenuntersuchungen erforderliche 96-well Format (ArrayStrip) überführt, das Testprotokoll angepasst und ebenfalls anhand der Referenzproben in Hannover, sowie in den Laboren der LUFA Nord-West und der LVL validiert.

Parallel wurden von den Erzeugergemeinschaften Landwirte für die Teilnahme am Projekt akquiriert und von jedem teilnehmenden Schweine-Mastbestand (60 Bestände) jeweils aus zwei aufeinanderfolgenden Mastdurchgängen 60 Tiere an den projektbeteiligten Schlachthöfen beprobt. Die dabei gewonnenen 3.600 Proben wurden mittels des neu entwickelten Microarrays im ArrayStrip Format untersucht, so dass für jeden Bestand ein „serologisches Bestandsprofil“ erstellt werden konnte. Zusätzlich wurden von jedem Bestand die Daten aus der Schlachtung der Tiere sowie Daten zum Hygienemanagement, zum Mastverlauf, zur Therapiehäufigkeit und zu Impfungen während Aufzucht und Mast erhoben. In einer Abschlussveranstaltung wurden den teilnehmenden Landwirten die Ergebnisse aller Bestände zusammengefasst vorgestellt und die Ergebnisse des eigenen Bestandes persönlich mitgeteilt und diskutiert. Die Ergebnisse des Innovationsprojektes wurden in einschlägigen

Fachzeitschriften veröffentlicht, sowie auf nationalen und internationalen Tagungen präsentiert.

1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zur Überwachung des Auftretens von Zoonoseerregern in Schweinebeständen sowie zur Verbesserung des Gesundheitsmanagements im Stall ist die Entwicklung neuer kostengünstiger Diagnosemethoden für Schweinebestände erforderlich. Im Rahmen des EIP-Agri geförderten Projektes „Multiserologie via Microarray“ wurde ein Protein-Microarray basierter Test zum simultanen Nachweis von Immunglobulin G (IgG) Antikörpern gegen Zoonose-Erreger und Erreger von Atemwegserkrankungen bei Schweinen entwickelt. Der Chip wurde zunächst in einem kleinen Reaktionsgefäß (ArrayTube) und nachfolgend im 96-well kompatiblen Format (ArrayStrip) erprobt. Auf beiden Formaten waren Blutserum- und Fleischsaftproben als Probenmaterial einsetzbar, so dass für die Untersuchung z.B. Proben aus dem deutschen Schweine-Salmonellen-Monitoring vom Schlachthof auf dem Microarray verwendet werden könnten. Unter den in diesem Projekt erprobten Antigenen zeigten sich für die Analyse von *Toxoplasma gondii* und *Yersinia enterocolitica* hohe und für *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, PRRS-Virus und *Salmonella* spp. moderate Testgenauigkeiten. In einem Feldversuch mit 60 am Projekt teilnehmenden Schweinemastbetrieben wurden 3.600 Proben im ArrayStrip Format in zwei projektbeteiligten Laboren untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Microarray-Technologie einfach in Routinelabore integrierbar ist und optimale Voraussetzung für die Erstellung serologischer Bestandsprofile bietet. Die serologischen Daten auf Herdenebene könnten zur Optimierung der Lebensmittelketteninformation verwendet werden und stellen ein wertvolles Instrument zur kontinuierlichen Optimierung der Herdengesundheit dar.

In order to monitor the occurrence of zoonotic agents in pig herds as well as to improve herd health management, the development of new cost-effective diagnostic methods for pigs is necessary. In this study, funded by EIP-Agri, a protein microarray based assay for the simultaneous detection of immunoglobulin G (IgG) antibodies against different zoonotic agents and pathogens causing respiratory diseases in pigs was developed. The chip was first tested in a small reaction vessel (ArrayTube) and thereafter in a 96-well compatible format (ArrayStrip). On both platforms, blood serum and meat juice samples could be used as sample materials, so that samples e.g. from the German national *Salmonella* spp. monitoring, that are sampled at the abattoirs, could be used for microarray analysis. Among the antigens tested in this project, high test accuracy was reached for the analysis of *Toxoplasma gondii* and *Yersinia enterocolitica* and moderate test accuracy was reached for *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, PRRS virus and *Salmonella* spp.. In a field trial with 60 fattening pig farms participating in the project, 3.600 samples were examined with the ArrayStrip platform. It was shown that microarray technology could be integrated easily into diagnostic laboratories and offers optimal prerequisites for the establishment of serological herd profiles. The serological data at herd level can be used to improve 'food chain information' and provides a valuable tool to continuously optimize herd health.

2 Eingehende Darstellung

2.1 Verwendung der Zuwendung

2.1.1 Gegenüberstellung Geschäftsplan und tatsächlich durchgeführte Teilschritte

Der in Abbildung 1 dargestellte Projektplan gibt einen Überblick über die im Geschäftsplan vorgesehenen Arbeitspakete (AP) des Projektes und den zeitlichen Rahmen. Für eine detaillierte Durchführung der einzelnen Teilschritte innerhalb der Arbeitspakete wurden folgende Projektphasen und Meilensteine festgelegt:

1. Vorbereitungsphase (AP 1)

- 1.1. Besetzung der verantwortlichen Stellen
 - 1.2. Festlegung der zu verwendenden Antigene
 - 1.3. Akquise der Antigene
 - 1.4. Vorbereitungsphase zum Microarray-Spotting
 - 1.4.1. Festlegung der zu spottenden Antigenkonzentration für die erste Produktionscharge
 - 1.5. Gewinnung definierten Fleischsaft und Blutseren
 - 1.5.1. Vorbereitungsphase (Materialbeschaffung, Bestandauswahl, Planung der Probenahme und -aufbereitung, Koordination)
 - 1.5.2. Entnahme gepaarter Proben (Fleischsaft und Blutserum) vom Schwein
 - 1.5.3. ELISA-Untersuchung der Fleischsaft- und Blutserumproben
 - 1.5.4. Auswahl geeigneter definierter Proben
 - 1.5.5. Ergebnis: definierte Proben für die Validierung liegen vor
 - 1.6. Optimierung des Microarray-Testprotokolls
 - 1.7. Vorbereitung und Konfiguration der ELISA-Roboter für eine automatisierte Bearbeitung
- Meilenstein 1: Vorbereitungsphase ist abgeschlossen

2. Erste Versuchsphase (AP 1)

- 2.1. Produktion einer ersten Microarray-Charge
 - 2.1.1. Spottung der Antigene auf die Microarray-Oberfläche
 - 2.1.2. Testen der Microarrays anhand von definierten Fleischsaft- und Blutserumproben
 - 2.1.2.1. Statistische Diskriminierung anhand der Spottschwärzung (quantitative Auswertung) und Bewertung der Testergebnisse
 - 2.1.2.2. Abgleich der Testergebnisse mit den ELISA-Ergebnissen der definierten Proben
 - 2.1.2.3. Ableitung einer optimierten Antigenkonzentration für die zweite Chargenproduktion
 - 2.2. Produktion einer zweiten Microarray-Charge
 - 2.2.1. Spottung der Antigene auf die Microarray-Oberfläche
 - 2.2.2. Testen der Microarrays mit definierten Fleischsaft und Blutserumproben
 - 2.2.2.1. Statistische Diskriminierung anhand der Spottschwärzung (quantitative Auswertung) und Bewertung der Testergebnisse
 - 2.2.2.2. Abgleich der Testergebnisse mit den ELISA-Ergebnissen der definierten Proben
 - 2.2.2.3. Ableitung einer optimierten Antigenkonzentration für die dritte Chargenproduktion
 - 2.3. Produktion einer dritten Microarray-Charge
 - 2.3.1. Spottung der Antigene auf die Microarray-Oberfläche
 - 2.3.2. Testen der Microarrays mit definierten Fleischsaft- und Blutserumproben
 - 2.3.2.1. Abgleich der Testergebnisse mit den ELISA-Ergebnissen der definierten Proben
 - 2.3.2.2. Statistische Validierung des Microarray im ArrayTube Format
- Meilenstein 2: Ein funktionsfähiger Microarray im ArrayTube Format liegt vor

3. Zweite Versuchsphase (AP 2)

3.1. Produktion von Microarrays im 96-well Format

3.2. Testen der Microarrays im 96-well Format mit definierten Fleischsaft- und Blutserumproben

3.2.1. Abgleich mit den Ergebnissen des validierten Microarrays im ArrayTube Format und den ELISA-Ergebnissen

3.2.2. Statistische Validierung des Microarray im 96-well Format

3.3. Ergebnis: automatisiertes, validiertes Verfahren für den Testprozess im 96-well Format

3.4. Laborvergleich

Meilenstein 3: Ein funktionsfähiger Microarray im 96-well Format liegt vor

4. Feldversuchsphase (AP 3 und AP 4)

AP 3:

4.1. Vorbereitungsphase für die Probennahme

4.1.1. Materialbeschaffung

4.1.2. Konfiguration der technischen Geräte im Schlachthof zur Probennahme

4.1.3. Abstimmung des Ablaufes der Probennahme und des Probenversandes mit den Schlachthöfen und den Laboren

4.1.4. Bestandsakquise durch die Erzeugergemeinschaften

4.2. Probennahme an den Schlachthöfen

AP 4:

4.3. Untersuchung der Proben in den Laboren

4.4. Auswertung und Bewertung der Proben

~~4.5. Kontrolluntersuchung einzelner Proben mit dem ELISA~~

4.6. Auswertung und Bewertung der Proben

4.7. Auswertung und Bewertung des automatisierten Testverfahrens im Feldversuch (ob gesamter Ablauf funktioniert)

4.8. Ergebnis: Das automatisierte 96-well Format des Microarray ist im Feld einsetzbar

Meilenstein 4: Der Feldversuch ist abgeschlossen

5. Strategieentwicklung (AP 5)

5.1. Analyse der Ergebnisse

5.2. Erstellen von Bestandsprofilen

5.3. Entwicklung von Konzepten zur Minimierungs- und Produktlenkung

Meilenstein 5: Die Konzepte und Strategien sind entwickelt

6. Planungs-, Organisations- und Abschlussphase (AP 6)

6.1. Projektplanung

6.2. Projektorganisation

6.3. Projektnachbearbeitung

6.4. Abschlussbericht schreiben

6.5. Abschlussveranstaltung

Meilenstein 6: Der Abschlussbericht liegt vor

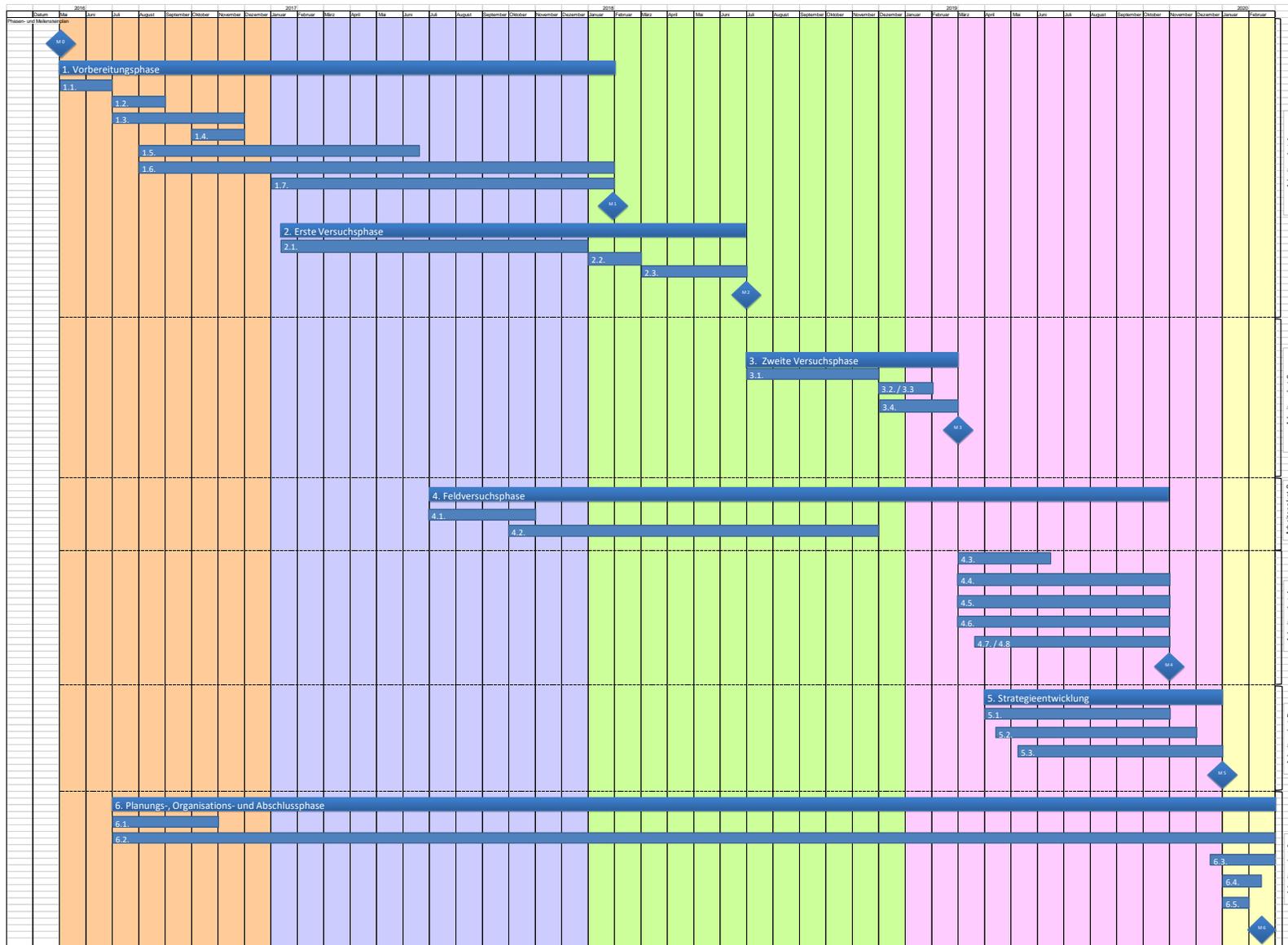


Abbildung 1: Projektplan

2.1.1.1 Vorbereitungsphase (AP 1)

Antigenakquise und Festlegung der zu spottenden Antigenkonzentrationen

Bei dem in diesem Projekt eingesetzten Microarray handelt es sich um einen Protein-Microarray, mit dem Antikörper (Immunglobulin G) im Testmedium nachgewiesen werden. Der Antikörpernachweis erfolgt bei dieser Nachweismethode durch die Bindung der Antikörper im Fleischsaft bzw. Blutserum an spezifische Antigene auf der Oberfläche des Microarray-Chips. Die Antigene haften als sogenannte „Spots“ auf der Oberfläche des Microarray-Chips. Bei der Microarray-Herstellung können bis zu 343 verschiedene „Spots“ auf einen Chip aufgetragen werden („Spotting“). Im Fall einer Bindungsreaktion (d.h. dem Vorhandensein von Antikörpern im Fleischsaft bzw. Blutserum) kommt es nach weiteren Reaktionen abschließend zu einer Schwärzung der jeweiligen Antigenstelle („Spot“). Der Schwärzungsgrad kann anschließend mithilfe eines speziellen Auslesegerätes (ArrayMate Reader, Alere Technologies GmbH, Jena) dargestellt und ausgewertet werden. In Arbeitsschritt 1.2. wurde zunächst festgelegt, welche Antigene relevanter Zoonose- und Produktionserkrankungen in diesem Projekt auf die Microarray-Oberfläche „gespottet“ werden. Diese Fragestellung wurde mit allen OG-Mitgliedern intensiv diskutiert. Letztlich wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Antigene ausgewählt und im Rahmen des Arbeitsschrittes 1.3. akquiriert.

Tabelle 1: Antigene und "Spotting-Konzentrationen" der ersten Microarray-Charge

Erregerantigen	Konz. 1 µg/µl	Konz. 2 µg/µl	Konz. 3 µg/µl
<i>Salmonella</i> SCS	0,50	0,20	0,10
<i>Salmonella</i> SE	0,50	0,20	0,10
<i>Salmonella</i> STM	0,50	0,20	0,10
<i>Salmonella</i> SA	0,50	0,20	0,10
<i>Trichinella spiralis</i>	1:10	1:20	1:50
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,30	0,20	0,10
<i>Hepatitis-E Virus</i>	0,50	0,20	0,10
<i>Toxoplasma gondii</i>	0,50	0,20	0,10
<i>Influenza-A Virus</i>	0,35	0,20	0,10
APP Serotyp 0144	1:20	1:50	1:10
APP Serotyp 0176	1:10	1:20	1:50
APP Serotyp 0185	1:10	1:20	1:50
APP Serotyp 0201	1:10	1:20	1:50
APP Serotyp 0202	1:10	1:20	1:50
APP Serotyp 0203	1:10	1:20	1:50
APP Serotyp 0212	1:10	1:20	1:50
APP Serotyp 0291	1:10	1:20	1:50

<i>PRRSV-EU Virus</i>	0,50	0,20	0,10
<i>PRRSV-US Virus</i>	0,50	0,20	0,10
<i>Mycobacterium avium</i>	0,23	0,10	0,05

APP = *Actinobacillus pleuropneumoniae*; PRRSV EU = Porcine reproductive and respiratory syndrome virus EU-Stamm; PRRSV US = Porcine reproductive and respiratory syndrome virus US-Stamm; Konz. = Antigenkonzentration in µg/µl je Spot

Die Auswahl und Akquise der Antigene gestaltete sich zeitintensiver als im Rahmen des ersten indikativen Zeitplans kalkuliert. Die folgenden Gründe können hierfür angeführt werden: Für die Validierung des Microarray (ArrayTube und 96-well Format) sollten die Microarray-Ergebnisse mit den Ergebnissen eines diagnostischen Routineverfahrens zum Antikörpernachweis (ELISA-Testsystem) verglichen werden. Dabei sollten optimaler Weise in beiden Testsystemen die gleichen Antigene verwendet werden, damit bei eventuellen Abweichungen zwischen ELISA und Microarray eindeutig auf das Testsystem und nicht auf Unterschiede in den Antigenen rückgeschlossen werden kann. Um diese Antigenübereinstimmung garantieren zu können, mussten die Antigene für Microarray- und ELISA-Testsystem vom gleichen Hersteller und am besten auch aus der gleichen Produktionscharge stammen. Dies musste sorgfältig mit den Antigenherstellern abgestimmt werden.

Bei den Antigenen handelt es sich für die Hersteller um essentielle Produktionsbestandteile, der aufwändige Entwicklungsarbeit zu Grunde liegt. Eine Weitergabe dieser Antigene an andere Firmen oder Forschungseinrichtungen ist daher in der Regel nicht möglich. Die Antigene für *Salmonella* (Serovare: SCS, SE, STM, SA), *Trichinella (T.) spiralis*, *Toxoplasma (T.) gondii*, *Yersinia (Y.) enterocolitica*, *Mycobacterium (M.) avium*, das Hepatitis E-Virus, das Influenza A-Virus sowie das Porcine reproductive and respiratory syndrom (PRRS)-Virus konnten nur durch die enge Zusammenarbeit mit Indical Bioscience akquiriert werden. Die Antigenakquise für *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* und *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) gestaltete sich besonders zeitaufwendig. Diese Antigene konnten über das OG-Mitglied LUFÄ Nord-West vom Hersteller IDvet (Grabels, Frankreich) beschafft werden. Von den Herstellern Indical Bioscience und IDvet konnten zu den jeweiligen Antigenen auch die entsprechenden ELISA-Tests hergestellt werden.

Aufgrund der besonderen wirtschaftlichen Bedeutung der Antigene waren weitere veterinärmedizinische Testhersteller nicht bereit, ihre Antigene für das Projekt zur Verfügung zu stellen. Die Antigenakquise für die Produktion der ersten Microarray Charge wurde daher im November 2016 vorerst beendet. Für die Produktion der zweiten Produktionscharge wurde zusätzlich ein weiteres Antigen für den Erreger *Y. enterocolitica* von der Institut Virion/Serion GmbH (Würzburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Als Referenztest für dieses nachträglich akquirierte Antigen wurde der von Indical Bioscience produzierte ELISA-Test verwendet.

Beim „Spotting“ der ersten Microarray-Charge im Januar 2017 entschied man sich basierend auf den Validierungsergebnissen der Vorgängerstudie (Hahne, 2014) und Erfahrungswerten der Projektpartner Indical Bioscience und Abbott/Alere Technologies dafür, jedes Antigen in drei unterschiedlichen Spot-Konzentrationen auf die Microarray-Oberfläche aufzutragen (siehe Tabelle 1).

Erstellung eines Referenzproben-Panels für Microarray-Untersuchungen

Die Validierung des Microarray (ArrayTube- und 96-well Format) sollte anhand von definierten (d.h. im ELISA vorgetesteten) Blutserum- und Fleischsaftproben erfolgen. Um die Validierungsergebnisse für Fleischsaft und Blutserum miteinander vergleichen zu können, sollten die definierten Proben vom gleichen Schwein stammen (sogenannte "gepaarte" Probe). Zum Zeitpunkt der Projektplanung war nicht absehbar, welche Mengen an Fleischsäften und Blutseren für den Validierungsprozess gebraucht werden würden. Wie sich im Projektverlauf zeigte, fielen die Verbrauchsmengen an Probenmaterial deutlich höher aus, als ursprünglich kalkuliert. Die eigentlich für das Projekt vorgesehenen, aus einem Vorgängerprojekt stammenden Blutseren und Fleischsäfte reichten mengenmäßig nicht aus, um den Bedarf während des gesamten Validierungsverlaufes zu decken. Das AP 1 wurde aus diesem Grund um einen zusätzlichen Arbeitsschritt (1.5. "Gewinnung von definierten Blutseren und Fleischsäften") erweitert.

Im Rahmen dieses Arbeitsschrittes wurden gezielt Bestände mit gesundheitlichen Problemen zwischen August 2016 und Januar 2017 ausgewählt und 184 Schweine „gepaart“ (Blutserum und Fleischsaft) an den drei projektbeteiligten Schlachthöfen beprobt. Blutproben wurden am Schlachtband direkt nach dem Entblutungsstich genommen. Dieser wurde durch einen tierschutzrechtlich geschulten Schlachthofmitarbeiter durchgeführt, der für die Probenahme nicht von seinem herkömmlichen Vorgehen abweichen musste. Der Entblutevorgang an sich und die Freigabe des Fleisches der beprobten Tiere für den menschlichen Verzehr wurden durch die Probenahme nicht beeinflusst. Für die Fleischsaftproben wurde ein größtmögliches Stück Zwerchfellpfeilmuskulatur am Schlachtband entnommen und in Plastikbeuteln eingefroren, um dies zur Fleischsaftgewinnung wieder aufzutauen. Durch dieses Vorgehen konnte eine relativ große Menge an Blutserum und Fleischsaft von jedem beprobten Tier generiert werden.

Die insgesamt 194 entnommenen gepaarten Proben wurden anschließend mithilfe von single-ELISA-Tests in den Laboren der LUFA Nord-West und der LVL auf alle für das Projekt relevanten Krankheitserreger untersucht (Ergebnisse siehe 2.4.3.1). Aus dem Pool an definierten Blutseren und Fleischsäften konnte anschließend ein Referenzproben-Panel für die Validierung des Microarrays erstellt werden. Ein Vorteil dieses neu erstellten Referenzproben-Panels bestand darin, dass durch das große Probenvolumen der Microarray in beiden Formaten durchgängig mit denselben Proben untersucht und somit die Ergebnisse verglichen werden konnten. Außerdem konnte die Auswahl der Referenzproben für die Validierung so gestaltet werden, dass Proben über den gesamten Messbereich (stark negativ, nahe des Cut-Offs, stark positiv) eines jeden eingesetzten ELISA-Tests vertreten sind.

Für den Erreger *T. spiralis* konnten, wie erwartet, bei den Beprobungen an den Schlachthöfen keine positiven Proben gefunden werden. Das Referenzproben-Panel wurde daher um neun gepaarte Serum- und Fleischsaftproben aus Infektionsversuchen des Bundesinstitutes für Risikobewertung ergänzt.

Für den Erreger *T. gondii* konnten durch die Probenahmen an den Schlachthöfen fünf gepaarte positive Proben generiert werden. Weitere gepaarte *T. gondii* positive Proben zu erhalten war nicht möglich. Das Referenzproben-Panel konnte jedoch um 20 *T. gondii* positive Seren aus ELISA-Untersuchungen des OG-Mitglieds Vion erweitert werden. Sieben *T. gondii* positive Fleischsäfte wurden zusätzlich aus Infektionsversuchen des Institutes für Parasitologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

Optimierung des Microarray-Testprotokolls

Ziel dieses Projektes war es, den Microarray im 96-well Format möglichst voll automatisiert zu bearbeiten. Das in der Vorgängerstudie (Hahne, 2014) entwickelte ArrayTube Testprotokoll musste hierzu so verändert werden, dass die Zahl an Arbeitsschritten auf ein Minimum reduziert wird, um die Fehleranfälligkeit des automatisierten Testsystems zu limitieren und die Bearbeitungszeit zu verkürzen. Aus diesem essentiellen Optimierungsschritt entstand Ende März 2017 in Zusammenarbeit mit Abbott/Alere Technologies und Indical Bioscience ein erstes neu entwickeltes Microarray Testprotokoll. Dieses wurde im weiteren Projektverlauf auf Grundlage der generierten Ergebnisse immer weiter angepasst. Nach einer Vielzahl von Experimenten konnte das Testprotokoll so optimiert werden, dass es für Blutserum und Fleischsaft aussagekräftige Ergebnisse liefert. Als „final“ bezeichnet werden konnten die Testprotokolle für Blutserum und für Fleischsaft im ArrayTube Format im März 2018.

Die Microarray-Untersuchung im 96-well Format unterscheidet sich u.a. in Bezug auf das Volumen, des den Chip umfassenden Reaktionsgefäßes vom ArrayTube Format. Das Reaktionsgefäß des ArrayTubes hat ein maximales Volumen von ca. 1500 µl, während die einzelne Kavität (Well) im 96-well Format maximal 300 µl fasst. Aufgrund des unterschiedlichen Flüssigkeitsfassungsvermögens beider Microarray-Formate musste das entwickelte Testprotokoll für die Untersuchungen im 96-well Format weiter modifiziert werden. Die Modifikationsversuche wurden im September 2018 abgeschlossen.

Vorbereitung/Konfiguration der automatisierten Bearbeitung

Die automatisierte Bearbeitung des 96-well Formates sollte mithilfe eines sogenannten ELISA-Roboters erfolgen. Mithilfe dieser Technologie ist es im Rahmen von ELISA-Tests möglich, die einzelnen Pipettierschritte zur Durchführung des Tests vollautomatisiert durchzuführen. Im Januar 2017 begannen die Labore mit der technischen Vorbereitung ihrer Roboter. Unterstützt wurden die LUFA Nord-West und die LVL dabei von Abbott/Alere Technologies. Für die technische Konfiguration der Roboter wurden in diesem Arbeitsschritt von Abbott ausrangierte Teststreifen (sogenannte „Dummstreifen“) zur Verfügung gestellt. Die Arbeit an diesen Teststreifen führte jedoch zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Im November 2018 einigten sich die Labore daher darauf, eine „halbautomatisierte“ Lösung unter Einsatz einer elektronischen Mehrkanalpipette umzusetzen (siehe 2.4.6).

2.1.1.2 Erste Versuchsphase (AP 1)

Die Projektplanung sah vor, dass das der Microarray-Chip im ArrayTube Format anhand von drei aufeinanderfolgenden Produktionschargen entwickelt wird. Durch diese Vorgehensweise sollte die Antigenkonzentration auf der Microarray-Oberfläche in Abhängigkeit vom Validierungsergebnis schrittweise angepasst werden. Die erste Microarray-Charge konnte im Januar 2017 erfolgreich produziert werden. Nach einer abschließenden Funktionstestung wurden die Microarrays Ende Mai 2017 an die Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover versendet. Die Testung der ersten Microarray-Charge erfolgte anhand von jeweils 30 in Arbeitsschritt 1.5.4. ausgewählten Blutserum- und Fleischsaftproben. Nach Auswertung der Blutserumergebnisse zeigte sich, dass der Microarray-Chip für zwei der zehn Erreger mit dem ELISA-Test vergleichbare Ergebnisse liefert.

Bei den Testungen der Fleischsaftproben konnten keine auswertbaren, d.h. mit dem Auslesegerät des Microarrays numerisch erfassbare Ergebnisse erzielt werden. Als problematisch stellten sich Protein- und Fettrückstände auf der Microarray-Oberfläche dar. Deshalb wurden an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zuerst, wie unter 2.1.1.1 erwähnt, weitere Versuche zur Optimierung des Testprotokolls durchgeführt. Erste Ergebnisse

zeigten, dass durch eine gezielte Probenvorbereitung (z.B. durch Zentrifugation, Anpassung der Probenverdünnung) die Auswertbarkeit der Fleischsaftproben verbessert werden kann. Die Antigen-Antikörper-Bindungen mussten jedoch sowohl für Blutserum- als auch für Fleischsaft erhöht werden, damit für mehr Erreger mit dem ELISA vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Untersuchungen hierzu wurden von der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover in enger Zusammenarbeit mit dem Team der Entwicklungsabteilung von Abbott/Alere Technologies und Indical Bioscience durchgeführt. Erst nach Abschluss dieser Untersuchungen konnte über die Spotting-Konzentrationen der zweiten Microarray-Charge (siehe Tabelle 2) entschieden werden.

Tabelle 2: Antigene und "Spotting-Konzentrationen" der zweiten Microarray-Charge

Erregerantigen	Konz. 1 µg/µl	Konz. 2 µg/µl	Konz. 3 µg/µl	Konz 4 µg/µl
Hepatitis-E Virus	0,25	0,50	0,75	
<i>Mycobacterium avium</i>	0,05	0,10	0,23	
<i>Yersinia enterocolitica</i> (QIAGEN)	0,10	0,20	0,30	
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Serion)	0,10	0,20	0,50	
Influenza-A Virus	0,05	0,10	0,20	
PRRSV ELISA-Mix (1)	0,10	0,20	0,50	
PRRSV ELISA-Mix (2)	0,10	0,20	0,50	
PRRSV-EU Virus	0,10	0,20	0,50	
PRRSV-US Virus	0,10	0,20	0,50	
<i>Salmonella</i> ELISA-Mix (1)	0,10	0,20	0,50	0,75
<i>Salmonella</i> ELISA-Mix (2)	0,10	0,20	0,50	0,75
<i>Salmonella</i> SE	0,20	0,50	0,75	
<i>Salmonella</i> STM	0,20	0,50	0,75	
<i>Salmonella</i> SCS	0,10	0,20	0,50	
<i>Salmonella</i> SA	0,10	0,20	0,50	
<i>Toxoplasma gondii</i>	0,20	0,50		
<i>Trichinella spiralis</i>	1:20	1:50		
APP ELISA-Mix	1:50	1:20	1:10	1:5
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	1:10	1:20	1:50	

Bei der ursprünglichen Projektplanung wurden die fachliche Komplexität dieses Arbeitsschrittes und der damit verbundene zeitliche Aufwand als geringer eingeschätzt. Zusätzlich musste die Produktion der zweiten Microarray-Charge bei Abbott/Alere Technologies aufgrund von Konzernumstrukturierungen mehrmals verschoben werden. Insgesamt führten diese Gegebenheiten zu erheblichen zeitlichen Verzögerungen im

Projektablauf. Daher konnte mit der Untersuchung der zweiten Microarray-Charge erst im Februar 2018 begonnen werden.

Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden weitere Anpassungen vorgenommen und für die dritte Microarray-Charge die in Tabelle 3 aufgeführten Antigenkonzentrationen festgelegt. Dieser für die dritte Microarray-Charge produzierte Chip wurde in der zweiten Versuchsphase auch im 96-well Format eingebaut.

Tabelle 3: Antigene und "Spotting-Konzentrationen" der dritten Microarray-Charge

Erregerantigen	Konz. 1 µg/µl	Konz. 2 µg/µl	Konz. 3 µg/µl	Konz 4 µg/µl
Hepatitis-E Virus	0,25	0,50	0,75	
<i>Mycobacterium avium</i>	0,05	0,10	0,23	
<i>Yersinia enterocolitica</i> (QIAGEN)	0,10	0,20	0,30	
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Serion)	0,10	0,20	0,50	
Influenza-A Virus	0,05	0,10	0,20	
PRRSV ELISA-Mix	0,10	0,20	0,50	0,75
PRRSV self-made Mix	0,10	0,20	0,50	0,75
<i>Salmonella</i> ELISA-Mix	0,10	0,20	0,50	0,75
<i>Salmonella</i> ELISA self-made Mix	0,10	0,20	0,50	0,75
<i>Salmonella</i> SE	0,20	0,50	0,75	
<i>Salmonella</i> STM	0,20	0,50	0,75	
<i>Salmonella</i> SCS	0,10	0,20	0,50	
<i>Salmonella</i> SA	0,10	0,20	0,50	
<i>Toxoplasma gondii</i>	0,20	0,50		
<i>Trichinella spiralis</i>	1:20	1:50		
APP ELISA-Mix	1:20	1:10	1:5	1:2
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	1:10	1:20	1:50	

Die Produktion der dritten Microarray-Charge konnte im Mai 2018 realisiert werden. Die Validierung des ArrayTube Formates wurde in Folge im August 2018 abgeschlossen. Der Meilenstein 2 („Ein funktionsfähiger Microarray im ArrayTube Format liegt vor“) wurde erreicht.

2.1.1.3 Zweite Versuchsphase (AP 2)

Die Produktion von Microarray-Streifen für das 96-well Format konnte im Juli 2018 erfolgen. Alle Microarray-Chips wurden so produziert, wie in Tabelle 3 angegeben. Um die Ergebnisse des 96-well Formates mit denen des ArrayTube Formates vergleichen zu können, wurden für die Untersuchungen des 96-well Formates ausschließlich Proben ausgewählt, für die im ArrayTube Format bereits ein Ergebnis vorlag.

Zuerst wurde an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover jeweils eine 96-well Platte mit definierten Blutseren (95 Seren plus einer Leerwert-Kontrolle) und eine 96-well Platte mit definierten Fleischsäften (95 Fleischsäfte plus einer Leerwert-Kontrolle) untersucht. Die 95 Blutserum- bzw. Fleischsaftproben setzten sich aus 88 gepaarten Proben aus Arbeitsschritt 1.5 und aus jeweils sieben zusätzlich akquirierten positiven Proben für *T. gondii* zusammen. Für *T. spiralis* konnten im ArrayTube Format mit den positiven Proben aus dem Bundesinstitut für Risikobewertung keine positiven Reaktionen auf dem Microarray erzielt werden. Aus diesem Grund wurden im 96-well Format keine zusätzlichen Proben für *T. spiralis* untersucht. Im Anschluss an die Untersuchung der zwei 96-well Format Platten an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover wurden die untersuchten Proben an die OG-Mitglieder LUFA Nord-West und LVL gesandt und dort ebenfalls im 96-well Format untersucht.

Da der Microarray in der Feldversuchsphase ausschließlich in diesen Laboren untersucht wird, beinhaltete die Validierung des Microarrays im 96-well Format einen „Laborvergleich“ (Arbeitsschritt 3.4) der Ergebnisse der 95 definierten Blutseren und Fleischsäfte aus Arbeitsschritt in allen drei Laboren (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, LUFA Nord-West, LVL). Die Auswertung dieses Laborvergleichs konnte im Februar 2019 abgeschlossen werden.

Um sicher zu stellen, dass die Untersuchung der Microarrays in den drei Laboren einheitlich durchgeführt wird, hatte Abbott/Alere Technologies zuvor im April 2017 ein gemeinsames Labor-Training für alle beteiligten Labore durchgeführt. Vor Beginn der Microarray-Untersuchungen stimmte die Tierärztliche Hochschule Hannover das Protokoll noch einmal intensiv mit den Labormitarbeitern der LUFA Nord-West und der LVL ab.

2.1.1.4 Feldversuchsphase (AP 3 und AP 4)

In der Feldversuchsphase sollte überprüft werden, ob sich ein Microarray-gestütztes Monitoringsystem einwandfrei in den Arbeitsalltag von Untersuchungslaboren und Schlachthöfen integrieren lässt. Der Projektplan sah vor, dass diese Überprüfung anhand von 3.600 Fleischsaft- und Blutserumproben aus 60 Schweinemastbeständen erfolgt. Mit der Akquise der 60 Schweinemastbestände durch die projektbeteiligten Erzeugergemeinschaften und der Probenahme an den Schlachthöfen wurde, aufgrund der unter 2.1.1.2 beschriebenen Verzögerungen in der ersten Versuchsphase bereits früher als ursprünglich im Projektplan vorgesehen, begonnen. Da die Proben im gefrorenen Zustand gut lagerfähig sind, konnte das Arbeitspaket 3 ohne einen Verlust an Probenqualität vorgezogen werden.

Für die Teilnahme der Landwirte am Projekt mussten Einwilligungs- und Datenschutzerklärungen erstellt werden. Im Rahmen der Projekttreffen wurden diese Unterlagen diskutiert und abgestimmt. Im Zeitraum Juli bis Oktober 2017 akquirierte die Erzeugergemeinschaft für Qualitätsvieh im Oldenburger Münsterlang eG insgesamt 40 Schweinemastbetriebe (20 Schweinemastbetriebe mit Schlachtung beim Schlachtunternehmen VION und 20 Schweinemastbetriebe mit Schlachtung beim Schlachtunternehmen Brand Qualitätsfleisch). Die Erzeugergemeinschaft für Schlachtvieh Bösel w.V. akquirierte im Zeitraum August bis November 2017 insgesamt 20 Schweinemastbestände mit Schlachtung beim Schlachtunternehmen Bösel.

Die Entnahme von Blutserum- oder Fleischsaftproben erfolgt am Schlachthof routinemäßig im Rahmen des Schweine-Salmonellen-Monitorings. Bei diesem standardisierten Verfahren werden Teile der Zwerchfellmuskulatur oder Blutproben am Schlachtband entnommen. Da jedoch ausschließlich ein *Salmonella* spp. ELISA durchgeführt wird, fällt die genommene Menge Probenmaterial (ca. 500 µl) deutlich geringer aus als bei der unter 2.1.1.1 beschriebenen Probenahme für die Erstellung des Referenzproben-Panels. Für eine einzelne

Microarray-Untersuchung, wie sie in der Feldversuchsphase vorgesehen war, ist diese Probenmenge jedoch mehr als ausreichend. Für die Entnahme werden in allen drei Schlachthöfen mit schlachthofspezifischen Barcodes versehene Fleischsafttrichter (siehe Abbildung 2) bzw. Serumröhrchen desselben Herstellers (Fa. KABE Labortechnik) verwendet.

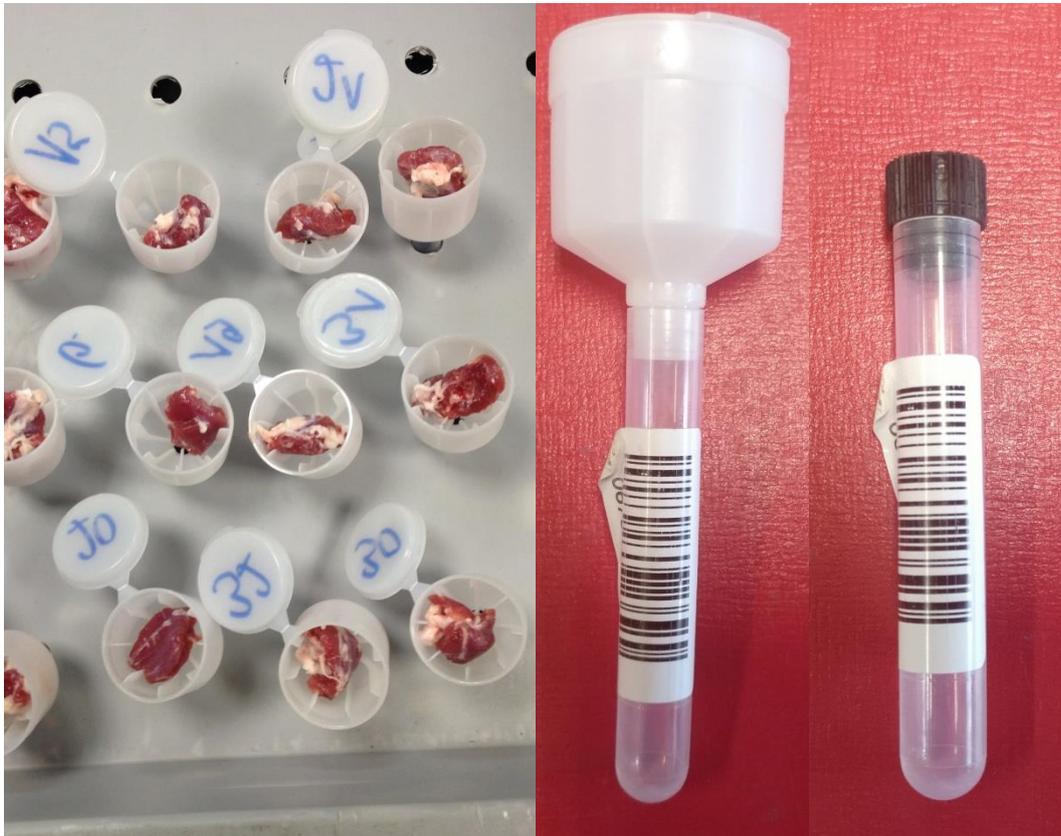


Abbildung 2: Gewinnung von Fleischsaftproben in barcodierten Fleischsafttrichtern

Die Zwerchfellpfeilmuskulatur wird in den Trichter gegeben. Der Trichter wird verschlossen und eingefroren. Beim Auftauen wird der Trichter aufgestellt und der abfließende Fleischsaft in der angehängten Röhre aufgefangen. Zur Lagerung des Fleischsafts wird der Trichter vom Röhrchen entfernt und dieses mit einem Stopfen verschlossen.

Durch Einscannen des Barcodes unmittelbar vor der Probenahme können die Fleischsafttrichter bzw. Serumröhrchen EDV-technisch aufgenommen und dadurch zuverlässig mit den Tier- und bestandsspezifischen Daten (z.B. Schlachtbefunde, Betriebsdaten) verknüpft werden. Im Rahmen des Salmonellen-Monitorings werden diese schweinespezifischen Daten an die Qualitytype GmbH übermittelt und später mit den Ergebnissen der Salmonellenuntersuchung verknüpft.

Für die Auswertung der Projektdaten ist es entscheidend, dass die entnommenen Blutserum- bzw. Fleischsaftproben sicher mit den zugehörigen schweinespezifischen Daten und den Laborergebnissen verknüpft werden. Eine solche Verknüpfung ließ sich technisch nur mithilfe der Einlese-Software des Salmonellen-Monitorings realisieren. Die elektronische Datenerfassung wurde daher im Vorfeld der Probennahmen so konfiguriert, dass die Projektproben im Routineablauf des Salmonellen-Monitorings erfasst und die Informationen zu diesen Proben gesondert gespeichert werden können. Die Probenahme und die Datenweiterleitung für das Salmonellen-Monitoring durften dabei jedoch in keinem Fall gestört werden. Die Datensätze der Projektproben wurden daher in regelmäßigen Abständen manuell per E-Mail in Form von Excel-Tabellen an die Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

übermittelt. Dort wurden die Daten aller Schlachthöfe erfasst und die Barcodenummern zur Eingabe der Microarray-Ergebnisse anschließend an die Untersuchungslabore weitergeleitet. Für die Realisierung der Probenahme wurden zunächst die Anforderungen an die zu konfigurierenden Geräte festgelegt. Dazu fanden mehrere Telefonkonferenzen mit den Mitarbeitern der Schlachthöfe, der Labore und der Erzeugergemeinschaften statt. Im Anschluss daran begannen die Schlachthöfe mit der Umsetzung der technischen Gerätekonfiguration. Folgende Punkte in Bezug auf die Organisation der Anlieferungs- und Probenlogistik wurden im Rahmen dieser Termine ebenfalls geklärt:

Kennzeichnung der Mastschweine:

Am Schlachthof musste sichergestellt werden, dass nur Schweine aus solchen Beständen beprobt werden, die am Projekt beteiligt sind. Auf den landwirtschaftlichen Betrieben wurden daher alle Mastschweine aus einem zu beprobenden Mastdurchgang, kurz vor ihrem Transport zum Schlachthof, mit einem Schlagstempel gekennzeichnet, der für das Projekt um ein Sonderzeichen erweitert wurde. Anhand dieser Kennzeichnung konnten die Schlachtschweine jederzeit als für das Projekt zu beprobende Schweine erkannt werden. Eine versehentliche Beprobung von Schweinen aus anderen Lieferpartien konnte so ausgeschlossen werden. Die Anlieferung der Beprobungspartie wurde durch die Erzeugergemeinschaften ca. 24 Stunden vor jeder Probenahme am Schlachthof angemeldet.

Weiterverarbeitung und Lagerung der Proben:

Die Blutserumproben wurden direkt nach der Entnahme vom Schlachtunternehmen VION (Emstek) an das Labor der LVL in Emstek geliefert. Im Labor wurden die Blutproben zur Serumgewinnung zentrifugiert. Das gewonnene Blutserum wurde bis zur Microarray-Untersuchung eingefroren bei der LVL gelagert.

Im Vergleich zur tiefgefrorenen Zwerchfellmuskulatur weist gewonnener und bei -20 Grad gelagerter Fleischsaft eine wesentlich geringere Haltbarkeit auf. Aus diesem Grund wurden die Fleischsaftproben zuerst eingefroren in den Fleischsafttrichtern gelagert und der Fleischsaft erst unmittelbar vor den Microarray-Untersuchungen gewonnen. Die Lagerung der Fleischsafttrichter erforderte dabei ein hohes Lagervolumen (ca. 1,5 m³). Aufgrund von begrenzten Lagerkapazitäten in den Laboren der LUFA Nord-West und der LVL wurden alle gewonnenen Zwerchfellmuskelproben bis zu Beginn der Microarray-Untersuchungen im Gefrierlager des Schlachtunternehmens Böseler Goldschmaus gelagert.

Der Projektplan sah vor, dass von jedem Schweinemastbetrieb insgesamt 60 Mastschweine aus zwei aufeinanderfolgenden Mastdurchgängen untersucht werden. Um eventuelle Probenverluste beim Transport oder der Probengewinnung ausgleichen zu können, wurde entschieden, dass die tatsächliche Beprobungszahl je Schweinemastbestand bei ca. 75 Tieren liegt. Nach Abschluss aller genannten Vorbereitungen begann das Schlachtunternehmen VION und das Schlachtunternehmen Brand Qualitätsfleisch im Oktober 2017 und das Schlachtunternehmen Böseler Goldschmaus im Dezember 2017 mit den Probennahmen. Bis November 2018 konnten an allen drei projektbeteiligten Schlachthöfen in enger Zusammenarbeit mit den Erzeugergemeinschaften die Probennahmen abgeschlossen werden. Im Anschluss wurden die mit den Barcodes verknüpften Schlachtbefunde der einzelnen Tiere von den Schlachtunternehmen an die Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover übermittelt.

Für die Untersuchungen der Fleischsaftproben im Labor der LUFA Nord-West wurden die im Gefrierlager des OG-Mitglieds Böseler Goldschmaus befindlichen 2.400 Fleischsafttrichter im

Februar 2019 an zwei Terminen abgeholt, aufgetaut und in Zusammenarbeit mit der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover sortiert nach Beständen und Mastdurchgängen bei der LUFA Nord-West wieder eingefroren. Die Untersuchung der Fleischsaftproben mittels Microarray wurde so deutlich vereinfacht.

Die für die Feldversuchsphase nötigen Testreagenzien wurden von Abbott/Alere Technologies und Qiagen/Indical Leipzig GmbH kostenlos zur Verfügung gestellt. Die Testreagenzien Blockierungslösung, Probenverdünner, Konjugat und Substrat (siehe Testprotokoll) wurden an der Tierärztlichen Hochschule angesetzt, in ausreichender Menge abgefüllt und an die Labore versandt.

Die Untersuchung der Feldproben konnte bei der LVL im Mai 2019 und bei der LUFA Nord-West im Juni 2019. Durch das hohe Engagement der beiden Labore die Microarray-Untersuchungen parallel zu ihrer Routinediagnostik durchzuführen, konnte der Arbeitsschritt 5.3 damit innerhalb von weniger als 4 Monaten abgeschlossen werden.

Um die vom Microarray-Reader als Textdateien ausgegebenen Daten aus den Laboren an die Tierärztliche Hochschule Hannover übermitteln zu können, wurden die im Rahmen des Laborvergleiches (Arbeitsschritt 3.4) im Dezember 2018 etablierten Möglichkeiten für einen regelmäßigen Datentransfer genutzt. Die Textdateien der Microarray-Messungen wurden an der Tierärztlichen Hochschule in comma separated value (CSV) Dateien umgewandelt und mit Hilfe von Microsoft Excel und dem Statistik Programm R so weiterverarbeitet, dass für jede auf dem Chip befindliche Antigenkonzentration ein gemessener Signalwert ausgegeben wurde.

Für alle Proben bei der das Microarray-Bild nicht auswertbar war oder der auf dem Microarray befindliche IgG-Kontroll-Spot keinen ausreichend hohen Signalwert zeigte, wurde die Untersuchung einer entsprechenden Reserveprobe des Bestandes (Mastdurchgangs) mit dem Labor abgestimmt.

Die Auswertung der Microarray-Daten des Feldversuchs (Arbeitsschritt 4.6 bis 4.8) konnte bei der Tierärztlichen Hochschule Hannover im Oktober 2019 abgeschlossen werden. Aufgrund der bereits fortgeschrittenen Zeit im Projektverlauf wurde entschieden, auf den Arbeitsschritt 4.5 (Kontrolluntersuchung einzelner Proben mit dem ELISA) zu verzichten. Die ELISA-Tests aus der Referenzprobenahme hatten zu diesem Zeitpunkt im Projekt ihre Haltbarkeit bereits überschritten und wären nur einsatzfähig gewesen, wenn eine erneute Funktionsprüfung bei den ELISA-Testherstellern möglich gewesen wäre.

2.1.1.5 Strategieentwicklungsphase (AP 5)

In der Strategieentwicklungsphase sollten neben der Erstellung der serologischen Bestandsprofile auch Konzepte zur Minimierung- und Produktlenkung entwickelt werden. In Hinblick darauf wurde entschieden, neben den Microarray-Daten auch die Daten aus der Schlachtung sowie Informationen über den Schweine-Mastbestand mit aufzunehmen.

Bei den Probenahmen für die Feldversuchsphase wurden die eingescannten Barcodes mit den entsprechenden Tagesschlachtnummern des Schlachtages für jedes Tier verknüpft und in regelmäßigen Abständen an die Tierärztliche Hochschule Hannover übermittelt. Die Schlachtbefunde der einzelnen beprobten und im Microarray untersuchten Tiere ließen sich so durch die Schlachtunternehmen in ihren Datenbanken abrufen. Die Datenweitergabe der Schlachtbefunde an die Tierärztliche Hochschule Hannover konnte im Juli 2019 von allen drei Schlachtunternehmen abgeschlossen werden. Um die erhobenen Schlachtbefunde einheitlich auswerten zu können, wurden diese durch die Tierärztliche Hochschule Hannover den in Tabelle 4 gezeigten Kategorien zugeordnet. Schlachtbefunde, die keinen eindeutigen Hinweis auf eine Erkrankung des Tieres geben, wurden aussortiert (siehe Tabelle 5). Als Orientierung galten dabei die Vorgaben zur Schlachtbefund-Kategorisierung der QS Qualität und Sicherheit

GmbH (Bonn, Deutschland), der alle am Projekt teilnehmenden Schlachthöfe angeschlossen sind.

Tabelle 4: Aufgenommene und kategorisierte Schlachtbefunde der untersuchten Mastschweine.

Schlachtunternehmen 1	Schlachtunternehmen 2	Schlachtunternehmen 3
Kategorie Lunge		
geringgr. Lungenveränderung	Pneumonie gering	Lunge bis 10% verändert
mittelgr. Lungenveränderung	Pneumonie mittel	Lunge 10-30% verändert
hochgr. Lungenveränderung	Pneumonie hoch	Lunge >30% verändert
Kategorie Brustfell		
geringgrad. Brustfellverwachs.	geringe Brustfellveränderung < 10 %	Brustfellentzündung bis 10 %
mittelgrad. Brustfellverwachs.	Brustfellentzündung mittel 10-30 %	Brustfellentzündung 10-30 %
hochgrad. Brustfellverwachs.	Brustfellentzündung hoch > 30 %	Brustfellentzündung >30 %
Kategorie Herzbeutel		
Herzbeutelverwachsung	Herzbeutelentzündung	Herzbeutel verändert
Kategorie Wurmbefall der Leber		
Leber verwurmt	Wurmlieber	Leber verändert (Wurmbefall)
Kategorie Haut		
Schwanzspitzennekrose Hautveränderung Ohrveränderung Schwanzbeißer Liegebeulen Bissverletzung	Ohr - Nekrose(n), Ohr - Entzündung(en) Liegebeulen/Bursitis >5 cm Durchmesser Bissverletzung am Schwanz	Schwanzveränderung
Kategorie Allgemeinerkrankungen, TK ¹ – Abszesse, Gelenke, Sonstiges		
Allgemeinerkrankung Abszesse TK ¹ Milz verändert Enteritis Nieren entzündlich verändert Darmlymphkn. Mycobakterien Vorderbein Abszess, Gelenke vorne Gelenke hinten	Beckenabszess, Leistenabszess, Wirbelabszess, multiple Abszesse Darmentzündung Leber path. verändert pathologisch verändert Wurmbefall Darm Beckenbruch Rückenmuskelnnekrose Schulter Abszess Kniegelenk untauglich, Hintereisbein untauglich, Schinken untauglich Abszess	Abszesse Darmentzündung Kotelett verworfen Sepsis Bauchfellentzündung Schulter verworfen Schinken beschnitten

¹TK = Tierkörper

Tabelle 5: Nicht aufgenommene Schlachtbefunde.

Schlachtunternehmen 1	Schlachtunternehmen 2	Schlachtunternehmen 3
Geschlinge o. bes. Befund Verunreinigungen Binneneber/Zwitter (SGS) Treibespuren VB (SGS) Schlachtschaden Teilschaden (SGS) vor der Waage Sägeschaden Eber Schlachtschaden/Verunreinigung tauglich	Geschlinge o.b. Befund Fäkalkontamination Binneneber Technisch verändert Schlachtschaden Teilschaden Ebergeruch 0/1/2/3/4 Borsten/Klauen untauglich	Binneneber

Um weitere Informationen über die Schweine-Mastbestände zu erhalten, wurden in Zusammenarbeit mit den Erzeugergemeinschaften Fragebögen erstellt und diese durch die Erzeugergemeinschaften von allen 60 teilnehmenden Mastbeständen abgefragt. Der Fragebogen beinhaltete allgemeine (siehe Tabelle 6) und spezielle Bestandsinformationen bezogen auf den beprobten Mastdurchgang (siehe Tabelle 7).

Tabelle 6: Allgemeine Bestandsinformationen

Mastplätze	Produktions-system	Management	Ventilation Zuluft	Ventilation Abluft	Temperatur-kurve
< 500 500-1000 1000-3000 >3000	geschlossen nur Mast	all in – all out gebäudeweise all in – all out abteilweise kontinuierlich belegt	Deckenventil Wandventil Rieseldecke Rieselkanal Türgang Kombination	Oberflur Unterflur Kombination	(Freitext)

Tabelle 7: Spezielle Bestandsinformationen bezogen auf den beprobten Mastdurchgang

Mortalität	Salmonellen Kategorie	Therapie-häufigkeit	Impfungen Ferkel	Impfungen Mast	Respirator. Erkankungen
< 1 %	1	0-0.1	(Freitext)	(Freitext)	ja
1-2%	2	0.1-0.5			ja, mit Behandlung
> 2 %	3	0.5-1			nein
		1-2			
		2-3			
		3-4			
		> 4			

Das Einholen der Bestandsinformationen durch die Erzeugergemeinschaften wurde im Juni 2019 abgeschlossen und die Bestandsdaten an die Tierärztliche Hochschule Hannover übermittelt.

2.1.1.6 Abschlussphase (AP 6)

In der Abschlussphase des Projektes wurden die Unterlagen zur personalisierten Rückmeldung der serologischen Bestandsprofile für jeden teilgenommenen Bestand erstellt. Es wurde dabei intensiv unter allen OG-Mitgliedern diskutiert, ab welcher Testgenauigkeit Microarray-Ergebnisse an den Bestand zurückgemeldet werden können. Im Januar 2020 wurden alle teilnehmenden Landwirte zu einer Abschlussveranstaltung am 28.01.2020 in Bakum (Vestrup) eingeladen und die Ergebnisse präsentiert und diskutiert.

Der Abschlussbericht wurde im Februar 2020 erstellt und gemeinsam mit dem letzten Auszahlungsantrag zum 15.02.2020 der Landwirtschaftskammer Niedersachsen übermittelt.

2.1.2 Darstellung der wichtigsten finanziellen Positionen

Im Rahmen der halbjährlichen Festsetzungen der Auszahlungen wurde, wie unter 1.6 erwähnt, zwischen zwei unterschiedliche Zuschussarten unterteilt. Beide Zuschussarten wurden zu 100 % gefördert. Die insgesamt geförderte Summe in Höhe von 413.970,41 € teilte sich dadurch wie folgt auf:

Zuschuss nach Nr. 2.1.1 der EIP-Richtlinie für Maßnahmen der laufenden Zusammenarbeit einer OG:

10.496,35 €

Zuschuss nach Nr. 2.1.2 der EIP-Richtlinie für Maßnahmen der Durchführung von Innovationsprojekten:

403.474,06 €.

Die wichtigsten finanziellen Positionen innerhalb des Zuschusses für die Durchführung von Innovationsprojekten waren Personalkosten und Kosten für Material- und Bedarfsmittel. Von allen OG-Mitgliedern gemeinsam wurden insgesamt Personalkosten in Höhe von 312.797,33 € abgerufen. Für Material- und Bedarfsmittel wurden insgesamt 85.568,36 € verwendet. Darunter fielen unter anderem Kosten für die bei Abbott/Alere Technologies GmbH hergestellten Microarrays sowie die von der Indical Bioscience GmbH hergestellten ELISA-Tests und Antigene. Diese konnten zu Forschungszwecken zum Selbstkostenpreis erworben werden. Die von IDvet (Grabels, Frankreich) und dem Institut Virion-Serion GmbH (Würzburg, Deutschland) hergestellten Antigene wurden kostenlos zur Verfügung gestellt.

2.2 Detaillierte Erläuterung der Situation zu Projektbeginn

2.2.1 Ausgangssituation

Fleischsaft- und Blutserumproben von Schlachtschweinen aus verschiedenen Mastbeständen, im Sinne der oben beschriebenen Multiserologie, wurden bereits in einem ersten Versuchsansatz (sog. proof of principle) durch Meemken und Blaha (2011) beschrieben und in ihrer Untersuchung mittels ELISA-Test praktisch erprobt. Der Vergleich der ELISA-Ergebnisse von Serum und Fleischsaft als Probenmaterial konnte eine Gleichwertigkeit von Serum und Fleischsaft als Probenmaterial zeigen (Meemken und Blaha, 2011). Serologische Bestandsprofile wurden in einer nachfolgenden Studie für 49 Schweinebestände mittels ELISA-Tests mit Fleischsaft als Probenmaterial für die Erreger von vier Zoonosen und drei

Produktionserkrankungen erstellt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine serologische Risikokategorisierung von Schweinebeständen hinsichtlich Zoonosen und Produktionskrankheiten sinnvoll ist, wenn sie für risikobasierte Entscheidungen im Rahmen der Fleischuntersuchung und im Rahmen des Herdengesundheitsmanagements herangezogen wird (Meemken et al., 2014).

Darüber hinaus wurden in einem BMEL geförderten Forschungsprojekt von der Stiftung Tierärztliche Hochschule in Zusammenarbeit mit der Fa. Abbott (ehemals Alere Technologies GmbH) und der Fa. Indical Bioscience (ehemals QIAGEN Leipzig GmbH) zur Diagnostik von Zoonoseerregern und Produktionskrankungen erste funktionsfähige Microarrays entwickelt und in kleiner Menge für wissenschaftliche Zwecke produziert (BLE-Förderkennzeichen: 2811HS013) (Hahne, 2014). Die in diesem Projekt erzielten, zum Teil sehr hohen, Testgenauigkeiten rechtfertigten eine weiterführende experimentelle Entwicklung des schweinespezifischen Microarrays. Dabei sollte erprobt werden, ob sich die Microarray-Technologie tatsächlich für die Durchführung im Rahmen der Massenserologie eignet und ihre Anwendung in veterinärmedizinische Diagnostiklabore integrierbar ist.

2.2.2 Projektaufgabenstellung

Durch die Kooperation von zwei Erzeugergemeinschaften als Vertreter der 60 am Projekt beteiligten Landwirte, drei Schlachthöfe, in denen die Probenahme erfolgt, zwei Diagnostiklaboren mit Möglichkeiten zur automatisierten Probenabarbeitung sowie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover als forschende und koordinierende Einrichtung sollen folgende Aufgaben interaktiv gelöst werden:

- a) Der bereits in einer Vorstudie entwickelte Microarray wird um ausgewählte Antigene erweitert und nach Validierung unter Zuhilfenahme von entsprechenden single-ELISA-Tests in ein anwendungsfreundliches 96-well Format überführt.
- b) In den zwei unterschiedlichen Dienstleistungslaboren werden die Microarrays im Hinblick auf eine Automatisierbarkeit und damit auch auf die Routineeinsatzfähigkeit überprüft.
- c) Von jedem der am Projekt beteiligten Schweinemastbestände werden Proben am Schlachthof entnommen und mit dem Microarray auf das Vorkommen von Antikörper gegen Zoonose-Erreger und Erreger von Produktionskrankheiten untersucht und zu serologischen Bestandsrisikoprofilen zusammengestellt. So werden sowohl die Interessen der Landwirte (Urproduktion) als auch die Interessen der Schlachthöfe und Fleisch verarbeitenden Betriebe (Verarbeitung) bedient und verknüpft. Die Probenentnahme am Schlachthof ist praxisnah und belastet die lebenden Tiere nicht.
- d) Die serologischen Bestandsrisikoprofile werden in Zusammenarbeit mit der Tierärztlichen Hochschule von den Erzeugergemeinschaften und den Schlachthöfen ausgewertet, den Landwirten rückgemeldet und Interventions- und Produktlenkungsmaßnahmen exemplarisch erarbeitet.
- e) Die Ergebnisse werden allen Interessengruppen auf geeignete Weise zugänglich gemacht.

2.3 Ergebnisse der OG in Bezug auf

2.3.1 Wie wurde die Zusammenarbeit im Einzelnen gestaltet?

Der fachliche Austausch zwischen den OG-Mitgliedern erfolgte hauptsächlich in Form von E-Mail-Kontakt und in Telefonaten. Insbesondere in der Anfangsphase des Projektes fanden mehrere Projekttreffen statt, um die Zusammenarbeit und den fachlichen Austausch der OG-Mitglieder zu fördern.

Die Erzeugergemeinschaften und die Schlachthöfe waren bereits vor dem Projektstart gut miteinander vernetzt, so dass die Zusammenarbeit für sie selbstverständlich war. Für eine möglichst kongruierende Untersuchung der Microarrays reisten die Labormitarbeiter aller drei Labore zu einem gemeinsamen Labortraining nach Jena und tauschen sich infolge intensiv telefonisch über die Microarray-Untersuchungen aus. Wann immer es erforderlich war, reisten die Mitarbeiterinnen der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover persönlich zu den OG-Mitgliedern, um diese bei der Umsetzung von Teilarbeitsschritten zu beraten und zu unterstützen.

Der fachliche Austausch zwischen der Projektkoordinatorin Frau Prof. Diana Meemken, Herrn Prof. Matthias Greiner und den beiden Projekt-Mitarbeiterinnen Frau Dr. Sylvia Mitrenga und Frau Katharina Loreck erfolgte in Form von regelmäßigen persönlichen und telefonischen Besprechungsterminen. Nachdem Institutsleiter Herr Prof. Günther Klein im Dezember 2016 verstarb, standen am Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zuerst Frau Prof. Corinna Kehrenberg und ab April 2019 Frau Prof. Madeleine Plötz als Ansprechpartner für das Projekt zur Verfügung.

2.3.2 Was war der besondere Mehrwert bei der Durchführung des Projektes als OG?

Erst durch die intensive Zusammenarbeit als Operationelle Gruppe konnten alle beschriebenen Arbeitsschritte realisiert und die einzelnen Projektmeilensteine erreicht werden. Dabei unterstützten sich die einzelnen OG Mitglieder Arbeitspaket und Aufgaben übergreifend.

Für die Akquise von Antigenen erwies es sich als vorteilhaft, Diagnostiklabore als OG-Mitglied zu haben, die mit den Herstellern von veterinärmedizinischen Tests gut vertraut sind. Die Akquise von Landwirten für das Projekt durch zwei Erzeugergemeinschaften erwies sich ebenfalls als vorteilhaft, da diese bei den Landwirten vor Ort sind und ein besonderes Vertrauensverhältnis zu den Landwirten pflegen. Eine telefonische Akquise seitens der Tierärztlichen Hochschule für das Projekt hätte deutlich mehr Zeit in Anspruch genommen. Die Zusammenarbeit mit den Schlachtunternehmen ermöglichte es, die elektronischen Systeme vor Ort zu nutzen und die Probennahmen schnell und effizient umzusetzen.

Bei der Organisation der Beprobungslogistik für die Feldversuchsphase haben sich die einzelnen OG-Mitglieder im Besonderen gegenseitig unterstützt. Des Weiteren waren im Arbeitsschritt der Erstellung der Fragebögen die Zusammenarbeit zwischen der Tierärztlichen Hochschule und den beiden Erzeugergemeinschaften von großer Bedeutung. Durch ihre langjährige Erfahrung in der Schweinefleischproduktion konnten die Erzeugergemeinschaften ein gezieltes Abfragen an Bestandsinformationen sicherstellen. Durch ihren direkten Kontakt zu den Landwirten konnten die Erzeugergemeinschaften das Ausfüllen der Fragebögen schneller und ausführlicher umsetzen, als es allein durch die Tierärztliche Hochschule möglich gewesen wäre.

Insgesamt bot die Zusammenarbeit als OG die Möglichkeit, fachliche Informationen schnell und unkompliziert zwischen den OG-Partnern auszutauschen. Die sehr unterschiedlichen fachlichen Sichtweisen wirkten sich dabei äußerst positiv auf die Planung der einzelnen

Arbeitsschritte aus und die gesamte Realisierung des Projektes konnte effizienter durchgeführt werden.

Außerdem bestand als OG die Möglichkeit, sich innerhalb des EIP-Netzwerkes mit anderen OGs auszutauschen. So konnten beispielsweise beim EIP-Workshop „Schweinehaltung“ auf Haus Düsse (Bad Sassendorf, NRW) interessante Kontakte geknüpft und im Fachkreis Ergebnisse und Ideen zum Projekt „Multiserologie via Microarray“ diskutiert und ausgetauscht werden.

2.3.3 Ist eine weitere Zusammenarbeit der Mitglieder der OG nach Abschluss des geförderten Projektes vorgesehen?

Eine nachfolgende Zusammenarbeit aller acht OG-Mitglieder in genau dieser Konstellation ist vorerst nicht vorgesehen. Aufgrund der sehr guten Zusammenarbeit sind jedoch Kooperationen in weiteren Forschungsprojekten sehr wahrscheinlich.

2.4 Ergebnisse des Innovationsprojektes

2.4.1 Zielerreichung

Alle im Projektplan festgelegten Meilensteine wurden erreicht.

Der Arbeitsschritt der automatisierten Bearbeitung der Microarrays im 96-well Format musste auf eine Bearbeitung mittels elektronischer Mehrkanalpipette abgeändert werden. Des Weiteren konnte der Punkt der ELISA-Nachkontrollen von Microarray-Ergebnissen aus der Feldversuchsphase nicht durchgeführt werden, um den bereits um 6 Monate verlängerten Projektzeitrahmen einhalten zu können. Der Einfluss dieser beiden Punkte in Hinblick auf das Gesamtziel war jedoch von untergeordneter Bedeutung.

2.4.2 Abweichung zwischen Planung und Ergebnis

Insgesamt haben sich nicht so viele Antigene auf dem Microarray als funktional erwiesen, wie ursprünglich erwartet. Für Antigene, die keine Funktionalität aufwiesen, müssten andere Antigene ausprobiert werden. Für Antigene mit moderaten Testgenauigkeiten müssten weitere Versuche zur Verbesserung der Antigenbindungen an der Microarray-Oberfläche durchgeführt werden. Insgesamt war es überraschend, dass die Standard-Formulierungen der Antigene, die von denselben Antigenherstellern stammten, zu so unterschiedlichen Ergebnissen auf dem Microarray führten. Eindeutige Rückschlüsse auf die Art des Antigens (z.B. nativ, LPS, rekombinant) konnten dabei nicht gezogen werden.

Aufgrund der Tatsache, dass alle Erreger von Produktionserkrankungen nur moderate Testgenauigkeiten aufwiesen, konnten den Landwirten keine Ergebnisse in Bezug auf diese Erreger zurückgemeldet werden.

Eine Umsetzung der ELISA-Nachkontrollen aus der Feldversuchsphase ist, genauso wie weitergehende Auswertungen des Feldversuchs, auch nach Ende der offiziellen Projektlaufzeit am Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit geplant. Die Ergebnisse des Feldversuchs sollen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht werden, um diese für die Wissen- und Landwirtschaft nutzbar zu machen.

2.4.3 Projektverlauf

2.4.3.1 Vorbereitungsphase (AP 1)

Erstellung eines Referenzproben-Panels für Microarray-Untersuchungen

Für die insgesamt 184 Serumproben, die mit 10 unterschiedlichen ELISA Tests für die Erstellung des Referenzproben-Panels untersucht wurden, wurden die in Tabelle 8 dargestellten Ergebnisse erzielt:

Tabelle 8: Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen mit Serum

ELISA-Test	positiv	negativ	fraglich
<i>T. gondii</i>	5	179	
<i>Trichinella</i> spp.	0	184	
<i>Y. enterocolitica</i>	90	94	
Hepatitis E virus	89	95	
<i>M. avium</i>	13	156	15
<i>M. hyopneumoniae</i>	120	43	21
<i>A. pleuropneumoniae</i>	119	63	2
Influenza A virus	65	119	
<i>Salmonella</i> spp.	62	122	
PRRSV	128	56	

Für drei ELISA-Tests war für die Ergebnis-Interpretation ein fraglicher Bereich vorgesehen. Für die Verwendung der ELISA-Ergebnisse in der ROC-Analyse wurde der Cut-Off in Bezug auf diese ELISA-Tests auf die Mitte des fraglichen Bereichs gesetzt.

Dabei ist zu beachten, dass für die ELISA-Untersuchung gezielt Bestände mit gesundheitlichen Problemen beprobt wurden und durch die in Tabelle 8 dargestellten Ergebnisse keinesfalls Rückschlüsse auf Prävalenzschätzungen gezogen werden dürfen.

Für die Microarray-Untersuchungen wurden im Anschluss 88 Proben für die Validierung im ArrayTube und im 96-well Format wie folgt ausgewählt: Erst wurden die Proben mit dem minimalsten, der maximalsten und drei Werten, die am nächsten zum ELISA-Cut-Off liegen, von jedem einzelnen ELISA-Test in das Referenzproben-Panel aufgenommen. Darüber hinaus wurde die Spannweite vom 5 % bis zum 95 % Perzentil von jedem ELISA-Test in acht gleich große Intervalle unterteilt. Die Serumproben, die am nächsten zu den jeweiligen Intervallgrenzen lagen, wurden von jedem ELISA-Tests ebenfalls für das Referenzproben-Panel ausgewählt. Diese Auswahlkriterien wurden für jeden Erreger gleich angewendet, so dass Proben anhand der Kriterien mehrfach ausgewählt werden konnten. In Abbildung 3 ist die Auswahl für den ELISA-Test von *Salmonella* spp. als Beispiel dargestellt. Dieses Vorgehen wurde angewandt, um den Messbereich jedes einzelnen ELISA-Tests optimal abzudecken und den Microarray basierend auf dem tatsächlichen Auftreten von Antikörpern in der Zielpopulation zu entwickeln.

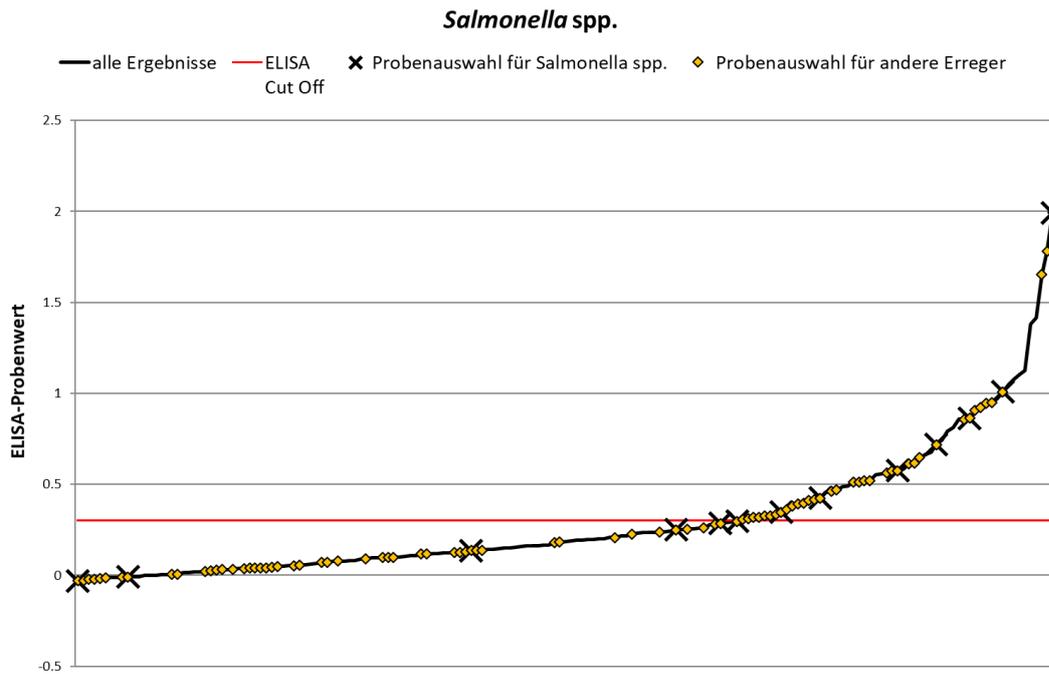


Abbildung 3: Referenzprobenauswahl für *Salmonella* spp.

Die koinzidenzielle Auswahl für mehrere Erreger resultierte in 88 ausgewählten Proben. Diese Proben wurden durch zwei per Zufall ausgewählte Proben plus den zusätzlich für *T. gondii* und *T. spiralis* (siehe 2.1.1.1) akquirierten Proben ergänzt. Die Referenzprobenauswahl wurde ausschließlich anhand der Serum-ELISA Ergebnisse durchgeführt. Für die Microarray-Untersuchungen mit Fleischsaft wurde entsprechend die gepaarte Probe verwendet. Die ELISA Ergebnisse des gesamten Referenzproben-Panels sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: ELISA-Ergebnisse des Referenzproben-Panels

ELISA	Referenzproben	
	positiv	negativ
<i>T. gondii</i>	25(S) 12(FS) *	85
<i>Trichinella</i> spp.	9 *	90
<i>Y. enterocolitica</i>	39	51
Hepatitis E virus	44	46
<i>M. avium</i>	14	76
<i>M. hyopneumoniae</i>	60	30
<i>A. pleuropneumoniae</i>	56	34
Influenza A virus	36	54
<i>Salmonella</i> spp.	38	52
PRRSV	64	26

* Extraproben: *Trichinella* spp.: 9 positive gepaarte Proben (BfR); *T. gondii*: 20 Seren (Diamedis), 7 Fleischsäfte (Parasitologie, TiHo)

Optimierung des Microarray-Testprotokolls

Das finale Testprotokoll für die Microarray-Analyse mit Serum ist in Tabelle 10 dargestellt. Das Testprinzip erklärt sich wie folgt: Zunächst wird eine Schutzschicht von dem Chip entfernt, indem dieser vorgewaschen wird. Als nächstes wird eine Blockierungslösung für 30 Minuten Inkubationszeit zugegeben. Nach dem Entfernen der Blockierungslösung wird die verdünnte Serum-Probe vom Schwein auf den Microarray aufgetragen und in der Probe vorhandene Antikörper können während einer Inkubationszeit von 60 Minuten an den jeweiligen Antigenspot binden. Ein Waschschrift entfernt ungebundenes Probenmaterial und ein Konjugat (Anti-Schwein-IgG-HRP) wird hinzugefügt. Die spezifisch gebundenen Antikörper werden über das Konjugat als Sekundäntikörper gebunden. Ein Waschschrift entfernt ungebundenes Konjugat und die Zugabe eines HRP-Substrats, führt zu einer Färbung aller Antigen-Spots, an denen das Konjugat gebunden hat. Die Substratlösung wurde nach zehn Minuten entfernt und der Microarray zum Auslesen in den ArrayMate Reader gegeben.

Tabelle 10: Testprotokoll für die Microarray-Untersuchung mit Blutserum

	Reagenzien	Verdünnung	Volumen	Temperatur	Schütteln	Zeit
Waschen	Protein Binding Puffer P1 (Alere)	-	500 µl	37 °C	400 rpm	5 min
Blocken	Blocking Lösung (QIAGEN)	-	100 µl	37 °C	300 rpm	30 min
Probe	Serum + Probenverdünner „pigtype blue“ (QIAGEN)	1:50	100 µl	37 °C	-	60 min
Waschen	Protein Binding Puffer P1 (Alere)		350 µl	RT*	-	3 x 0 min
Konjugat	Anti-Pig IgG-HRP (Sigma) + Konjugatstabilisator (QIAGEN)	1:10.000	100 µl	37 °C	300 rpm	30 min
Waschen	Protein Binding Puffer P1 (Alere)	-	350 µl	RT*	-	3 x 0 min
Substrat	HRP Substrat Lösung D1 (Alere)	-	100 µl	RT*	-	10 min

Legende:

*RT = Raumtemperatur

Bei der ersten Übertragung dieses Testprotokolls auf die Untersuchung von Fleischsaft, waren aufgrund von angefärbten Fett- und Proteinrückständen gräuliche Verfärbungen auf den Microarray-Bildern zu sehen, sodass sich die Bilder nicht auswerten ließen. Nach Testprotokolloptimierung (Zentrifugation des Fleischsaftes, Erhöhung der Anzahl an Waschschriften) waren keine Rückstände mehr vorhanden (siehe Abbildung 4).

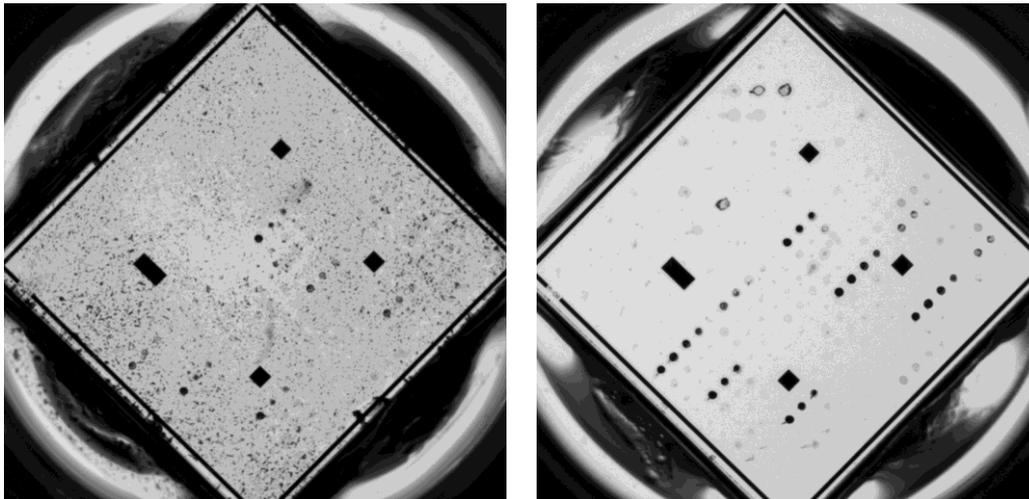


Abbildung 4: Untersuchung einer gepaarten Feldprobe links vor und rechts nach Testprotokolloptimierung

Das finale Testprotokoll für die Microarray-Untersuchung mit Fleischsaft ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Testprotokoll für die Microarray-Untersuchung mit Fleischsaft

	Reagenzien	Verdünnung	Volumen	Temperatur	Schütteln	Zeit
Waschen	Protein Binding Puffer P1 (Alere)	-	500 µl	37 °C	400 rpm	5 min
Blocken	Blocking Lösung (QIAGEN)	-	100 µl	37 °C	300 rpm	30 min
Probe	Serum + Probenverdünner „pigtype blue“ (QIAGEN)	1:2	100 µl	37 °C	-	60 min
Waschen	Protein Binding Puffer P1 (Alere)		350 µl	RT	-	5 x 0 min
Konjugat	Anti-Pig IgG-HRP (Sigma) + Konjugatstabilisator (QIAGEN)	1:10.000	100 µl	37 °C	300 rpm	30 min
Waschen	Protein Binding Puffer P1 (Alere)	-	350 µl	RT	-	5 x 0 min
Substrat	HRP Substrat Lösung D1 (Alere)	-	100 µl	RT	-	10 min

Legende:

*RT = Raumtemperatur

Für die Untersuchung im 96-well Format, wurden bei den oben abgebildeten Testprotokollen anstatt Volumina von 500 µl beim Vorwaschen und 350 µl bei allen anderen Waschschritten, jeweils immer 150 µl Protein Binding Puffer P1 verwendet.

2.4.3.2 Erste Versuchsphase (AP 1)

Die Validierung des Microarrays im ArrayTube Format erfolgte anhand der in Tabelle 9 dargestellten definierten Blutserum- und Fleischsaftproben. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde für jede getestete Antigen-Konzentration die Sensitivität (Wahrscheinlichkeit für ein positives Testergebnis, bei einem serologisch positiven Tier) und die Spezifität (Wahrscheinlichkeit für ein negatives Testergebnis, bei einem serologisch negativen Tier) auf Grundlage des ELISA-Ergebnisses als Referenztest errechnet. Um den Grenzwert (Cut-Off) für die Unterscheidung von positiven zu negativen Ergebnissen zu setzen, wurden sogenannte „Receiver-Operating-Characteristic“-Kurven (ROC-Kurven) erstellt. ROC-Kurven werden erstellt, indem die Richtig-Positiv-Rate (Sensitivität) gegen die Falsch-Positiv-Rate (1-Spezifität) für mögliche Grenzwerte aufgetragen wird. Ziel ist es, den Grenzwert mit dem besten Kompromiss aus Sensitivität und Spezifität abzuleiten. Ein perfekter Test erzeugt eine Kurve, die sehr nah an der linken oberen Ecke des Diagrammes verläuft. Dies würde bedeuten, dass der Microarray alle Blutseren bzw. Fleischsäfte mit positivem ELISA-Ergebnis als solche erkannt (Trefferquote 100%) und kein negativer Test fälschlicherweise als positiv klassifiziert wird (Falsch-Positiv-Rate von 0%). Hätte das Antigen auf dem Microarray keine Entscheidungskraft, würde die ROC-Kurve auf der diagonalen Achse liegen, was einer Zufallsentscheidung entsprechen würde.

Exemplarisch sind in Abbildung 5 die ROC-Kurven von *Y. enterocolitica* und *Salmonella* spp. Für die Untersuchung im ArrayTube Format mit Serum dargestellt.

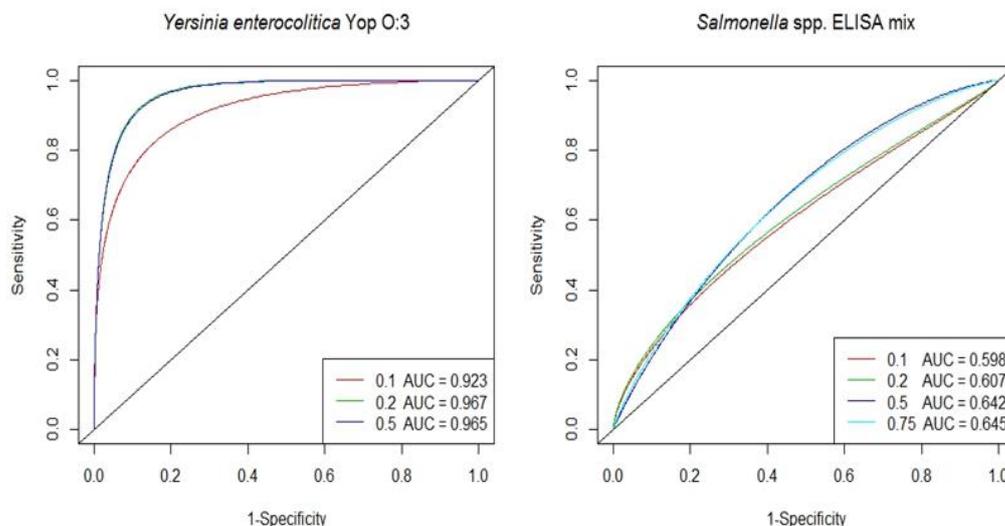


Abbildung 5: ROC-Kurven für unterschiedliche Antigen-Konzentrationen für *Y. enterocolitica* (links) und *Salmonella* spp. (rechts) bei der Untersuchung mit Serum im ArrayTube Format

Die Fläche unterhalb der ROC-Kurve (area under curve, kurz: AUC) ist ein Maß für die Qualität des Tests. Ein Test ohne Fehlklassifikation hätte einen AUC-Wert von 1. Weitere Testqualitäten lassen nach Gardner and Greiner (2006) aus dem AUC-Wert wie folgt interpretieren:

- Niedrige Testqualität: AUC-Wert 0,5 - 0,7
- Moderate Testqualität: AUC-Wert 0,7 – 0,9

- Hohe Testqualität: AUC-Wert 0,9 - 1

Die berechneten antigenspezifischen AUC-Werte (mit 95% Konfidenzintervall), die Sensitivitäten, die Spezifitäten und die Grenzwerte im ArrayTube Format sind in Tabelle 12 dargestellt. Die Ergebnisse beziehen sich auf die Antigenkonzentrationen, mit der für jedes Antigen der höchste AUC-Wert erreicht wurde

Tabelle 12: Ergebnisse der ROC-Analyse für Serum und Fleischsaft im ArrayTube Format

Erregerantigen	Serum				Fleischsaft			
	AUC (95 % CI)	Sensitivität	Spezifität	Grenzwert ¹	AUC (95 % CI)	Sensitivität	Spezifität	Grenzwert ¹
<i>Toxoplasma gondii</i>	0.907 (0.819-0.995)	0.84	0.953	0.112	0.892 (0.679-1)	0.8	1	0.311
<i>Trichinella spiralis</i>	0.538 (0.323-0.753)	0.444	0.756	0.008	0.588 (0.457-0.719)	1	0.344	0.005
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Qiagen)	0.861 (0.784-0.939)	0.872	0.765	0.032	0.841 (0.752-0.93)	0.846	0.804	0.02
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Serion)	0.967 (0.934-1)	0.923	0.941	0.195	0.915 (0.857-0.972)	0.949	0.804	0.078
Hepatitis E virus	0.608 (0.491-0.725)	0.909	0.326	0.081	0.608 (0.491-0.726)	0.773	0.435	0.005
<i>Mycobacterium avium</i>	0.797 (0.685-0.909)	0.857	0.671	0.024	0.578 (0.4-0.756)	0.5	0.724	0.006
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	0.942 (0.887-0.996)	0.983	0.8	0.197	0.925 (0.869-0.98)	0.879	0.931	0.373
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	0.766 (0.66-0.873)	0.804	0.706	0.025	0.769 (0.665-0.873)	0.804	0.636	0.165
Influenza A virus	0.625 (0.506-0.743)	0.694	0.556	0.012	0.571 (0.447-0.694)	0.333	0.852	0.018
<i>Salmonella</i> spp. ELISA mix	0.645 (0.529-0.76)	0.289	0.942	0.333	0.627 (0.504-0.75)	0.395	0.923	0.251
<i>Salmonella</i> spp. self-made mix	0.568 (0.445-0.692)	0.237	0.962	0.541	0.601 (0.476-0.725)	0.342	0.962	0.421
PRRS virus ELISA mix	0.733 (0.624-0.841)	0.607	0.808	0.196	0.897 (0.831-0.963)	0.813	0.923	0.044
PRRS virus self-made mix	0.87 (0.798-0.943)	0.688	0.962	0.225	0.883 (0.815-0.951)	0.781	0.923	0.028

¹ Der Grenzwert wurde so gesetzt, dass der Youden-Index (Sensitivität+Spezifität-1) maximal ist

Insgesamt gelang es, mithilfe des ArrayTube Formates Antikörper gegen Zoonose- und Produktionserkrankungen in Blutserum und Fleischsaft nachzuweisen. Für beide Testmedien wurden moderate bis hohe Testgenauigkeiten für die Zoonoseerreger *T. gondii* und *Y. enterocolitica* und die Produktionserkrankungen APP, PRRS-Virus und *M. hyopneumoniae* erzielt.

Weitergehende Darstellungen der Ergebnisse des ArrayTube Formates in der Untersuchung mit Serum als Probenmaterial sind online (Open Access) in der Publikation von Loreck et al. (2019) einsehbar.

2.4.3.3 Zweite Versuchsphase (AP 2)

Im 96-well Format bilden acht Microarray-Chips, die jeweils von einer eigenen Kavität umschlossen sind, einen sogenannten Microarray-Streifen (ArrayStrip). Die Streifen sind einzeln verpackt und werden zur Bearbeitung in einen Halterahmen eingesetzt. Maximal zwölf Streifen können zusammen in einem Halterahmen gemeinsam bearbeitet und mit dem Auslesegerät (ArrayMate Reader) ausgelesen werden. In diesem Fall stellt der Rahmen mit zwölf eingesetzten Streifen à acht Microarray-Chips eine sogenannte 96-well Platte dar. Zuerst wurde im Labor der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover eine 96-well Platte mit Serumproben und eine 96-well Platte mit Fleischsaftproben untersucht. Die Auswertung der beiden 96-well Platten erfolgte wie bereits unter 2.4.3.2 erwähnt anhand von ROC-Kurven. Die aus den ROC-Kurven errechneten AUC-Werte, die Spezifitäten (Sp), die Sensitivitäten (Se) und die Cut-Off-Werte der einzelnen Antigen-Konzentrationen im 96-well Format sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Ergebnisse der Microarray-Untersuchungen im 96-well Format im Labor der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Antigen- konzentration	96-well Format Serum				96-well Format Fleischsaft			
	AUC	Se	Sp	Cut-Off	AUC	Se	Sp	Cut-Off
APP 1:20	0.672	0.411	0.968	0.057	0.821	0.661	0.906	0.038
APP 1:10	0.642	0.321	0.968	0.07	0.736	0.554	0.906	0.049
APP 1:5	0.71	0.607	0.839	0.095	0.777	0.545	0.938	0.127
M. hyo 1:50	0.656	0.596	0.733	0.017	0.612	0.362	0.9	0.019
M. hyo 1:20	0.713	0.491	0.867	0.055	0.671	0.474	0.9	0.017
M. hyo 1:10	0.836	0.732	0.867	0.097	0.663	0.397	0.9	0.051
PRRSV SM 0.1	0.566	0.719	0.565	0.009	0.589	0.453	0.792	0.009
PRRSV SM 0.2	0.669	0.438	0.87	0.036	0.716	0.406	0.958	0.03
PRRSV SM 0.5	0.529	0.75	0.391	0.012	0.738	0.688	0.708	0.013
PRRSV SM 0.75	0.685	0.422	0.957	0.186	0.876	0.844	0.917	0.032
PRRSV EL 0.1	0.592	0.469	0.739	0.015	0.634	0.344	0.958	0.012
PRRSV EL 0.2	0.626	0.359	0.913	0.037	0.686	0.469	0.958	0.016
PRRSV EL 0.5	0.616	0.672	0.609	0.027	0.796	0.844	0.667	0.015
PRRSV EL 0.75	0.664	0.438	0.913	0.162	0.884	0.719	0.957	0.041
Salmonella SM 0.1	0.443	0.5	0.549	0.129	0.588	0.649	0.588	0.043
Salmonella SM 0.2	0.537	0.361	0.745	0.263	0.631	0.676	0.627	0.075
Salmonella SM 0.5	0.591	0.611	0.588	0.272	0.7	0.757	0.647	0.116
Salmonella SM 0.75	0.624	0.639	0.608	0.286	0.718	0.73	0.686	0.158
Salmonella EL 0.1	0.608	0.194	1	0.164	0.602	0.405	0.843	0.036
Salmonella EL 0.2	0.604	0.333	0.882	0.144	0.611	0.514	0.784	0.048
Salmonella EL 0.5	0.625	0.417	0.784	0.205	0.712	0.622	0.745	0.092
Salmonella EL 0.75	0.657	0.806	0.431	0.117	0.721	0.595	0.784	0.114
Yersinia Serion 0.1	0.834	0.73	0.9	0.041	0.819	0.763	0.78	0.02
Yersinia Serion 0.2	0.948	0.838	0.96	0.057	0.927	1	0.7	0.022
Yersinia Serion 0.5	0.974	1	0.94	0.292	0.942	1	0.78	0.24
Yersinia Qiagen 0.1	0.57	0.622	0.6	0.017	0.507	0.553	0.54	0.006
Yersinia Qiagen 0.2	0.689	0.649	0.74	0.03	0.779	0.684	0.8	0.01
Yersinia Qiagen 0.3	0.824	0.73	0.88	0.041	0.806	0.895	0.62	0.009
HEV 0.25	0.478	0.114	0.977	0.058	0.576	0.568	0.636	0.006
HEV 0.5	0.454	0.591	0.512	0.015	0.601	0.795	0.5	0.008
HEV 0.75	0.483	0.455	0.674	0.023	0.599	0.795	0.409	0.011
Influenza 0.05	0.608	0.618	0.679	0.016	0.588	0.857	0.415	0.003
Influenza 0.1	0.588	0.706	0.528	0.034	0.552	0.771	0.396	0.01
Influenza 0.2	0.621	0.647	0.642	0.017	0.58	0.486	0.755	0.011
M. avium 0.05	0.539	0.538	0.716	0.03	0.579	0.923	0.293	0.01
M. avium 0.1	0.46	0.538	0.676	0.011	0.531	0.538	0.653	0.006
M. avium 0.23	0.548	0.385	0.865	0.041	0.596	0.846	0.413	0.008
Toxo 0.2	0.847	0.667	0.988	0.263	0.955	0.833	0.976	0.169
Toxo 0.5	0.872	0.75	0.951	0.056	0.99	1	0.952	0.064

AUC = Area Under Curve, Se = Sensitivität, Sp = Spezifität, SM = self-made mix, EL = ELISA mix, M. hyo = Mycoplasma hyopneumoniae, HEV = Hepatitis-E-Virus
Die Cut-Off-Werte wurden so gesetzt, dass der Youden Index (Sensitivität+Spezifität-1) maximal ist.

Nachfolgend wurden die von der Tierärztlichen Hochschule im 96-well Format untersuchten Proben an die Labore der LUFA Nord-West und der LVL versandt und dort ebenfalls jeweils eine 96-well Platte mit Serumproben und eine 96-well Platte mit Fleischsaftproben untersucht. Die Ergebnisse der ROC Analysen beider Labore mit beiden Testmedien sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Ergebnisse der Microarray-Untersuchungen im 96-well Format in den projektbeteiligten Laboren

Antigen Konzentration	Lab. 1 Serum		Lab. 2 Serum		Lab. 1 FS		Lab. 2 FS	
	AUC	Cut-Off	AUC	Cut-Off	AUC	Cut-Off	AUC	Cut-Off
APP 1:20	0.803	0.004	0.538	0.015	0.721	0.009	0.749	0.01
APP 1:10	0.725	0.01	0.546	0.011	0.771	0.012	0.674	0.011
APP 1:5	0.842	0.021	0.572	0.002	0.733	0.01	0.723	0.027
M. hyo 1:50	0.785	0.01	0.796	0.014	0.803	0.014	0.665	0.027
M. hyo 1:20	0.597	0.004	0.733	0.007	0.774	0.012	0.602	0.025
M. hyo 1:10	0.593	0.026	0.838	0.056	0.746	0.02	0.665	0.064
PRRSV SM 0.1	0.581	0.002	0.577	0.002	0.477	0.006	0.604	0.005
PRRSV SM 0.2	0.64	0.003	0.53	0.003	0.529	0.016	0.624	0.016
PRRSV SM 0.5	0.625	0.003	0.637	0.022	0.792	0.028	0.778	0.008
PRRSV SM 0.75	0.576	0.01	0.61	0.026	0.883	0.016	0.831	0.021
PRRSV EL 0.1	0.51	0.002	0.51	0.002	0.576	0.004	0.463	0.004
PRRSV EL 0.2	0.6	0.002	0.563	0.003	0.612	0.009	0.658	0.006
PRRSV EL 0.5	0.633	0.027	0.659	0.037	0.895	0.036	0.828	0.01
PRRSV EL 0.75	0.585	0.036	0.611	0.022	0.868	0.031	0.821	0.032
Salmonella SM 0.1	0.518	0.176	0.58	0.02	0.408	0.034	0.508	0.072
Salmonella SM 0.2	0.556	0.25	0.58	0.041	0.633	0.089	0.532	0.036
Salmonella SM 0.5	0.599	0.395	0.606	0.066	0.692	0.114	0.523	0.068
Salmonella SM 0.75	0.627	0.407	0.62	0.074	0.687	0.139	0.516	0.073
Salmonella EL 0.1	0.579	0.027	0.62	0.008	0.612	0.088	0.592	0.028
Salmonella EL 0.2	0.589	0.108	0.622	0.025	0.643	0.045	0.463	0.014
Salmonella EL 0.5	0.607	0.311	0.647	0.032	0.67	0.059	0.49	0.027
Salmonella EL 0.75	0.656	0.137	0.656	0.028	0.692	0.05	0.488	0.028
Yersinia Serion 0.1	0.538	0.009	0.807	0.011	0.832	0.026	0.806	0.01
Yersinia Serion 0.2	0.75	0.026	0.929	0.023	0.963	0.102	0.907	0.029
Yersinia Serion 0.5	0.945	0.19	0.971	0.164	0.98	0.432	0.942	0.179
Yersinia Qiagen 0.1	0.641	0.002	0.565	0.007	0.583	0.008	0.601	0.005
Yersinia Qiagen 0.2	0.613	0.005	0.763	0.007	0.696	0.007	0.612	0.006
Yersinia Qiagen 0.3	0.55	0.004	0.891	0.007	0.867	0.008	0.714	0.009
HEV 0.25	0.542	0.01	0.588	0.002	0.567	0.003	0.514	0.001
HEV 0.5	0.545	0.003	0.594	0.006	0.526	0.004	0.534	0.002
HEV 0.75	0.531	0.001	0.539	0.003	0.535	0.002	0.533	0.003
Influenza 0.05	0.545	0.003	0.642	0.003	0.513	0.012	0.516	0.004
Influenza 0.1	0.526	0.003	0.572	0.005	0.596	0.004	0.66	0.005
Influenza 0.2	0.56	0.007	0.424	0.004	0.557	0.003	0.516	0.005
M. avium 0.05	0.683	0.006	0.478	0.003	0.564	0.004	0.543	0.005
M. avium 0.1	0.796	0.003	0.557	0.003	0.584	0.004	0.657	0.003
M. avium 0.23	0.717	0.007	0.532	0.014	0.58	0.004	0.614	0.006
Toxo 0.2	0.784	0.029	0.745	0.03	0.909	0.058	0.839	0.114
Toxo 0.5	0.825	0.031	0.782	0.03	0.915	0.045	0.881	0.162

FS = Fleischsaft, AUC = Area Under Curve, Se = Sensitivität, Sp = Spezifität, SM = self-made mix, EL = ELISA mix, M. hyo = Mycoplasma hyopneumoniae, HEV = Hepatitis-E-Virus. Die Cut-Off-Werte wurden so gesetzt, dass der Youden Index (Sensitivität+Spezifität-1) maximal ist.

Die an der Tierärztlichen Hochschule im Monocup- und im 96-well Format erzielten hohen Testqualitäten für die Zoonose-Erreger *Y. enterocolitica* und *T. gondii* konnten von beiden Laboren für Blutserum und Fleischsaft bestätigt werden. Für APP wurden, mit Ausnahme der Serum Untersuchung bei der LVL, moderate Testqualitäten erzielt. Für *M. hyopneumoniae* wurden in beiden Laboren im Fleischsaft und im Fall der LUFA für Serum moderate Qualitäten erreicht. Im Fall von PRRSV erzielten beide Labore für Fleischsaft moderate und für Serum geringe Testgenauigkeiten.

Zur Überprüfung der Übereinstimmung zwischen allen drei Laboren wurden Cohens Kappa-Werte mit entsprechenden 95% Konfidenzintervallen errechnet. Der Cohens Kappa-Wert ist ein statistisches Maß für die Übereinstimmung von zwei Beurteilungen, der die erwartete Häufigkeit von Zufallsübereinstimmungen mitberücksichtigt. Gemäß Landis and Koch (1977) und Hunt (1986) stellen Kappa-Werte zwischen 0,4 und 0,75 eine moderate bis gute Übereinstimmung und Werte über 0,75 eine ausgezeichnete Übereinstimmung dar.

In die Prüfung auf Übereinstimmung mittels Cohens Kappa wurden nur die Antigene einbezogen, für die in allen drei Laboren mindestens eine Sensitivität von 0.6 mit einem minimalen Signalwert von 0.1 als Cut-Off erreicht werden konnte. Dies traf für beide Testmedien auf *T. gondii* und *Y. enterocolitica*, für Serum auf *M. hyopneumoniae* und für Fleischsaft auf APP zu. Die Ergebnisse des Laborvergleiches für Serum und Fleischsaft sind in den Tabellen 15 und 16 dargestellt.

Tabelle 15: Ergebnisse des Laborvergleiches mit Serum

Labor	Antigen	Lab. 1			Lab. 2			Lab. 3		
		Kappa	CI low	CI high	Kappa	CI low	CI high	Kappa	CI low	CI high
Lab. 1	<i>T. gondii</i>				0.941	0.826	1.057	0.728	0.474	0.982
	<i>Y. enterocolitica</i>		x		0.679	0.534	0.824	0.787	0.661	0.912
	<i>M. hyo.</i>				0.019	-0.019	0.058	0.428	0.252	0.603
Lab. 2	<i>T. gondii</i>		n = 94					0.639	0.345	0.934
	<i>Y. enterocolitica</i>		n = 94			x		0.628	0.468	0.788
	<i>M. hyo.</i>		n = 93					0.034	-0.033	0.101
Lab. 3	<i>T. gondii</i>		n = 94			n = 95				
	<i>Y. enterocolitica</i>		n = 94			n = 95			x	
	<i>M. hyo.</i>		n = 93			n = 95				

Lab. = Labor, Kappa = Cohens Kappa-Wert, CI (low/high) = oberes und unteres Konfidenzintervall des Kappa-Wertes, n = Anzahl der gepaarten Ergebnisse aus beiden Laboren

Tabelle 16: Ergebnisse des Laborvergleiches mit Fleischsaft

Labor	Antigen	Lab. 1			Lab. 2			Lab. 3		
		Kappa	CI low	CI high	Kappa	CI low	CI high	Kappa	CI low	CI high
Lab. 1	T. gondii				0.809	0.625	0.993	0.852	0.687	1.017
	Y. enterocolitica		x		0.934	0.86	1.008	0.749	0.618	0.881
	APP				-0.021	-0.064	0.021	0.046	-0.066	0.159
Lab. 2	T. gondii		n = 94					0.84	0.661	1.018
	Y. enterocolitica		n = 94			x		0.748	0.617	0.878
	APP		n = 93					-0.031	-0.064	0.001
Lab. 3	T. gondii		n = 95			n = 94				
	Y. enterocolitica		n = 95			n = 94			x	
	APP		n = 94			n = 94				

Lab. = Labor, Kappa = Cohens Kappa-Wert, CI (low/high) = oberes und unteres Konfidenzintervall des Kappa-Wertes, n = Anzahl der gepaarten Ergebnisse aus beiden Laboren

Der Vergleich mittels Cohens Kappa für *M. hyopneumoniae* und APP zeigte, dass für diese Antigene keine gute Übereinstimmung besteht. Einzig beim Vergleich des *M. hyopneumoniae* Antigens zwischen Labor 1 und Labor 3 wurde eine moderate Übereinstimmung (Kappa=0.428) festgestellt.

Im Gegensatz dazu wurden für die Antigene *T. gondii* und *Y. enterocolitica* zwischen allen drei Laboren hohe Übereinstimmungen festgestellt. In Verbindung mit den Ergebnissen der ROC-Analysen lässt sich schlussfolgern, dass bei einem Antigen die hohe Funktionalität besitzt, die Ergebnisse besser in allen drei Laboren reproduzierbar waren, als bei Antigenen mit moderater Testqualität.

2.4.3.4 Feldversuchsphase (AP 3 und AP 4)

In Bezug auf die Anwendbarkeit des Microarrays im 96-well Format wurde festgestellt, dass die Microarray-Untersuchung leicht in Routine-Diagnostiklabore integrierbar ist und die Abarbeitung einer 96-well Platte im Microarray Format nur geringfügig aufwändiger als die Durchführung eines ELISA-Tests ist. Mit dem in Arbeitspaket 2 erstellten Microarray-Testprotokoll können 96 Schweine in ca. 2,5 Stunden multiserologisch untersucht werden. Das Probenmaterial, das beim Schweine-Salmonellen-Monitoring entnommen wird, ist auf dem Microarray im 96-well Format einsetzbar und auch das Probenvolumen würde für die Untersuchung ausreichen.

Von den in der Feldversuchsphase 3.600 untersuchten Microarrays, waren nur sehr wenige Microarrays nicht auswertbar. Im Labor der LVL mussten 30 von 1.200 (2,5 %) und im Labor der LUFA Nord-West 16 von 2.400 (0,7 %) Proben wiederholt gemessen werden. Dies ist für die Untersuchung von Protein-Microarrays in beiden Fällen eine sehr geringe Ausfallquote. Mit den wiederholten Messungen konnten für alle 60 Schweinemastbestände 60 valide Ergebnisse erreicht werden.

2.4.3.5 Strategieentwicklungsphase (AP5)

Unter den 3.600 untersuchten Proben wurde eine Seroprävalenz von 53 % (95% Konfidenzintervall: 52 % - 55 %) für *Y. enterocolitica* und eine Seroprävalenz von 4 % (95% Konfidenzintervall: 3 % - 5 %) für *T. gondii* ermittelt.

Seroprävalenzen für weitere Erreger können aufgrund der zu geringen Testqualität bzw. der nicht ausreichend hohen Übereinstimmung zwischen den Laboren (in Bezug auf *M. hyopneumoniae* und APP) nicht angegeben werden.

Die im Rahmen der Strategieentwicklungsphase erhobenen Daten der Schlachtbefunde führten zu den in den Abbildungen 7 bis 9 dargestellten Ergebnissen:

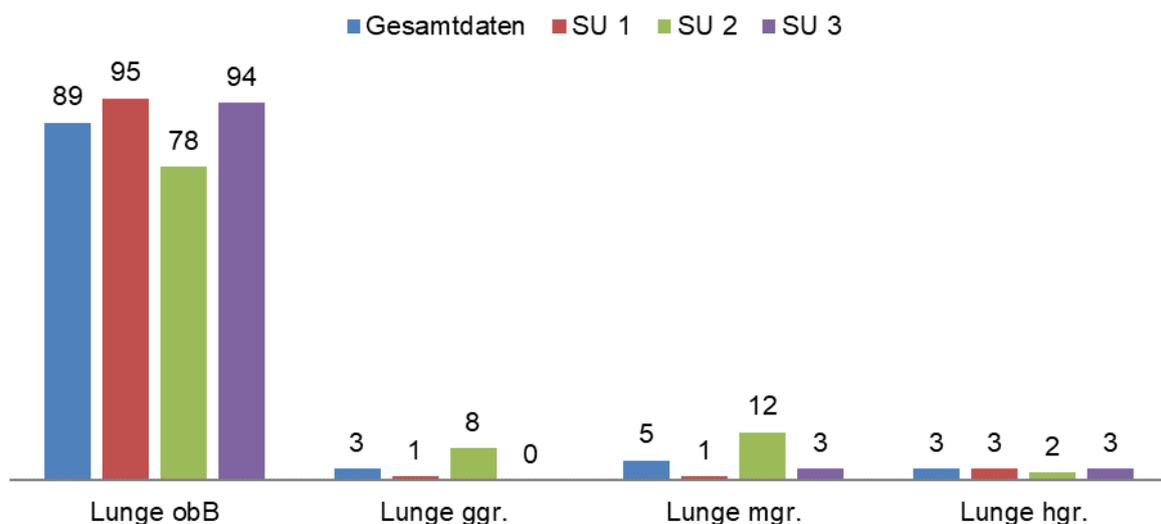


Abbildung 6: Anteil an Tieren mit Lungenbefund unter 3600 Mastschweinen in Prozent %
Darstellung der Gesamtdaten im Vergleich zu den Daten der drei projektbeteiligten Schlachtunternehmen (SU)

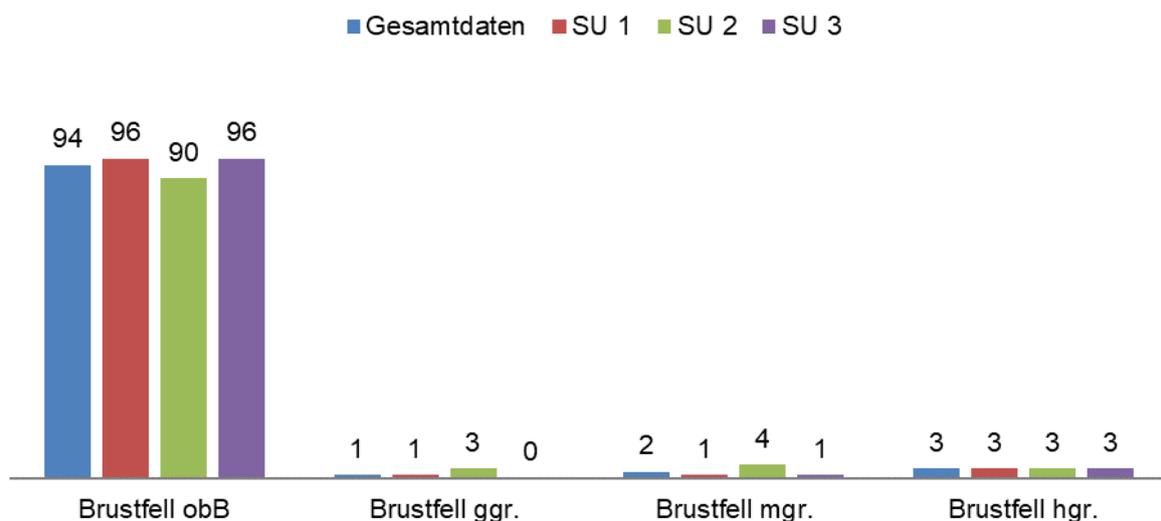


Abbildung 7: Anteil an Tieren mit Brustfellbefund unter 3600 Mastschweinen in Prozent %
Darstellung der Gesamtdaten im Vergleich zu den Daten der drei projektbeteiligten Schlachtunternehmen (SU)

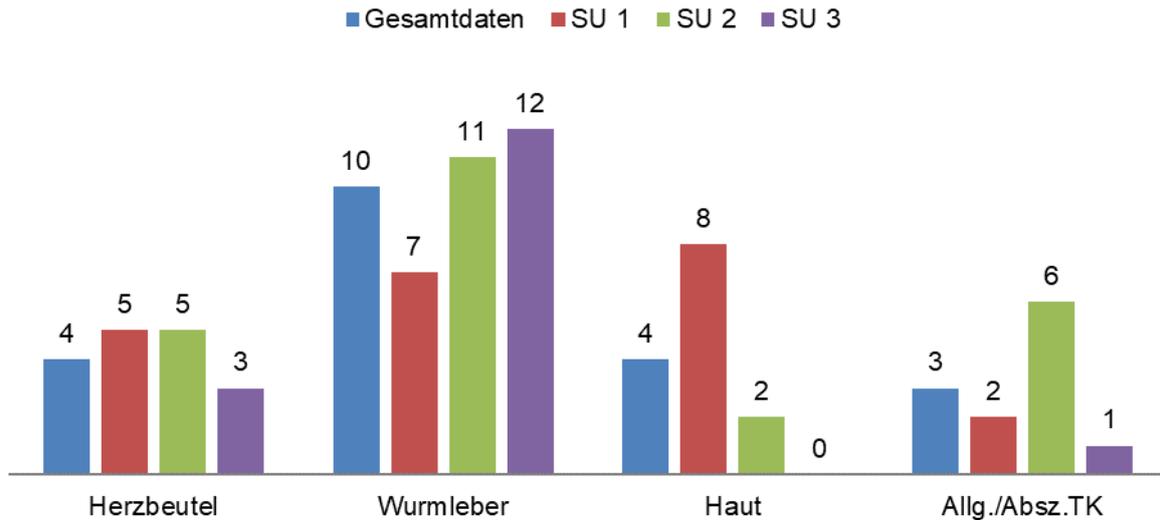


Abbildung 8: Anteil an Tieren mit sonstigen Schlachtbefunden unter 3600 Mastschweinen in Prozent % Darstellung der Gesamt Daten im Vergleich zu den Daten der drei projektbeteiligten Schlachtunternehmen (SU)

Die Quote der Tiere die keinen pathologisch relevanten Befund am Schlachthof zeigten, lag bei 72 %. Unter den 28 % der Tiere mit mindestens einem Befund bezog sich dieser bei 21% aller Tiere auf nur eine Befund-Kategorie (Kategorisierung siehe 2.1.1.5). Insgesamt wurden Schlachthof übergreifend für alle Befundkategorien, die nach den Vorgaben zur Schlachtbefund-Kategorisierung der QS Qualität und Sicherheit GmbH erhoben wurden, sehr einheitliche Befunderhebungen festgestellt.

Eine Auswertung der Schlachtbefunde und Bestandinformationen in Hinblick auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Atemwegserreger war aufgrund der zu geringen Testqualität der Atemwegserreger nicht möglich.

Eine abschließende Regressionsanalyse zwischen dem Auftreten eines Schlachtbefundes, den Bestandinformationen und dem Vorhandensein von Antikörpern gegen oder *T. gondii* oder *Y. enterocolitica* soll im Nachgang des Projektes in Bezug auf Einzeltier- und Herdenebene noch durchgeführt werden.

2.4.3.6 Abschlussphase (AP6)

In der Abschlussphase wurden den Landwirten die Ergebnisse des eigenen Bestandes (hier fiktive Daten) wie folgt schriftlich mitgeteilt:

„Sehr geehrte/r Teilnehmer/in,

vielen Dank für Ihre Teilnahme am Forschungsprojekt „Multiserologie via Microarray“. Anbei erhalten Sie die Ergebnisse, die für die von Ihnen teilnehmende/n VVVO-Nummer/n ermittelt wurden.

Ziel des Projektes war es, ein Testsystem zum simultanen Nachweis von verschiedenen Antikörpern gegen relevante Zoonose- und Atemwegserreger zu entwickeln. Dies ist für *Toxoplasma gondii* und *Yersinia enterocolitica* mit einer sehr hohen Testgenauigkeit gelungen, sodass wir Ihnen den Antikörper-Status hinsichtlich dieser Zoonoseerreger gerne mitteilen möchten.

Es wurden aus zwei (möglichst) aufeinanderfolgenden Mastdurchgängen jeweils 30 Schweine am Schlachtband beprobt und mittels Microarray serologisch untersucht. Der Anteil der positiven Proben (Intra-Herdenprävalenz) ist für Ihren Bestand in der Anlage dargestellt.

Insgesamt haben 60 niedersächsische Schweinebestände am Projekt teilgenommen. Zur Einschätzung der eigenen Intra-Herdeprävalenz innerhalb der Studiengruppe sind in der Anlage die Ergebnisse aller teilnehmenden VVVO-Nr. zusammengefasst dargestellt.

Selbstverständlich werden sämtliche Daten, die im Rahmen dieser Studie erhoben wurden, streng vertraulich behandelt. Eine personen- oder VVVO-Nr. bezogene Darstellung sowie die Weitergabe der Daten an Dritte ist grundsätzlich ausgeschlossen.

Vielen Dank für Ihr Vertrauen. Bei Rückfragen können Sie sich gerne melden.“

Folgende Informationen wurden den teilnehmenden Landwirten (hier beispielhaft der fiktive Bestand VEC 1111) in der bestandsspezifischen Anlage mitgeteilt:

Tabelle 17: Mitteilung der Ergebnisse der serologischen Bestandsuntersuchung

Schlachtdatum	<i>Yersinia enterocolitica</i> *	<i>Toxoplasma gondii</i> *
18. Nov. 2017	96.7 % (29 von 30 Proben positiv)	3.3 % (1 von 30 Proben positiv)
27. Mrz. 2018	100 % (30 von 30 Proben positiv)	0 % (0 von 30 Proben positiv)
gesamt	98.3 % (59 von 60 Proben positiv)	1.7 % (1 von 60 Proben positiv)

* „Infektionen vom Schwein mit *Yersinia enterocolitica* und/oder *Toxoplasma gondii* sind in der Regel klinisch nicht erkennbar und verursachen in der Fleischuntersuchung keine sichtbaren Befunde. Bei *Yersinia enterocolitica* handelt es sich um Bakterien, die beim Verzehr von rohem oder ungenügend erhitztem Schweinefleisch beim Menschen Durchfall, Bauchschmerzen und Fieber hervorrufen können. Bei *Toxoplasma gondii* handelt es sich um Protozoen (Parasiten), für die Katzen den Endwirt und Säugetiere (z.B. Schweine) einen Zwischenwirt darstellen. Eine Infektion mit *Toxoplasma gondii* kann bei immunsupprimierten Personen zu schweren Infektionen führen und bei Infektionen während der Schwangerschaft kann es zum Abort oder zu Missbildungen des Neugeborenen kommen.“

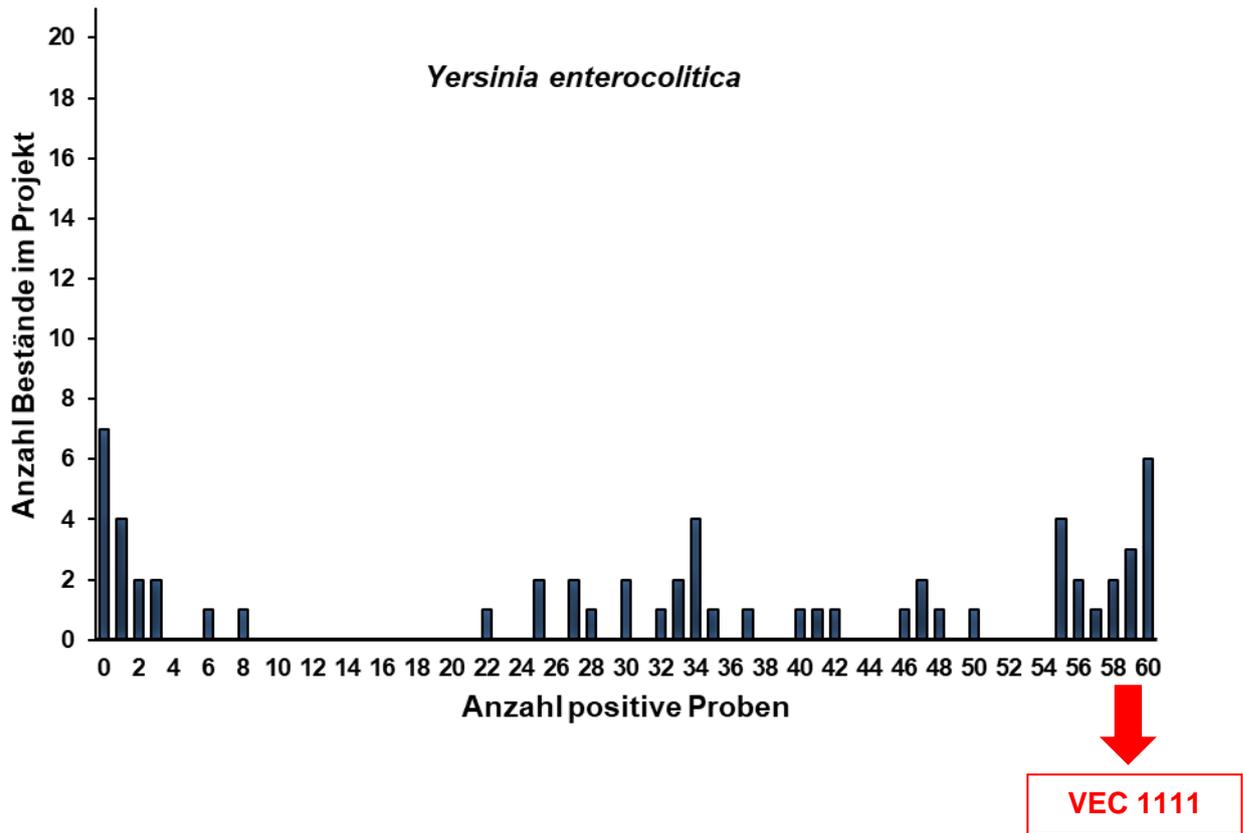


Abbildung 9: Anzahl positiver *Y. enterocolitica* Befunde von 60 untersuchten Tieren pro Bestand. Insgesamt 60 Schweine-Mastbestände haben am Projekt teilgenommen.

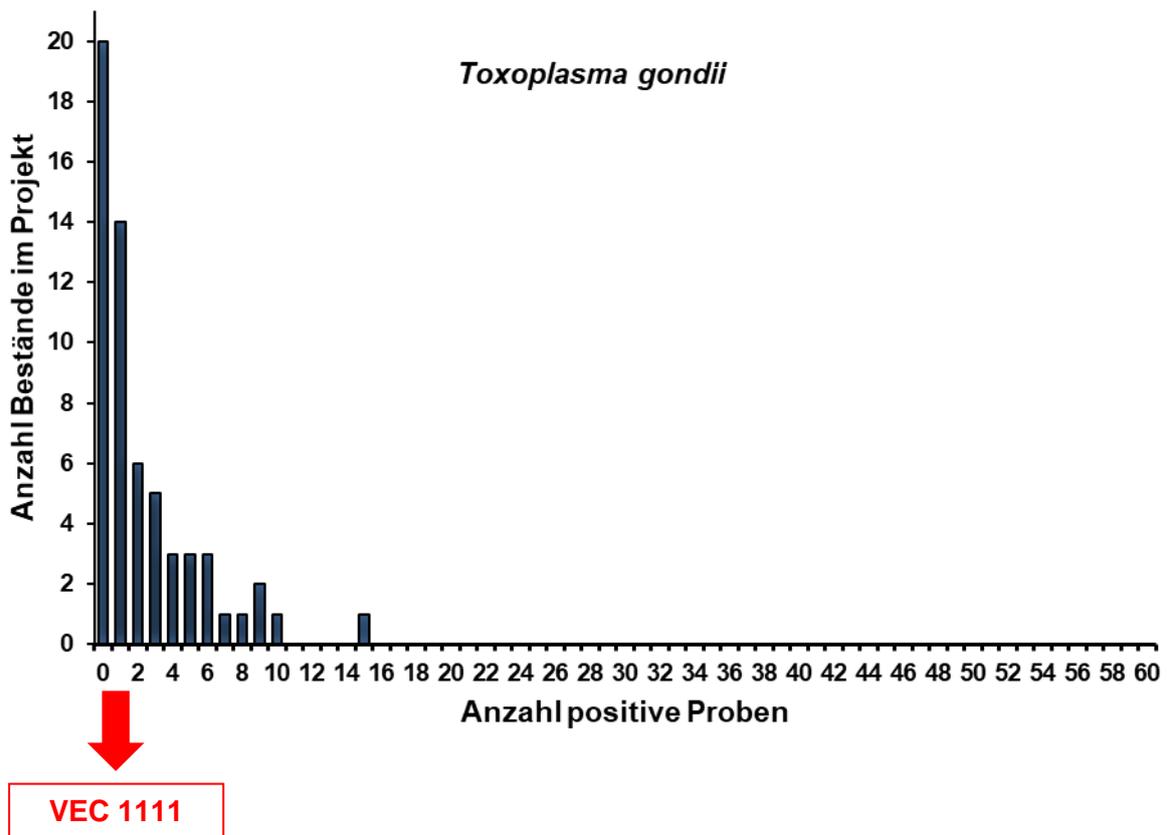


Abbildung 10: Anzahl positiver T. gondii Befunde von 60 untersuchten Tieren pro Bestand. Insgesamt 60 Schweine-Mastbestände haben am Projekt teilgenommen.

2.4.4 Beitrag des Ergebnisses zu förderpolitischen EIP-Themen

Die Operationelle Gruppe „Multiserologie via Microarray“ fokussiert sich in Anlehnung an die „Mitteilung der KOM (2012) 79 final/2“ auf der einen Seite auf den Bereich der „Innovativen Produkte und Dienstleistungen für eine integrierte Versorgungskette“ in der Land- und Ernährungswirtschaft und auf der anderen Seite auf den Bereich der „Lebensmittelqualität, -sicherheit und gesunde Lebensweisen“.

Dabei konnte gezeigt werden, dass eine „Multiserologie via Microarray“ durch ihre Kosteneffizienz und stufenübergreifende Nutzbarkeit für die Tiergesundheits- und Lebensmittelsicherheitsoptimierung entscheidend dazu beitragen kann, die Wertschöpfungskette „Schweinefleischerzeugung“ transparenter und nachhaltiger zu gestalten.

Bezugnehmend auf die in der Niedersächsischen Regionalen Innovationsstrategie für intelligente Spezialisierung (RIS3) genannten Kompetenz- und Spezialisierungsfelder bezieht sich die OG „Multiserologie via Microarray“ auf die „Land- und Ernährungswirtschaft“ mit besonderem Schwerpunkt auf die Qualitätslandwirtschaft.

Innerhalb der OG wurde schwerpunktmäßig das horizontale Handlungsfeld 2 der niedersächsischen RIS3 Strategie zur „Stärkung der Innovationspotentiale im ländlichen Raum“ bearbeitet. Die „Multiserologie via Microarray“ bietet dabei gleichermaßen Lösungsansätze für die unter Punkt 3a und 3d der Anlage 1 genannten Schwerpunktthemen:

- 3a) „Wettbewerbsfähige, Ressourcen schonende und artgerechte Produktionssysteme in der konventionellen und ökologischen Tierhaltung im Hinblick auf die Tiergesundheit, das Tierwohl und Konzepte zur Antibiotikaminimierung“
- 3d) „Produkt- und Prozessinnovationen entlang der landwirtschaftlichen Wertschöpfungskette zur Verbesserung der Lebensmittelsicherheit sowie der Lebensmittelqualität“.

2.4.5 Nebenergebnisse

Insbesondere in der ersten Versuchsphase, in der das „Spotting-Verhalten“ der Antigene untersucht wurde, war es notwendig im Herstellungsprozesses einige Schwierigkeiten zu überwinden. Antigen-Spots begannen direkt nach dem „Spotting“ auf der Oberfläche zu „verlaufen“ bzw. sich so stark zu vergrößern, dass sie mit umgebenden Spots migrierten. Dies konnte durch eine Pufferung der Antigene in eine Pufferlösung, die frei von Detergenzien ist, deutlich reduziert werden. Trotzdem vergrößerten sich die Antigenspots der höchsten Antigenkonzentrationen von PRRSV, *M. hyopneumoniae* und APP weiterhin. Als Ergebnis wurde sie mit größerem Abstand zu umgebenen Antigen-Spots gespottet. Ursächlich dafür könnte eine zu hohe Antigenkonzentration oder das Proteins selbst sein.

Antigene, die im Projektverlauf nicht weiter ausgewertet, deren Spotting-Verhalten sich aber in der ersten Versuchsphase als „unproblematisch“ gezeigt hat, waren die Antigene der einzelnen APP sowie der einzelnen *Salmonella* Serotypen. Eine Serotypisierung wäre für diese beiden Erreger für Schweinebestände sehr interessant.

2.4.6 Arbeiten, die zu keinem Ergebnis geführt haben

Der ursprüngliche Projektplan sah vor, dass die Bearbeitung des 96-well Formates vollautomatisiert in einem sogenannten ELISA-Roboter durchgeführt wird. Diese Vollautomatisierung konnte in der Projektlaufzeit aufgrund der hohen Fehleranfälligkeit der ELISA-Roboter nicht realisiert werden. Bereits minimale Fehlberührungen des Roboters können die Microarray-Oberfläche erheblich beschädigen. In diesem Fall ist eine Auswertung des Tests durch das Auslesegerät nicht mehr möglich. Um solche oberflächlichen Schäden auszuschließen, bedarf es einer sehr genauen technischen Konfiguration des Roboters. Insbesondere im Hinblick auf die Materialkosten eines Microarray-Chips wären häufige Fehler des Roboters im Projekt nicht zielführend gewesen. Hinsichtlich der Untersuchungseffizienz (z.B. Einsparung von Zeit- und Personalkapazitäten) einigten sich die Labore daher im November 2018 darauf, eine „halbautomatisierte“ Lösung unter Einsatz einer elektronischen Mehrkanalpipette umzusetzen.

2.4.7 Mögliche weitere Verwendung von Investitionsgütern

In diesem Projekt wurden keine Investitionskosten beantragt, daher stehen keine Investitionsgüter zur weiteren Verwendung zur Verfügung.

2.5 Nutzen der Ergebnisse für die Praxis

Anhand von „serologischen Bestandsprofilen“ könnten auf Bestandsebene Interventionen zur Verbesserung der Tiergesundheit eingeleitet und auf Schlachthofebene risikoorientierte Entscheidungen bezüglich der weiteren Verarbeitung des Fleisches getroffen werden.

Auf der Ebene der Ernährungswirtschaft könnte anhand von informationsbasierter Produktlenkung die Lebensmittelsicherheit und –qualität in Bezug auf die Erreger *T. gondii* und *Y. enterocolitica* erhöht werden, da Tierbeständen mit einem hohen Risiko für das Vorkommen von Zoonoseerregern identifiziert werden können. Das aus diesen Beständen stammende Fleisch könnte gezielt für nicht sensible Produkte wie Fleischkonserven verwendet werden. Gleichzeitig könnten Beständen mit einem niedrigen Risiko für Zoonose-Erreger, Fleisch für die Herstellung von sensiblen Produkten wie Rohwurst liefern.

2.6 Verwertung und Nutzung der Ergebnisse

Die im Rahmen der Feldversuchsphase generierten serologischen Bestandsprofile wurden an die 60 am Projekt teilnehmenden Schweinemastbestände zurückgemeldet und mögliche Interventionsmaßnahmen mit Schlachthöfen, Erzeugergemeinschaften und Landwirten diskutiert.

2.7 Wirtschaftliche und wissenschaftliche Anschlussfähigkeit

Hinsichtlich der wissenschaftlichen Anschlussfähigkeit hat sich gezeigt, dass sich die Microarray-Technologie sehr gut für die Untersuchung von Tierbeständen eignet. Es ist geplant, weitere Einsatzgebiete der Microarray-Technologie in der Veterinärmedizin zu erproben. Auch ein Einsatz von Microarrays zur Untersuchung von Lebensmitteln ist denkbar. Die während dieses Projektes gesammelten Erfahrungen und Kontakte bieten dafür sehr gute Voraussetzungen.

2.8 Kommunikations- und Disseminationskonzept

Für die Verbreitung der Durchführung und der Ergebnisse des Projektes wurden unterschiedliche Kommunikationswege genutzt:

Wissenschaftliche Publikationen:

- Loreck, K., Mitrenga, S., Meemken, D., Heinze, R., Reissig, A., Mueller, E., Ehrlich, R., Engemann, C. & Greiner, M. 2019. Development of a miniaturized protein microarray as a new serological IgG screening test for zoonotic agents and production diseases in pigs. PLOS ONE, 14, e0217290.
<https://journals.plos.org/plosone/article/authors?id=10.1371/journal.pone.0217290>
- Eine weitere wissenschaftliche Publikation befindet sich zum Berichtszeitpunkt im Review-Prozess.

Wissenschaftliche Tagungen:

- Vortrag bei der RME (Rapid Methods Europe) - Konferenz in Amsterdam
Pingen, S.; Greiner, M.; Klein, G.; Meemken, D. (2016): „Multi-serology via Microarray“
- Vortrag und Veröffentlichung im Abstract-Band bei der 58. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Amtstierärztlicher Dienst und

Lebensmittelkontrolle, Sonderausgabe: 26.-29.09.2017, Programm- und Abstract-Band S. 103, Garmisch-Partenkirchen

Pingen, S., Loreck, K., Kehrenberg, C., Klein, G., Meemken, D., Greiner, M. (2017): „Multiserologie via Microarray“ - Tiergesundheits- und Lebensmittelsicherheitsoptimierung mittels „Chip“

- Posterbeitrag und Veröffentlichung im Abstract-Band bei der 58. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Sonderausgabe: 26.-29.09.2017, Programm- und Abstract-Band S. 227, Garmisch-Partenkirchen
Loreck, K., Pingen, S., Kehrenberg, C., Klein, G., Meemken, D., Greiner, M. (2017): „Multiserologie via Microarray“ – Validierung eines schweinespezifischen Microarrays für Zoonosen und Produktionserkrankungen
- Posterbeitrag und Veröffentlichung im Abstract-Band bei der 59. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz der DVG, Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Sonderausgabe: 25.-28.09.2018, Programm- und Abstract-Band S. 190, Garmisch-Partenkirchen
Loreck, K., Pingen, S., Meemken, D., Greiner, M. (2018): Serologische Diagnostik von Zoonosen und Produktionserkrankungen in Schweinebeständen mittels Protein-Microarray
- Posterbeitrag und Veröffentlichung im Abstract-Band beim National Symposium on Zoonoses Research, Joint meeting of the German Research Platform for Zoonoses and the Research Network Zoonotic Diseases, 17-19 October 2018, Program and Abstracts S.173, Berlin
Loreck, K., Pingen, S., Meemken, D., Greiner, M. (2018): Serological diagnosis of zoonoses and production diseases in pig herds using a protein microarray
- Vortrag und Veröffentlichung im Abstract-Band bei der 19. Fachtagung für Fleisch- und Geflügelfleischhygiene (5.-6.3.2019), Zentrum für Veterinary Public Health, Fachbereich Veterinärmedizin – Institut für Lebensmittelsicherheit und –hygiene, Freie Universität Berlin in Kooperation mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung, Programm- und Abstract-Band S. 15, Berlin
Loreck, K., Mitrenga, S., Meemken, D., Greiner, M. (2019): Simultane serologische Untersuchungen zu Tierkrankheiten und Zoonosen mit dem Microarray
- Vortrag und Veröffentlichung im Abstract-Band bei der 60. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz der DVG, Programm- und Abstract-Band S. 197, Garmisch-Partenkirchen
Loreck, K., Mitrenga, S., Meemken, D., Greiner, M. (2019): Diagnostik für gesunde Schweine und sichere Lebensmittel – Erstellung serologischer Bestandsprofile mittels Microarray

Veranstaltungen im EIP-Netzwerk:

- Vortrag beim bundesweiten DVS-Workshop zum Thema „Schwein“ im April 2018 auf Haus Düsse

- Vortrag beim Workshop für Innovationsdienstleister im Dezember 2018 in Hannover

Weitere Veröffentlichungen:

- Forschungsinformation auf der Website der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
- Meemken, Diana (2016): Multiserologie via Microarray: Diagnostik für gesunde Schweine und sichere Lebensmittel, Beitrag im TiHo-Anzeiger Ausgabe 03/2016, S. 23
- Lüken, Caroline (2017): Schweinekrankheiten effektiv diagnostizieren, Beitrag im Jahresbericht der Landwirtschaftskammer, S. 45

3 Literatur

- GARDNER, I. A. & GREINER, M. 2006. Receiver-operating characteristic curves and likelihood ratios: improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. *Veterinary Clinical Pathology*, 35, 8-17.
- GRUMMER, B., BLAHA, T. & MEEMKEN, D. 2010. VETKOLLEG NUTZTIERE Ausblick auf die virologische und bakteriologische Diagnostik von morgen.
- HAHNE, S. 2014. *Entwicklung und Validierung eines Protein-Microarrays zur simultanen serologischen Untersuchung von Fleischsaftproben auf Erreger von Zoonosen und Produktionskrankheiten beim Schwein. Elektronische Ressource*, Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- HUNT, R. J. 1986. Percent agreement, Pearson's correlation, and kappa as measures of inter-examiner reliability. *J Dent Res*, 65, 128-30.
- LANDIS, J. R. & KOCH, G. G. 1977. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics*, 33, 363-74.
- LORECK, K., MITRENGA, S., MEEMKEN, D., HEINZE, R., REISSIG, A., MUELLER, E., EHRLICH, R., ENGEMANN, C. & GREINER, M. 2019. Development of a miniaturized protein microarray as a new serological IgG screening test for zoonotic agents and production diseases in pigs. *PLOS ONE*, 14, e0217290.
- 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. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 62, 192-199.
- MEEMKEN, D., TANGEMANN, A. H., MEERMEIER, D., GUNDLACH, S., MISCHOK, D., GREINER, M., KLEIN, G. & BLAHA, T. 2014. Establishment of serological herd profiles for zoonoses and production diseases in pigs by "meat juice multi-serology". *Preventive Veterinary Medicine*, 113, 589-598.