



Hochschule Anhalt

Anhalt University of Applied Sciences

Fachbereich Angewandte Biowissenschaften
und Prozesstechnik

PassPork

Nachweis von pathogenen Keimen in Schweinefleisch

Validierung und Ermittlung des Detektionslimits

Bachelorarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Bachelor of Science (B.Sc.)

Anja Zanfrini

Mat. Nr.: 4053544

Studiengang: Lebensmitteltechnologie

Vertiefung: Qualitätssicherung

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Cordes

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Heun

Datum der Abgabe: 03.02.2015

Danksagung

Ich möchte mich bei beiden Gutachtern bedanken und insbesondere bei Frau Prof. Dr. Cordes, da Sie die Betreuung meiner Bachelorarbeit kurzfristig übernommen hat und mir behilflich war.

Herrn Dr. Frettlöh und Herrn Ehm möchte ich für ihre Hilfestellungen im Labor danken. Die Einweisung in das zu bearbeitende Thema und das Arbeitsklima waren sehr gut. Vielen Dank, dass Sie mir die Möglichkeit der Erarbeitung eines spannenden, europaweiten Forschungsprojekts gegeben haben.

Meinen Eltern möchte ich danken, dass sie immer für mich da waren und mich so gut es ging unterstützt haben.

Simone Kambeck, Tobias Holzapfel und Anna Siebigteroth danke ich für die Erstellung meines Pendlerkoffers, der mir jeden Tag den Weg zur Arbeit verschönert hat und mir Kraft zum Durchhalten gegeben hat. Sascha Böhm danke ich für die vielen technischen Ratschläge und die Motivationsprüche. Auch an alle nicht genannten Freunde ein Dank für eure seelische Unterstützung.

Und zu guter Letzt möchte ich Robert Hoffmann danken, der viel Geduld bewiesen hat und mich während des Endspurts immer wieder aufgebaut und motiviert hat.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs-und Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
2 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit.....	3
2.1 Wortlaut der Aufgabenstellung	3
2.2 Erläuterung der Aufgabenstellung.....	3
2.3 Ziel der Bachelorarbeit	4
3 Darstellung relevanter Mikroorganismen in Bezug auf das PassPork-Projekt	5
3.1 Salmonellen	5
3.1.1 <i>Taxonomie, physiologische Merkmale und Habitat</i>	5
3.1.2 <i>Salmonellose</i>	6
3.1.3 <i>Präventionsmaßnahmen</i>	7
3.1.4 <i>Kultureller Nachweis</i>	8
3.2 <i>Escherichia coli</i>	9
3.2.1 <i>Taxonomie, physiologische Merkmale und Habitat</i>	9
3.2.2 <i>Escherichia-coli-Enteritis</i>	9
3.2.3 <i>Präventionsmaßnahmen</i>	10
3.2.4 <i>Kultureller Nachweis</i>	11
4 Darstellung der Funktionsprinzipien moderner, diagnostischer Methoden	14
4.1 Immunologische Verfahren	14
4.2 DNA-basierende Methoden.....	15
4.3 Sensortechnologien.....	17
5 Darstellung des Funktionsprinzips der PassPork-Methode.....	18
6 Material und Methoden	20
6.1 Material für den klassischen, kulturellen Nachweis.....	20
6.1.1 <i>Geräte und Hilfsmittel</i>	20
6.1.2 <i>Puffer, Lösungen, Medien</i>	20

6.1.3 Probenmaterial	20
6.2 Material für die PassPork- / Schwarzlichtmethode	21
6.2.1 Geräte und Hilfsmittel.....	21
6.2.1.1 Versuche zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität.....	21
6.2.1.2 Versuch zur Ermittlung des Detektionslimits	21
6.2.2 Puffer, Lösungen, Medien.....	22
6.2.2.1 Versuche zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität.....	22
6.2.2.2 Versuch zur Ermittlung des Detektionslimits	22
6.2.3 Probenmaterial	22
6.2.3.1 Versuche zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität.....	22
6.2.3.2 Versuch zur Ermittlung des Detektionslimits	22
7 Methoden.....	23
7.1 Experimentelle Durchführung der klassischen, kulturellen Nachweise.....	23
7.1.1 Probenentnahme	23
7.1.2 Probenpräparation im Labor.....	24
7.1.2.1 Prüfung auf Salmonellen.....	24
7.1.2.2 Prüfung auf Escherichia coli	25
7.2 Experimentelle Durchführung der PassPork-/Schwarzlichtmethode	26
7.2.1 Probenentnahme	26
7.2.2 Probenpräparation im Labor.....	27
7.2.3 Erläuterung zur Probenauswertung	28
7.3. Darstellung der Versuchsreihen.....	29
7.3.1 Versuche zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität	29
7.3.1.1 Gestellte Stanzproben von der Quh-Lab	29
7.3.1.2 Am Schlachthof entnommene Stanzproben	30
7.3.1.3 Am Schlachthof entnommene Kratzschwammproben	30
7.3.2 Versuch zur Ermittlung des Detektionslimits.....	30
8 Auswertung der Versuchsreihen.....	32
8.1 Versuche zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität	32
8.1.1 Gestellte Stanzproben von der Quh-Lab.....	32
8.1.2 Am Schlachthof entnommene Stenzen.....	34
8.1.3 Am Schlachthof entnommene Kratzschwammproben	36

8.2 Versuch zur Ermittlung des Detektionslimits.....	38
9 Diskussion	43
9.1 Auswertung der Versuchsreihen.....	43
9.1.1. Versuche zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität	43
9.1.2 Versuch zur Ermittlung des Detektionslimits.....	44
9.2 Vergleich der PassPork-/Schwarzlichtmethode und modernen, diagnostischen Methoden	45
10 Zusammenfassung.....	47
Literaturverzeichnis.....	X
Quellverzeichnis	XII
Anhangsverzeichnis.....	A1
Selbstständigkeitserklärung	A4

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung

Bedeutung der Abkürzung

ATTC	American Type Culture Collection
aw-Wert	Wasseraktivität
BGL-Bouillon	Brillantgrün-Galle-Laktose-Bouillon
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E. coli	Escherichia coli
EAEC	Enteroaggregative Escherichia coli
EHEC	Enterohämorrhagische Escherichia coli
EIEC	Enteroinvasive Escherichia coli
EPEC	Enteropathogene Escherichia coli
ETEC	Enterotoxische Escherichia coli
ECD-Agar	Escherichia-Coli-Direkt-Agar
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay

HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points, Gefahrenanalyse
IMViC-Test	I für den Indol-Test auf Indolbildung M für die Methylrot-Probe zum Nachweis von Säurebildung V für den Voges-Proskauer-Test auf Acetoinbildung i dient der besseren Aussprache C für den Test auf Citratverwertung.
ISO	International Organization for Standardization
KbE	Koloniebildende Einheit
LB	Lysogeny Broth
LFD	Lateral Flow Device
MKTTn-Bouillon	Muller-Kauffmann Tetrathionat-Novobiocin- Bouillon
OPRP	operative Präventivprogramme
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
pH-Wert	potentia Hydrogenii, Maßstab für die Acidität oder Alkalität einer Lösung
RVS-Bouillon	Rappaport-Vassiliadis-Bouillon
S. typhi,	Salmonella typhi,

S. paratyphi,
S. paratyphi B,
S. paratyphi C

Salmonella paratyphi,
Salmonella paratyphi B,
Salmonella paratyphi C

VRB-Agar

Violet-Red-Bile-Agar

VRBD-Agar

Violet-Red-Bile-Dextrose-Agar

XLD-Agar

Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar

x_m

Arithmetischer Mittelwert

Abbildungs-und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Salmonellen.....	5
Abbildung 2: Salmonellenwachstum auf XLD-Agar.....	8
Abbildung 3: Escherichia coli.....	9
Abbildung 4: Wirkungsprinzip ELISA	14
Abbildung 5: Funktionsprinzip einer PCR	16
Abbildung 6: Funktionsprinzip eines Biosensors	17
Abbildung 7 : PassPork-Reader	19
Abbildung 8 : PassPork-LFD im fluoreszierenden Licht.....	19
Abbildung 9: Flussdiagramm vom Ablauf der Stanzprobenentnahme	23
Abbildung 10 : Flussdiagramm vom Ablauf der Kratzschwammprobenentnahme.....	23
Abbildung 11 : Flussdiagramm zum Ablauf eines kulturellen Salmonellennachweises	24
Abbildung 12 : Flussdiagramm zum Ablauf des E. coli-Nachweises.....	25
Abbildung 13 : Flussschema zum Ablauf der PassPork-Probenentnahme	26
Abbildung 14 : Probenahmestelle am Schwein	26
Abbildung 15 : Probenpräparation der PassPork-Methode.....	27
Abbildung 16 : Probenpräparation der PassPork-Methode mit integriertem Filter im Stomacherbeutel	27
Abbildung 17 : Flussdiagramm zur Bedienung des PassPork-Readers	28
Tabelle 1 : Nachweis von Salmonellen mit gestellten Stanzproben.....	32
Tabelle 2 : Nachweis von E.coli mit gestellten Stanzproben	33
Tabelle 3 : Nachweis von Salmonellen aus Stanzproben vom Schlachthof.....	34
Tabelle 4 : Nachweis von E.coli aus Stanzproben vom Schlachthof	35
Tabelle 5 : Nachweis von Salmonellen aus Kratzschwammproben.....	36
Tabelle 6 : Nachweis von E.coli aus Kratzschwammproben vom Schlachthof	37
Tabelle 7 : Erster Testlauf	38
Tabelle 8 : Zweiter Testlauf.....	39
Tabelle 9 : Berechnung des Detektionslimits	41

1 Einleitung

Fleisch ist, wie die Veröffentlichung des „Fleischatlas 2014“ beweist, nach wie vor ein beliebtes Lebensmittel. Weltweit gesehen wird jährlich ein erneutes Wachstum verzeichnet. Deutschland ist mit 58 Millionen geschlachteten Schweinen jährlich führend in Europa. [1] Fleisch bietet pathogenen Keimen ein optimales Nährmedium. Aus diesem Grund ist die mikrobielle Prüfung von Produkten von Nöten, damit der Verbraucher geschützt werden kann und ein unbedenkliches Fabrikat erhält.

Die häufigsten pathogenen Keime in Bezug auf Schweinefleisch sind Salmonellen, Listerien, Yersinien und Campylobacter. Für diese Mikroorganismen gibt es Nachweismethoden, die jedoch oftmals sehr zeitintensiv oder kostenintensiv sein können. In diesem Zusammenhang haben sich acht europäische Forschungslabore zusammengeschlossen, um ein Verfahren zum schnelleren und kostengünstigeren Nachweis von pathogenen Keimen im Produkt „Schwein“ zu entwickeln. Für diesen Zweck sollen LFD's und ein Lesegerät für die Testauswertung hergestellt werden. Durch diese Methodik werden mehrere gängige Verfahrensmuster miteinander kombiniert. Zukünftig soll der PassPork-Reader in Schlachthöfen als Kontrollsystem im HACCP-Konzept dienen. [2]

Quh-Lab ist eines dieser Lebensmittelsicherheitslabor und ist in Siegen ansässig. Es ist spezialisiert auf mikrobiologische, molekularbiologische und chemische Testverfahren und betreut überwiegend Kunden aus dem Fleischergewerbe. Die Mitarbeiter nehmen ebenfalls eine beratende Funktion in Hinblick auf EU-Zulassungen und internationalen Standards wie beispielsweise der ISO 22000 und HACCP ein. Quh-Lab ist für die Validierung des PassPork-Geräts verantwortlich. Es handelt sich um einen Feldversuch, dabei sollen analytische Resultate, die durch die neue PassPork-Methode gewonnen wurden, mit klassischen Nachweismethoden auf Salmonellen und E. colis überprüft und verglichen werden. Die Sensitivität und Spezifität sollen 80% betragen und in diesem Zusammenhang bestätigt werden. Des Weiteren muss das Detektionslimit von Salmonellen und E. colis ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit werden im theoretischen Teil zunächst Salmonellen als pathogene Keime näher beleuchtet. Dabei werden vor allem die Eigenschaften, das Krankheitsbild, die Präventionsmaßnahmen und die kulturellen Nachweismethoden erläutert. Auch auf E. colis als

Indikatorkeime für Verschmutzungen wird in diesem Teil der Arbeit näher eingegangen. Es werden Eigenschaften, Krankheitsbilder, Präventionsmaßnahmen, sowie der kulturelle Nachweis beschrieben. Anschließend folgt eine kurze Einführung in das Feld der modernen diagnostischen Methoden. Die allgemeine Funktionsweise von immunologischen Methoden, DNA-basierenden- und Sensorverfahren soll erläutert werden. Anschließend wird die grobe Funktionsweise der PassPork-Methodik beschrieben.

Hauptgegenstand der Arbeit sind drei Versuchsreihen, um die Zuverlässigkeit der neuen Methode zu überprüfen und eine Versuchsreihe zum Detektionslimit für Salmonellen und E. colis. Es soll eine Validierung der PassPork-Methode vorgenommen werden. Der experimentelle Teil enthält eine Auflistung der Materialien, eine Beschreibung des Versuchsaufbaus, die Durchführung und die anschließende Darstellung der Ergebnisse und eine folgende Diskussion. Die Diskussion bezieht sich auf die Resultate der Versuchsreihen und auf einen Methodenvergleich.

Abschließend erfolgt ein Fazit in Bezug auf die vollständige Arbeit.

2 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

2.1 Wortlaut der Aufgabenstellung

„PassPork: Nachweis von pathogenen Keimen in Schweinefleisch; Validierung und Ermittlung des Detektionslimits“

2.2 Erläuterung der Aufgabenstellung

Die Arbeit besteht aus zwei wesentlichen Aufgaben:

1) Validierung:

Der PassPork-Reader wurde zur Detektion von pathogenen Keimen in Schweinefleisch hergestellt. Es ist ein Lesegerät für LFD's., die ebenfalls für dieses Projekt von einer Partnerfirma entwickelt wurden. Bei der Validierung soll die PassPork-Methode von der Probensammlung am Schlachthof bis zur Probenauswertung im Labor überprüft werden und somit der PassPork-Reader im Einsatz getestet und bewertet werden. Die Zuverlässigkeit der PassPork-Methode wird mit klassischen, kulturellen Nachweismethoden verglichen. Die Spezifität und Sensitivität sollen 80% betragen.

Problematisch ist die Tatsache, dass der Reader zum Start der Validierung nicht vollständig funktionstüchtig ist. Der Grund hierfür sind Verschiebungen im Zeitablauf des Projektes. Die Entwicklung der LFD's hat mehr Zeit als erwartet beansprucht, sodass der Reader ein paar wesentliche Softwarefehler (Einfrieren, Laggen, automatisches Herunterfahren) aufweist und keine fest definierte Detektionsgrenze beinhaltet. Aus diesem Grund wurde zur Überprüfung der LFD's eine zusätzliche Überprüfungsmethode neben dem Reader eingesetzt. Da die LFD's fluoreszieren, können die Ergebnisse der Untersuchung im abgedunkelten Raum und mit Einsatz einer ultravioletten Lampe überprüft werden. Die eingelesenen Ergebnisse des Readers werden am Ende der Validierung von einem Partnerlabor in Spanien ausgewertet, unter Einbeziehung der gesammelten Resultate mittels Schwarzlichtlampe.

Ein weiteres Problem stellt die Probenbeschaffung dar. Für diesen Feldversuch sollen Proben am Schlachthof entnommen und ausgewertet werden. Es ist jedoch nicht möglich täglich oder wöchentlich einen Besuch auf einen Schlachthof zu unternehmen und daher werden eingefrorene Stenzen ebenfalls als Probenmaterial verwendet. Dies entspricht nicht dem Validierungsprotokoll, welches eine Probenfläche von 400 cm² vorschreibt, die mittels Mullbindentuch unter möglichst hohem Druckaufwand 20 Sekunden abgerieben werden muss. Die Ergebnisse dieser Alternativprobenentnahme werden separat dargestellt, damit die Ergebnisse des Validierungsprotokolls nicht verfälscht werden.

2) Ermittlung des Detektionslimits:

Momentan gibt es lediglich ein LFD, welches Salmonellen und E. coli detektieren kann. Für diese Arbeit soll eine Validierung vorgenommen werden und ein Detektionslimit von E. coli und Salmonellen festgestellt werden. Für diesen Zweck werden ausgewählte Glycerinkulturen verwendet.

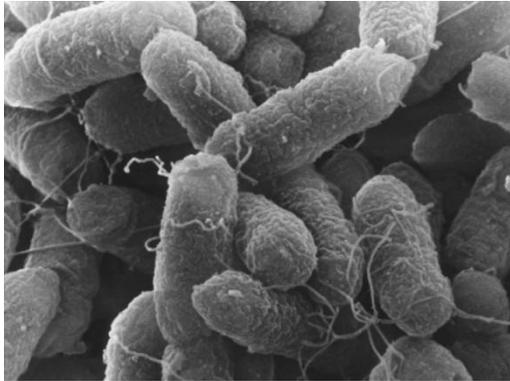
2.3 Ziel der Bachelorarbeit

Eine Validierung im eigentlichen Sinne ist nicht möglich, da der Reader zu unausgereift ist. Aus diesem Grund bezieht sich die Validierung auf die Probensammlung bis hin zur Auswertung der LFD's mittels ultravioletten Lichts. Es handelt sich daher um eine Vorvalidierung. Die gesammelten Resultate werden zur Optimierung des Readers herangezogen und eine Detektionsgrenze eingerichtet. Auf diese Weise rückt das Projekt dem Ziel einer kostengünstigen, schnellen, einfachen und treffsicheren Methode zur Ermittlung von pathogenen Keimen im Schweinefleisch ein Stück näher. Die Bachelorarbeit soll somit eine neue Möglichkeit zur Detektion von pathogenen Keimen aufzeigen.

3 Darstellung relevanter Mikroorganismen in Bezug auf das PassPork-Projekt

3.1 Salmonellen

3.1.1 Taxonomie, physiologische Merkmale und Habitat



[38] Abbildung 1: Salmonellen

Salmonellen gehören der Ordnung der Enterobacteriales an und werden der Familie der Enterobacteriaceae zugeordnet. Die Gattung *Salmonella* gliedert sich in die Arten *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* kann in mehrere Subspezies unterteilt werden. Die Gattung *Salmonella* umfasst mehr als

2300 Serovare. Die Einteilung in Serovare wird nach dem Antigeneschema von KAUFMANN-WHITE vorgenommen. Bei Salmonellen werden drei wesentliche Antigene unterschieden. Zunächst existiert das „H“-Antigen, welches auch als Geißelantigen bekannt ist. Des Weiteren gibt es das „O“-Antigen, welches auch als somatisches Antigen bekannt ist. Das „Vi“-Antigen, welches in der äußersten Peripherie der Zelle lokalisiert ist und als Kapselantigen bezeichnet wird. Die Differenzierung in Serogruppen basiert auf den „O“-Antigenen. Die Untergliederung in Serovare wird durch die „H“-Antigene bewerkstelligt. Besonders ist, dass der gleiche Salmonellen-Serotyp zwei unterschiedliche H-Antigene besitzen kann, die als „H1“ und „H2“ bezeichnet werden. Die Ausbildung dieser Phasen ist von der Aktivität der verantwortlichen Gene abhängig. [3] [4] [5] [6]

Salmonellen sind gramnegative, fakultativ anaerobe, meist bewegliche Stäbchenbakterien mit einer Größe von 0,7 - 1,5 x 2,0 - 5,0 µm, die Katalase-positiv und Oxidase-negativ sind. Kennzeichnend ist auch ihre Fähigkeit Glukose zu Ameisensäure, Ethanol, Acetat oder Lactat und Kohlendioxid fermentieren zu können. Laktose wird in der Regel nicht unter Säurebildung abgebaut. Des Weiteren können sie Nitrat zu Nitrit reduzieren und Thiosulfat zu Schwefelwasserstoff umsetzen. Salmonellen haben ein optimales Wachstum, wenn der pH-Wert in einem neutralen Bereich ist, der aw-Wert bei 0,995 liegt und die Temperatur zwischen 35 - 45°C beträgt. Das Wachstum wird bei Temperaturen unter 15°C eingeschränkt und sollte die Temperatur unter 7°C sinken, kann eine Vermehrung ausgeschlossen werden. [3] [4][6][7]

Salmonellen sind auf der Erde stark verbreitet, sie können sowohl bei warmblütigen als auch bei kaltblütigen Lebewesen im Darmtrakt vorkommen. Sie zählen zu den wichtigsten bakteriellen Durchfallerregern für Menschen. Desweiteren gehören sie zu den Zoonosen, da sie von Tieren auf Menschen übertragbar sind. Man unterscheidet zwischen wirtsspezifischen Serovaren, Serovare, die auf einen Wirt begrenzt sind und ubiquitären Serovaren. Im ersten Fall handelt es sich unter anderem um Salmonella Paratyphi A und C, welche nur beim Menschen Fieberschübe auslösen können. Salmonella Gallinarum hingegen tritt primär bei Geflügel auf, kann aber auch in Ausnahmefällen den Wirt wechseln und dort Erkrankungen hervorrufen. Die ubiquitären Serovare wie Salmonella Enteritidis können zu Infektionen vieler unterschiedlicher Wirte führen. [3][8]

3.1.2 Salmonellose

Es bestehen zwei Gruppen der Salmonellose. Zum einen existiert das typhöse Krankheitsbild und zum anderen die Gastroenteritis.

Die Enteritiserreger betreffen Mensch und Tier. Sie werden vorwiegend durch Fleisch, Eier und Eiprodukte weitergegeben. Als Besonderheit gilt die Tatsache, dass durch die Salmonellen die Tiere nicht zwingend erkranken müssen und auf diese Weise asymptomatisch ausgeschieden werden können und auf andere Tiere oder Tierprodukte übergehen können. Die Inkubationszeit beträgt 12 – 16 Stunden und es benötigt eine hohe Anzahl von Erregern (ca. 100000 Bakterien). Kleinere Mengen überleben die Magenpassage nicht. Die Erreger verwenden ein komplexes System, um diesen Schritt zu bewältigen. Sie benötigen mehr als 50 verschiedene Säure-Schock-Proteine, um sich ihren Weg zu ebnen. Im Anschluss klemmen sie sich an die Epithelzelle des Darmes mittels Adhäsion und dringen auf diese Weise in die Zellen ein. Salmonellen führen zu einer Entzündung der Darmschleimhaut mit den gängigen Symptomen wie Diarrhö, Brechreiz und Fieber. Diese Anzeichen klingen in der Regel nach drei bis vier Tagen ab, allerdings können noch Wochen später Erreger in den Ausscheidungen gefunden werden. Die Therapie beschränkt sich auf symptomatische Maßnahmen wie Flüssigkeits- und Elektrolytersatz. Lediglich bei schweren Krankheitsverläufen und bei Risikogruppen (Kleinkinder, immungeschwächte Menschen und ältere Personen) werden Antibiotika gegeben. [5] [8] [9] [10]

Typhus, eine gefürchtete und für den Menschen gefährliche Tropenkrankheit, wird durch die Erreger *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* und *S. paratyphi C* ausgelöst. Die Krankheit kommt zwar weltweit vor, ist aber vor allem in Entwicklungsländern verbreitet, in denen schlechte hygienische Bedingungen herrschen. In Afrika, Südamerika und Südostasien sind besonders hohe Erkrankungsanzahlen sowie wiederholte Ausbrüche und Epidemien bekannt. Hierbei handelt es sich um eine lokale Darminfektion, die sich auf andere Organsysteme ausweiten kann. Die Inkubationszeit beträgt 10 – 20 Tage, in den ersten Tagen können die Erreger im Blut nachgewiesen werden. Die Übertragung findet nicht ausschließlich oral statt, sondern fäkaloral. Es reicht schon eine geringe Keimzahl (10^3 Keime) aus. Nach oraler Aufnahme gelangen die Erreger über den Magen, den Dünndarm und nach Durchdringung der Darmschleimhaut in das Lymphsystem. Dort vermehren sie sich und treten in das Blut über. Die Krankheit äußert sich durch unscheinbare Symptomen wie Angina, Unwohlsein, Bronchitis, Kopfschmerzen und ansteigendem Fieber. Auch eine Milzschwellung, ein verlangsamter Herzschlag und Durchfall können auftreten. Sollte auch nur der Verdacht auf Typhus bestehen, muss man dies unverzüglich melden. Typhus kann im schlimmsten Fall tödlich enden und die Behandlung erfolgt durch einen Flüssigkeits- und Elektrolytersatz und mittels der Einnahme von Antibiotika. [5] [10]

3.1.3 Präventionsmaßnahmen

Um das Risiko einer Salmonellenerkrankung zu minimieren, sollten grundlegende Maßnahmen im Alltag ergriffen werden. Rohe Lebensmittel bzw. Lebensmittel, die besonders leicht von Salmonellen befallen werden können, sollten schnell verbraucht werden und vorher im Kühlschrank gelagert werden, da so die Vermehrung der Bakterien verringert wird. Die Salmonellen können auch in der Tiefkühltruhe überleben und daher sollte die Auftauflüssigkeit weggegossen werden und im Anschluss mit heißem Wasser nachgespült werden. Des Weiteren sollten Lebensmittel ausreichend erhitzt werden, um Salmonellen abzutöten. Außerdem können regelmäßiges Wechsel der Geschirrtücher und Spüllappen zu einer risikofreieren Umgebung beitragen. [11]

Unternehmen, die mit risikoreichen Produkten arbeiten, müssen abteilungsspezifische Hygienepläne verwenden, die unter anderem eine Sterilisation der Instrumente, die Verwendung von hygienisch einwandfreiem Wasser und eine Flächendesinfektion enthalten sollten. Die

Mitarbeiterhygiene spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle, daher sind regelmäßige Schulungen unentbehrlich. [12]

Da die häufigste Ursache einer Salmonellose durch den Verzehr von tierischen Produkten bedingt ist, gibt es grundlegende Präventionsmaßnahmen, die Fleischbauern beachten sollten. Zum einen sollte das Wasser und Futter auf eine Kontamination überprüft sein, zum anderen sollten neue Tiere zunächst serologisch und biologisch untersucht werden. Darüber hinaus ist es notwendig die Räume der infizierten Tiere zu reinigen und zu desinfizieren. [13]

Im Fall von Typhus-Schutzmaßnahmen sollte eine Impfung mittels lebenden *S. typhi* und *S. paratyphi* durchgeführt werden.

3.1.4 Kultureller Nachweis

Salmonellen gelten als Lebensmittelsicherheitskriterium und die Überprüfung auf diese Bakterien ist von großer Bedeutung. Das Verfahren zur Bestimmung von Salmonellen in Lebensmitteln wird auf Grundlage der amtlichen Methode laut § 64 LFGB ASU L 00.00-20 durchgeführt. Die Probengröße beträgt in der Regel 25g. Diese entnommene Probe wird in ca. 225ml gepufferten Peptonwasser 18 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschließend werden von dieser Voranreicherung 0,1ml zu 10ml RVS-Bouillon und 1ml zu 10ml MKTTn-Bouillon gegeben. Die

erste Probe wird nun bei 41,5°C 24 Stunden bebrütet und die zweite Probe in dem gleichen Zeitintervall bei 37°C. Nach der Wartezeit findet eine Isolierung auf Selektivnährböden wie dem XLD-Agar statt. Dieses Medium wird erneut 24 Stunden bei 37 ° C bebrütet und als nächster Schritt folgt die Identifizierung. Charakteristisch bilden Salmonellen auf diesen Nährmedium ein schwarzes Koloniezentrum mit einer minimal rötlich gefärbten transparenten Zone. Ausnahmen wie Schwefelwasserstoff-negative Formen entwickeln sich rosa bis rosarot und laktosepositive Salmonellen wachsen als gelbe Kolonie. Auf Endo-Agar und MacConkey-Agar erscheinen sie als farblose, transparente



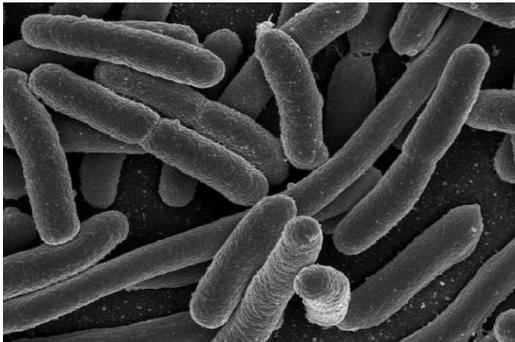
Abbildung 2: Salmonellenwachstum auf XLD-Agar

Kolonien. Als letzter Schritt erfolgt eine biochemische oder serologische Bestätigung unter Verwendung von Reinkulturen. Die serologische Bestätigung erfolgt mittels

Objektträgeragglutinationstest. Hierfür wird eine verdächtige Kolonie auf einer Reaktionsplatte mit einem Tropfen Latexreagenz vermennt und bei Agglutination liegt ein positives Ergebnis vor. [3]

3.2 Escherichia coli

3.2.1 Taxonomie, physiologische Merkmale und Habitat



[37] Abbildung 3: Escherichia coli

Escherichia coli gehört der Ordnung der Enterobacteriales, der Familie der Enterobacteriaceae, der Gattung Escherichia und der Art Escherichia coli an. Es werden zwei Hauptgruppen unterschieden. Zum einen die fakultativ pathogenen Stämme, die Bestandteil der physiologischen Darmflora sind und zum anderen die obligat pathogenen Stämme, die nicht zu der normalen Darmflora zugeordnet werden. Für E. coli sind derzeit 181 O-Serotypen und 56 H-Serotypen beschrieben, aus denen sich über 2000 Serovare ergeben. Escherichia coli ist bekannt als Indikatorkeim für Wasseruntersuchungen und weist bei Vorhandensein auf eine fäkale Kontamination hin. [14] [15]

Escherichia coli sind gramnegative, nicht sporenbildende, fakultative anaerobe, häufig peritrich begeißelte Stäbchenbakterien mit einer Größe von 1-1,5 x 2-6 µm, die Oxidase-negativ und Katalase-positiv sind. Kennzeichnend für Enterobacteriaceae ist die Eigenschaft, dass sie Glucose oxidativ und fermentativ unter Säurebildung abspalten können. Außerdem sind sie in der Lage Nitrat zu Nitrit reduzieren. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 37°C und das Minimum zwischen 3°C und 10°C. [15][16] [17]

Das natürliche Habitat von Escherichia Coli stellt der Dickdarm des Menschen und anderer Warmblüter dar.[15]

3.2.2 Escherichia-coli-Enteritis

Die meisten E.coli-Stämme sind natürlicher Bestandteil der Darmflora. Es existieren allerdings auch obligat pathogene Stämme (EHEC, ETEC, EIEC, EAEC, EPEC), die kein natürlicher

Bestandteil der Darmflora sind und zu Escherichia-coli-Enteritis führen können. Innerhalb von 1 - 3 Tagen nach der Infizierung entzündet sich der Magen-Darm-Trakt und als Folge treten Bauchschmerzen und Durchfall auf. Gelegentlich treten Begleitsymptome wie Übelkeit, Erbrechen, Gliederschmerzen, Fieber und Kopfschmerzen auf. In schlimmen Fällen erleiden Patienten zusätzlich eine schwere Entzündung des Dickdarms, die zu Darmblutungen oder zu Funktionsstörungen der Niere führen kann. Die auslösenden Bakterienstämme weisen auf Grund von unterschiedlichen Pathogenitätsfaktoren eine eigenständige Pathogenese auf. Dies führt dazu, dass unterschiedliche Patientengruppen betroffen sein können. Enteropathogene E.coli-Bakterien sind besonders für Neugeborene risikoreich. Die Ansteckung erfolgt über Schmierinfektionen oder die Aufnahme von verunreinigten Lebensmitteln. Als Symptome gelten Durchfall, Bauchschmerzen, Erbrechen und Fieberschübe. Die Virulenz von EPEC beruht auf Adhärenzfaktoren. Enterohämorrhagische E. coli sind Bakterien, die ebenfalls Darminfekte auslösen können. Der EHEC-Erreger ist hochinfektiös und wird deshalb von der WHO zu den gefährlichsten Keimen gezählt. Die Virulenz von EHEC ist durch Adhärenz der Bakterien an der Darmwand und durch die Wirkung von Shiga-like-Toxinen bedingt. Die produzierten Toxine zerstören die Darm- und Nervenzellen. Es kommt zu blutigem Durchfall und Erbrechen. Für enteroinvasive E. coli existiert keine bestimmte Risikogruppe. Die Infizierung erfolgt durch eine lokale bakterielle Invasion des Darms. Der Patient erleidet eine dysenterische Diarrhö. Dies ist die Bezeichnung für einen schleimigen, blutigen Stuhl mit Fieber. Enterotoxische Escherichia coli sind Krankheitserreger, die häufig bei schlechten Hygienebedingungen auftreten und Durchfall auslösen. Die Virulenz von ETEC ist durch Enterotoxine bedingt. EAEC-Infektionen sind häufige Ursachen der Reisediarrhö. EAEC schädigen bedingt durch ihre Toxine die Schleimhaut und führen zu sekretorischer Diarrhö. Die meisten E. coli-Infektionen sind jedoch ungefährlich und können durch Flüssigkeitsausgleich behoben werden. Die Behandlung von Komplikationen orientiert sich an den medizinischen Erfordernissen. [18][19][35]

3.2.3 Präventionsmaßnahmen

Um die Infektion mit pathogenen E. colis zu vermeiden, sollten grundlegende Regelungen eingehalten werden. Kochen und Braten bei 70°C für 10 Minuten tötet Bakterien ab und inaktiviert die von ihnen gebildeten Giftstoffe. Abwehrgeschwächte Menschen sollten vorsorglich auf den Verzehr von rohen Lebensmitteln tierischer Herkunft verzichten. Nach dem Einkauf ist es ratsam, alle rohen und verderblichen Lebensmittel unverzüglich im Kühlschrank zu lagern oder einzufrieren. Sie sollten nie länger als zwei Stunden außerhalb des Kühlschranks

liegen bleiben. Beim Auftauen von Fleisch muss das Auftauwasser sorgfältig entfernt werden. Außerdem ist ein hohes Maß an Hygiene erforderlich, dies gilt zum einen für die eigene Person und zum anderen für den Arbeitsbereich und die Gerätschaften. Wasser, das nicht ausdrücklich als Trinkwasser ausgewiesen ist, sollte nicht getrunken werden. Nach einem Besuch im Streichelzoo sollten grundsätzlich die Hände gewaschen werden. Für die Mitarbeiter in einem Lebensmittelbetrieb sind jährliche Schulungen Pflichtveranstaltungen. Da ein Befund von E.coli als Indiz für Verunreinigung gilt, sollten Hygienerichtlinien eingehalten werden und nur steriles Material verwendet werden. Infizierte Tiere sollten stets von anderen Tieren getrennt werden und eine regelmäßige Reinigung und Desinfizierung der Unterkunft ist vorzunehmen. [20]

3.2.4 Kultureller Nachweis

Es gibt eine Vielzahl von Nährböden, auf denen E. colis wachsen können:

VRB-Agar mit MUG:

VRB-Agar mit MUG ist ein leicht rötlich gefärbter Nährboden. Er dient zum Nachweis und zur Koloniebestimmung coliformer Keime aus Wasser, Lebensmitteln und Molkereiprodukten. Der Nährboden wird aerob für 18-24 Stunden bei 36°C inkubiert. Die Supplementierung mit MUG verbessert die Nachweismöglichkeit für E. coli, da β -D-Glucuronidase-positive E.coli im ultravioletten Licht fluoreszieren. E. colis wachsen auf diesen Agar als rote Kolonie mit einem rötlichen Präzipitathof. [21]

VRBD-Agar:

VRBD-Agar ist ein lilafarbender Nährboden. Er dient unter anderem zum Nachweis und der Zählung von Enterobacteriaceae in Fleisch und –erzeugnissen. Für die Durchführung der Methode wird ein Doppelansatz benötigt. Der Agar wird bei ca. 95°C erhitzt und verflüssigt. Nach einer Abkühlung auf ca. 45°C kann das Medium über die in der Petrischale befindliche Probe gegossen werden. Das Probenvolumen beträgt 1 ml. Nachdem der Agar erstarrt ist, werden weitere 15 ml des flüssigen VRBD-Agars zur Überschichtung zugegeben. Nach Erstarren des Agars werden die Platten 22 bis 26 Stunden bei 37°C inkubiert. Rote Kolonien deuten mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Enterobacteriaceae hin. [22]

ECD-Agar mit MUG:

ECD-Agar mit MUG ist ein gelblich gefärbter Nährboden. Er dient zum direkten Nachweis von *Escherichia coli* in Lebensmitteln. Der Nährboden wird aerob für 18 – 24 Stunden bei 36°C inkubiert. ECD-Agar mit MUG ermöglicht den direkten Nachweis von *E.coli* mittels Fluoreszenz. *E. coli* sind bekannt für ihre β -D-Glucuronidaseaktivität, die durch Spaltung von 4-Methylumbelliferyl- β -glucuronid nachgewiesen werden kann. Durch die zusätzliche Durchführung eines Indoltests auf der Platte, können *E.coli* nachgewiesen werden. Dafür wird Kovac-Reagenz auf die Probe geträufelt. Bei einem positiven Testergebnis entsteht eine kirschrote Färbung um die Kolonien. [23]

Endo-Agar:

Endo-Agar ist ein rosafarbender Nährboden. Er dient zum Nachweis und zur Isolierung von *Enterobacteriaceae*. Endo-Agar wird aerob 16-24 Stunden bei 36°C inkubiert. *E. coli* wachsen als tiefrote Kolonien, die teilweise einen metallischen Glanz aufweisen. [24]

MacConkey-Agar:

MacConkey-Agar ist ein mäßig selektiver Nährboden zum Nachweis von *Enterobacteriaceae* in pharmazeutischen Produkten, Lebensmitteln, Wasser und anderen Materialien. Der Nährboden wird für 18 bis 72 Stunden bei 30-35 °C inkubiert. Das Wachstum von rosafarbenden Kolonien deutet auf die mögliche Anwesenheit von *E. coli* hin. [25]

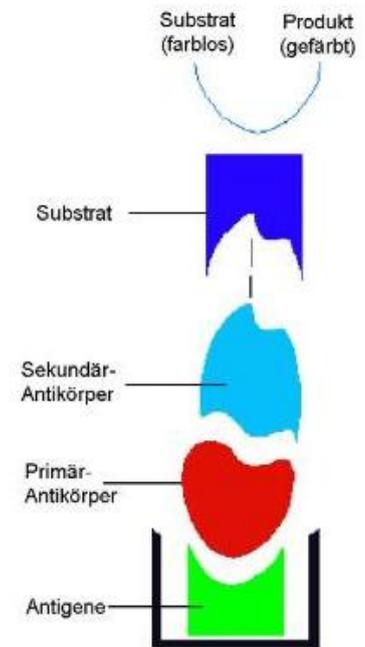
Die Wahl des Nährmediums ist abhängig vom zu untersuchenden Produkt. Für Fleischproben wird in Laboren der VRBD-Agar als Selektivmedium gewählt. Die Beimpfung von Nährböden genügt für einen Beweis der Anwesenheit von *E.coli* nicht. Das Vorhandensein von *E.coli* muss durch Identifizierungstests bestätigt werden. Hierfür eignet sich unter anderem der IMViC-Test. Diese Prüfmethode dient zur Unterscheidung von *E.coli* und anderen *Enterobacteriaceae*. Dieser Test besteht aus einer Indolprüfung zum Nachweis einer Indolreaktion, einer Methylrotprobe zum Nachweis von Säurebildung, einem Voges-Proskauer-Test auf Acetoinbildung und einen Test für die Citratverwertung. Bei der Indolprüfung wird untersucht, ob Typtophan zu Indol,

Ammoniak und Pyruvat mit Unterstützung der Tryptophanase umgesetzt werden kann. Als Indikator wird dabei das Kovac–Reagenz verwendet. Diese wird in ein Übernachtkulturröhrchen geträufelt. Bei Vorhandensein von *E. coli* entsteht ein kirschroter Ring. Der Nachweis von Säurebildung wird durch eine Methylrotprobe durchgeführt. Methylrot dient als pH–Indikator und hat einen Farbumschlag ab einem pH–Wert von 4,5 zu rot. Der Voges–Proskauer–Test untersucht die Acetoinbildung. *E. coli* können Pyruvat nicht zu Acetoin umwandeln, Enterobacter besitzen diese Fähigkeit. Das Medium wird mit Naphtol- und Kaliumhydroxid–Lösung vermengt. Bei *E. coli* findet kein Farbausschlag ins rötliche statt. Der letzte Test, der die Citratverwertung anzeigen soll, funktioniert wie folgt: Die Kulturen wurden auf eine Citratplatte aufgetragen und nach Inkubation für zwei Tage mit Bromthymolblau versetzt. Durch den Säureindikator Bromthymolblau kann die Alkalisierung des Mediums durch Abbau von Citrat angezeigt werden. Bei Enterobacter bildet sich ein blauer Hof, bei *E. coli* hingegen nicht. [15]

4 Darstellung der Funktionsprinzipien moderner, diagnostischer Methoden

4.1 Immunologische Verfahren

Immunologische Verfahren sind Methoden, die auf eine Antikörper-Antigen-Reaktion beruhen. Auf diese Weise können unter anderem Viren und Bakterien identifiziert werden. Es gibt eine Untergliederung der immunologischen Verfahren. Bei der Agglutination binden die Antikörper an Antigene und es entsteht eine sichtbare Verklumpung. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist der Latex-Test, der unter anderem zum Salmonellennachweis herangezogen wird. Die in der Probe befindlichen Antigene, reagieren mit den Antikörpern in der Latexreagenz und auf einem Reagenzpapier erfolgt eine Ausflockung.[29] Bei einer Präzipitatreaktion findet die Verknüpfung der Antikörper mit den Antigenen in einer Lösung statt. Es existieren außerdem enzymologische und radioimmunologische Testverfahren, bei denen ein Reaktionspartner mit einem Enzym oder einem radioaktiven Nuklid beschichtet ist. Die Immunfluoreszenz beruht auf der farblichen Erkennung des Antigen-Antikörper-Komplexes. Ein Beispiel für diese Methode ist der ELISA und da dieser Test zu den bekanntesten immunologischen Tests zählt, wird er hier näher beleuchtet. Beim ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent



[27] Abbildung 4 : Wirkungsprinzip ELISA

assay) handelt es sich um eine quantitative Nachweismethode, die auf einer Antikörper-Antigenreaktion beruht. ELISA kann mit Hilfe einer enzymvermittelten Reaktion diese Wechselwirkung farblich kenntlich machen. Es gibt mehrere ELISA-Verfahren. In diesem Fall wird nicht der kompetitive ELISA erläutert, sondern die Sandwichmethode beschrieben, da sie sehr oft verwendet wird. Bei diesem ELISA wird eine Mikrotiterplatte mit dem zu bestimmenden Antigen beschichtet. Es erfolgt eine Ausspülung um ein Übermaß an Antigenen zu entfernen. Die restlichen Antigene binden sich durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Vertiefungswand. Die Probenlösung wird auf die Platte pipettiert und im positiven Fall findet eine Antigen-Antikörper-Reaktion statt. Nun erfolgt ein weiterer Waschvorgang. Anschließend wird ein weiterer Antikörper zugegeben, der mit einem bestimmten Enzym verbunden wurde. Dieser verknüpft sich mit dem Ende des Antigen-Antikörper-Komplexes. Auf diese Weise findet eine Sandwichbildung statt. Nach einer weiteren Auswaschung, um andere Antikörper zu

entfernen, wird ein Substrat zugegeben, das von dem gebundenen Enzym in ein Farbprodukt umgewandelt wird. In Abbildung 4 wird dieses Funktionsprinzip schematisch dargestellt. [26] [27] Eine Weiterentwicklung der ELISA ist die Immunchromatographie. Das Lateral Flow Device besteht aus einem Sample Pad, einem Konjugat Pad, einer Reaktionsmatrix und einem Absorbant Pad. Die Probe wird zunächst dem Sample Pad zugefügt und dies dient als Filter. Auf dem Konjugat Pad befinden sich entweder Latex- oder Goldpartikel, die sich beim Eindringen der Probelösung mit der Lösung vermischen. Auf diese Weise können Antikörper und Antigene miteinander reagieren und ein Komplex bilden. Diese Verknüpfung bindet an weitere Antikörper auf einer Membranoberfläche. Es kommt zum Farbumschlag durch die farblich markierten Antikörper. Durch die Saugwirkung des Papiers wird die zu prüfende Flüssigkeit fortbewegt. Die restliche Flüssigkeit wird ohne Rückfluss am Ende des Papiers aufgezogen. Der Farbumschlag gibt Auskunft über den Verlauf des Versuchs.[28]

4.2 DNA-basierende Methoden

DNA-basierte Analyse bezeichnet molekularbiologische Methoden zur Bestimmung einer Spezies mittels ihrer DNA als Analyt. DNA-basierende Methoden detektieren die hinzugefügte DNA. Diese Verfahren haben den Vorteil, dass sie hitzebeständiger sind als immunologische Verfahren, die sich auf Proteine beziehen. 1987 entwickelte der amerikanische Chemiker Kary B. Mullis die Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, kurz PCR). Diese dient der Vervielfältigung bestimmter Gensequenzen innerhalb einer doppelsträngigen DNA-Kette. Die Anwendungsgebiete der PCR sind vielseitig, unter anderem wird diese Methodik für die Charakterisierung von Bakterien und Pilzen herangezogen. Voraussetzung für die Durchführung der PCR ist die Freisetzung der DNA durch Lyse der mikrobiellen Zellen. Der anschließende Ablauf der PCR beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Reaktionsschritten, die in Abbildung 5 schematisch dargestellt sind.

- *Denaturierung:*

Die Template-DNA wird auf 94°C erhitzt. Dies führt zur Abspaltung der Stränge.

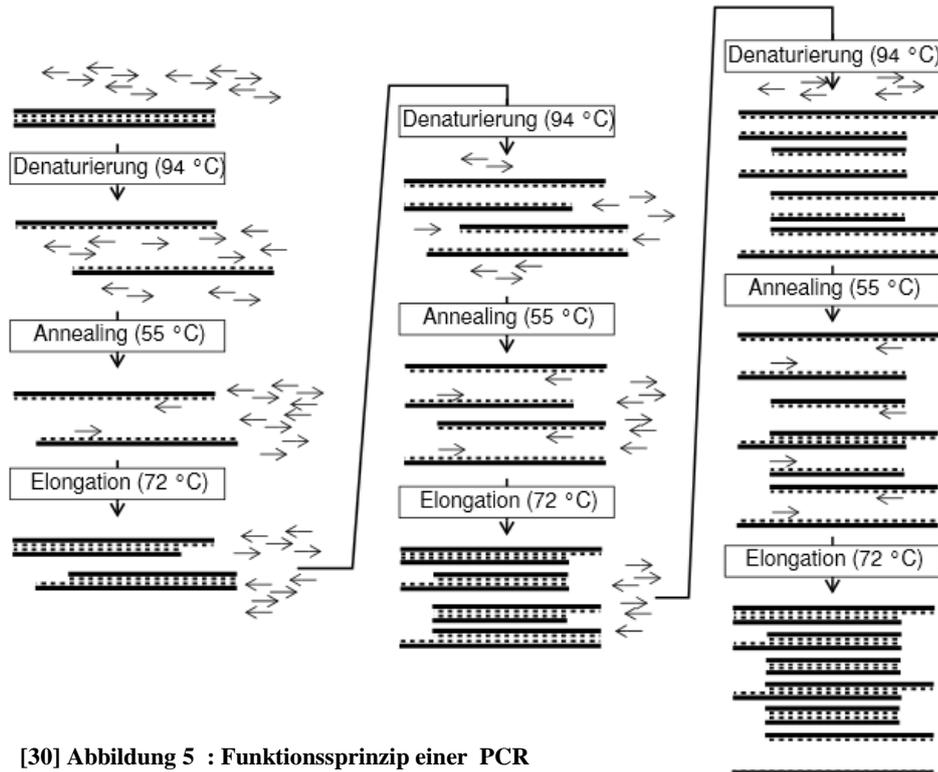
- *Annealing:*

Die Temperatur wird auf 55°C gesenkt, damit die Primer sich an die DNA hybridisieren können. Diese Verbindung ist nur stabil, wenn Primer und die DNA-Abschnitte komplementär sind und

sich zwischen ihren Bausteinen Basenpaare bilden können.

- *Elongation:*

Erhöhung der Temperatur auf 72°C, das Arbeitsoptimum der Polymerase für eine optimale Zweitstrangsynthese. Es kommt zur Verdopplung der DNA-Menge.



[30] Abbildung 5 : Funktionsprinzip einer PCR

Die Identifizierung der Amplifikate kann in der Gelelektrophorese oder durch Anlagerung einer Gensonde erfolgen. [30], [31]

Eine Weiterentwicklung ist die real-time PCR. Diese Methode wird sehr häufig in Laboren verwendet und ist eine der bekanntesten Methoden. Bei dieser Methodik werden sowohl für jede Erreger-DNA spezifische Primer als auch ein weiteres speziesspezifisches DNA-Fragment verwendet. Diese zusätzliche Sonde kann beispielsweise eine TaqMan-Sonde sein und bindet ebenfalls in der gesuchten Zielsequenz und bedingt die hohe Spezifität des Verfahrens. Bei der Vervielfältigung der Zielsequenz wird die fluoreszenzmarkierte TaqMan-Sonde durch die Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase von der Zielsequenz abgespalten und zerstört. Es wird ein Fluoreszenzsignal freigesetzt, welches durch eine Laserdetektion im Reaktionsgefäß

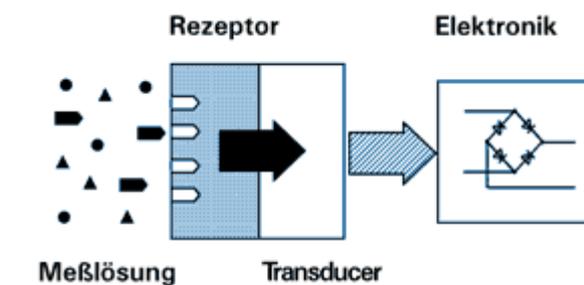
gemessen und aufgezeichnet wird. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist somit ein Maß für die Menge des gebildeten Produktes und direkt proportional zur Ausgangsmenge des gesuchten Erregers in den Proben. [32]

4.3 Sensortechnologien

Es existieren unterschiedliche Systeme im Bereich der Sensortechnologien. Es gibt unter anderem elektrochemische Sensoren, optische Sensoren und Biosensoren. Im Folgenden wird die Funktionsweise der Biosensoren schriftlich und in Abb. 6 schematisch beschrieben. Diese Sensoren werden unter anderem zum Aufspüren von pathogenen Krankheitserregern erforscht.

Ein Biosensor besteht aus zwei wesentlichen Elementen. Zum einen aus einem biologischen Erkennungssystem, welches die Aufgabe eines Signalgebers besitzt, zum anderen aus einem elektrischen Signalwandler. Die biologische Komponente kann unterschiedlicher Herkunft sein. Es können Mikroorganismen, Enzyme, Antikörper und weitere Komponenten als biologische Komponente dienen. Diese Komponente muss allerdings zu einer spezifischen Reaktion führen.

Durch diese Reaktion entstehen Veränderungen, die unter anderem den pH-Wert, das Gewicht und die Wärmeentwicklung betreffen. Diese Wechselwirkungen zwischen Analyten und selektiven Erkennungsstrukturen erzeugen ein Signal, welches vom Signalwandler



[36] Abbildung 6 : Funktionsprinzip eines Biosensors

erfasst und in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. [33]

5 Darstellung des Funktionsprinzips der PassPork-Methode

Das PassPork-Projekt beruht auf einer Kombination von hoch spezifischen monoclonalen Antikörpern, Lateral Flow Chromotographie und optischen Scannern. Schweinefleischproduzenten erhalten dadurch die Möglichkeit einen Echtzeittest zu absolvieren, der die Anwesenheit von vier pathogenen Keimen nachweisen soll. Momentan besteht allerdings nur ein LFD, welches Salmonellen und E. coli erfassen kann. [2]

Antigene sind körperfremde Stoffe, die wiederum von körpereigenen Proteinen, auch Antikörpern genannt, identifiziert werden können. Diese beiden Stoffe verknüpfen sich und dies führt dazu, dass im Körper eine Immunantwort ausgesandt wird. Fresszellen suchen nach dem Antigen und entfernen dieses.

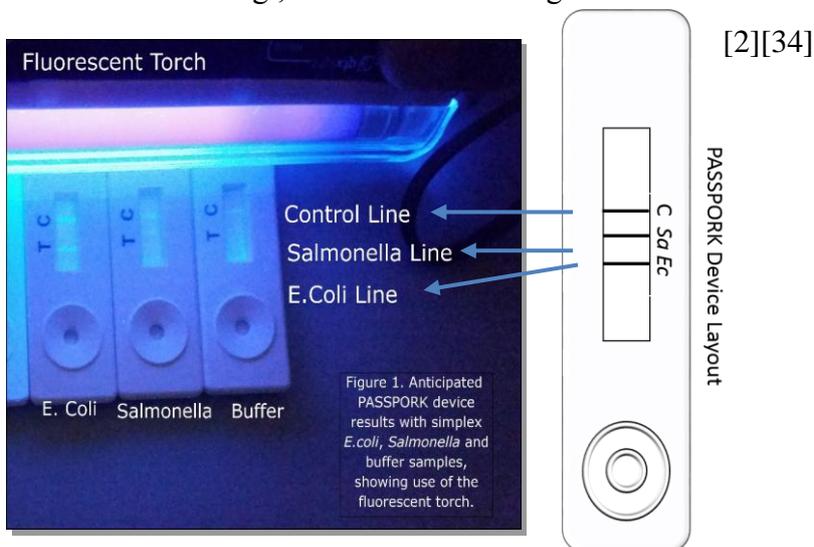
Immunologische Lateral Flow Assays beziehen sich auf den Effekt der Antikörper-Antigen-Reaktion. Für das Projekt wurden monoklonale Antikörper verwendet, das sind Antikörper, die eine hohe Spezifität aufweisen und verschiedenste Moleküle an einer bestimmten Bindungsstelle andocken lassen. Diese Antigene wurden mit Farbmolekülen markiert, damit sie auf einer Membran sichtbar werden.

Im ersten Schritt wird die flüssige Probe dem LFD zugeführt. Das Probenvolumen beträgt 100µl und wird in eine dafür vorgesehene kreisrunde Öffnung auf dem LFD gegeben. Die Probe wird von einer Probenunterlage aufgenommen, damit Verunreinigungen abgeschieden werden können. Unter der Probenunterlage liegt die Konjugat-Unterlage, in dem sich die primären Antikörper befinden, die an kolloidales Latex gebunden sind. Bei einem positiven Fund reagieren der Analyt und die gebundenen Antikörper miteinander. Die Probenflüssigkeit fließt auf die Nitrozellulosemembran. Der gebildete Komplex trifft auf einen sekundären Antikörper und wird dort gebunden. Dadurch entsteht eine gefärbte Bande auf der Membran. Die Färbung ist von der Konzentration des Analyten abhängig. Um eine korrekte Durchführung der Testmethode aufzuzeigen, wird eine Kontrollbande als interne Referenz genutzt. Antikörper, die nicht an der spezifischen Markierung andocken, werden an der Kontrollbande festgehalten. Die restliche Probenflüssigkeit fließt zu einem Filterpapier, welches sie einzieht. Auf diese Weise wird ein Rückfluss vermieden. [2][34]



In den PassPork-Reader (Abb.7) werden die LFD's nach zehnmütiger Wartezeit eingeführt und dort findet ein Einscannen durch einen optischen, fluoreszenzlesenden Scanner statt und eine anschließende Auswertung der Probe. Die Daten werden auf einer im Reader integrierten SD-Karte gespeichert und können jederzeit auf einen PC übertragen werden. Momentan funktioniert die Auswertung der Proben durch den Reader nicht optimal, da dessen Grenzwerte nicht eingestellt sind und aus diesem Grund wird für die Auswertung der Proben eine ultraviolette Lampe herangezogen, mit deren Hilfe sollen die Balken im Dunklen erkennbar werden und so eine Auswertung

der Proben vorgenommen werden kann. Die visuelle Auswertung ist simpel, sobald die Kontrolllinie „C“ sichtbar wird, ist das LFD gültig. Erscheinen weiterhin die Testlinie „T“ und oder die mittlere Testlinie, ist der Test positiv. Sollte die Kontrolllinie nicht vorhanden sein, gilt der Test als ungültig. Dies wird in Abbildung 8 verdeutlicht. Sie zeigt, wie die Auswertung der LFD's im ultravioletten Licht vorzunehmen ist.



[2]Abbildung 8 : PassPork-LFD im fluoreszierenden Licht

6 Material und Methoden

6.1 Material für den klassischen, kulturellen Nachweis

6.1.1 Geräte und Hilfsmittel

- Stomacherbeutel (Oxoid)
- Stomacherbeutel mit Filter (Grade Blender Bags)
- Pipetten/-spitzen (Eppendorf, 10 – 100 µm und 100 – 1000 µm)
- Hochdruckdampfsterilisator (Wolf, Sanoclav)
- Kern Präzisionswaage EWB 620-2M (Kern & Sohn GmbH)
- Glasgefäß
- Löffel
- Petrischalen (greiner bio-one, Petri Dish 94 x 16 with vents)
- Brutschrank (Heraeus, 37°C und 42°C)
- Einweg-Impföse
- Homogenisator (BagMixer[®])
- Stanzgerät + Zubehör (gestellt vom Schlachthof)
- Kratzschwämme (3 M Health Care)

6.1.2 Puffer, Lösungen, Medien

- 9ml RVS-Boullion (Thermo Scientific)
- Gepuffertes Peptonwasser (Carl Roth GmbH + Co KG)
- VRBD-Agar (Carl Roth GmbH + Co KG)
- Latexagglutinationstestset (Oxoid)
- Tryptophan-Bouillonröhrchen (Oxoid)
- BGL-Bouillon mit Durham-Röhrchen (Oxoid)
- Kovac-Reagenz (Oxoid)

6.1.3 Probenmaterial

- Schweinehälften (Schlachthof in Wittlich)
- Schweinestanzten (Gestellt von der Quh-Lab)

6.2 Material für die PassPork- / Schwarzlichtmethode

6.2.1 Geräte und Hilfsmittel

6.2.1.1 Versuche zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität

- PassPork-Reader (Ateknea Solutions)
- Mini Black Light (Forsite diagnostics)
- LFD's (Forsite diagnostics)
- Mullbinden aus Baumwolle (MEFRA, Gauze swabs, 10 x 10 cm type 17, 16ply)
- Stomacherbeutel (Seward, classic 400, standard bags)
- Stomacherbeutel mit Filter (Grade Blender Bags)
- Spritze ohne Nadel (Terumo® Syringe without needle, 20 ml)
- Filter (Sample Acrodisc® Premium 25mm Syringe Filter with 10,00 µm Versapor® Membrane, PALL)
- Zentrifuge (HERMLE Z200 A LAB-Exchange)
- Zentrifugenröhrchen (Greiner bio-one, , Cellstar® tubes, 15 ml)
- Pipetten/-spitzen (Eppendorf, 10 – 100 µm und 100 – 1000 µm)
- Pipettierball
- Glaspipette (10ml)
- Hochdruckdampfsterilisator (Wolf, Sanoclav)

6.2.1.2 Versuch zur Ermittlung des Detektionslimits

- Kern Präzisionswaage EWB 620-2M (Kern & Sohn GmbH)
- Glasgefäß
- Löffel
- Petrischalen (greiner bio-one, Petri Dish 94 x 16 with vents)
- Einweg-Impföse (10µ Durchmesser)
- Brutschrank (Heraeus, 37°C)
- Reagenzgläser
- Pipetten/-spitzen (Eppendorf, 10 – 100 µm und 100 – 1000 µm)
- Spatel
- Bunsenbrenner

- Hochdruckdampfsterilisator (WOLF, Sanoclav)

6.2.2 Puffer, Lösungen, Medien

6.2.2.1 Versuche zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität

- 0,9%ige Natriumchloridlösung (EMSURE[®], ACS ISO, Reag. Ph Eur, Sodium Chlorid, 500g)
9g auf 1000ml Wasser (steril)
- Buffer C: PDEXTTC2014061300

6.2.2.2 Versuch zur Ermittlung des Detektionslimits

- LB- Boullion (Carl Roth GmbH + Co KG, Charge: 172183019)
10g auf 400 ml Wasser (steril)
- LB-Agar (Carl Roth GmbH + Co KG, Charge: 172181116)
16g auf 400 ml Wasser (steril)
- Verdünnungsreihe mit Ringerlösung

6.2.3 Probenmaterial

6.2.3.1 Versuche zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität

- Schweinehälften (Schlachthof in Wittlich)
- Schweinestanzten (Gestellt von der Quh-Lab)

6.2.3.2 Versuch zur Ermittlung des Detektionslimits

- ATTC 14028 Salmonella typhimurium
- ATCC 13076 Salmonella enteritidis
- ATCC 25405 K12- Stamm E.Coli (Sicherheitsstamm)
- DSM 4261 Escherichia coli

7 Methoden

7.1 Experimentelle Durchführung der klassischen, kulturellen Nachweise

7.1.1 Probenentnahme

Es gibt destruktive und nicht destruktive Verfahren zur Probenentnahme. Bei dem destruktiven Verfahren wird die Haut des Tieres zerstört, was zur Wertminderung des Produktes führt. Die Quh-Lab wendet für das Projekt zwei Verfahren an. Zum einen die Stanzmethode und zum anderen die Kratzschwammmethode. Diese beiden Verfahren sollen der neuen PassPork-Methode gegenübergestellt werden.

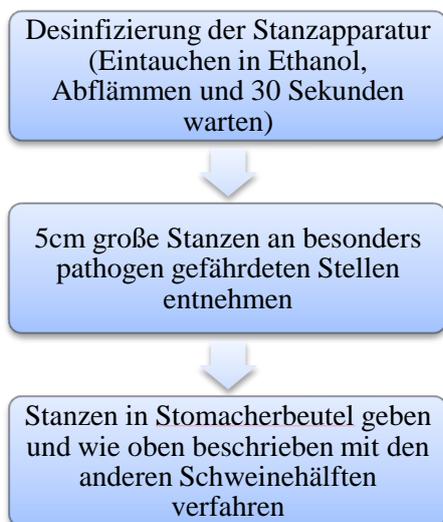


Abbildung 9: Flussdiagramm vom Ablauf der Stanzprobenentnahme

Bei der Stanzmethode werden dem Schwein in der Kühlkammer 5 cm große und runde Hautteile an besonders kritischen Stellen für pathogenen Befall entnommen. Hierzu zählt unter anderem auch die Wangenpartie. Bei der Entnahme ist es von Bedeutung steril zu arbeiten, um keine Keimverschleppung zu verursachen. Der Stanzapparat wird somit vor jedem Schwein desinfiziert. Dies geschieht mittels Eintauchen in Ethanol und anschließendes Abflämmen über einen portablen Bunsenbrenner. Die gestanzten Probenteile werden in einen Stomacherbeutel gegeben und gut verschlossen in das Labor transportiert. Der Vorgang ist im nebenstehenden Flussdiagramm in Abb. 9 übersichtlich dargestellt.

Die Probenentnahme mittels Kratzschwamm ist sehr simple und schnell durchzuführen. Die Kratzschwämme befinden sich in einem Beutel und sind mit einem neutralen Puffer benetzt. Sie sind an einem Haltegriff befestigt, sodass leicht jede Stelle am Schwein erreichen werden kann. Mit Druckaufwand wird an einer ausgewählten Partie für mindestens 20 Sekunden gerieben und anschließend wird der Kratzschwamm zurück in seinen Beutel gegeben und verschlossen. Das folgende Flussdiagramm (Abb. 10) zeigt nochmals die wesentlichen Schritte.

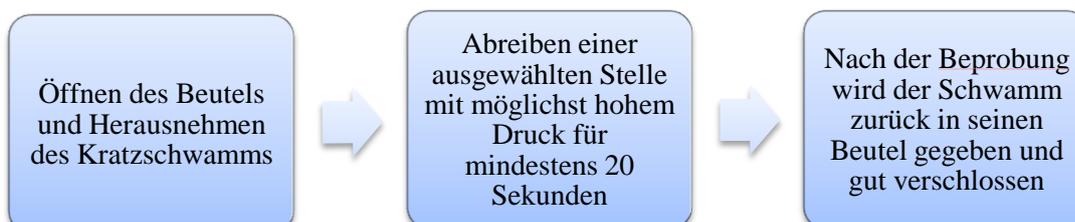


Abbildung 10 : Flussdiagramm vom Ablauf der Kratzschwammprobenentnahme

7.1.2 Probenpräparation im Labor

7.1.2.1 Prüfung auf Salmonellen

Die Untersuchung auf Salmonellen ist in Abb. 11 ersichtlich und ist wie folgt gegliedert:

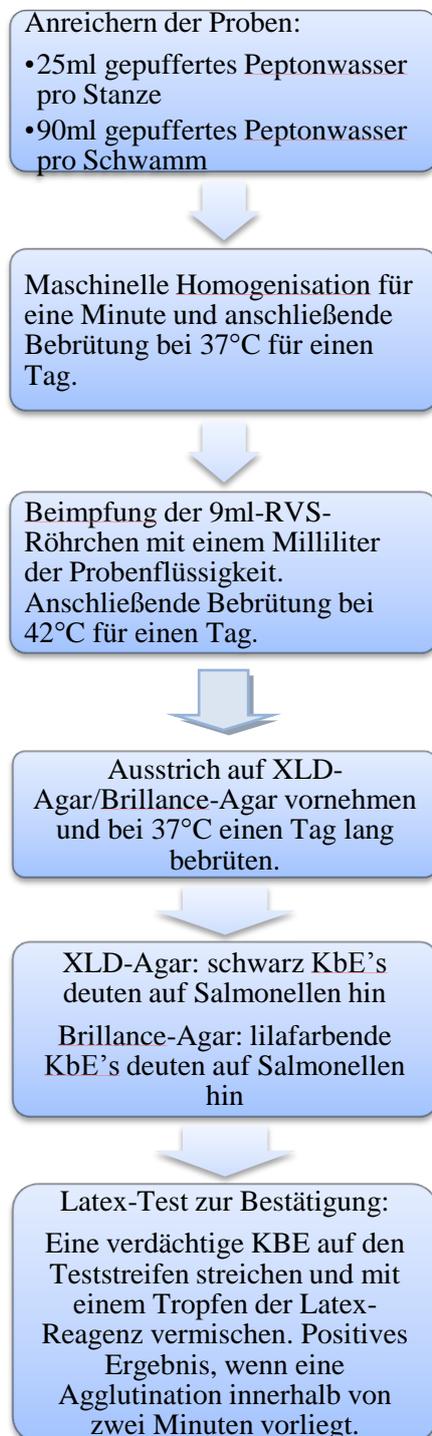


Abbildung 11 : Flussdiagramm zum Ablauf eines kulturellen Salmonellennachweises

Zunächst werden die Proben mit gepufferten Peptonwasser angereichert. Bei den Stanzproben wird pro Stanze 25ml Pepton in den Stomacherbeutel gegeben und im Fall der Kratzschwämme wird pro Beutel 90 ml Pepton hinzugefügt. Anschließend werden die Beutel eine Minute lang maschinell homogenisiert. Im nächsten Schritt folgt eine Inkubation der Beutel bei 37°C für einen Tag. Nach dieser Wartezeit wird ein Milliliter der Flüssigkeit entnommen und mit 9 ml RVS-Boullion vermischt. Die Entnahme der Flüssigkeit erfolgt mittels Eppendorfpipette. Dieses beimpfte RVS-Röhrchen wird für einen weiteren Tag in einen Brutschrank von 42°C gegeben. Am Folgetag wird eine sterile Impföse verwendet und in das Medium eingetaucht. Anschließend erfolgt ein Abstrich auf dem XLD-Brilliance Salmonella-Nährboden von Oxid. Der XLD- Agar ist rot gefärbt, während der Brilliance Salmonella-Nährboden weiß gefärbt ist. Bei dem Anfertigen der einzelnen Abstriche ist darauf zu achten, dass vor jeder neuen Probe die Impföse über einen Bunsenbrenner abgeflammt wird. Nach der Beimpfung der Nährböden erfolgt eine weitere Inkubation bei 37°C für einen Tag. Die Auswertung wird am Folgetag vorgenommen. Schwarze Kolonien auf den XLD-Agar und lilafarbende Kolonien auf der Brillianceagarfläche deuten auf Salmonellenbefall hin. Um eine Bestätigung zu erhalten, wird bei den verdächtigen Kolonien ein Latex-Test durchgeführt. Hierfür wird mit einer sterilen Impföse Material der verdächtigen Salmonellenkolonie von der Platte entnommen und diese wird auf der beiliegenden Testkarte mit einem Tropfen Latex-

Reagenz vermischt. Die Probe sollte innerhalb von 2 Minuten agglutinieren, anderenfalls wird die Reaktion als falsch-positiv gewertet. Eine positive Salmonellenprobe liegt somit vor, wenn eine Agglutination innerhalb von zwei Minuten Reaktionszeit stattfindet.

7.1.2.2 Prüfung auf *Escherichia coli*

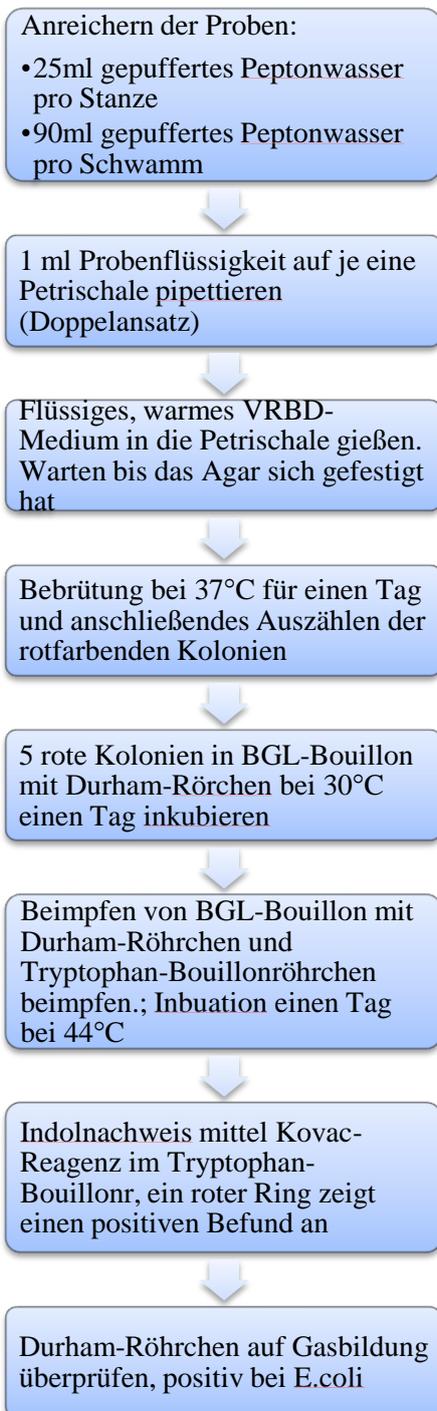


Abbildung 12 : Flussdiagramm zum Ablauf des *E. coli*-Nachweises

Die Untersuchung auf *E. Coli* ist wie folgt durchzuführen und sie ist ebenfalls in Abb. 12 schematisch dargestellt. Zunächst werden die Proben mit gepufferten Pepton angereichert. Stanzproben werden mit je 25ml pro Probe vermengt und Kratzschwammproben erhalten 90ml des Peptons. Es wird ein Doppelansatz von jeder Probe angefertigt. Hierfür werden doppelt so viele Petrischalen als Probenbeutel benötigt. Es wird je ein Milliliter Probenflüssigkeit entnommen und auf eine Petrischale pipettiert. Vor jeder neuen Probe wird die Eppendorfpipette mit Bacillol desinfiziert. Anschließend wird erwärmtes VRBD-Medium auf die Proben gegeben und gewartet bis sich das Medium gefestigt hat. Darauf folgt eine Bebrütung bei 37°C für einen Tag. Enterobacteriaceae bilden charakteristische rosafarbene oder rote Kolonien mit oder ohne Präzipitathof. Anschließend werden alle Kolonien ausgezählt. Von jeder Platte werden 5 rote Kolonien abgeimpft und in BGL-Bouillon mit Durham-Röhrchen geben. Es erfolgt eine Inkubation bei 30°C für einen Tag. Anschließend erfolgt eine Abimpfung mittels Öse in frische BGL-Bouillon mit Durham-Röhrchen und parallel wird ein Tryptophan-Bouillonröhrchen beimpft und beide Proben werden bei 44°C einen Tag inkubiert. BGL-Bouillon wird auf Gasbildung beurteilt und im Tryptophan-Bouillonröhrchen erfolgt ein Indolnachweis unter Zugabe von Kovac-Reagenz. Eine positive Probe liegt bei der Bildung eines kirschroten Ringes vor.

E.coli sind in der Lage Laktose als Kohlenstoffquelle zu vergären. Dabei entstehen saure Stoffwechselprodukte und Kohlenstoffdioxid. Mittels Durham-Röhrchen kann das gesammelte Gas nachgewiesen werden.

7.2 Experimentelle Durchführung der PassPork-/Schwarzlichtmethode

7.2.1 Probenentnahme

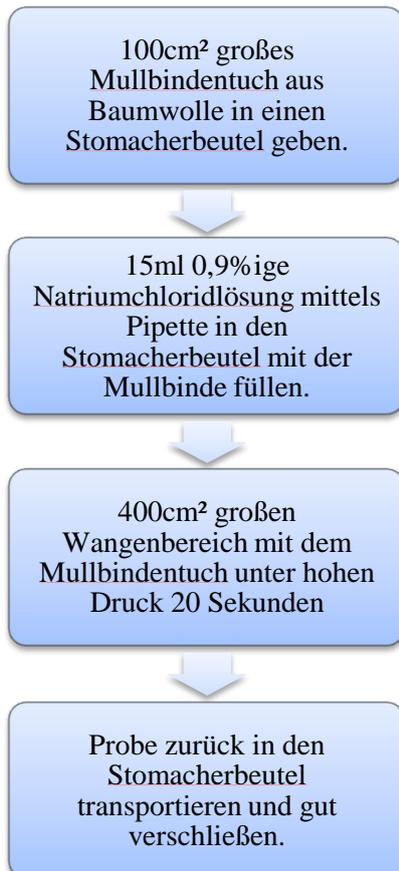
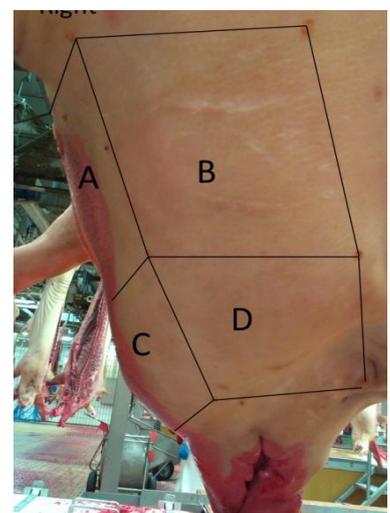


Abbildung 13 : Flusschema zum Ablauf der PassPork-Probenentnahme

Anschließend wird die Probe zurück in den Stomacherbeutel transportiert. Es ist von großer Bedeutung, dass die Hände vor jeder Probenentnahme neu desinfiziert werden, um Bakterienkontaminationen zu vermeiden. In Abb. 13 sind die einzelnen Schritte für die Probensammlung laut dem Validierungsprotokoll aufgelistet.

Zunächst wird je ein 100cm² großes Mullbindentuch in einen Stomacherbeutel gegeben und mit 15 ml 0,9%iger Natriumchloridlösung benetzt. Diese Beutel müssen nun mindestens 20 Stunden gut verschlossen ruhen, bevor sie für die Probenentnahme zum Einsatz kommen dürfen. Es kann auch ein Stomacherbeutel mit integriertem Filter verwendet werden.

Die Probenentnahme wird an einem Schlachthof durchgeführt. In einer Kühlkammer werden die Schweinehälften für die weitere Verarbeitung gelagert. Es herrschen Temperaturen um die 4°C. Es wird eine Probenentnahmestelle am Schwein festgelegt, die 400cm² groß sein sollte. Abbildung 14 zeigt solche Bereiche in der Wangenpartie von einer Schweinehälfte. Dieses Gebiet wird mindestens zwanzig Sekunden mit möglichst viel Druck horizontal, vertikal und diagonal mit einem 100cm² großen, benetzten Mullbindentuch abgerieben.



[2] Abbildung 14 : Probenentnahmestelle am Schwein

7.2.2 Probenpräparation im Labor

Nach der Probenentnahme beginnt der Laborteil. Hierfür wird ein steriler Arbeitsplatz benötigt. Eine sterile Werkbank sorgt für bestmögliche Arbeitsbedingungen. Unter der Werkbank werden den Proben jeweils 20 ml 0,9%ige Natriumchloridlösung zugefügt. Anschließend wird jeder Stomacherbeutel zwei Minuten mit der Hand massiert, um eine homogene Flüssigkeit zu erhalten. Nach Ablauf der Zeit gibt es zwei Durchführungsvarianten, diese hängen von der Wahl des Stomacherbeutels ab. Hat der Stomacherbeutel keinen Filter muss die Flüssigkeit vor der Beimpfung der LDF's gefiltert werden. Dafür wird eine nadellose Einwegspritze verwendet, mit mindestens 5 ml der Probenflüssigkeit aufgenommen wird und durch einen 10µm-Filter in ein Zentrifugenröhrchen gepresst wird. Das PassPork-Prozedere sieht anschließend eine zwölfminütige Zentrifugierung bei 3000G vor. Das Pellet wird daraufhin mit 200µl des 0,9%ige NaCl-Lösung vermengt. Das der Filter im LFD wird mit dem Laufmittel ausgewaschen und ein Probenvolumen von 100µl wird dem LFD zugeführt. Da Zentrifugen sehr kostenintensiv sind und eine günstige, neue Nachweismethode gefunden werden soll, wird dieser Schritt bei der Validierung weggelassen. Diese Maßnahme ist genehmigt wurden. Man entnimmt stattdessen nur 100µl der gefilterten Flüssigkeit. Da der 10µm-Filter in der Anschaffung ebenfalls sehr kostenintensiv ist, kann auch ein Stomacherbeutel mit Filter verwendet werden. Dieser sorgt ebenfalls dafür, dass Fädenreste vom Mullbindentuch herausgefiltert werden. Die Fließdiagramme (Abb. 15 und 16) zeigen die wesentlichen Präparationsschritte.



Abbildung 15 : Probenpräparation der PassPork-Methode



Abbildung 16 : Probenpräparation der PassPork-Methode mit integriertem Filter im Stomacherbeutel

7.2.3 Erläuterung zur Probenauswertung

Nach der Beimpfung der LDF's müssen 10 Minuten gewartet werden bis die Proben in das Gerät eingelesen werden können und eine Auswertung mittels ultravioletten Lichts getroffen werden kann.

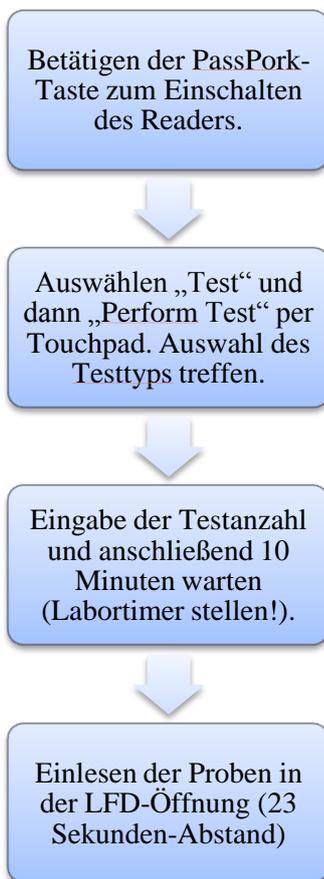


Abbildung 17 : Flussdiagramm zur Bedienung des PassPork-Readers

Die Bedienung des PassPork-Readers ist simpel und in Abb. 17 in Form eines Flussdiagramms dargestellt. Zunächst wird durch leichtes Eindrücken die PassPork-Taste, welche sich in der Mitte der Readeroberfläche befindet und über der ein Anschaltsymbol gezeichnet ist, betätigt. Anschließend muss zwischen den Möglichkeiten „Test“ und „Configuration“ gewählt werden. Die „Test-Taste“ führt in das Testmenü. Dort können der Probennamen festgelegt oder ändert werden, ein Test durchgeführt und als letztes bereits gesammelte Resultate begutachtet werden. Da es in diesem Teil der Arbeit um die Probenauswertung geht, wird die Beschreibung des Readers auf die Testreihenermittlung begrenzt. Wird das Feld „Perform Test“ betätigt, kann eine Auswahl des LFD-Typs getroffen werden. Momentan besteht jedoch nur die Möglichkeit den Typ „Salmonella/E. coli“ zu wählen. Anschließend erfragt das Gerät wie viele Tests durchgeführt werden sollen und per Touchpad kann eine Anzahl eingegeben werden und diese wird mit „OK“ bestätigt. Nachdem die Anzahl festgelegt wurde, erfolgt die Frage, ob ein interner Timer für zehn Minuten gestellt werden soll oder ob ein

Timer vom Laborpersonal gestellt werden soll. Wichtig ist, dass die 10 Minuten nicht unterschritten werden, da sonst Verwicklungen in den Auswertungsdiagrammen auftreten können. Die Quh-Lab hat sich auf den Labortimer bezogen und es konnte direkt eine Testreihe gestartet werden. Im Abstand von 23 Sekunden können die einzelnen LDF's in die markierte Einbuchtung am Boden des Readers geben werden, wo sie in das Gerät eingescannt werden und Daten zur Auswertung liefern. Da das Gerät zu dem Zeitpunkt der Validierung noch nicht komplett geeicht war, musste man auf eine zweite Kontrollmethode zurückgreifen. Die LDF's reagieren auf ultraviolettes Licht und diese Eigenschaft wurde genutzt. In einem abgedunkelten Raum wurden die LDF's unter Schwarzlicht begutachtet und dort konnte festgestellt werden, ob

das LFD bei E. coli, Salmonellen oder der Kontrolleinheit angeschlagen hat. Der „C“-Balken steht für die Kontrolleinheit. Der Balken bei „T“ zeigt das Vorhandensein von E. coli an und leuchtet ein Balken in der Mitte auf, liegen Salmonellen vor.

7.3. Darstellung der Versuchsreihen

7.3.1 Versuche zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität

7.3.1.1 Gestellte Stanzproben von der Quh-Lab

In diesem Versuch werden Stanzproben von einer Größe von 5cm für beide Testmethoden eingesetzt. Die Proben wurden in einer Tiefkühltruhe gelagert. Die Proben werden nach klassischen Methoden auf Salmonellen und E. coli untersucht und mittels PassPork-Methode getestet. Bei der PassPork-Methode kommt es zur Abweichung im Verlaufsprotokoll. In diesem Fall wird die Stanze als Probenfläche gesehen und 20 Sekunden unter möglichst hohem Druck abgerieben. Alle weiteren Schritte sind wieder einheitlich im Bezug auf die Probenpräparation im Labor. Auf Grund der geringen Probengröße können keine einheitlichen Proben miteinander verglichen werden. Es werden lediglich Proben vom gleichen Tier miteinander verglichen. Es gibt insgesamt 42 Durchläufe für diese Testreihe. Dieser Versuch soll zeigen, wie sensitiv die PassPork-Methodik im Vergleich zu klassischen Nachweismethoden ist. Es wird die Spezifität und die Sensitivität berechnet, deren Wunschwerte über 80% liegen sollen. Die Formel für die Berechnungen sehen folgendermaßen aus:

Sensitivität:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtiger Positiver}}{(\text{Anzahl richtiger Positiver} + \text{Anzahl falscher Negativer})}$$

Spezifität:

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtiger Negativer}}{(\text{Anzahl richtiger Negativer} + \text{Anzahl falscher Positiver})}$$

7.3.1.2 Am Schlachthof entnommene Stanzproben

Bei diesem Versuch werden Stanzproben vom selben Schwein aus einem festlegten Bereich bei der Wangenpartie entnommen. Diese Proben werden im Labor nach dem Ablaufschema für klassische Tests untersucht. Diese Ergebnisse werden denen der PassPork-Methode gegenübergestellt. Bei der PassPork-Methode wird eine nicht destruktive Methode zur Probensammlung angewandt. Die Sensitivität und Spezifität werden berechnet.

7.3.1.3 Am Schlachthof entnommene Kratzschwammproben

Bei diesem Versuch werden Kratzschwammproben vom selben Schwein aus einem festlegten Bereich bei der Wangenpartie entnommen. Diese Proben werden im Labor nach dem Ablaufschema für klassische Tests untersucht. Diese Ergebnisse werden denen der PassPork-Methode gegenübergestellt. Die Sensitivität und Spezifität werden berechnet.

7.3.2 Versuch zur Ermittlung des Detektionslimits

Bei diesem Versuch werden Glycerinkulturen als Nachweiskulturen gewählt:

- ATTC 14028 *Salmonella typhimurium*
- ATCC 13076 *Salmonella enteritidis*
- ATCC 25405 K12- Stamm *E.Coli* (Sicherheitsstamm)
- DSM 4261 *Escherichia coli*

Diese Kulturen werden im nächsten Schritt mittels Impföse auf je eine LB-Platte gestrichen. Wichtig ist, dass die Impfösen steril sind. Anschließend folgt eine Bebrütung der Platten bei 37°C für 16 Stunden. Nach Ablauf der Zeit wird je eine Kultur in 4ml LB-Boullion gegeben und für weitere 16 Stunden bebrütet. Am darauffolgenden Tag wird eine Verdünnungsreihe bis 10⁻⁹ angelegt. Je 50µl werden aus den Verdünnungsstufe 10⁻⁷ bis 10⁻⁹ auf eine LB-Platte gegeben und mit einem sterilen Spatel sorgfältig auf der Platte verteilt. Außerdem werden von jeder Verdünnungsreihe alle Proben zu je 100µl in ein LFD gegeben und nach 10 minütiger Wartezeit wie oben beschrieben ausgewertet. Die bespatelten Platten werden für weitere 18 Stunden in den Brutschrank bei 37°C gegeben und am nächsten Tag ausgewertet. Durch die Anzahl der KbE's,

das verwendete Volumen und die Verdünnungszahl können Rückschlüsse auf die Anzahl von KBE's/ml in der Anfangslösung getroffen werden. Anschließend muss die Detektionsgrenze der LFD's berücksichtigt werden, die im ultravioletten Licht ermittelt wurde und anhand dieser Angaben kann das Detektionslimit errechnet werden. Die Berechnungsformeln sehen folgendermaßen aus:

Berechnung der Anzahl KBE in einem Milliliter:

$$\text{KBE/ml} = \text{KBE} * (\text{aufgetragenes Vol. [ml]}) * 10^x$$

Berechnung des Detektionslimits:

$$\text{Detektionslimit [KBE/ml]} = \text{KBE/ml} * 10^{-x}$$

8 Auswertung der Versuchsreihen

8.1 Versuche zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität

8.1.1 Gestellte Stanzproben von der Quh-Lab

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der PassPork-/Schwarzlichtmethode vergleichend zu den Ergebnissen der klassischen Verfahren dargestellt. Aus diesen Ergebnissen erfolgt die Berechnung der Sensitivität und der Spezifität. Die Sensitivität gibt an, wie viele erkrankte Schweine vom Test richtig als betroffen erkannt wurden sind. Die Spezifität hingegen steht dafür, wie viele Schweine von der Testanalyse richtig als nicht betroffen eingestuft wurden. Die angestrebten Werte für die Spezifität und Sensitivität sollen 80% betragen. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse hinsichtlich der Salmonellenuntersuchung aus den gestellten Stanzproben. Tabelle 2 enthält die Ergebnisse für den E. coli- Befund dieser Proben. Die Berechnungen beziehen sich auf 42 Testdurchläufe.

Tabelle 1 : Nachweis von Salmonellen mit gestellten Stanzproben

		Tatsächlicher Sachverhalt		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Testergebnis	Positiv	3	3	6
	Negativ	2	34	36
	Gesamt	5	37	42

Salmonellen:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtiger Positiver}}{(\text{Anzahl richtiger Positiver} + \text{Anzahl falscher Negativer})}$$

$$\text{Sensitivität} = \frac{3}{(3 + 2)} = 0,6 = 60\%$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtiger Negativer}}{(\text{Anzahl richtiger Negativer} + \text{Anzahl falscher Positiver})}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{34}{(34 + 3)} = 0,9189 = 91,89\%$$

Die Werte für die Sensitivität liegen unter 80%, daraus kann geschlossen werden, dass die PassPork-/Schwarzlichtmethode in diesem Fall dazu führt, dass zu oft Proben als negativ bewertet wurden, die es nicht sind. Der Grund hierfür liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Probenbehandlung. Für die PassProk-/Schwarzlichtmethode wird ein Probenbereich von 400cm² benötigt, der ist bei einer einzelnen Stanze von 5cm nicht gegeben. Des Weiteren konnte nicht die identische Stanze für beide Testverfahren verwendet werden. Es wurden Stanzen vom gleichen Tier miteinander verglichen, deren Probenstellen aber unterschiedlicher Herkunft waren. Für die Verwendung einer identischen Probe hätte zunächst eine Homogenisierung der Proben in gepufferten Peptonwasser stattfinden müssen. Bei dieser Vorgehensweise würde die Beprobung mittels Mullbindentuch außer Acht gelassen werden und diese ist wichtiger Bestandteil der Validierung des Verfahrens. Die schlechten Testergebnisse müssen also nicht zwangsweise auf eine gescheiterte, neue Testmethode hindeuten. Die Tests mit Schweinehälften vom Schlachthof halten den vorgeschriebenen Ablaufplan ein und sind somit aussagekräftiger als der Vorversuch mit Stanzen.

Tabelle 2 : Nachweis von E.coli mit gestellten Stanzproben

		Tatsächlicher Sachverhalt		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Testergebnis	Positiv	3	5	8
	Negativ	1	33	34
	Gesamt	4	38	42

E. coli:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtiger Positiver}}{(\text{Anzahl richtiger Positiver} + \text{Anzahl falscher Negativer})}$$

$$\text{Sensitivität} = \frac{3}{(3 + 1)} = 0,75 = 75\%$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtiger Negativer}}{(\text{Anzahl richtiger Negativer} + \text{Anzahl falscher Positiver})}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{33}{(33 + 5)} = 0,8684 = 86,84\%$$

Auch für diese Werte gilt eine geringe Aussagefähigkeit aus den oben beschriebenen Gründen.

8.1.2 Am Schlachthof entnommene Stanzproben

Die Tabellen 3 und 4 enthalten die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Proben vom Schlachthof. Hier wird die Mullbindenmethode des PassPork-Verfahrens der Stanzprobenentnahme für die klassische Analyse gegenübergestellt. Da es sich bei der Stanzprobenentnahme um ein destruktives Verfahren handelt, wurden für die Versuchsreihe nur 20 Stanzproben genehmigt. Tabelle 3 bezieht sich auf die Salmonellenuntersuchung, während Tabelle 4 die Ergebnisse des E. coli-Vergleichs aufzeigt.

Tabelle 3 : Nachweis von Salmonellen aus Stanzproben vom Schlachthof

		Tatsächlicher Sachverhalt		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Testergebnis	Positiv	4	2	6
	Negativ	1	12	13
	Gesamt	5	14	19

Ein Stomacherbeutel wurde bei der maschinellen Homogenisierung zerstört und war somit nicht auswertbar!

Salmonellen:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtiger Positiver}}{(\text{Anzahl richtiger Positiver} + \text{Anzahl falscher Negativer})}$$

$$\text{Sensitivität} = \frac{4}{(4 + 1)} = 0,8 = 80,00\%$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtiger Falschergebnisse}}{(\text{Anzahl richtiger Falschergebnisse} + \text{Anzahl falscher Richtigergebnisse})}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{12}{(12 + 2)} = 0,8571 = 85,71\%$$

Die Spezifität und Sensitivität sind in diesem Fall gut. Der Unterschied zu den Stanzproben, die von der Quh-Lab gestellt wurden, ist hier auch deutlich ersichtlich. Die Zuverlässigkeit des neuen Verfahrens ist in diesem Fall im Rahmen der geforderten Wertvorstellung.

Tabelle 4 : Nachweis von E.coli aus Stanzproben vom Schlachthof

		Tatsächlicher Sachverhalt		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Testergebnis	Positiv	5	3	8
	Negativ	2	9	11
	Gesamt	7	12	19

E.coli:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtiger Positiver}}{(\text{Anzahl richtiger Positiver} + \text{Anzahl falscher Negativer})}$$

$$\text{Sensitivität} = \frac{5}{(5 + 1)} = 0,7143 = 71,43\%$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtiger Negativer}}{(\text{Anzahl richtiger Negativer} + \text{Anzahl falscher Positiver})}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{9}{(9 + 3)} = 0,75 = 75,00\%$$

Die Analysewerte von E. coli sind hingegen stark abweichend von dem Sollwert. In diesem Fall sollte das Verfahren nochmals optimiert werden. Kleinere Fehler könnten allerdings auch bei Begutachtung der LFD's unter Schwarzlicht aufgetreten sein, da dort die angezeigten Balken nicht immer gleich stark fluoresziert haben und so eventuelle Fehlinterpretationen aufgetreten sein könnten. Daher sind in diesem Fall die Ergebnisse der Reader-Auswertung entscheidend. Ein weiterer Grund kann sein, dass das Detektionslimit des Gerätes im Vergleich zu der klassischen Nachweismethode überschritten wurde und daher die Proben als „falsch negativ“ bewertet wurden.

8.1.3 Am Schlachthof entnommene Kratzschwammproben

Die Tabellen 5 und 6 enthalten die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Proben vom Schlachthof. Hier wird die Mullbindenmethode des PassPork-Verfahrens der Kratzschwammprobenentnahme für die klassische Analyse gegenübergestellt. Tabelle 5 bezieht sich auf die Salmonellenuntersuchung, während Tabelle 6 die Ergebnisse des E. coli-Vergleichs aufzeigt. Insgesamt wurden 40 Durchläufe getestet.

Tabelle 5 : Nachweis von Salmonellen aus Kratzschwammproben

		Tatsächlicher Sachverhalt		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Testergebnis	Positiv	6	4	10
	Negativ	1	29	30
	Gesamt	7	33	40

Salmonellen:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtiger Positiver}}{(\text{Anzahl richtiger Positiver} + \text{Anzahl falscher Negativer})}$$

$$\text{Sensitivität} = \frac{6}{(6 + 1)} = 0,8571 = 85,71\%$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtiger Falschergebnisse}}{(\text{Anzahl richtiger Falschergebnisse} + \text{Anzahl falscher Richtigergebnisse})}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{28}{(28 + 4)} = 0,8787 = 87,87\%$$

Es handelt sich bei beiden Probenentnahmeverfahren um nicht destruktive Verfahren. Die Ergebnisse sind im Sollbereich.

Tabelle 6 : Nachweis von E.coli aus Kratzschwammproben vom Schlachthof

		Tatsächlicher Sachverhalt		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Testergebnis	Positiv	5	3	8
	Negativ	2	30	32
	Gesamt	7	33	40

E. coli:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtiger Positiver}}{(\text{Anzahl richtiger Positiver} + \text{Anzahl falscher Negativer})}$$

$$\text{Sensitivität} = \frac{5}{(5 + 2)} = 0,7143 = 71,43\%$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtiger Negativer}}{(\text{Anzahl richtiger Negativer} + \text{Anzahl falscher Positiver})}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{30}{(30 + 3)} = 0,9091 = 90,91\%$$

Die Ergebnisse für die Sensitivität entsprechen nicht dem Sollwert.

Die Ergebnisse der Testreihe in Hinblick auf die Zuverlässigkeit sind nicht optimal ausgefallen. Die erste Versuchsreihe wird als gescheiterte Methode außer Acht gelassen. Die beiden anderen Versuchsreihen zeigen, dass die Resultate für den Salmonellenbefund in beiden Fällen die Sollwerte erreichen. Die Sensitivität und auch die Spezifität liegen über 80%. Das war die Zielvorgabe. In Hinblick auf den E. coli- Befund ist die Sensitivität unter 80%. Dafür können zwei Ursachen verantwortlich sein. Es können Defizite hinsichtlich der Nachweisgrenze vorhanden sein, so dass zu wenige Bakterien anwesend waren oder es wurden Fehlinterpretationen der optischen Auswertung gemacht. Die Überprüfung der zweiten These erfolgt in einem spanischen Partnerunternehmen, das die eingelesenen Resultate des Readers in Bezug auf die klassischen Ergebnisse und der Schwarzlichtmethode auswertet. Die Nachweisgrenzen für E.coli und Salmonellen wurden im zweiten Versuch ermittelt.

8.2 Versuch zur Ermittlung des Detektionslimits

Es ist entscheidend die Grenzen der neuartigen Methode zu kennen. Für die Absolvierung des Versuchs wurden wie bereits in der Durchführung beschrieben vier unterschiedliche Glycerinkulturen verwendet. Die folgende Tabelle zeigt den ersten Testdurchlauf für die vier Kulturen und die Berechnung ergibt eine Anzahl von KBE/ml.

Tabelle 7 : Erster Testlauf

Glycerinkultur	Aufgetragenes Volumen [µl]	Verdünnung 10^{-x}	KBE	KBE/ml	Mittelwert x_m [KBE/ml]
14028 Salmonella typhimurium	50	9	5	$1 \cdot 10^{11}$	$7,23 \cdot 10^{10}$
14028 Salmonella typhimurium	50	8	37	$7,4 \cdot 10^{10}$	
14028 Salmonella typhimurium	50	7	215	$4,3 \cdot 10^{10}$	
13076 Salmonella enteritidis	50	9	7	$1,4 \cdot 10^{11}$	$8,35 \cdot 10^{10}$
13076 Salmonella enteritidis	50	8	31	$6,2 \cdot 10^{10}$	
13076 Salmonella enteritidis	50	7	243	$4,86 \cdot 10^{10}$	
DSM4261 Escherichia coli	50	9	11	$2,2 \cdot 10^{11}$	$1,13 \cdot 10^{11}$
DSM4261	50	8	41	$8,2 \cdot 10^{10}$	

Escherichia coli					
DSM4261 Escherichia coli	50	7	18	$3,74 \cdot 10^{10}$	
ATTC 25405 K12- Stamm E.Coli	50	9	1	$2 \cdot 10^{10}$	$2,61 \cdot 10^{10}$
ATTC 25405 K12- Stamm E.Coli	50	8	14	$2,8 \cdot 10^{10}$	
ATTC 25405 K12- Stamm E.Coli	50	7	151	$3,02 \cdot 10^{10}$	

Berechnungsbeispiel Salmonella typhimurium:

$$\text{KBE/ml} = \text{KBE} \cdot (\text{aufgetragenes Vol. [ml]}) \cdot 10^x \quad x_m = (x_1 + x_2 + x_3) / x_{\text{Anzahl}}$$

$$\text{KBE/ml} = 5 \cdot 20 \text{ml} \cdot 10^9 = 1 \cdot 10^{11}$$

$$x_m = (1 \cdot 10^{11} + 7,4 \cdot 10^{10} + 4,3 \cdot 10^{10}) / 3$$

$$x_m = 7,23 \cdot 10^{10} \text{ [Einheit: KBE/ml]}$$

Die folgende Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse für die Durchführung des zweiten Testdurchlaufs und im Anschluss die Berechnung der Anzahl von KBE/ml in der Anfangslösung.

Tabelle 8 : Zweiter Testlauf

Glycerinkultur	Aufgetragenes Volumen [µl]	Verdünnung 10^{-x}	KBE	KBE/ml	Mittelwert x_m [KBE/ml]
14028 Salmonella typhimurium	50	9	3	$6 \cdot 10^{10}$	$\sim 5,33 \cdot 10^{10}$
14028	50	8	28	$5,6 \cdot 10^{10}$	

Salmonella typhimurium					
14028 Salmonella typhimurium	50	7	221	$4,42 \cdot 10^{10}$	
13076 Salmonella enteritidis	50	9	4	$8 \cdot 10^{10}$	$6,47 \cdot 10^{10}$
13076 Salmonella enteritidis	50	8	31	$6,2 \cdot 10^{10}$	
13076 Salmonella enteritidis	50	7	261	$5,22 \cdot 10^{10}$	
DSM4261 Escherichia coli	50	9	7	$1,4 \cdot 10^{11}$	$\sim 9,46 \cdot 10^{10}$
DSM4261 Escherichia coli	50	8	41	$8,2 \cdot 10^{10}$	
DSM4261 Escherichia coli	50	7	309	$6,18 \cdot 10^{10}$	
ATTC 25405 K12- Stamm E.Coli	50	9	1	$2 \cdot 10^{10}$	$\sim 2,75 \cdot 10^{10}$
ATTC 25405 K12- Stamm E.Coli	50	8	17	$3,4 \cdot 10^{10}$	
ATTC 25405 K12- Stamm E.Coli	50	7	143	$2,86 \cdot 10^{10}$	

Berechnungsbeispiel Salmonella typhimurium:

$$\text{KBE/ml} = \text{KBE} * (\text{aufgetragenes Vol. [ml]}) * 10^x$$

$$\text{KBE/ml} = 5 * 20\text{ml} * 10^9 = 6 * 10^{10}$$

$$x_m = (x_1 + x_2 + x_3) / x_{\text{Anzahl}}$$

$$x_m = (6 * 10^{10} + 5,6 * 10^{10} + 4,4 * 10^{10}) / 3$$

$$x_m = 5,33 * 10^{10} \text{ [Einheit: KBE/ml]}$$

In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse aus den beiden Testläufen zusammengefasst und die Resultate der Probenbegutachtung unter ultraviolettem Licht mit einbezogen. Auf diese Weise kann im nächsten Schritt das Detektionslimit berechnet werden.

Tabelle 9 : Berechnung des Detektionslimits

Glycerinkulturen	Erster Testlauf KBE/ml	Zweiter Testlauf KBE/ml	Mittelwert x_m KBE/ml	Detektionslimit KBE/ml
ATTC 14028 Salmonella typhimurium	$7,23 * 10^{10}$	$5,33 * 10^{10}$	$\sim 6,29 * 10^{10}$	6,29E+5
ATCC 13076 Salmonella enteritidis	$8,34 * 10^{10}$	$6,47 * 10^{10}$	$\sim 7,41 * 10^{10}$	7,41E+6
DSM4261 Escherichia coli	$1,13 * 10^{11}$	$9,46 * 10^{10}$	$\sim 1,04 * 10^{11}$	1,04E+7
ATTC 25405 K12- Stamm E.Coli	$2,61 * 10^{10}$	$2,75 * 10^{10}$	$\sim 2,68 * 10^{10}$	2,68E+7

Berechnung des Detektionslimits:

1) ATTC 14028 Salmonella typhimurium:

$$\text{Detektionslimit} = x_m * 10^{-x} = (6,29 * 10^{10}) * 10^{-5} = 6,29E+5$$

Das LFD zeigte im ultravioletten Licht zuletzt bei der Verdünnung 10^{-5} eine Reaktion.

2) ATCC 13076 *Salmonella enteritidis*:

$$\text{Detektionslimit} = x_m * 10^{-x} = (7,41 * 10^{10}) * 10^{-4} = 7,41E+6$$

Das LFD zeigte im ultravioletten Licht zuletzt bei der Verdünnung 10^{-4} eine Reaktion.

3) DSM4261 *Escherichia coli*:

$$\text{Detektionslimit} = x_m * 10^{-x} = (1,04 * 10^{11}) * 10^{-4} = 1,04E+7$$

Das LFD zeigte im ultravioletten Licht zuletzt bei der Verdünnung 10^{-4} eine Reaktion.

4) ATTC 25405 K12- Stamm *E. coli*:

$$\text{Detektionslimit} = x_m * 10^{-x} = (2,68 * 10^{10}) * 10^{-3} = 2,68E+7$$

Das LFD zeigte im ultravioletten Licht zuletzt bei der Verdünnung 10^{-3} eine Reaktion.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die Werte für Salmonellen als auch für *E. coli* hochangesiedelt sind, so dass eine Voranreicherung der Proben empfehlenswert ist, um bessere Resultate erzielen zu können. Die Grenzwerte von *E. coli* sind höher als die von Salmonellen und dies spiegelt sich in den Ergebnissen von der ersten Versuchsreihe wieder. Die Ergebnisse sind sensitiver.

9 Diskussion

9.1 Auswertung der Versuchsreihen

9.1.1. Versuche zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität

Es wurden drei Testläufe im Bezug auf die Validierung der PassPork-/Schwarzlichtmethode durchgeführt. Im ersten Fall wurden Stanzproben als Probematerial für den Vergleich zwischen den beiden Methoden herangezogen. Im zweiten und dritten Fall wurden Proben verglichen, die am Schlachthof gesammelt wurden sind. Zum einen wurden für das klassische Verfahren Stanzproben entnommen und zum anderen Kratzschwammproben, die mit der Mullbindenprobenentnahme der PassPork-Methode verglichen wurden. Das Ziel der Untersuchung war, dass die Zuverlässigkeit der neuen PassPork-/Schwarzlichtmethode im Bereich der Sensitivität und der Spezifität nicht unter 80% liegen soll.

Im ersten Fall wurde das Ziel nicht erreicht, da die Probenbedingungen nicht den Vorgaben des Validierungsschemas entsprochen haben. Es ist festzuhalten, dass die Proben in diesem Test nicht identisch waren und somit keine aussagekräftigen Ergebnisse geliefert werden konnten. Für zukünftige Tests sollte die Beprobungsfläche eingehalten werden oder eine Alternativtestmethode bereitgestellt werden. Der Firma Quh-Lab ist es nicht möglich täglich neue Proben vom Schlachthof zu holen und daher ist ein Alternativtestverfahren die Wahl, die bevorzugt werden sollte.

Im zweiten Fall wurden Stanzproben vom Schlachthof per Selektivnährböden untersucht und mit der PassPork-/Schwarzlichtmethode verglichen. Die Probenentnahme mittels Mullbindentuch war in der Durchführung wesentlich einfacher und auch schneller zu bewältigen. Allerdings ist die Vorbehandlung der Mullbinden zeitraubend und bereits benetzte Tücher sind zu bevorzugen. Die anschließende Laborarbeit ist schnell bewältigt. Allerdings sollte statt dem teuren Filter eventuell besser auf einen Stomacherbeutel mit integriertem Filter zurückgegriffen werden, da auf diese Weise Kosten einspart werden können und auch ein Arbeitsschritt. Das Zurückhalten von Fädenresten gewährt diese Vorgehensweise ebenfalls. Die Auswertung zeigt, dass die Ergebnisse im Fall der Salmonellenuntersuchung auf die geforderten 80% für die Sensitivität und Spezifität kommen, jedoch bei der E.coli-Erkennung Defizite vorhanden sind. In Hinblick auf die Detektionsgrenzen aus Versuch 2 ist ersichtlich, dass E. coli in höherer Konzentration vorhanden sein müssen, um detektiert werden zu können. Des Weiteren könnten Fehler bei der Begutachtung unter ultraviolettem Licht aufgetreten sein, so dass Fehlinterpretationen entstanden

sind. Diese Aussage kann nur überprüft werden, wenn die Ergebnisse der Readeranalyse vorliegen, die von einem Partnerunternehmen in Spanien ausgewertet werden.

Im dritten Fall wurden Kratzschwammproben vom Schlachthof per Selektivnährböden untersucht und mit der PassPork-/Schwarzlichtmethode verglichen. Es handelt sich bei beiden Probenentnahmemethoden um nicht destruktive Varianten und beide sind schnell durchzuführen. Der Vorteil der Kratzschwämme liegt darin, dass diese bereits vorbenetzt sind und zum sofortigen Einsatz genommen werden können. Die Ergebnisse sind hier ähnlich ausgefallen wie im zweiten Fall und die Begründung ist identisch

Die Ergebnisse dieser Testreihe waren aufschlussreich. Sie zeigen, dass Salmonellen leichter zu detektieren sind als E. coli. Bei den Versuchen handelte es sich um eine Vorvalidierung und diese zeigte, dass die Methode im Bereich der E.coli nicht sensitiv genug ist. Die Werte für die Sensitivität und Spezifität sind im Fall der Salmonellen im Bereich der Zielvorstellungen. Durch eine Voranreicherung der Proben könnten die Ergebnisse zusätzlich optimiert werden. Die Idee der Methode ist gut, jedoch muss das Verfahren in allen Bereichen überarbeitet werden. Es sollte ein einheitliches Probeentnahmeverfahren entwickelt werden, dessen Kosten überschaubar sind. Eine gute Alternative stellen Stomacherbeutel mit Filtern dar. Es wäre vorstellbar, dass die Probe in Pepton angereichert wird. Auf diese Weise entsteht ein Bezug zu den klassischen Tests und es hätte den Vorteil, dass auch Stanzproben verwendet werden könnten.

9.1.2 Versuch zur Ermittlung des Detektionslimits

Bei der Ermittlung des Detektionslimit wurden Glycerinkulturen verwendet und die Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen eines anderen Forschungslabors annähernd überein. Die Grenzwerte dieses Labors lagen für E. coli bei $1.00E+7$ KBE/ml und für Salmonellen erhielten sie einen Detektionslimit von $5.70E+5$ KBE/ml. Die Durchführung der Ermittlung des Detektionslimit scheint somit erfolgreich gewesen zu sein. Festzuhalten ist, dass die ermittelten Werteparameter sowohl für die Salmonellen als auch für E. coli sehr hoch angesiedelt sind. Aus diesem Grund sollten die Proben vorangereichert werden, damit die Sensitivität gesteigert werden kann. Es sollte an der Optimierung des Detektionslimits gearbeitet werden, da die Zuverlässigkeit des Verfahrens von diesen Ergebnissen abhängig ist. Alternativ muss nach einem neuwertigen Nachweismodell für den Reader gesucht werden. Für diesen Fall ist eine neue Technik im Gespräch, die auf fluoreszierende Bakterien beruht. Die Einzelheiten werden noch unter den Vertragspartnern diskutiert.

9.2 Vergleich der PassPork-/Schwarzlichtmethode und modernen, diagnostischen Methoden

Die PassPork-Methode wurde entwickelt, damit ein neues, schnelles, leicht zu bedienendes, kostengünstiges und zuverlässiges Verfahren zum Schutz der Verbraucher vor pathogenen Keimen in Schweinefleisch entsteht. Im folgenden werden ELISA, real-time PCR, Biosensoren und die PassPork-Methode miteinander verglichen.

Schnelle Methode:

Bakterielle Krankheitserreger werden in der Regel in aufwändigen Prozeduren nachgewiesen, die mehrere Tage in Anspruch nehmen können. Daher sind schnelle und zuverlässige Alternativen gesucht. Der ELISA ist ein schnelles Testverfahren zum Nachweis von Antikörpern. Jedoch kann er nicht in real-time durchgeführt werden. In dieser Hinsicht hat die PassPork-Methode einen entscheidenden Vorteil. Die PCR ist ebenfalls in real-time möglich. Biosensoren arbeiten auch sehr schnell und können vor Ort beispielsweise zur Erkennung von Salmonellen eingesetzt werden.

Bedienbarkeit:

Die Handhabung einer Technologie sollte so einfach wie möglich gehalten sein und dennoch präzise Angaben liefern. Für viele Verfahren wird Fachpersonal benötigt. Der ELISA-Test ist relativ simpel aufgebaut. Allerdings müssen ein paar Hinweise beachtet werden. Zum einen sollten die Testkomponenten vor der Durchführung für mindestens 2–3 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Bei der Testdurchführung muss darauf geachtet werden, dass die Temperatur gehalten wird, da der Test temperaturempfindlich ist. Die Auswaschung sollte in relativ kurzen Zeitintervallen erfolgen, um eine Austrocknung der Einbuchtungen und eine ungleichmäßige Inkubationszeit zu verhindern. Die Fleischproben sollten vor der Analyse von Gewebsresten befreit werden. Die Durchführung der ELISA ist nach einer Einweisung und nach ein wenig Routine möglich. Wichtig ist, dass präzise gearbeitet wird.

Die PCR galt als komplizierte Methode, die nur von Experten durchführbar sei. Jedoch hat sich diese Methode in den Jahren weiterentwickelt. Real-time PCRs können oftmals ganz leicht vor

Ort durchgeführt werden und das ohne die Aufsicht eines Experten. Es gibt häufig Einweg-Kartuschen und einen Analyzer, die die Bedienbarkeit simpel halten.

Die Handhabung von Biosensoren ist abhängig von dem jeweiligen Sensor. Die Funktionsprinzipien ähneln sich, allerdings ist die Umsetzung der Technik vielschichtig.

Die Durchführung der PassPork-Methode ist ohne große Fachkenntnisse möglich. Der Reader ist übersichtlich aufgebaut. Die Bedienungsanleitung erstreckt sich über zwei DIN-A4-Seiten und enthält schematische Darstellungen. Die Probenpräparation könnte verkürzt werden, indem statt eines normalen Stomacherbeutel, ein Stomacherbeutel mit Filter verwendet wird, der die Fadenreste herausfiltert. Auf diese Weise würden Kosten und Arbeitszeit eingespart werden. Generell sind das Verfahren und die Durchführung simpel.

Kosten:

Die Kosten für einen Test belaufen sich bei allen Verfahren zwischen 2 und 5 Euro, das ist abhängig von dem jeweiligen Anbieter. Der Preis für das PassPork-Lesegerät soll sich auf 300-500Euro belaufen, was beispielweise günstiger als ein ELISA-Reader ist, dessen Preis ab 1000 Euro aufwärts anzusiedeln ist. Generell wird für die PassPork-Methode wenig Material benötigt, so dass von einer günstigen Alternative gesprochen werden kann. [2]

Zuverlässigkeit:

ELISA-Tests und real-time PCRs sind weltweit anerkannte Methoden. Der ELISA gilt als sensitiv, spezifisch, qualitativ und quantitativ. Die real-time PCR wird als sehr sensitiv und quantitativ eingestuft. Allerdings kann keine Aussage über die Lebensfähigkeit der Bakterien getroffen werden. Auch die Sensortechnologien sind äußerst sensitiv und quantitativ. Die PassPork-Methode ist derzeit noch keine vertrauenswürdige Methode. Die Werte für die Selektivität und Spezifität müssen noch optimiert werden.

Zusammenfassend eignet sich die PassPork-Methode als gute Alternative zur Detektion von pathogenen Keimen in Schweinfleisch, sofern die Treffsicherheit und das Detektionslimit verbessert werden. In Preis, Handhabung und Kosten ist die Methode weit vorne.

10 Zusammenfassung

Schweineprodukte werden in Europa nach wie vor bevorzugt verspeist. Doch gerade tierische Produkte können von pathogenen Keimen befallen sein und zu Erkrankung eines Menschen führen. Besonders häufig treten Salmonellosen auf, die durch Salmonellenerreger ausgelöst werden. Betroffene Personen leiden unter Magenschmerzen, Durchfall und Erbrechen. Bei einer solchen Erkrankung ist eine ständige Flüssigkeitszufuhr unerlässlich, um den Verlust auszugleichen. [1][3][5]

Um den Verbraucher zu schützen, durchlaufen die Produkte eine Qualitätskontrolle und für diesen Zweck wurde das PassPork-Projekt entwickelt. Dieses Projekt sollte eine neuartige Methode werden, die vor Ort an Schlachthöfen als HACCP-Maßnahme eingesetzt werden kann. Dabei sollte ein Reader entwickelt werden, der leicht zu bedienen ist und in den LFD's eingesetzt werden können, die von dem Reader gescannt und analysiert werden. Der PassPork-Reader sollte eine schnelle, zuverlässige und kostengünstige Alternative zu den teilweise teuren oder zeitaufwendigen anderen Testverfahren werden. Die LFD's sollen Salmonellen und E. coli nachweisen und zukünftig sollen auch noch andere pathogene Keime wie Campylobacter nachgewiesen werden können. [2]

Das Projekt wurde von acht europäischen Firmen betreut und jede hatte ihren Teil zu erfüllen. Dabei stellte sich heraus, dass die Zusammenarbeit vieler Firmen oft problematisch werden kann. Sobald eine Firma ihre Frist nicht einhalten konnte, verschob sich der Startzeitraum der anderen Firmen automatisch nach hinten. Aus diesem Grund wurde die Validierung nicht mit einem vollausgereiften Reader durchgeführt, da aus Zeitmangel nicht alle Fehler beseitigt werden konnten und auch keine Optimierung des Detektionslimits getroffen wurde. Daher wurde eine Alternative zum Reader gesucht, um die Validierung des Verfahrens durchführen zu können. Da die LFD's fluoreszierend sind, wurden die Ergebnisse mittels ultravioletten Lichts ausgewertet.

Im ersten Teil der Validierung sollte die Zuverlässigkeit der Methode im Vergleich zu bewährten Plattenverfahren getestet werden. Aus diesem Grund gab es drei Testreihen. Im ersten Fall wurden Stanzproben untersucht, die von der Firma Quh-Lab gestellt wurden. Bei diesem Versuch gab es zwei wesentliche Probleme. Die Testfläche betrug keine 400cm² wie vorgeschrieben und aus diesem Grund war die Bearbeitung der Proben kritisch. Es konnten auch keine identischen Proben für den Vergleich der Verfahren herangezogen werden. Daher sind die Ergebnisse dieses Vorversuchs nicht aussagekräftig. Für die Validierung der Methode so wie sie

derzeit ist, eignen sich besser Proben, die vom Schlachthof geholt werden und somit auch praxisnah sind. Die Ergebnisse der Proben vom zweiten und dritten Fall, die vom Schlachthof entnommen wurden, sind sowohl im Vergleich „Kratzschwamm zu PassPork-/Schwarzlicht“ als auch „Stanzen zu PassPork-/Schwarzlicht“ im Fall E.coli nicht präzise genug. Die Forderung für den Sollwert der Sensitivität und Spezifität von 80% konnten nicht erreicht werden. Gründe hierfür können sein, dass die Grenzwerte für die Erkennung unterschritten wurden und auch eine Ungenauigkeit beim Begutachten der Proben im Schwarzlicht können als Ursache herangezogen werden. Für die zweite genannte Ursache müssen die Werte des Readers herangezogen werden, die derzeit von einem spanischen Partnerunternehmen ausgewertet werden.

Die Ermittlung des Detektionslimits ist entscheidend, damit die Grenzen der Methode erkannt werden können. Für diese Bestimmung wurden Glycerinkulturen verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass das Limit für Salmonella typhimurium bei $6,29E+5$ KBE/ml liegt, für Salmonella enteritidis bei $7,41E+6$ KBE/ml, für den E.coli K12-Stamm bei $2,68E+7$ KBE/ml und für E. coli bei $1,04E+7$ KBE/ml. Diese Werte sind sehr hoch und sollten optimiert werden, da anderenfalls die Methode nur mit einer vorherigen Anreicherung der Proben sinnig ist. Anderenfalls muss ein neues Testwerkzeug entwickelt werden. Eine Idee beruht auf der Detektion mittels fluoreszierender Bakterien.

Festzuhalten ist, dass die Idee der PassPork-Methode sehr gut ist, die Umsetzung jedoch noch Verbesserungspotential aufweist. Angefangen bei der Probenentnahme, die Benetzung der Mullbinden ist sehr zeitaufwendig und es wäre sinnvoller auf bereits benetzte Mullbinden zurückzugreifen. Auch sollten Stomacherbeutel mit integriertem Filter verwendet werden, um Kosten bei dem teuren $10\mu\text{m}$ -Filter einzusparen. Desweiteren sollten die Proben im Labor nicht per Handmassage homogenisiert werden, da eine maschinelle Homogenisierung wesentlich zeitschonender ist. Das Einlesen in den Reader war oftmals problematisch, da dessen Bildschirm ständig eingefroren ist oder der Reader sich selbstständig ausgeschaltet hat. Diese Mängel werden noch behoben, aber für die Validierung waren diese Zustände nicht förderlich. Die Begutachtung der Proben unter ultraviolettem Licht war teilweise schwierig, da die Erkennungsbalken gelegentlich sehr schwach leuchteten.

Fazit dieser Bachelorarbeit ist, dass eine Validierung im ursprünglichen Sinn nicht möglich war. Die Tests in Bezug auf die Sensitivität und Spezifität haben gezeigt, dass das Verfahren optimiert werden muss. Eine Voranreicherung der Proben ist empfehlenswert, da die

Detektionsgrenzen sehr hoch angesiedelt sind. Die Idee der Methodik ist gut und alle anderen Faktoren wie Schnelligkeit, gute Handhabung und geringer Kostenaufwand sind auch vorzeigbar. Die Ergebnisse der Untersuchung werden von den Partnerfirmen in Vergleich zu den Ergebnissen des PassPork-Readers ausgewertet und sie helfen bei der Erstellung einer Detektionsgrenze.

Literaturverzeichnis

- [2] Seventh Framework Programme: THEME [SME-2012-1], Annex 1- “Description of Work”, 2014
- [3] Hächler H.; Lehner A.; Stephan, R.; Zweifel C.: Non typhöse Salmonellen, Lebensmittelhygienische Bedeutung, 1. Auflage, Behr’s Verlag Hamburg, 2014
- [4] Mersmann, C.: Rechtliche Bewertung des Salmonellennachweises in Lebensmitteln, Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, 2001
- [5] Müller, S.; Quirnbach, G.: Original Prüfungsfragen mit Kommentar GK2, Medizinische Mikrobiologie, 13. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2002
- [6] Weber H.: Mikrobiologie der Lebensmittel, Grundlagen, 9. Auflage, B. Behr’s Verlag GmbH & Co. KG Hamburg, 2010
- [7] Rieth, M.: Pharmazeutische Mikrobiologie, Qualitätssicherung, Monitoring, Betriebshygiene, 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag & Co KGaA Weinheim, 2012
- [8] Hauser, E.: Gefahrenidentifizierung der im Schwein epidemiologisch bedeutenden Salmonella enterica subsp. Enterica Serovare 4, [5], 12:i:-und Derby, Dissertation, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Freie Universität Berlin, 2011
- [9] Düllingen M.; Kirov A.; Unverricht H.: Hygiene und medizinische Mikrobiologie, Lehrbuch für Pflegepersonal, 6. Auflage, Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2013
- [10] Bleich S.; Döller P.; Heizmann W.; Kropp S.: Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Immunologie zur Vorbereitung auf das 1. Staatsexamen, 2. Auflage, Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1999
- [11] Sarkady C.; Wachter K.: Das große Buch der Kinderkrankheiten, Erkennen, Behandeln, Vorbeugen, Compact Verlag GmbH, München, 2010
- [12] Gottschalk U.; Maeting S.; Kern-Wächter E.: THIEMEs Endoskopieassistent , 1. Auflage, Thiemeverlag, Stuttgart, 2009
- [13] Hoedemaler M.; de Kruif A.; Mansfeld R.: Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind, 3.Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 2014
- [14] Delorme, S.: Untersuchung zum Nachweis von verotoxinogenen E. coli (VTEC), speziell Serovar O157, in Lebensmitteln tierischen Ursprungs mit verschiedenen Anreicherungsverfahren, Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus Liebig Universität Gießen, 2008

- [15] Bülte M.; Goll, M.: Escherichia coli, Eigenschaften, Vorkommen und Präventionsmaßnahmen, 2. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg, 2014
- [16] Fuchs G.; Schlegel H.: Allgemeine Mikrobiologie, 8.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007
- [17] Krömker V.: Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene; Parey Verlag, Stuttgart, 2007
- [18] Weber H.: Mikrobiologie der Lebensmittel, Grundlagen, 9.Auflage, Behr's Verlag, Hamburg, 2010
- [19] Gerok W.; Huber C.; Meinertz T.; Zeidler H.: Die Innere Medizin Referenzwerk für den Facharzt , 11. Auflage, Schattauer GmbH, Stuttgart, 2007
- [26] Horn, F.: Biochemie des Menschen, Das Lehrbuch für das Medizinstudium, 5. Auflage, Thieme-Verlag, Hamburg,2012
- [28] Dürr; Kraft: Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 4. Auflage, Schattauer GmbH, Stuttgart, 2005
- [29] Lupp, P.; Schlebusch, H.: POCT- Patientennahe Labordiagnostik, 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012
- [31] Braun, R.; Geiss, H.; Kimmig, P.; Neumeister, B.: Mikrobiologische Diagnostik, 2. Auflage, Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2009
- [33] Antranikian G.: Angewandte Mikrobiologie, Springer Verlag, Berlin, 2006

Quellverzeichnis

[1] Benning, R.; Chemnitz, C.: Der Fleischatlas, 1. Auflage, Atlas Manufaktur, „Online im Internet“,

http://www.bund.net/fileadmin/bundnet/publikationen/landwirtschaft/140108_bund_landwirtschaft_fleischatlas_2014.pdf aus dem Jahr 2014, Abfrage am 15.12.2014

[20] Engelhardt, G.; Hörmansdorfer, S.: EHEC (Enterohämorrhagische Escherichia coli) – Erkrankungen durch Lebensmittel: ein Überblick, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, „Online im Internet“,

<http://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/hygiene/bakterien/ehec/> aus dem Jahr 2012, Abfrage am 16.12.2014

[21] Heipa Dr. Müller GmbH: Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar mit Mug, Eppelheim, „Online im Internet“, http://www.heipha.de/files/product/de/1871e-1-0101_VRB-mitMUG.pdf , Abfrage am 16.12.2014

[22] Heipa Dr. Müller GmbH: Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar, Eppelheim, „Online im Internet“, http://www.heipha.de/files/product/de/0185e-3-0511_VRBD_2.pdf , Abfrage am 16.12.2014

[23] Heipa Dr. Müller GmbH: ECD-Agar mit MUG, Eppelheim, „Online im Internet“, http://www.heipha.de/files/product/de/1872e-1-0101_%20ECD-Agar-mitMUG.pdf , Abfrage am 16.12.2014

[24] SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH Berlin: Endo-Agar (Lactose-Fuchsin-Sulfit-Agar), Berlin, „Online im Internet“, <http://www.sifin.de/deutsch/produktinfo/endo-agar-tn1130-pi-de.pdf> aus dem Jahr 2012, Abfrage am 16.12.2012

[25] Heipa Dr. Müller GmbH: MacConkey-Agar nach EP/USP, Eppelheim, „Online im Internet“, http://www.heipha.de/files/product/de/0126e-5-0411_MacConkey_0.pdf, Abfrage am 16.12.2014

[27] CONATEX-DIDACTIC Lehrmittel GmbH: Einführung zum ELISA-Test, Neunkirchen, „Online im Internet“, http://www.conatex.com/mediapool/betriebsanleitungen/BAD_2013793.pdf , Abfrage am 22. 12. 2014

[30] Müllhardt, C: Molekularbiologie/Genomics, Springer Verlag, „Online im Internet“, <http://www.springer.com/978-3-8274-2036-7> aus dem Jahr 2009, Abfrage am 22.12.2014

- [32] Carpegen GmbH: Real-Time-PCR, Münster, „Online im Internet“, <http://www.carpegen.de/de/forschung-und-entwicklung/real-time-pcr.html> , Abfrage am 02.01.2015
- [34] Avondet, M.; Hofmann, W.; Landolt, S.: Lateral Flow Assay, „Online im Internet“, http://www.labor-spiez.ch/de/dok/po/pdf/LFA_aw_int.pdf , Abfrage am 06.01.2015
- [35] Evers, K.; Freyer, T.; Westphalen, G.: Escherichia-coli-Enteritis, „Online im Internet“, <http://flexikon.doccheck.com/de/Escherichia-coli-Enteritis>, Abfrage am 14.01.2015
- [36] Bilddatei: „Online im Internet“, <http://www.biohytec.de/uploads/pics/biosens.gif>, Abfrage am 19.01.2015
- [37] Bilddatei: „Online im Internet“ <http://indianapublicmedia.org/eartheats/files/2013/06/e-coli.jpg>, Abfrage am 19.01.2015
- [38] Bilddatei: „Online im Internet“ http://i.onmeda.de/relaunch/salmonellen_rem-580x435.jpg, Abfrage am 19.01.2015

Anhangsverzeichnis

Anhang 1 : PassPork-Reader und einschub für das medium.....	A2
Anhang 2 : Protokoll der Probenpräparation.....	A3

Anhang 1: PassPork-Reader und Einschub für das Testmedium



Abb. 18 Einschub und PassPork-Reader

Anhang 2: Protokoll der Probenpräparation

Materials	Procedure
<p>All materials, which are in direct contact with the sample, should be sterile. The mentioned materials or similar should be used.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 10-16 layer gauze cotton swab (MEFRA, Gauze swabs, 10x10 cm, type 17, 16 ply) • Stomacher bag (Seward, classic 400, standard bags) • Salt water, NaCl 0.9 % (wt/vol) • Syringe (20 ml) (Terumo® Syringe without needle, Terumo®) • Filter (10 µm) (Sample Acrodisc® Premium 25 mm Syringe Filter with 10.0 µm Versapor® Membrane, PALL) • Centrifuge tube (15 ml) (Greiner bio-one, Cellstar® tubes) • Centrifuge 	<p>Under sterile conditions pre-moist the cotton swab in a stomacher bag with 15 ml of 0.9% NaCl water. Leave it for at least 20 hours.</p> <p>By use of sterile gloves between each swab sample, swab an area (of 400 cm²) according to the procedure you follow at the slaughterhouse. If you have no routine procedure, the use the 400 cm² on the jowl are as displayed in Figure 1 (in methodology) as sampling area is suggested.</p> <p>Rub the swab against the skin, both vertically, horizontally and diagonally not less than 20 seconds – use 2 kg pressure or as much pressure as possible.</p> <p>Add 20 ml of 0,9 % NaCl water to the sample and homogenise by use of hand massage for 2 minutes (or stomaching for 1 minute).</p> <p>Fill the syringe with the sample liquid and press it through the 10µm filter – at least 5 ml of liquid must come through.</p> <p>Put the filtered liquid into the centrifuge tube and centrifuge for 12 minutes at 3000 G with a temperature at 4 °C.</p> <p>Pour out the liquid and re-suspend the pellet in 200 µl salt water and mix thoroughly.</p> <p>Add 100 µl to the LFD. (Follow the instructions from forsite)</p>

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die Bachelorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Das bearbeitete Thema wurde nicht schon früher im Rahmen einer anderen Arbeit behandelt.

Eitorf, 23.01.2015

Anja Zanfrini