

Wissenschaftliche Einrichtung Veterinary Public Health

Institut für Fleischhygiene und -technologie

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

**Unterschiedliche Bewertungsmöglichkeiten von Fleischsaft- und Serum-ELISA am
Beispiel der Erfassung der Seroprävalenzen von *Toxoplasma gondii*, *Yersinia
enterocolitica* und *Salmonella* in deutschen Outdoor-Schweinehaltungen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Henry Bernardt

Tierarzt

aus Rostock

Berlin 2017

Journal-Nr.: 3743

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Fries
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Alter
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Pork; *Toxoplasma gondii*; *Yersinia enterocolitica*; Salmonella; animal husbandry;
epidemiologie; meat hygiene; food safety; ELISA

Tag der Promotion: 25.04.2017

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-809-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2017

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2017

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Svea und Mika

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
TABELLEN- & ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
Tabellen.....	IV
Abbildungen	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR.....	3
2.1. Der Erreger <i>T. gondii</i>.....	3
2.1.1. Taxonomie und Morphologie.....	3
2.1.1.1. Taxonomie.....	3
2.1.1.2. Morphologie und Eigenschaften.....	3
2.1.2. Der Lebenszyklus.....	6
2.1.2.1. Infektion der Katze.....	7
2.1.2.2. Infektion des Zwischenwirtes.....	8
2.1.3. Nachweisverfahren.....	9
2.1.3.1. Direkte Nachweisverfahren.....	9
2.1.3.2. Indirekte Nachweisverfahren.....	9
2.1.4. <i>T. gondii</i> beim Schwein.....	9
2.1.5. <i>T. gondii</i> beim Menschen.....	12
2.1.6. <i>T. gondii</i> in der Lebensmittelkette-Schwein.....	13
2.2. Der Erreger <i>Y. enterocolitica</i>.....	15
2.2.1. Taxonomie und Morphologie.....	15
2.2.1.1. Taxonomie.....	15
2.2.1.2. Morphologie, Pathogenitätsmechanismen und Eigenschaften.....	16
2.2.2. Anzucht und Nachweisverfahren.....	17
2.2.2.1. Direkte Nachweisverfahren.....	17
2.2.2.2. Indirekte Nachweisverfahren.....	17
2.2.3. <i>Y. enterocolitica</i> beim Schwein.....	18
2.2.4. <i>Y. enterocolitica</i> beim Menschen.....	19
2.2.5. <i>Y. enterocolitica</i> in der Lebensmittelkette Schwein.....	19
2.3. Der Erreger <i>Salmonella</i>.....	21
2.3.1. Taxonomie und Morphologie.....	21
2.3.1.1. Taxonomie.....	21
2.3.1.2. Morphologie und Eigenschaften.....	22
2.3.2. Anzucht und Nachweisverfahren.....	22
2.3.2.1. Direkte Nachweisverfahren.....	22
2.3.2.2. Indirekte Nachweisverfahren.....	22
2.3.3. <i>Salmonella</i> beim Schwein.....	23
2.3.4. <i>Salmonella</i> beim Menschen.....	24
2.3.5. <i>Salmonella</i> in der Lebensmittelkette Schwein.....	24
2.4. Zoonoseerreger in der Outdoorhaltung.....	26

2.5. ELISA- Assay	27
2.6. ELISA im Rahmen von Bestandsuntersuchungen	28
3. MATERIAL & METHODEN.....	29
3.1. Material und Geräte	29
3.2. Proben (prelab)	30
3.2.1. Probenqualität.....	30
3.2.2. Probengewinnung.....	30
3.3. Technik (inlab)	31
3.3.1. Der Fleischsaft.....	31
3.3.2. Der ELISA.....	32
3.3.3. Der <i>Toxoplasma</i> -ELISA.....	33
3.3.4. Der <i>Y. enterocolitica</i> -ELISA	36
3.3.5. Der <i>Salmonella</i> -ELISA	39
3.4. Statistik	41
3.4.1. Die Datenbearbeitung.....	41
3.4.2. Statistische Aufarbeitung	41
4. ERGEBNISSE	43
4.1. Häufigkeiten und statistische Kennzahlen	43
4.1.1. Nachweis von <i>T. gondii</i> (Hersteller Cut'off).....	43
4.1.2. Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> (Hersteller Cut'off).....	44
4.1.3. Nachweis von <i>Salmonella</i> (Hersteller Cut'off)	45
4.2. Nachweise in den Beständen	47
4.2.1. Nachweis von <i>T. gondii</i> in Fleischsaft und Serum (Hersteller Cut'off)	47
4.2.2. Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> in Fleischsaft und Serum (Hersteller Cut'off)	50
4.2.3. Nachweis von <i>Salmonella</i> in Fleischsaft und Serum (Hersteller Cut'off).....	53
4.2.4. <i>T. gondii</i> in den Beständen unabhängig vom Hersteller Cut'off	56
4.2.5. <i>Y. enterocolitica</i> in den Beständen unabhängig vom Hersteller Cut'off	59
4.2.6. <i>Salmonella</i> in den Beständen unabhängig vom Hersteller Cut'off.....	62
4.3. Einzelnachweise bezogen auf die Region (Hersteller Cut'off).....	65
4.3.1. Nachweis von <i>T. gondii</i> bezogen auf die Bundesländer in Serum und Fleischsaft	65
4.3.2. Nachweis von <i>T. gondii</i> bezogen auf Alte und Neue Bundesländer.....	67
4.3.3. Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> bezogen auf die Region im Serum und Fleischsaft.....	67
4.3.4. Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> bezogen auf Alte und Neue Bundesländer.....	69
4.3.5. Nachweis von <i>Salmonella</i> bezogen auf die Region im Serum und Fleischsaft	70
4.3.6. Nachweis von <i>Salmonella</i> bezogen auf Alte und Neue Bundesländer	71
4.4. Einzelnachweise bezogen auf die Haltungsart in Aufzucht und Mast.....	72
4.4.1. Nachweis von <i>T. gondii</i> bezogen auf die Haltungsart	72
4.4.2. Nachweis von <i>Y. enterocolitica</i> bezogen auf die Haltungsart	75
4.4.3. Nachweis von <i>Salmonella</i> bezogen auf die Haltungsart.....	77
5. DISKUSSION	79
5.1. Der Versuchsaufbau	79
5.1.1. Die Probenqualität	79
5.1.2. Die Probenzahl	80
5.1.3. Die Bestandsauswahl.....	80
5.1.4. Die gewählte Nachweisttechnik	81
5.1.5. Ziel der Arbeit	82

5.2. Die Seroprävalenzen der Erreger unter Nutzung des Hersteller Cut´off.....	83
5.2.1. <i>T. gondii</i>	83
5.2.2. <i>Y. enterocolitica</i>	84
5.2.3. <i>Salmonella</i>	84
5.3. Seroprävalenzen der Erreger in den Betrieben	86
5.3.1. Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> in den Betrieben.....	86
5.3.2. Seroprävalenz von <i>Y. enterocolitica</i> in den Betrieben.....	87
5.3.3. Seroprävalenz von <i>Salmonella</i> in den Betrieben	87
5.4. Seroprävalenzen der Erreger in den untersuchten Bundesländern	89
5.4.1. Seroprävalenz von <i>T.gondii</i>	89
5.4.2. Seroprävalenz von <i>Y. enterocolitica</i>	90
5.4.3. Seroprävalenz von <i>Salmonella</i>	90
5.5. Seroprävalenzen der Erreger bezogen auf die Haltungssysteme	92
5.5.1. Vergleich Outdoor-Indoor-Haltung	92
5.5.2. Haltung in Aufzucht und Mast	94
5.6. Bewertung der Ergebnisse eines ELISA	96
5.7. Beispiel einer vom Hersteller-Cut´off unabhängigen Bewertung in 2 Schritten	98
5.7.1. Bestandsbewertung mittels Median der OD%-Ergebnisse des Einzelbetriebs	98
5.7.2. Erstellung und Nutzung eines Kategorisierungsschlüssels mittels TG-ROC	99
5.7.3. Neubewertung der Betriebe	101
5.7.3.1. <i>T. gondii</i>	101
5.7.3.2. <i>Y. enterocolitica</i>	103
5.7.3.3. <i>Salmonella</i>	103
5.8. Implementierung der Bestandsbewertung als Monitoringprogramm in die Lebensmittelkette	106
6. ZUSAMMENFASSUNG	108
7. SUMMARY.....	110
8. LITERATURVERZEICHNIS	112
8.1. wissenschaftliche Texte	112
8.2. Gesetzestexte	130
Publikationsverzeichnis	131
Danksagung	132
Selbständigkeitserklärung.....	134

Tabellen- & Abbildungsverzeichnis

Tabellen

Tabelle 2.1:	Anzahl der Tage, die <i>T. gondii</i> unter experimentellen Bedingungen infektiös für Mäuse blieb, Daten nach YILMAZ und HOPKINS (1972)	6
Tabelle 2.2:	Studien mit Nachweis von <i>T. gondii</i> in der Primärproduktion	13
Tabelle 4.1:	Ergebnisse der Untersuchung auf <i>T. gondii</i>	43
Tabelle 4.2:	Kennzahlen der OD% aller auf <i>T. gondii</i> untersuchten Proben	44
Tabelle 4.3:	Ergebnisse der Untersuchung auf <i>Y. enterocolitica</i>	44
Tabelle 4.4:	Kennzahlen der OD% aller auf <i>Y. enterocolitica</i> untersuchten Proben	45
Tabelle 4.5:	Ergebnisse der Untersuchung auf <i>Salmonella</i>	45
Tabelle 4.6:	Kennzahlen der OD% aller auf <i>Salmonella</i> untersuchten Proben	46
Tabelle 4.7:	Bestandsbezogene Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchung auf <i>T. gondii</i>	47
Tabelle 4.8:	Bestandsbezogene Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchung auf <i>Y. enterocolitica</i>	50
Tabelle 4.9:	Bestandsbezogene Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchung auf <i>Salmonella</i>	53
Tabelle 4.10:	Anzahl der Betriebe mit bestimmten <i>Salmonella</i> Seroprävalenzen	55
Tabelle 4.11:	Verteilung der Proben auf die Bundesländer	65
Tabelle 4.12:	Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchung auf <i>T. gondii</i> bezogen auf die Region in relativen und absoluten Zahlen	66
Tabelle 4.13:	Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchung auf <i>Y. enterocolitica</i> bezogen auf die Region in relativen und absoluten Zahlen	68
Tabelle 4.14:	Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchung auf <i>Salmonella</i> bezogen auf die Region in relativen und absoluten Zahlen	70
Tabelle 4.15:	Haltungskombinationen aus Aufzucht und Mast	72
Tabelle 4.16:	Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchung auf <i>T.gondii</i> Bezogen auf die Haltungsart	74
Tabelle 4.17:	Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchung auf <i>Y. enterocolitica</i> bezogen auf die Haltungsart	76
Tabelle 4.18:	Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchung auf <i>Salmonella</i> bezogen auf die Haltungsart	78
Tabelle 5.1:	Anzahl der Betriebe je Kategorie für Serum und Fleischsaft (Mediankategorisierung)	102

Tabelle 5.2:	Anzahl der Betriebe in freigewählten Prävalenzbereichen (Hersteller-Cut'off)	103
Tabelle 5.3:	Anzahl der Betriebe je Kategorie für Serum und Fleischsaft (Mediankategorisierung)	104
Tabelle 6.1:	Gesamtprävalenzen von <i>T. gondii</i> , <i>Y. enterocolitica</i> und <i>Salmonella</i> in Serum und Fleischsaft	108
Tabelle 7.1.:	Overall-serorevalence of <i>T. gondii</i> , <i>Y. enterocolitica</i> and <i>Salmonella</i> in serum and meat juice	110

Abbildungen

Abbildung 2.1.:	Taxonomie von <i>T. gondii</i> (nach MEHLHORN 1995)	3
Abbildung 2.2.:	Schematische Darstellung eines Tachyzoiten	4
Abbildung 2.3.:	Schematische Darstellung einer Gewebszyste mit Bradyzoiten	4
Abbildung 2.4.:	Schematische Darstellung einer Oocyste; 4 Sporozysten sind sichtbar	5
Abbildung 2.5.:	<i>T. gondii</i> -Prävalenzen in Veröffentlichungen von 1964 bis 2007	10
Abbildung 2.6.:	Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> in deutschen Mastschweinen und Sauen	11
Abbildung 2.7.:	Taxonomie <i>Y. enterocolitica</i> (nach EFSA 2007b)	15
Abbildung 2.8.:	Taxonomie <i>Salmonella</i> (nach GRIMONT 2007)	21
Abbildung 2.9.:	Prinzip eines indirekten ELISA	27
Abbildung 3.1.:	Fleischsaftgewinnung mittels Trichter	31
Abbildung 4.1.:	OD% der Serumproben für <i>T. gondii</i> , einzeln für jeden Betrieb	56
Abbildung 4.2.:	OD% der Fleischsaftproben für <i>T. gondii</i> , einzeln für jeden Betrieb	57
Abbildung 4.3.:	Graphische Darstellung des Medians der OD% der Serumproben für jeden Betrieb	57
Abbildung 4.4.:	Graphische Darstellung des Medians der OD% der Fleischsaftproben für jeden Betrieb	58
Abbildung 4.5.:	OD% der Serumproben für <i>Y. enterocolitica</i> einzeln für jeden Betrieb	59
Abbildung 4.6.:	OD% der Fleischsaftproben für <i>Y. enterocolitica</i> , einzeln für jeden Betrieb	60
Abbildung 4.7.:	Graphische Darstellung des Median der OD% der Serumproben für jeden Betrieb	60
Abbildung 4.8.:	Graphische Darstellung des Median der OD% der Fleischsaftproben für jeden Betrieb	61
Abbildung 4.9.:	OD% der Serumproben für <i>Salmonella</i> für jeden Betrieb	62
Abbildung 4.10.:	OD% der Fleischsaftproben für <i>Salmonella</i> für jeden Betrieb	63
Abbildung 4.11.:	graphische Darstellung des Median der OD% der Serumproben für jeden Betrieb	63
Abbildung 4.12.:	graphische Darstellung des Median der OD% der Fleischsaftproben für jeden Betrieb	64
Abbildung 4.13.:	<i>T. gondii</i> in Fleischsaft und Serum bezogen auf die Haltungsform	73
Abbildung 4.14.:	<i>Y. enterocolitica</i> in Fleischsaft und Serum bezogen auf die Haltungsform	75
Abbildung 4.15.:	<i>Salmonella</i> in Fleischsaft und Serum bezogen auf die Haltungsform	77

Abbildung 5.1.:	Vergleichende Darstellung der Einzeltier OD% für <i>T. gondii</i> aller 41 Betriebe mit den Medianen der OD%	98
Abbildung 5.2.:	Kategorisierungsschlüssel für <i>T. gondii</i>	100
Abbildung 5.3.:	Kategorisierungsschlüssel für <i>Y. enterocolitica</i>	100
Abbildung 5.4.:	Kategorisierungsschlüssel für <i>Salmonella</i>	100

Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidest.	aqua bidestillata
Abb.	Abbildung
ABF	Antibiotic free
Abs.	Absatz
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
Anh.	Anhang
Art.-Nr.	Artikel-Nr.
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BPLS	Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar
BPW	Buffered Peptone Water (gepuffertes Peptonwasser)
CIN-Agar	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAT	Direkter Agglutinationstest
DIN	Deutsches Institut für Normen
DNA	Desoxyribonucleic-acid
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EN	Europäische Norm
et al.	et alii
EU	Europäische Union
Fl.	Flasche
g	Gramm
h	Stunde
H-Ag	H-Antigen (Oberflächenantigen)
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HRP	Horseradish-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
iHAT	indirekter Hämagglutinationstest
ISO	Internationale Organisation für Normen
kGy	KiloGray
KOH	Kaliumhydroxid (ergibt mit Wasser Kalilauge)
L	Liter
LAT	Latexagglutinationstest
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molare Masse
Meckl.Vorp.	Mecklenburg-Vorpommern
min	Minuten
MKTTn	Müller-Kauffmann-Tetrathionat-Bouillon
ml	Milliliter
mP	Prozent bezogen auf die OD% des ELISA
MTP	Mikrotiterplatte
N	Anzahl
NK	negativ Kontrolle
nm	Nanometer
NRW	Nordrhein-Westfalen

Abkürzungsverzeichnis

O ₂	Sauerstoff
O-Ag	O-Antigen (Oberflächenantigen)
OD	optische Dichte
OD%	Prozent der optischen Dichte
PCR	Polymerase-Chain-Reaktion
Pk.	Positivkontrolle
P.P.	prozentuale Positivität
ppt	parts per trillion
PSB	Pepton-Sorbitol-Gallensalz-Bouillon
Rb	Rambach-Agar
RKI	Robert Koch Institut
rRNA	ribosomale Ribonucleic-acid
RV	Rappaport-Vassiliadis-Medium
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
Schlesw.-H.	Schleswig Holstein
SchwSalmoV	Verordnung zur Verminderung der Salmonellenverbreitung durch Schlachtschweine (Schweine-Salmonellen-Verordnung)
Se	Sensibilität
s	Sekunde
SFT	Sabin-Feldman-Test
Sp	Spezifität
spp.	Spezies (Plural)
<i>T.</i>	<i>Toxoplasma</i>
TG ROC	two-graph receiver operating characteristic
Tab.	Tabelle
TMB	Tetramethyl-Benzidine
TTn	Tetrathionat-Bouillon
U/min	Umdrehungen pro Minute
VO (EG)	EU-Verordnung
x	mal
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>
Yops	<i>Yersinia</i> -Outer-Proteins
z. B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
%	Prozent
≥	größer gleich
≤	kleiner gleich
<	kleiner als
>	größer als
=	gleich
θ ₀	theta zero
Ø	Durchschnitt
TM™	Team
-	bis
-	minus
-	negativ
+	positiv

1. Einleitung

Mit der Verordnung (EG) 178/2002 wurde die Landwirtschaft Teil der Lebensmittelkette. Dies ermöglicht es erstmalig, die Nutztierbestände in ein Konzept der Lebensmittelüberwachung und Gefahrenabwehr einzubauen. Bereits die Primärproduktion muss als Teil der Qualitätskontrolle betrachtet werden. Dies zwingt zu neuen Ansätzen der Überwachungstechniken und zu einer mehr präventiv orientierten Tiermedizin in den Nutztierbeständen (VO EG 854/2004).

Die Verordnung (EG) 1244/2007 greift diesen Gedanken auf und erlaubt weitere Untersuchungsschritte in Hinblick auf die „risikobasierte Fleischuntersuchung“. Eine ganzheitliche Schlachtier- und Fleischuntersuchung bezieht sich folglich nicht mehr nur auf die seit Robert von Ostertag beschriebenen Untersuchungsschritte auf einzelne zoonotische Agentien und deren Ausprägung. Vielmehr rücken, aufgrund der in den letzten Jahrzehnten neu entwickelten Nachweismethoden, Erreger in den Fokus, die in den bisherigen Überwachungskonzepten von Lebensmitteln tierischen Ursprungs wenig oder keine Beachtung gefunden haben.

Auch der Wandel von konventionellen Haltungssystemen zu artgerechteren extensiven Haltungssystemen kann zu weiteren Verschiebungen im Vorkommen der bisher beachteten Agentien führen, sowie neu in den Fokus tretende Erreger nach sich ziehen.

Der protozoische Parasit *Toxoplasma (T.) gondii* gehört zu den über Lebensmittel übertragbaren Zoonosen. Nach MEAD et al. (1999) zählt er zu den bedeutendsten Krankheitserregern sogenannter *food-born diseases*.

Zu den Hauptansteckungsquellen gehören rohes und nicht genügend erhitztes Fleisch (KAPPERUD et al. 1996; BARIL et al. 1999; COOK et al. 2000). Sollte der Erreger in den Tierhaltungen zu finden sein, ist aufgrund des in Deutschland verbreiteten Rohverzehr von Schweinefleischprodukten von einem erhöhten Ansteckungsrisiko auszugehen. Die Aufnahme von *T. gondii* in ein standardisiertes Monitoringprogramm mit angeglichenem Risikomanagement wird diskutiert (HILL et al. 2006; KIJLSTRA et al. 2009).

Yersinia (Y.) enterocolitica findet in der heutigen Form der Schlachtier- und Fleischuntersuchung des Schweins keine Berücksichtigung. Auch sind keine Monitoringprogramme auf Bestandesebene vorgeschrieben. Die Infektion des Menschen mit dem gram-negative Bakterium kann neben einfachen Verlaufsformen wie Enteritiden auch zu schwerwiegenden Erkrankungen mit Septikämien und Mikroabszessbildung der inneren Organe führen (BOTTON et al. 1999). Dabei ist der Erreger auf allen Stufen der Lebensmittelkette nachzuweisen (KAPPERUD et al. 1991; HENSEL et al. 2004, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2004).

Für *Salmonella* wurde nach Einführung der „Verordnung zur Verminderung der Salmonellenverbreitung durch Schlachtschweine“ (Schweine-Salmonellen-Verordnung) im März 2007 ein Monitoringprogramm auf Bestandsebene etabliert. Danach werden erstmalig Bestände je nach Prävalenz dieses Zoonoseerregers in drei Kategorien eingeteilt und nötige Maßnahmen zur Erregerreduktion eingeleitet. Dies könnte Vorbild für die Überwachung anderer Zoonoseerreger sein.

Ziel dieser Arbeit ist es, die ELISA-Technik als ein praktisch umsetzbares Verfahren zur Erfassung der Seroprävalenz von mehreren ausgewählten Zoonoseerregern zu testen, die Ergebnisse unterschiedlicher Bewertungsmöglichkeiten zu unterwerfen und zu diskutieren.

Hierzu wurden die Seroprävalenzen von *T. gondii*, *Y. enterocolitica* und *Salmonella* in Schweinen ausgewählter Outdoorbetriebe erfasst.

Dabei sollte die Praktikabilität und die Aussagekraft der ELISA-Technik zur Detektion mehrerer Zoonoseerreger, eingebettet in den Ablauf der Lebensmittelkette, geprüft werden.

Stellt sich die Beprobung der Tierkörper in den Schlachtbetrieben und die Anwendung des ELISA im Labor für mehrere Erreger als sicheres, aussagekräftiges und praktikables Instrument heraus, kann die Integration in kontinuierliche Qualitätssicherungssysteme diskutiert werden.

2. Literatur

2.1. Der Erreger *T. gondii*

2.1.1. Taxonomie und Morphologie

2.1.1.1. Taxonomie

T. gondii ist ein weltweit verbreiteter, obligat intrazellulär lebender Parasit. Der einzellige Organismus gehört zum Stamm der Apikomplexa (MONTROYA et al. 2004). Die genaue taxonomische Zuordnung ist der Abbildung 2.1. zu entnehmen.

Stamm	Apikomplexa
Klasse	Sporozoea
Unterklasse	Coccidia
Ordnung	Eucoccidiida
Unterordnung	Eimeriina
Familie	Isosporidae
Gattung	<i>Toxoplasma</i>

Abb.2.1. : Taxonomie von *T. gondii* (nach MEHLHORN 1995)

Drei klonale Linien von *T. gondii* sind bekannt. Sie unterscheiden sich durch ihre Virulenz für verschiedene Wirte (HOWE et al. 1995). So werden den jeweiligen klonalen Linien unterschiedliche Immunantworten des Wirtsorganismus auf eine Infektion zugesprochen (SAEIJ et al. 2005). Die genetische Diversität liegt jedoch nur bei 1 bis 2 Prozent. Typ I ist hoch virulent für Mäuse und verursacht auch beim Menschen akute opthalmologische und kongenitale Erkrankungen. Typ II ist für die chronische Toxoplasmose beim Menschen verantwortlich und Typ III wird häufiger bei Tieren mit geringer oder ohne Symptomatik nachgewiesen. Ziel ist es durch das Verständnis der unterschiedlichen Pathomechanismen der drei Linien in der Zukunft neue präventive und therapeutische Ansätze entwickeln zu können (SAEIJ et al. 2005).

2.1.1.2. Morphologie und Eigenschaften

Morphologisch sind drei verschiedene Formen bekannt. Entsprechend den Phasen des Lebenszyklus liegt der Parasit als Tachyzoit, Bradyzoit oder Oocyste vor (DUBEY et al. 1998).

Die während der Endodygonie (Zweiteilung) vorliegende tachyzoite Form (Abb. 2.2.) ist 6 µm lang und 2 µm breit, mit einem spitzen Vorder- und einem rundem Hinterende. Sie ist

länglich und bogenartig geformt. Der Tachyzoit besitzt einen zentralen Kern und einen apikalen Komplex, der zu der Zuordnung Apikomplexa führte. Er dient der Penetration der Wirtszelle während der akuten Phase der Infektion. Der Wortteil „tachy“ bedeutet schnell, was die schnelle Teilungsphase und die Entstehung etlicher Klone beschreibt. Da sichtbare Bewegungseinrichtungen wie Flagellen, Cilien oder Pseudopodien fehlen, bewegen sich Tachyzoiten mittels Rotation, Gleiten und Undulieren fort (DUBEY et al. 1998).

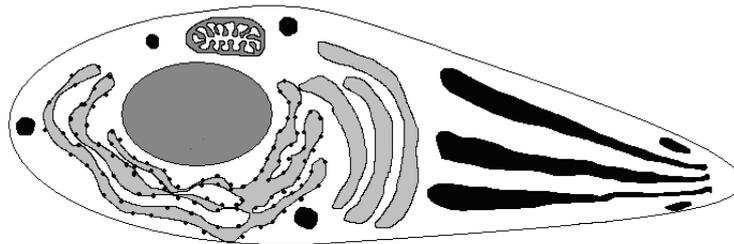


Abb. 2.2.: Schematische Darstellung eines Tachyzoiten

Tachyzoite Formen von *T. gondii* werden durch 1% Trypsinlösung und 0,25% Pepsinlösung innerhalb einer Stunde zersetzt (SHARMA et al. 1981). Damit werden sie in der Mehrzahl nach oraler Aufnahme während der Magenpassage abgetötet und erreichen nicht den Dünndarm, wo sie sich erfolgreich vermehren könnten.

Bradyzoiten (Abb. 2.3.) stellen die Dauerform von *T. gondii* im Wirtsgewebe dar. Sie liegen als Reaktion auf das Immunsystem des Wirtes in Zysten vor. Der Parasit bildet hierzu eine $<0,5\mu\text{m}$ starke, komplexe Membran, die ein Überdauern im Gewebe ermöglicht und ihn gegen die Abwehrmechanismen des Wirtes schützt. Die Teilungsgeschwindigkeit wird dabei herabgesetzt, was zur Bezeichnung Bradyzoit führte (bradys: langsam).

Je nach Gewebeart nehmen die Zysten eine unterschiedliche Gestalt an. So sind sie im Gehirn rund und in der Muskulatur länglich geformt. Junge Gewebezysten beinhalten nur zwei bis drei Bradyzoiten bei einer Größe um die $5\mu\text{m}$, ältere mehrere 100 bei einer Ausdehnung von $70\text{-}100\mu\text{m}$ (DUBEY et al. 1998).

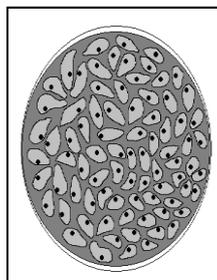


Abb. 2.3. : Schematische Darstellung einer Gewebezyste (Pfeil) mit Bradyzoiten

Bradyzoiten gelten als magensaftresistent. Neben einer gewissen Resistenz gegenüber proteolytischen Enzymen (JACOBS et al. 1960), konnte PETERSEN (1979) zusätzlich die

Widerstandsfähigkeit im sauren Milieu belegen. SHARMA und DUBEY (1981) stellten fest, dass Bradyzoiten erst nach 3 Stunden in Pepsinverdauungssaft oder 6 Stunden in Trypsinverdauungssaft inaktiviert werden. Untersuchungen zur Inaktivierung im Lebensmittel lassen ein Tenazitätsprofil zu: es stellte sich heraus, dass Oocysten in Fleisch bei Erhitzung auf 60°C nach 10 Minuten und beim Lagern bei Temperaturen von -10°C für 3 Tage inaktiviert werden (EL-NAWAWI et al. 2008).

LUNDEN und UGGLA (1992) konnten nach 24 bis 28 Stunden Rauchbehandlung von infizierten Hammelkeulen bei einer Temperatur von 50°C keine infektiösen Toxoplasmen mehr nachweisen. In die Hammelkeule wurde vor dem Räucherungsprozess eine Natriumchlorid-Lösung injiziert. Gleiches gelang den Autoren bei der Behandlung von zystenhaltigem Fleisch mit 15% Kochsalz- und 12,5% Zuckerlösung bei 4°C über 64 Stunden.

DUBEY et al. (1997) stellten fest, dass Toxoplasmazysten unter Laborbedingungen mit einer 6% NaCl-Lösung sicher abgetötet werden. Bei geringeren Konzentrationen ist die sichere Abtötung jedoch deutlich abhängig von der Reifungstemperatur und -dauer. So überlebten die Zysten eine 21tägige Behandlung mit 0,85% NaCl-Lösung bei 15°C.

Auch die Wirkung radioaktiver Strahlung wurde untersucht. Die Bestrahlung von Fleisch mit 0,5 kGy führte zur Inaktivierung von *T. gondii* in Fleischproben (DUBEY 1996b).

Zusammenfassend kommt es nicht bei allen Lebensmitteln aufgrund des Herstellungsverfahrens zu einer erfolgreichen Eliminierung des Parasiten (TENTER et al. 2000)

T. gondii wird über einen kurzen Zeitraum von frisch infizierten Katzen als Oocyste fäkal ausgeschieden. Katzen sind die einzigen Wirte, bei denen diese zusätzliche Form der Verbreitung nachgewiesen wurde (HUTCHISON 1965; HUTCHISON et al. 1968; HUTCHISON et al. 1971).

Die ausgeschiedenen Oozysten sind 12-15µm groß, farblos und von annähernd runder Gestalt. Nach der Ausscheidung folgt die Sporulation in der Außenwelt, die zur Ausbildung von 2 Sporozysten mit je 4 Sporozoiten führt (Abb. 2.4.). Die Sporozoiten haben eine Größe von 2µm x 6-8µm (DUBEY et al. 1998).

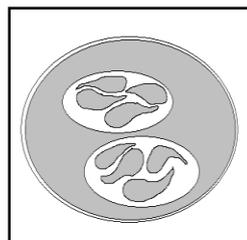


Abb. 2.4. : Schematische Darstellung einer sporulierten Oocyste; 4 Sporozoiten sind sichtbar

Oocysten stellen die umweltresistenteste Form von *T. gondii* dar. YILMAZ und HOPKINS (1972) setzten Oocysten in Katzenkot (unbehandelt und als Suspension) im Labor und im Freien bedeckt mit feuchter Gaze, sowie unbedeckt, unterschiedlichen Lufttemperaturen aus. Tabelle 2.1 stellt einen Teil ihrer Ergebnisse dar.

Tab. 2.1: Anzahl der Tage, die *T. gondii* unter experimentellen Bedingungen infektiös für Mäuse blieb, Daten nach YILMAZ und HOPKINS (1972)

Präparationsart	Inkubator (37°C)	Kühlschrank (4°C)	Raum (22,5°C)	Im Freien, sonnig (6-36°C)	Im Freien, schattig (5,5-35,5°C)
Fäzes Suspension					
bedeckt	199	410	410	306	306
unbedeckt	46	183	153	76	91
Fäzes unbehandelt					
bedeckt	153	410	306	183	334
unbedeckt	30	214	107	46	76

Es gelang den Autoren darzustellen, dass Oocysten im Katzenkot, bedeckt und feucht gelagert, eine deutlich längere Überlebensdauer besitzen als in trockener und warmer Umgebung. So stieg die Überlebensdauer der Oocysten von 30 Tagen in unbedeckter und trockener Umgebung bei 37°C auf 410 Tage in bedeckter, feuchter und 4°C kühler Umgebung an. Auch der Abtötungseffekt von direktem Sonnenlicht wurde belegt. Kühle, feuchte und schattige Bedingungen sind somit günstig für die Überlebensdauer der Oocysten in der Außenwelt. Auch FRENKEL et al. (1975) konnten Oocysten 18 Monate lang, trotz warmer Sommer und kalter Winter, im Erdreich nachweisen.

In 4°C kaltem Wasser mit einem Gehalt von 15ppt NaCl können Oocysten sporulieren. Der Parasit blieb unter diesen Bedingungen über 24 Monate infektiös (LINDSAY et al. 2009).

2.1.2. Der Lebenszyklus

Über ein halbes Jahrhundert hat es gedauert, bis der komplexe Lebenszyklus von *T. gondii* aufgeklärt werden konnte. Erst als man verstand, welche Rolle Feliden als einzige Endwirte mit der Ausscheidung von Oocysten spielen, wurde der Lebenszyklus klar (DUBEY 2009).

T. gondii kann weltweit in wahrscheinlich allen warmblütigen Tieren und damit auch im Menschen nachgewiesen werden. Der Parasit ist fakultativ zweiwirtig. Die Infektion erfolgt durch die Aufnahme der sporulierten, infektiösen Oocysten oder den Verzehr von rohem oder ungenügend erhitztem Fleisch. Der Übertrag der Oocysten ist durch die Tenazität in schattigem, feuchtem und kühlem Milieu noch lange Zeit nach der Ausscheidung durch einen Endwirt möglich (YILMAZ et al. 1972). So scheiden Katzen die Oocysten aus und geben sie an ihre Umwelt ab. Kommt es zur Aufnahme dieser Oocysten durch eine weitere Katze, folgt

die Infektion und somit die geschlechtliche und ungeschlechtliche Vermehrung mit Ausbildung von Oocysten und Gewebezysten. Werden die Oocysten von Zwischenwirten wie Nutztieren aufgenommen, erfolgt einzig eine ungeschlechtliche Vermehrung mit Ausbildung von Gewebezysten. Diese Zysten können in der Folge in die Lebensmittelkette eingetragen und vom Menschen aufgenommen werden. Neben der zufälligen, oralen Aufnahme von Oocysten aus der Umwelt durch Erde, verschmutzte Gegenstände oder Wasser ist dies eine weitere Möglichkeit des Übertrags auf den Menschen.

2.1.2.1. Infektion der Katze

Bei der Infektion des Endwirtes Katze ist zwischen der Aufnahme einer sporulierten Oocyste und einer Gewebezyste zu unterscheiden.

Nach oraler Aufnahme der sporulierten und damit infektionsfähigen Oocyste durch eine Katze wird der Magen passiert und die Sporozoitien werden im Dünndarm freigesetzt. Von hier aus gelangen die Parasiten über Lymph- und Blutgefäße in die extraintestinalen Organe. Durch Endodyogenie kommt es zur schnellen Vermehrung der Tachyzoiten in den Gewebezellen. Ein Teil der Parasiten verbleibt unter Ausbildung von Zysten im Gewebe, der andere Teil gelangt zurück in den Darm. Hier bilden sie sich zu Mikro- und Makrogamonten um. Diese werden in der Folge zu begeißelten und beweglichen Mikro- und unbegeißelten, unbeweglichen Makrogameten. Der Mikrogamet befruchtet den Makrogamet. Das Ergebnis der geschlechtlichen Fortpflanzung ist die Ausbildung der unsporulierten Oocyste, die abschließend mit dem Kot ausgeschieden wird.

Die Anzahl der ausgeschiedenen Oocysten variiert von Tier zu Tier und hat nach DUBEY et al. (1996a) ein Maximum in den ersten 3 Tagen der bis 21 Tage andauernden Patenz. Die Autoren beschreiben Ausscheidungen von 7,2 bis 162 Millionen Oocysten pro Tier. Die Ausscheidung von Oocysten kann nach Aufnahme von Tachyzoiten, Gewebezysten und Oocysten auftreten. Auffallend ist, dass weniger als 50% der Katzen nach Tachyzoiten- und Oocysteningestion Oocysten ausscheiden, die Ausscheidung nach Aufnahme von Gewebezysten jedoch bei fast allen Katzen nachgewiesen werden kann (DUBEY 2004).

Erfolgt die Aufnahme von Gewebezysten durch den Verzehr von tierischem Gewebe durch eine Katze, kommt es zur ungeschlechtlichen Vermehrung (Endodyogenie) bereits in den Darmepithelzellen. Ein Teil der so entstandenen Merozoiten führt eine extraintestinelle Wanderung mit Umbildung zu Gewebezysten in den Organen durch.

Der im Darm verbleibende Anteil der Merozoiten durchläuft die beschriebene geschlechtliche Fortpflanzung mit Merogonie und Gamogonie.

Im Falle der direkten geschlechtlichen Fortpflanzung ohne vorherige Körperwanderung dauert die Präpatenz nach Aufnahme von Gewebezysten nur 3 bis 10 Tage. Die Infektion mit Oocysten hingegen führt zu einer verlängerten Präpatenz von 18 bis 36 Tagen.

2.1.2.2. Infektion des Zwischenwirtes

Gesondert zu betrachten ist die Aufnahme von *T. gondii* durch Zwischenwirte. Die Infektion erfolgt ebenfalls über Oocysten aus der kontaminierten Umwelt oder den Verzehr von zystenhaltigem Gewebe. Die Vermehrung verläuft hier rein ungeschlechtlich durch Endodyogenie mit folgender Ausbildung von Gewebezysten. Es werden keine Oocysten gebildet oder ausgeschieden.

Der Parasit gelangt in den Darm des Wirtes und dringt in die Zellen des retikuloendothelialen Systems ein. Durch Endodyogenie kommt es zur schnellen, intrazellulären Vermehrung der in diesem Stadium als Tachyzoiten bezeichneten Parasiten. Es entsteht eine sogenannte Pseudozyste in der Zelle. Durch die Vermehrung der Tachyzoiten steigt der Druck in der Wirtszelle an, was zur Ruptur dieser führt. Es folgt die weitere Ausbreitung in die Organe des Wirtes.

Durch Zystenbildung entzieht sich *T. gondii* der Immunantwort des Wirts. Innerhalb dieser Zysten läuft die Endodyogenie langsamer, jedoch stetig weiter ab. So bilden sich Zysten, die mit bis zu hundert Bradyzoiten gefüllt sind und ein Leben lang persistieren. Der Zyklus schließt sich nach oraler Aufnahme des Wirtsgewebes durch einen neuen Wirt mit anschließender Infektion.

Dabei macht das Rind eine Ausnahme. DUBEY und THULLIEZ (1993) beschrieben, dass das Immunsystem dieser Tierart in der Lage zu sein scheint, eine Bekämpfung des Parasiten trotz Zystenstadium zu ermöglichen.

2.1.3. Nachweisverfahren

2.1.3.1. Direkte Nachweisverfahren

Die einfachste Methode, *T. gondii* nachzuweisen, ist die mikroskopische Untersuchung von Quetschpräparaten von Gehirn-, Muskel- oder Lungengewebe (DUBEY 1995a).

Beim Bioassay werden Versuchstiere einem Gewebe ausgesetzt, das im Verdacht steht, mit Toxoplasmen infiziert zu sein. Die Bildung von Antikörpern, Gewebszysten oder im Fall des Katzenfütterungsversuchs die Ausscheidung von Oocysten wird kontrolliert (DUBEY 1995a).

Der Nachweis des B1 Gens mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein überwiegend in der Humanmedizin angewandtes, schnelles Verfahren zum direkten Nachweis einer Toxoplasmainfektion. Aufgrund der Amplifizierung eines Gens kann bereits ein einzelner Parasit nachgewiesen werden. Ist in der Probe kein Erregermaterial vorhanden, kann dies allerdings zu falsch negativen Ergebnissen führen (WYSS et al. 2000).

2.1.3.2. Indirekte Nachweisverfahren

Der Sabin-Feldman-Test (SFT) war das erste serologische Testverfahren zum indirekten Nachweis von *T. gondii* (SABIN und FELDMAN 1948). Es werden lebende Tachyzoiten mit Methylenblau angefärbt und mit dem Testmaterial inkubiert. Sind Antikörper vorhanden, bleibt diese Anfärbung nach einer Inkubationsphase aus. Dies stellt heute noch den Goldstandard dar.

Der Direkte Agglutinationstest (DAT) wurde erstmals von FULTON und TURK (1959) beschrieben. Seitdem wurde er modifiziert und erzielt ähnlich gute Ergebnisse wie der SFT. Es handelt sich um einen indirekten serologischen Test (DESMONTS und REMINGTON 1980). Weitere indirekte Verfahren stellen der Latexagglutinationstest (LAT) und der indirekte Hämagglutinationstest (IHAT) dar (DUBEY 1986).

Das geläufigste indirekte Nachweisverfahren stellt der ELISA dar. Aufgrund seiner Sensitivität, Spezifität, Reproduzierbar- und Automatisierbarkeit eignet er sich besonders für epidemiologische Untersuchungen mit großen Probenzahlen. Die Durchführung wird im Kapitel 3, „Material & Methoden“ erläutert.

2.1.4. *T. gondii* beim Schwein

Aufgrund der Verzehrsgewohnheit und des täglichen Konsums kann das Schwein eine besondere Rolle beim Eintrag von *T. gondii* in die humane Lebensmittelkette spielen. Schweine infizieren sich durch Aufnahme von Oocysten aus der Umgebung, durch ihre omnivore Lebensweise aber auch durch den Verzehr von Nagetieren, Insekten oder Kot. Die Seroprävalenz steht im engen Zusammenhang mit der Anwesenheit von Katzen und

Nagetieren in der Schweinehaltung (DUBEY et al. 1995b; WEIGEL et al. 1995; LEHMANN et al. 2003; DABRITZ et al. 2007; VILLARI et al. 2009; GARCIA-BOCANEGRA et al. 2010) Des weiteren scheinen *Toxoplasmen* transplazentar übertragbar zu sein. Mehrere Studien konnten Tachyzoiten in mumifizierten und abgestorbenen Schweinefeten nachweisen (DUBEY 1986). Die Zahl totgeborener Ferkel schien mit einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* zu korrelieren. Dem steht die Untersuchung von SCHULZIG (2005) gegenüber. Sie wies bei neugeborenen Ferkeln von Sauen mit hohen Antikörpertiter gegen *T. gondii* ebenfalls Antikörper gegen den Parasiten nach, stellte aber bereits wenige Wochen nach der Geburt fest, dass die Titer bei den Ferkeln rapide abgesunken waren. Ähnliches gelang auch BOCH et al. (1965), bei deren Untersuchung die Ferkel von Toxoplasma-positiven Sauen erst nach der ersten Milchaufnahme Antikörper aufwiesen.

Es ist festzuhalten, dass Toxoplasmainfektionen bei Schweinen weltweit vorkommen. Die Durchseuchungsrate ist jedoch abhängig von unterschiedlichen Faktoren. Einfluss haben die Tierzahl und -dichte, die Art der Haltungsbedingungen, die Möglichkeiten des Übertrags durch andere Tierarten auf das Schweine (ASSADI-RAD et al. 1995; DUBEY et al. 1995b; WEIGEL et al., 1995; LEHMANN et al. 2003; KIJLSTRA et al. 2004; VILLARI et al. 2009; GARCIA-BOCANEGRA et al. 2010), das Futter (DUBEY et al. 1992) sowie die Jahreszeit (SCHULZIG 2005).

Die Abbildung 2.5. zeigt die Prävalenzen in den vergangenen Jahrzehnten in Deutschland. Während 1964 noch 98% der 500 untersuchten Schlachtschweine im Sabin-Feldman-Test positive Titer aufwiesen (BOCH et al. 1964), sank die Zahl in weiteren Studien in den darauf folgenden Jahren auf 37% bei 350 getesteten Tieren im Jahr 1976 (STOLL und KRAFT 1976) und 16,2% bei 834 Mastschweinen 1982 (BOCH und NEUROHR 1982). SEINEKE (1996) konnte bei keinem der 60 mittels ELISA getesteten Mastschweine Antikörper gegen *T. gondii* nachweisen. Zu beachten sind die geringen Probenvolumina bei den beschriebenen Untersuchungen.

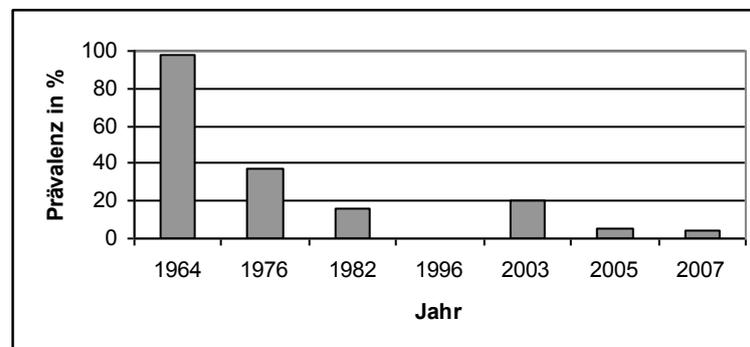


Abb. 2.5. : *T. gondii*-Prävalenzen in Veröffentlichungen von 1964 bis 2007

Neuere Untersuchungen mit deutlich größeren Tierzahlen deuten auf eine weiterhin bestehende Prävalenz in den Beständen hin. So ergab eine groß angelegte Studie im Jahr 2003 (FEHLHABER et al. 2003), dass 20,4% aller beprobten Mastschweine positiv waren. Davon waren 15,4% der Tiere aus großen Produktionsanlagen (über 1000 Tiere), 15% aus ökologischer und 52% aus Kleinhaltungen (1-20 Tiere) im ELISA positiv.

Zwei Jahre später waren 5,6% der 374 von SCHULZIG (2005) untersuchten Mastschweine positiv für *Toxoplasma gondii* Antikörper. LUDEWIG et al. (2007) untersuchten 4999 Mastschweine und Sauen in verschiedenen Betrieben und Bundesländern. 3,9% aller Tiere waren positiv. Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass Bundesland und betriebsabhängig große Unterschiede in den Prävalenzen zu finden sind. Die Autoren verzeichnen einen Anstieg der Prävalenz insgesamt und speziell in einzelnen Betrieben, was sie auf die Änderungen hin zur „tierfreundlicheren“ und „naturnahen“ Haltung zurückführen.

Bei gesonderter Betrachtung der Sauen betrug die Seroprävalenz bei Untersuchungen von SEINEKE (1996) 8%, SCHULZIG (2005) 40% und LUDEWIG et al. (2007) 31,6%. Die Anzahl der Sauen mit Toxoplasmaantikörpern war stets höher als bei den Mastschweinen (Abb. 2.6.)

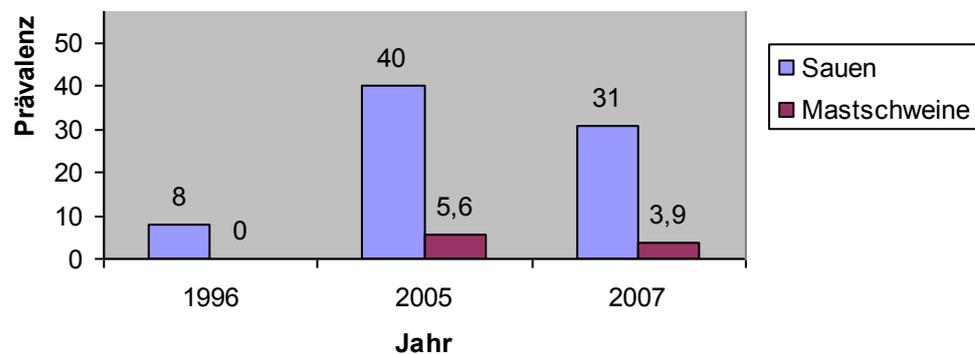


Abb. 2.6. : Seroprävalenz von *T. gondii* in deutschen Mastschweinen und Sauen

In einer weiteren Studie fanden DAMRIYASA et al. (2004) bei 19% der 2041 untersuchten Sauen aus 94 Betrieben Antikörper gegen *T. gondii*. Dabei fand sich in 96% der Betriebe mindestens eine positive Sau. 14% der untersuchten Betriebe hatten eine Seroprävalenz von über 50%. Es unterstützt die Vermutung anderer Autoren, dass das höhere Alter der Schweine eine steigende Toxoplasmaprävalenz nach sich ziehen könnte (WEIGEL et al. 1995; WYSS et al. 2000).

2.1.5. *T. gondii* beim Menschen

Im Jahr 2010 gingen 14 Meldungen von konnataler Toxoplasmose beim Robert-Koch-Institut (RKI) ein. Dabei waren Jungen und Mädchen aus 9 Bundesländern betroffen. In 2 Fällen wurden Missbildungen beschrieben (RKI 2010)

In den Jahren zuvor lagen die Zahlen gemeldeter Fällen in Deutschland zwischen 38 im Jahr 2001 und 8 in 2009. Das RKI verzeichnet dabei keine Tendenz. Im Jahresbericht der ECDC und EFSA werden 1259 Fälle einer Toxoplasmose für die 27 EU-Staaten beim Menschen genannt (EFSA 2011).

Da es sich dabei nur um die gemeldeten Fälle handelt und die Infektion bei immunkompetenten Menschen latent verläuft, ist von einer höheren Prävalenz beim Menschen auszugehen.

Bei immunkompetenten Personen führt die Infektion zu einer chronischen, subklinischen Toxoplasmose. Zu einem lebensbedrohlichen Verlauf kann die Erkrankung bei immunsupprimierten Menschen führen. Die Symptome reichen von Kopfschmerzen, Fieber, Krampfanfälle über Gleichgewichtsstörungen, Sehstörungen bis hin zu Lähmungserscheinungen und Wesensveränderungen.

Die Toxoplasmaenzephalitis kommt bei AIDS-Patienten vor. Der Krankheitsverlauf endet trotz Behandlung in 10 bis 30 % der Fälle letal. Somit nimmt *T. gondii* eine bedeutende Stellung als Krankheitserreger bei an AIDS erkrankten Menschen oder Patienten mit immunsupprimierenden Therapien ein (TENTER et al. 2000).

Bei seronegativen Frauen besteht die Gefahr der konnatalen Infektion während der Schwangerschaft mit schweren Folgen für das Kind. So unterscheiden sich die Folgen je nach Infektionszeitpunkt während der Schwangerschaft. Eine Infektion im ersten Trimon führt in der Regel zum Abort. Spätere Infektionen können beim Ungeborenen zu Hydrocephalus, intrakranialer Kalzifikation, Epilepsie, Hepatomegalie, Ascitis, sowie zu Thrombozytopenie mit Petechien und Anämie führen. Eine der häufigsten Folgen stellen okuläre Veränderungen wie Chorioretinitis, Strabismus und folgende Blindheit dar. Dabei manifestieren sich die Symptome zum Teil erst im Laufe der ersten 20 Lebensjahre.

Zusätzlich rückt *T. gondii* als auslösendes Agens bei psychischen Erkrankungen wie Schizophrenie und Depression in den Blickpunkt (HENRIQUEZ et al. 2009).

2.1.6. *T. gondii* in der Lebensmittelkette-Schwein

Aufgrund der in Tabelle 2.2 verdeutlichten Prävalenzen von *T. gondii* in den deutschen Schweinehaltungen ist von einem Eintrag über die Primärproduktion auszugehen.

Tabelle 2.2: Studien mit Nachweisen von *T. gondii* in der Primärproduktion

Autor	Prävalenz	Probenzahl
FEHLHABER et al. 2003	Ø 20,40%	1013
DAMRIYASA et al. 2004	Ø 19,00%	2041
SCHULZIG et al. 2005	Ø 5,60%	374
LUDEWIG et al. 2007	Ø 3,90%	4999

Serologische Nachweise von *T. gondii* gelangen auch in küchenfertigem Fleisch. So untersuchte SCHULZIG (2005) Nackenfleisch und Kotelett ökologischer und konventioneller Herkunft. Von den 200 Proben aus ökologischer Haltung waren 18 positiv (9%). Von den 200 untersuchten Proben aus konventioneller Haltung waren 5 (2,5%) positiv.

FEHLHABER et al. (2003) untersuchten 240 Hackfleischproben auf *T. gondii*, wovon 5,4% der untersuchten Proben positiv waren.

Somit muss davon ausgegangen werden, dass mit *T. gondii* kontaminiertes Schweinefleisch in die Lebensmittelkette gelangt.

Selbst bei niedrigen Prävalenzen von *T. gondii* im Schweinefleisch potenziert sich die Wahrscheinlichkeit für die Kontamination von Fleischerzeugnissen durch die Herstellung aus dem Fleisch mehrerer Tiere (KIJLSTRA et al. 2009).

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) gab in einer Stellungnahme bekannt, dass kurzgereifte Rohwurstprodukte eine Infektionsquelle darstellen können. Das Bundesinstitut machte dabei das Gefahrenpotential vom Herstellungsprozess der Wurst und Pökelwaren abhängig. Es lässt sich zusammenfassen, dass Produkte aus rohem Fleisch in dem Maße ein geringeres Aufkommen an infektiösen Toxoplasmazysten beinhalten, wie sie länger bestimmte Reifungs- und Trocknungsprozesse durchlaufen. So geht von gepökelten Rohdauerwaren kein Risiko aus (BfR Stellungnahme 039/2005).

Dass auch die Küchenzubereitung eine Rolle bei der Infektion mit *T. gondii* spielt, stellten LUNDEN et al. (1992) fest. Während *T. gondii* beim Braten durch die Erhitzung des Fleisches auf 72°C die Infektionsfähigkeit verliert, bleibt der Erreger bei der Mikrowellenzubereitung durch einen technisch bedingt anderen Temperaturverlauf auch bei 72°C infektiös.

Insgesamt werden 30-63% aller Toxoplasmainfektionen durch nicht oder unzureichend erhitztes Fleisch verursacht, womit die Lebensmittelkette das größte Risiko für die Infektion des Menschen darstellt (COOK et al. 2000).

Die Verhinderung der Infektion des Menschen mit *Toxoplasma*-positivem Fleisch beinhaltet vor allem präventive Maßnahmen. Physikalische Verfahren wie Erhitzen oder Gefrieren zur Unschädlichmachung des Erregers vor der Weiterverarbeitung von zum Verzehr vorgesehenem Schweinefleisch sind beschrieben (LUNDEN et al 1992, KIJLSTRA et al. 2008).

Seronegative Frauen sollten während der Schwangerschaft den Kontakt zu rohem Fleisch meiden. Empfehlungen besagen, rohes Fleisch nur mit Handschuhe zu verarbeiten und ausreichend erhitzt zu verzehren. Alternativ ist das Fleisch vor der Zubereitung bei -12°C zu lagern (GROSS 2004).

2.2. Der Erreger *Y. enterocolitica*

2.2.1. Taxonomie und Morphologie

2.2.1.1. Taxonomie

Klasse	Bacteria
Familie	<i>Enterobacteriaceae</i>
Spezies	<i>Yersinia pestis</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>
Subspezies	<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>enterocolitica</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>palaearctica</i>
	<i>Yersinia intermedia</i> <i>Yersinia kristensenii</i> <i>Yersinia frederiksenii</i> <i>Yersinia aldovae</i> <i>Yersinia rohdei</i> <i>Yersinia mollaretii</i> <i>Yersinia bercovieri</i> <i>Yersinia ruckeri</i> <i>Yersinia aleksiciae</i>

Abbildung 2.7.: Taxonomie *Y. enterocolitica* (nach EFSA 2007b)

Die Gattung *Yersinia* gehört mit ihren 12 Spezies zur Familie der Enterobacteriaceae (Tabelle 2.3) (EFSA 2007b). Neben den drei pathogenen Spezies *Yersinia* (*Y.* *pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, hat auch der fischpathogene Keim *Y. ruckeri* in den letzten 20 Jahren an Bedeutung gewonnen. Die restlichen sieben werden als Umweltkeime beschrieben (SELBITZ 2007a). *Y. enterocolitica* stellt die einzige Spezies dar, die zwei Subspezies beinhaltet. Aufgrund von Untersuchungen an 16S rRNA war die Unterteilung in *Yersinia enterocolitica* ssp. *enterocolitica* und *Yersinia enterocolitica* ssp. *palaearctica* möglich (NEUBAUER et al. 2000).

Eine weitere Differenzierung der Spezies *Y. enterocolitica* ist mittels Antigenen in Serotypen möglich. Dabei hat sich die Einteilung mittels Oberflächen- (O), Kapsel- (K) und Geißel-(H) Antigen durchgesetzt. Die Zuordnung erfolgt in O-Ag (O:1, O:3 usw.) und H-Ag (a, b, c

usw.). Zusätzlich wird *Y. enterocolitica* aufgrund biochemischer Eigenschaften in 6 Biovarien (1A, 1B, 2, 3, 4, 5) unterteilt (EFSA 2007b).

In Europa und speziell in Deutschland sind Yersinien der Serovare O:3 mit dem H-Ag a, b, c oder v des Biovars 4 oder O:9 mit dem H-Ag a oder b des Biovars 2 vertreten.

2.2.1.2. Morphologie, Pathogenitätsmechanismen und Eigenschaften

Yersinien sind 1-3µm lange und 0,5-0,8µm breite, gerade, gram-negative Stäbchen. Sie sind durch Ausbildung von peritrichen Geißeln bei 28°C beweglich (mit Ausnahme von *Y. pestis*). Das Bakterium ist fakultativ anaerob (HOLT et al. 1994).

Eine Besonderheit stellen die Yersinia-Outer-Proteins (YOPs) dar. Sie werden durch ein Plasmid kodiert, das es den drei humanpathogenen Yersinien *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* ermöglicht, die Zellen der Immunabwehr auszuschalten. Dabei können YOPs in 2 Gruppen eingeteilt werden. Eine Gruppe dient als Translokationseinheit und ermöglicht es der anderen Gruppe, in die Zellen der Immunabwehr einzudringen und so der Phagozytose zu entgehen und die weitere Immunantwort zu behindern (CORNELIS et al. 1998). Neben der Bedeutung dieser Plasmide in Bezug auf die Humanpathogenität von *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, ermöglicht die Detektion von YOPs-Antikörper den Nachweis des Erregers (SCHOERNER et al. 1990, LOUIS 2005).

Das Bakterium zeichnet sich durch Überlebensfähigkeit bei niedrigen Temperaturen aus. Noch bei 4°C ist ein Wachstum möglich. Das Wachstumsoptimum liegt zwischen 22 bis 29°C (MORRIS und FEELEY 1976).

Der Effekt von Schutzatmosphären auf das Wachstum des Erregers ist fraglich. Untersuchungen über den Einfluss des CO₂-Gehaltes in modernen Verpackungen von Hackfleisch bezogen auf das Wachstum von *Y. enterocolitica* zeigten, dass die CO₂-Konzentration nur indirekt auf die Vermehrungsrate des Keims einwirkt. So wiesen Proben mit unterschiedlichen O₂/CO₂ Verhältnissen konstant niedrige Keimzahlen bezogen auf *Y. enterocolitica* auf, wohin gegen die mesophile Gesamtkeimzahl mit Erhöhung des Sauerstoffgehaltes anstieg. Das verminderte Wachstum von *Y. enterocolitica* bei höheren O₂-Konzentrationen lässt sich mit der Unterdrückung durch andere Keime erklären (STROTMANN 2006).

2.2.2. Anzucht und Nachweisverfahren

2.2.2.1. Direkte Nachweisverfahren

Der direkte Nachweis von *Y. enterocolitica* aus Lebensmittel-, aber auch Umgebungsproben aus der Produktion mittels mikrobiologischer Anzucht wird über die ISO 10273:2003 geregelt. Sie sieht die Anreicherung in einem selektiven, flüssigen Nährmedium mit anschließender Anzucht und Identifikation auf selektiven, festen Nährmedien und abschließender biochemischer Bestätigung vor.

Hierzu eignet sich für die Anzucht von Yersinien der feste, selektive Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar (CIN-Agar) nach Voranreicherung in Pepton-Sorbitol-Gallensalz-Bouillon (PSB-Bouillon). Anschließend werden verdächtige Kolonien zur weiteren biochemischen Untersuchung entnommen.

Bei der biochemischen Untersuchung werden verdächtige Kolonien mittels Oxidase-, Harnstoff-, Tryptophan- und der Reaktionen im Kligleragar vorgeprüft. Anschließend werden die Kolonien aufgrund ihrer vorhanden oder nicht vorhandenen Verstoffwechslung von Saccharose, Rhamnose, Ornithin, Lysin und Citrat bestätigt.

Der Nachweis auf Pathogenität erfolgt durch Salicin-, Äskulin- und Pyrazinamidasetest, eine Bestätigung erfolgt mittels des kalziumabhängigen Wachstums bei 37°C.

Mittels PCR lassen sich Spezies- und Pathogenitätsnachweise durchführen. PROHASKA (2009) beschreibt in ihrer Arbeit eine real-time PCR mit hoher Sensitivität und Spezifität, die zum Monitoring von Fleischproben genutzt werden kann. Nach JOHANNESSEN et al. (2000) besitzt die PCR eine deutlich höhere Sensitivität als die Anzucht. So konnte der Erreger in Schweinefleisch mittels PCR 8 mal häufiger als mit der Anzucht nachgewiesen werden.

2.2.2.2. Indirekte Nachweisverfahren

Serologische Nachweise sind mittels ELISA und Immunoblot etabliert. Vorzugsweise werden Antikörper gegen Yersinia-Outer-Proteins (YOPs) detektiert (SCHOERNER et al. 1990, LOUIS 2005). Auch der Nachweis von Antikörpern gegen Lipopolysaccharide (LPS) ist möglich (NIELSEN et al 1995). Allerdings begründen SCHOERNER et al. (1990) den Vorteil der Detektion der YOPs im Gegensatz zu den LPS-Antikörpern mittels ELISA aufgrund von Kreuzreaktionen mit anderen Erregern beim Nachweis von LPS-Antikörpern, welche bei der Detektion von YOPs-Antikörpern nicht auftraten. Somit stellt der serologische Nachweis von YOPs-Antikörpern das spezifischere Verfahren dar.

2.2.3. *Y. enterocolitica* beim Schwein

Y. enterocolitica führt beim Schwein zu latenten Infektionen. Nur Jungtiere erkranken klinisch an einer meist enteralen Yersiniose mit Diarrhoe und Kachexie. Somit ist das Schwein vornehmlich Träger und Ausscheider des Erregers. Trotzdem werden auch bei latent infizierten Tieren ohne jede Klinik in der Sektion Tonsilitiden mit Mikroabszessen beschrieben. Auch werden Serositiden, Arthritiden und Pneumonien in *Yersinia* positiven Beständen genannt. Ein weiteres Merkmal sind Leistungsverluste, wie vermindertes Wachstum und eine schlechte Reproduktion.

Die Tiere infizieren sich oral über die Aufnahme von Fäkalien oder fäkal verschmutzten Gegenständen und Futter sowie Sperma und Abortmaterial (SKJERVE et al. 1998).

Im Jahr 2001 wurden 60% der von FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001) untersuchten Tonsillentupfer von frisch geschlachteten Schweinen in Deutschland positiv auf *Yersinia* getestet. In der gleichen Studie wiesen die Autoren in 10% der gesammelten Kotproben *Y. enterocolitica* nach.

Serologisch konnten HENSEL et al. (2004) in 45,5% der untersuchten Bestände den Erreger nachweisen. Bei den Untersuchungen von LANGKABEL (2011) reagierten 62,9% der 1773 untersuchten Mastschweine aus deutschen Betrieben positiv im Fleischsaft-Elisa.

NIELSEN et al. (1996) verglichen die Ergebnisse von Sammelkotproben und serologischen Untersuchungen bei Mastschweinen. Es stellte sich heraus, dass sich der Zeitpunkt der Erregerausscheidung mit dem Kot und das Auftreten von Antikörpern im Blut nicht decken. Die deutlichen Unterschiede begründen die Autoren mit der zeitlich begrenzten Ausscheidungsdauer und der langen Persistenz von Antikörpern im Blut. Die Autoren stellten fest, dass Tiere, die sich als Absatzferkel infizieren, seltener während der Mastperiode Erreger ausscheiden, als ältere Tiere in der Aufzucht mit Erregerkontakt. Manche Tiere bilden noch unabhängig vom Infektionszeitpunkt zum Zeitpunkt der Schlachtung Antikörper.

SKJERVEN et al. (1998) konnten belegen, dass durch die Haltungsbedingungen das Infektionsrisiko in den Mastbeständen gesenkt werden kann. So führen eine strikte Trennung von infizierten und nicht infizierten Tieren, Handfütterung und der Einsatz von Unterdruckventilen im Stall, zu einem niedrigeren Risiko der Infektion.

2.2.4. *Y. enterocolitica* beim Menschen

Eine Infektion mit Yersinien beim Menschen stellt eine meldepflichtige Erkrankung dar. Im Jahr 2010 wurden deutschlandweit 3368 Fälle einer Yersiniose beim Menschen dem Robert-Koch-Institut (RKI) gemeldet. Im Vorjahr waren es 3731. Am häufigsten erkrankten Kleinkinder im Alter von 1 bis 4 Jahren (RKI 2011).

Die klinische Erkrankung führt beim Menschen zu einer Enteritis mit Abdominalschmerz, Diarrhoe und Vomitus. In schwereren Fällen treten Lymphadenitiden und Septikämien auf, dies jedoch nur in Verbindung mit weiteren Vorerkrankungen. Als Folge einer Septikämie kann es zur Mikroabszessbildung in Leber, Milz, Lunge, Herz und Gelenken kommen. Auch Meningitiden sind beschrieben (BOTTONE et al. 1999). Immunvermittelte Folgeerkrankungen wie Uveitis, Thyreoiditis, Arthritis und Erythema nodosum sind beschrieben (NEUBAUER et al. 2001).

2.2.5. *Y. enterocolitica* in der Lebensmittelkette Schwein

Übertrag und Verbreitung des Erregers sind von der Primärproduktion über die gesamte Lebensmittelkette hinweg zu verfolgen. Der Eintrag *Yersinia*-positiver Tiere in einen Mastbestand führt über die Fäkalien zur Infektion weiterer Tiere. Der Tiertransport wird als weitere Möglichkeit des Keimübertrags gesehen. (SKJERVE et al 1998) Dieser rote Faden zieht sich im Schlachthof in die Wartebereiche hinein. Die Hygiene und das Trennen Erregernegativer Tiere von Ausscheidern sind die bedeutensten Präventivmaßnahmen um die Kontamination einzudämmen (FUKUSHIMA et al. 1990).

Auch während des Schlacht- und Zerlegeprozesses konnten Übertragungswege nachgewiesen werden. So kann bereits während des Transports und der Wartezeit auf dem Schlachthof eine Übertragungen von Yersinien von ausscheidenden Tieren auf Tiere mit negativem Bestandsstatus nachgewiesen werden (FUKUSHIMA et al. 1990). Das Umschneiden des Anus wird kritisch betrachtet (NESBAKKEN 1994). Der Übertrag durch das Messer stellt zudem eine weitere Möglichkeit dar, den Keim von Schlachtkörper zu Schlachtkörper weiterzutragen (KAPPERUD 1991).

Da Yersinien in den Tonsillen (FRIES et al. 2002; FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2010) und Mandibularlymphknoten nachgewiesen wurden, ist der Anschnitt mit dem Messer im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung ein weiterer zu diskutierender Übertragungsgang.

FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2004) konnten mittels Tier- und Umgebungsproben in allen acht untersuchten Metzgereien *Y. enterocolitica* nachweisen. In sechs Betrieben war das

humanpathogene Serovar O:3 vertreten. Bei der Beprobung von Schweinefleisch im Handel waren 18% der 446 untersuchten Proben Erregerpositiv (MESSELHAUSSER et al. 2011).

Da sich der Erreger bei einer Temperatur von 4°C noch vermehren kann (KAPPERUD 1991), scheint der Rohverzehr von Hackfleisch problematisch.

Laut dem Bundesinstitut für Risikobewertung wird empfohlen, Fleisch vor dem Verzehr für mindestens 2 Minuten auf mindestens 70°C zu erhitzen (BfR 2013).

2.3. Der Erreger *Salmonella*

2.3.1. Taxonomie und Morphologie

2.3.1.1. Taxonomie

Salmonellen werden in zwei Spezies eingeteilt, *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*. Die Spezies *Salmonella enterica* lässt sich wiederum in 6 Subspezies unterteilen (Abb. 2.8.) (GRIMONT 2007). Abgesehen von *S. enterica* ssp. *enterica*, *S. enterica* ssp. *diarizonae* und *S. enterica* ssp. *arizonae* sind alle Vertreter Keime, die nicht im Tier oder dem Mensch zu finden sind. Die Subspezies *S. enterica* ist der einzige Vertreter, der bei warmblütigen, die Subspezies *S. enterica* ssp. *diarizonae* und *S. enterica* ssp. *arizonae* die, die bei wechselwarmen Tieren zu finden sind (SELBITZ 2007b).

Klasse	-Bacteria
Familie	-Enterobacteriaceae
Genus	-<i>Salmonella</i>
Spezies	-<i>Salmonella enterica</i>
Subspezies	<i>S. enterica</i> ssp. <i>indica</i> <i>S. enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i> <i>S. enterica</i> ssp. <i>arizonae</i> <i>S. enterica</i> ssp. <i>houtenae</i> <i>S. enterica</i> ssp. <i>salamae</i> <i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i>
	-<i>Salmonella bongori</i>

Abbildung: 2.8.: Taxonomie *Salmonella* (nach GRIMONT 2007)

Aufgrund ihrer Oberflächen- (O) und Geißelantigene (H), lassen sich Salmonellen mit Hilfe des Kaufmann-White-Schemas einteilen (LE MINOR 1984). Die Zahl der Serovare betrug im Jahr 2007 2579 (GRIMONT 2007). Aktuell muss von einer höheren Zahl ausgegangen werden. Die Serovare der Subspezies *S. enterica* ssp. *enterica* sind zusätzlich benannt. Obwohl die Serovare überwiegend wirtunspezifisch sind, gibt es wenige Ausnahmen. So werden die Serovar Thyphi und Paratyphi der Subspezies *S. enterica* ssp. *enterica* nur beim Menschen, Dublin nur beim Rind und Gallinarium nur beim Geflügel nachgewiesen (SELBITZ 2007a).

2.3.1.2. Morphologie und Eigenschaften

Salmonellen sind gramnegativ Stäbchen. Sie sind 0,7-1,5µm breit und 2-5µm lang, gerade und überwiegend begeißelt. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 37°C, was bei der Anreicherung zum direkten Erregernachweis nutzbar gemacht wird (LE MINOR 1984). Das Wachstum gelingt bereits auf einfachen Nährmedien unter aeroben und fakultativ anaeroben Bedingung. Auch ihre biochemischen Eigenschaften werden für den direkten Erregernachweis genutzt. Hervorzuheben sind hier die Bildung von H₂S mit einer Schwarzfärbung der Kolonien, der Abbau von Propylenglykol und einem resultierenden rötlichem Farbumschlag auf Rambach-Agar, die Pinkfärbung nach Fermentation von Glucuronat sowie das Unvermögen, Lactose zu verstoffwechseln (SELBITZ 2007b).

2.3.2. Anzucht und Nachweisverfahren

2.3.2.1. Direkte Nachweisverfahren

Die mikrobielle Anzucht dient dem direkten Erregernachweis. Festgelegt ist dieser durch die DIN EN ISO 6579:2014-08. Diese beschreibt ein horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* aus Proben, die aus der Lebensmittelkette stammen. Das beinhaltet neben dem eigentlichen Produkt auch die Primärproduktion und die Beprobung von lebensmittelverarbeitenden und produzierenden Stätten. Dabei wird zunächst eine Voranreicherung im nichtselektiven Flüssignährmedium mit anschließender Anreicherung im selektiven Flüssignährmedium durchgeführt. Danach wird auf zwei verschiedenen festen, selektiven Nährmedien ausgestrichen und der Keim als mögliche *Salmonella* identifiziert. Das Ergebnis wird mit biochemischen und/oder serologischen Test bestätigt.

Die realtime-PCR stellt ein weiteres, sensitives Instrument zum schnellen Nachweis von *Salmonella* dar. Hierbei werden spezifische DNA-Sequenzen des Erregers nachgewiesen. Entsprechende Verfahren mit kurzer Anreicherungsphase im Medium und der direkt angeschlossenen realtime-PCR ohne vorherige Anzucht sind beschrieben. Bei dem Verfahren wird in einem Thermocycler die Probe erhitzt um den DNA-Doppelstrang aufzutrennen. Anschließend werden Taq-Polymerase, Primer, Basen und Farbsonden hinzugefügt um mögliche Erreger-DNA-Fragmente zu vervielfältigen und photometrisch nachweisen zu können (KRAMER et al. 2010, MÜLLER 2010).

2.3.2.2. Indirekte Nachweisverfahren

Serologisch eignet sich der indirekte Nachweis über ELISA-Techniken für Monitoringprogramme und epidemiologische Untersuchungen mit großem Probenaufkommen (STEINBACH et al. 1999). Als Probenmedium eignen sich Serum und Fleischsaft. Mehrere

kommerzielle Testkits von verschiedenen Herstellern stehen zur Verfügung. Detektiert werden Antikörper gegen LPS-Oberflächenantigene. Die Testkits sind im Rahmen der „Verordnung zu Verminderung der Salmonellenverbreitung durch Schlachtschweine“ zugelassen und etabliert. Jedoch variieren sie in ihrer Sensitivität und Spezifität (RÖSLER et al. 2011; SZABO et al. 2008)

2.3.3. *Salmonella* beim Schwein

Schweine können latente Träger und Ausscheider von Salmonellen sein oder klinisch erkranken. Dabei werden zwei Verlaufsformen unterschieden. Die enterocolitische Salmonellose wird überwiegend durch *S. Typhimurium* verursacht, wohingegen der schweinespezifische Keim *S. Cholerasuis* septikämische Verläufe hervorruft.

Die durch *S. Typhimurium*-Infektion hervorgerufene Enteritis führt zu mehreren Tagen Durchfall mit andauernder Ausscheidung des Erregers auch nach Genesung. Betroffen sind größere Tiergruppen.

Die *S. Cholerasuis*-Infektion ist durch plötzliche Todesfälle und akute Erkrankungen mit Mattigkeit, hohem Fieber, Diarrhoe und Verfärbungen der Adnexe gekennzeichnet. Sie tritt bei Einzeltieren auf (PAULIN et al. 2007).

Im Jahr 2008 wurden die Ergebnisse einer Beprobung von 2651 Mastschweinen aus dem Jahr 2007 vom Bundesinstitut für Risikobewertung veröffentlicht. Dabei wurden 2482 Tiere serologisch mittels Fleischsaft-ELISA und 2569 durch direkte Erregeranzucht auf Salmonellen untersucht. 801 (32,3%) Tiere waren serologisch und 326 (12,7%) mikrobiologisch positiv (BfR 2008). Andere Autoren beschreiben deutlich niedrigere Seroprävalenzen. So lagen die Seroprävalenzen bei der Untersuchung von MÜLLER (2010) von 545 Schweinen je nach Entnahmezeitpunkt bei 6,8% bis 10,8% bei einem Cut'off von $\geq 200\text{OD}\%$. PENNER (2004) untersuchte 1920 Tiere mittels ELISA, von denen bei einem Cut'off von $\geq 400\text{OD}\%$, 6,5% serologisch positiv waren.

Aufgrund der Verbreitung und des zoonotischen Potenzials, das von dem Erreger ausgeht, wurde im März 2007 die „Verordnung zur Verminderung der Salmonellenverbreitung durch Schlachtschweine“ (Schweine-Salmonellen-Verordnung) installiert. Diese sieht vor, dass alle Schweinemastbestände regelmäßig auf Salmonellen beprobt werden. Hierzu werden Blut- oder Fleischsaftproben frühestens 14 Tage vor bis spätestens während der Schlachtung gewonnen. Diese werden mittels kommerzieller, vom Friedrich-Löffler-Institut zugelassener LPS-ELISA getestet. Anschließend erfolgt eine Einteilung der Betriebe in drei Kategorien. Kategorie 1 beinhaltet Bestände mit bis zu 20% serologisch positiven Tieren, Kategorie 2 mit 20-40% Reagenten und Kategorie 3 mit über 40% serologisch positiven Tieren. Betriebe der

Kategorie 3 haben ihre Ergebnisse den zuständigen Veterinärbehörden mitzuteilen und entsprechende Maßnahmen zur Keimreduzierung durchzuführen (RÖSLER 2009).

2.3.4. *Salmonella* beim Menschen

Obwohl sich Menschen an Tieren anstecken können, gibt es mit den Serovaren *S. Typhi* und *S. Paratyphi* zwei Serovare, die nur beim Menschen nachgewiesen werden. Andere Serovare sind typische Zoonoseerreger. Salmonellen gehören zu den bedeutenden durch Lebensmittel übertragbaren Erregern. Dem Robert-Koch-Institut wurden 2010 25.228, im Jahr 2009 31.169 Fälle einer Salmonellose beim Menschen mitgeteilt (RKI Epidemiologisches Bulletin 3/2011). In einem gemeinsamen Bericht der ECDC und EFSA, werden für das Jahr 2009 108.614 Fälle von Salmonellosen beim Menschen genannt. Das sind 17,4% weniger als im Jahr zuvor. Der Bericht erwähnt, dass die Zahlen im fünften Jahr in Folge abnehmen (EFSA 2011). Dies führen die Autoren auf verbesserte Hygiene und Managementabläufe in den Nutztierbeständen zurück.

Klinisch treten infolge einer Gastroenteritis Diarrhoe, Abdominalschmerz, Vomitus und Fieber auf. Bei ernsthaftem Verlauf kann es zu lebensbedrohlicher Dehydrierung oder septikämischen Verläufen kommen (GIRAUDON et al. 2009; ISSACK et al. 2009; VAN CAUTEREN et al. 2009; KILIC et al. 2010). In der Regel ist die Infektion selbstlimitierend.

2.3.5. *Salmonella* in der Lebensmittelkette Schwein

Trotz der ubiquitären Verbreitung der Salmonellen gelten lebensmittelliefernde Tiere als bedeutende Quelle für die humane Salmonellose (FOLEY et al. 2008). Zirka 20-30% der humanen Salmonelloseerkrankungen lassen sich auf den Verzehr von Schweinefleisch und dessen Produkten zurückführen (BLAHA 2008). Diese Nachweise beim Mastschwein lassen sich im Verlauf der Lebensmittelkette verfolgen. Weltweit wurden und werden Salmonellen im Bereich der Schweinemast, Schlachtung, Verarbeitung und des Vertriebs nachgewiesen. Die Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeiten wird verkompliziert durch unterschiedliche Probenmaterialien, die sich aus Tierproben und Umgebungsproben jeglicher Art und den unterschiedlichen Untersuchungsmethoden zusammensetzen. So werden unterschiedliche (direkte und indirekte) Nachweisverfahren durchgeführt, die die Ergebnisse in der Summe schwer vergleichbar machen (FRIES 2009).

Die Eintrags- und Zirkulationsrouten der Erreger im Bestand sind dabei vielfältig. Trotzdem kann der Eintrag der Salmonellen in einen Schweinebestand durch drei wesentliche Punkte beschrieben werden (BLAHA 2001):

- Horizontal durch Personen, Vögel, Futter, Schädlinge usw.
- Vertikal durch den Übertrag der Erreger von der Muttersau auf die Ferkel usw.
- Zirkulation der Keime zwischen Ausscheidern, kontaminierten Gegenständen und bisher Salmonella-negativen Tieren

BODE (2007) verfolgte Mastschweine vom Ferkelalter bis zur Schlachtung in drei unterschiedlichen Mastbetrieben vor und nach bestandsspezifischen Maßnahmen zur Reduzierung von *Salmonella*. Dabei konnte sie nachweisen, dass sich Maßnahmen zur Keimreduzierung positiv auf den Erregergehalt auswirken, solange diese konsequent durchgeführt werden.

Die Autorin geht aufgrund ihrer Ergebnisse ebenfalls davon aus, dass durch Jungsauen eingeschleppte Salmonellen den Sauenbestand belasten und dies der Hauptursprung für eine Salmonellenproblematik im weiteren Verlauf der Lebensmittelkette ist.

Salmonellen können in der Folge auch bei geschlachteten Schweinen serologisch und mikrobiologisch nachgewiesen werden (CZERNY et al. 2001; BODE 2007; BfR 2008).

Über Schweinefleischprodukte gelangen die Erreger zum Verbraucher (EFSA 2011).

2.4. Zoonoseerreger in der Outdoorhaltung

Nachdem über Jahrzehnte die Nutztierhaltung eine zunehmende Industrialisierung erfahren hat, gibt es seit einigen Jahren einen Wandel der öffentlichen Meinung mit zunehmender Kritik an den modernen Haltungssystemen. Dies lenkt die Aufmerksamkeit zu natürlicheren und tierfreundlicheren Nutztierhaltungen (DAVIES 2011). Die sogenannte Outdoorhaltung stellt eine Möglichkeit der Produktion von lebensmittelliefernden Tieren, die sich an den Tierschutzgedanken anlehnt, dar. Dabei gibt es keine klaren Definitionen und unterschiedliche Haltungsformen sind möglich.

Die sich durch diese Art der Tierhaltung darstellenden Problematiken werden in der Wissenschaft stark diskutiert. So besteht im Vergleich zur konventionellen Schweinmast in offenen Haltungssystemen ein engerer Kontakt zur Aussenwelt sowie den damit verbundenen Vektoren für Zoonoseerreger. Aufgrund der Bodenbeschaffenheit sind schlechtere Möglichkeiten zur Reinigung und Desinfektion gegeben. Es wird angenommen, dass durch den Wandel hin zur vermehrten Outdoorhaltung die Prävalenzen für Zoonoseerreger wie *T. gondii* oder *Salmonella* ansteigen (KIJLSTRA et al. 2004; DAVIES 2011).

In den USA wurden 292 Serumproben aus konventionellen Schweinmast- und 324 aus Outdoor/ABF-Betrieben auf *T. gondii*, *Trichinella spiralis* und *Salmonella* untersucht. Die Prävalenz von *Salmonella* und *T. gondii* lag in den konventionellen Betrieben bei 39% und 1%, bei den Outdoor/ABF-Betrieben bei 54% und 7%. Zwei Schweine aus Outdoor/ABF-Haltung waren *Trichinella*-positiv (GEBREYES et al. 2008). V.D. GIESSEN et al. (2007) bestätigen diese Aussage für *T. gondii*. In ihrer Untersuchung waren 4% der konventionellen und 33% der Freilandbetriebe *Toxoplasma*-positiv.

CALLAWAY et al. (2005) konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede in der Salmonellenprävalenz zwischen Indoor- und Outdoorhaltung finden, vermuten aber, dass die Bedingungen der Outdoorhaltung (Hütten, Böden) zu einer längeren Persistenz der Erreger in der Umgebung führen.

In einer niederländischen Untersuchung waren alle 621 Mastschweine aus 30 konventionellen Betrieben *Toxoplasma*-negativ, wohin gegen 38 von 1295 Tieren aus Outdoor-Systemen positiv auf den Erreger getestet wurden (KIJLSTRA et al. 2004).

2.5. ELISA- Assay

Der Enzyme-linked immunosorbent Assay ist ein indirektes, serologisches Nachweisverfahren für eine Vielzahl von Erregern.

Es werden Testseren mit antigenbeschichteten Mikrotiterplatten (MTP) inkubiert. Befinden sich Antikörper im Testserum, binden diese an die beschichtete Oberfläche der MTP. In weiteren Schritten wird die MTP mit Anti-Antikörper-Konjugat inkubiert, das sich wiederum an den gebundenen Antikörper heftet. Aufgrund der Beschichtung des Anti-Antikörpers kann ein in der Folge dazu gegebener Farbstoff am Konjugat binden. Der Antigen-Antikörper-Komplex wird durch einen Farbumschlag sichtbar (Abb. 2.9.).

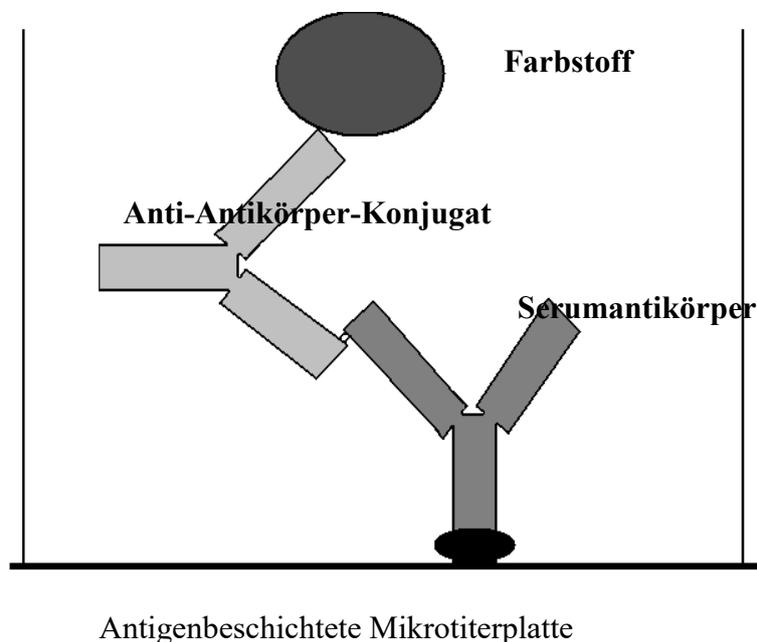


Abb. 2.9. : Prinzip eines indirekten ELISA

Zur Beschichtung der MTP eignen sich rekombinante und traditionelle Antigene. Da zur Gewinnung von traditionellen Antikörpern Tierversuche notwendig sind, stellen Rekombinate aufgrund der Anzucht mittels Bakterienplasmid eine schnelle und günstige Alternative dar. Auch lassen sich durch moderne Verfahren rekombinante Antikörper produzieren, die auf ein weites Spektrum an Antikörpern (akute und chronische Phase der Infektion) reagieren (GAMBLE et al., 2005).

2.6. ELISA im Rahmen von Bestandsuntersuchungen

Der ELISA wird in Deutschland unter anderem im Rahmen der „Schweine-Salmonellen-Verordnung“ zum Bestandsmonitoring routinemäßig eingesetzt (RÖSLER 2009).

Antikörper können in verschiedenen Probenmedien nachgewiesen werden. So hat sich die Beprobung von Tieren mittels Fleischsaft und Serum etabliert. Die Bewertung der Ergebnisse ist nicht immer eindeutig, da die Technik abhängig vom Probenmedium und Zustand der Tiere ist. So werden im Serum höhere OD% gemessen als im Fleischsaft (RÖSLER et al. 2011; WILHELM et al. 2007). Stress und Dehydratation wirken sich unterschiedlich schnell auf Antigenkonzentrationen in Serum und Fleischsaft aus und stellen Faktoren für Schwankungen zwischen den Medien da (DAVIES et al. 2003). Auch ist die Lokalität der Fleischprobe entscheidend. NOBMANN et al. (2011) konnten belegen, dass es Unterschiede der serologischen Ergebnisse zwischen den Proben aus Zwerchfellpfeiler-, Nacken- und Bauchmuskulatur gibt.

Beim Vergleich von kommerziellen Test-Kits unterschiedlicher Hersteller kommt es zu unterschiedlichen Ergebnissen. So führten in Studien *Salmonella*-ELISA, die kommerziell erhältlich und im Rahmen des *Salmonella*-Monitorings zugelassen sind, zu unterschiedlichen OD-Werten. Die dort untersuchten Tests variieren in ihrer Sensitivität und Spezifität (RÖSLER et al. 2011; SZABO 2008; VICO et al. 2010).

Der Einsatz zum Zwecke der Einzeltierdiagnostik wird bezweifelt (NOLLET et al 2005). Aussage über den Status einer Infektion aufgrund eines seropositives Resultats können nicht getroffen werden. So konnten RÖSLER et al. (2011) mit mehreren Tests erst 3 Wochen post infectum positive Tiere nachweisen. Auch kann nicht sicher zwischen einer akuten, chronischen oder latenten Infektion unterschieden werden.

Das größte Problem stellt die Ergebnisauswertung dar. So hängt die Fähigkeit des ELISA Testsystems, positive Reagenten zu detektieren, von den Cut'offs der Hersteller ab. Dabei ist zu bedenken, dass eine hohe Sensitivität immer auf Kosten der Spezifität geht und man positive Reagenten diagnostiziert, die eventuell keine sind (RÖSLER et al. 2011).

Der Ermittlung eines ideale Cut'off kann für jedes ELISA-System individuell ermittelt werden. Hierzu dient die "two-graph receiver operating characteristic-Analyse" (TG-ROC). Der Schnittpunkt der Graphen der Sensitivität und der Spezifität ergibt den idealen Cut'off (GREINER et al. 1995). In der Folge kann der Cut'off für bestimmte Fragestellungen durch variierende Verhältnisse zwischen Sensitivität oder Spezifität genauer festgelegt werden.

3. Material & Methoden

3.1. Material und Geräte

- Tiefkühltruhe: Liebherr profi line -28°C
- Kühlschrank: Liebherr profi line 6°C

- Pipetten: Einkanalpipette Eppendorf Research VARIABEL 20µl
VWR international GmbH Deutschland

Einkanalpipette Eppendorf Research FIX 100µl
VWR international GmbH Deutschland

Einkanalpipette Eppendorf Research VARIABEL 10-100µl
VWR international GmbH Deutschland

Mehrkanalpipette Eppendorf Research 8 Kanal 50-1200µl mit
Ladeadapter
VWR international GmbH Deutschland

Glaspipette

- Pipettenspitzen: Pipettenspitzen Multi® Universal
2-200µl, PP, gelb, lose, unsteril
Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe

epT.I.P.S. Standard Vol. 50 - 1250 µl green
Eppendorf, Hamburg

1ml Glaspipette
10ml Glaspipette

- Pipettenracks: Racks, unsteril
Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe

- Messbecher: 1l, Glas
50ml, Glas

- Pipettierwannen

- Verdünnungsplatte (MTP)

- Vortex Heidolph REAX 2000

- Vortex für MTP Vortex Genie™ 2, Scientific Industries

- Washer: ELx50 Auto Strip Washer
BIO-TEC Inc., Highland Park Winooski, Vermont USA

- Reader: EL 800 Universal Microplate Reader
BIO-TEC Inc., Highland Park Winooski, Vermont USA
- 2 Wecker
- PC
- Drucker
- Software: Microsoft® Office Word SP3
Microsoft Office Professional Edition 2003
Microsoft Corporation

Microsoft® Office Excel
Microsoft Office Professional Edition 2003
Microsoft Corporation

EndNoteX
Thomson Reuters

Microsoft® Paint Version 5.1
Microsoft Corporation

IBM SPSS 20

KC4™ Version 3.4, Rev. 2.1
BIO-TEK Inc., Winooski, Vermont, USA

Adobe Acrobat Reader

3.2. Proben (prelab)

3.2.1. Probenqualität

Bei dem Probenmaterial handelte es sich um Fleischsaft und Serum. Bevorzugte Lokalisation zur Entnahme der Fleischproben war das Diaphragma. Es handelte sich um mindestens 10g schwere Muskelproben, die zur Gewinnung von Fleischsaft mittels eines Fleischsafttrichters dienten. Das Serum wurde zunächst als Vollblut gewonnen und in der Folge abzentrifugiert.

3.2.2. Probengewinnung

In der vorliegenden Arbeit wurden 2004 Tiere aus 41 Outdoorbetrieben untersucht. Allen beprobten Tieren wurde während des Schlachtprozesses und vor der Kühlung eine Blut- und eine Muskelprobe entnommen und codiert. Anschließend wurden die Proben gekühlt zur weiteren Bearbeitung ins Institut für Fleischhygiene und -technologie überführt. Die Entnahme der Proben erfolgte während 22 Ausfahrten in unterschiedlichen Schlachtbetrieben.

Die Betriebsauswahl war zufällig und abhängig von den an den Schlachtbetrieb gelieferten Schlachttieren. Dementsprechend ergaben sich die Probenzahlen pro Betrieb aus der Zahl der an dem Tag am Schlachthof angelieferten Tiere und wurden nicht zuvor statistisch ermittelt.

3.3. Technik (inlab)

3.3.1. Der Fleischsaft

Die Gewinnung des Fleischsafts erfolgte durch langsames Auftauen der Proben mittels Fleischsafttrichter im Kühlschrank bei bis zu 8°C innerhalb von 24h. Der Tauprozess verlängerte sich um weitere 24h, wenn nicht genügend Fleischsaft gewonnen wurde. Die Aufbereitung der Probe endete mit dem Entfernen des Trichters samt Fleisch vom Röhrchen mit dem gewonnenen Fleischsaft. Der Fleischsaft wurde in Eppendorfgefäßen umgefüllt und tiefgefroren gelagert. Abbildung 3.1. stellt die Gewinnung des Fleischsaftes schematisch dar. Jede Probe bekam eine Identifizierung (Ausfahrt und durchlaufende Nummer). Vor der Untersuchung des Fleischsaftes mittels ELISA wurde jede Probe aufgrund von Schwebeteilchen 3 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert.

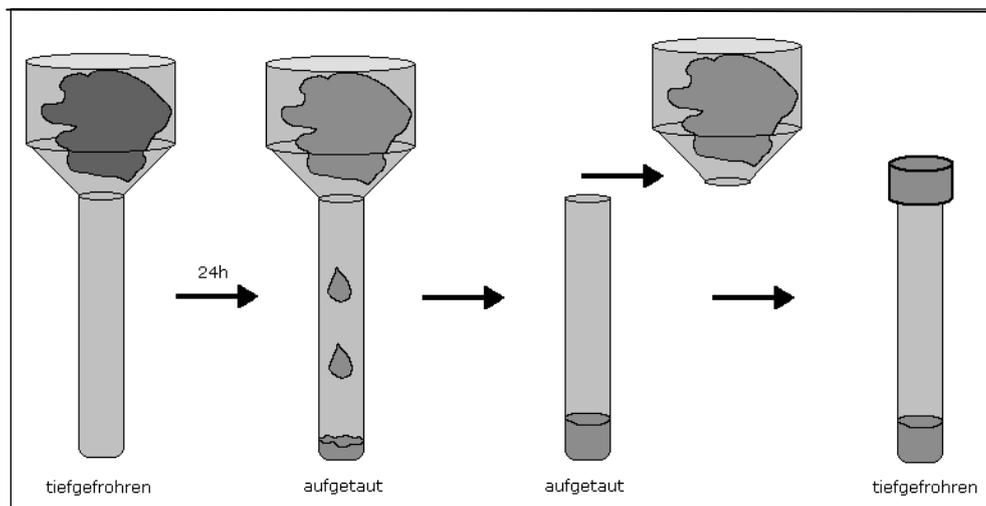


Abb. 3.1. : Fleischsaftgewinnung mittels Trichter

3.3.2. Der ELISA

Bei den verwendeten ELISA-Assay handelte es sich um ein indirektes, serologisches Verfahren. Die benutzten ELISA-Kits waren nach einer Eingewöhnungsphase einfach und schnell durchführbar. Trotzdem muss erwähnt werden, dass es sich dabei um ein Testverfahren handelt, das bei Nichteinhaltung der Herstelleranweisungen anfällig für Fehler ist. So kann es bei Abweichungen am Probenmaterial (z.B. Sediment, Temperatur), den Reagenzien (Temperatur) und den Ablaufzeiten zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Positiv zu erwähnen ist, dass Schwankungen durch die mitgeführten Hersteller- und Feldkontrollen sicher zu erkennen waren.

3.3.3. Der *Toxoplasma*-ELISA

Priocheck Toxoplasma Ab porcine ELISA
Prionics AG, Schlieren-Zürich Schweiz

Zur Detektierung von *T. gondii*-Antikörpern in Fleischsaft oder Serum.
Das Kit besteht aus folgenden Inhalten:

- Testplatte 96 Well
- Probenpuffer
2x 60ml
- Waschpuffer
20x konzentriert
- Waschpufferzusatz
0,1%
- Konjugatpuffer
1 Flasche 60ml,
- Konjugat
30x konzentriert
1 Flasche. 2ml
- Chromogen (TMB) Substrat
1 Flasche 60ml.
- Stopplösung
1 Flasche 60ml
- Demineralisiertes Wasser
1 Flasche 10ml
- Positivkontrolle (lyophilisiert)
- Schwachpositivkontrolle (lyophilisiert)
- Negativkontrolle (lyophilisiert)

Vor der Durchführung des Tests gilt es, nicht gebrauchsfertige Reagenzien für den Gebrauch vorzubereiten.

Herstellung der Waschpuffergebrauchslösung:

50ml Waschpuffer (20fach), 949ml demineralisiertes Wasser und 1ml Waschpufferzusatz werden in ein 2L Gefäß gegeben und durch Schwenken vermischt. Anschließend wird der gebrauchsfertige Waschpuffer in den entsprechenden Behälter des ELx50 Auto Strip Washer überführt. Der Waschpuffer ist 2 Wochen bei 22°C haltbar.

Herstellung der Konjugatgebrauchslösung:

Die Konjugatgebrauchslösung sollte kurz vor Gebrauch angesetzt werden. Für eine Platte benötigt man 11,6ml Konjugatpuffer + 400µl Konjugat. Dies wird in mehreren Schritten pipettiert, um ein präzises Arbeiten zu ermöglichen (Konjugatpuffer: 10ml, dann 1ml und

zuletzt 600µl jeweils mit der Glas- und 1000µl Pipette, Konjugat: 400µl mit der 1000µl Pipette). Gut mischen.

Herstellung der Kontrollproben:

Zu dem Lyophilisat der Positiv-, schwach Positiv- und Negativkontrolle werden 200µl demineralisiertes Wasser pipettiert. Die Kontrollproben sind bei -20°C bis -80°C lager- und bis zu 5x auftaufähig.

Kontrollenverdünnung:

Die Kontrollenverdünnung erfolgt in einer Mikrotiter-Verdünnungsplatte. Hierzu werden 90µl Probenpuffer mit der Mehrfachkanalpipette in alle Wells gegeben. Anschließend werden je 10µl der verdünnten Positivkontrollen in die Wells A1 und B1 pipettiert. Dieser Schritt wird mit 10µl Schwachpositivkontrolle für die Wells C1 und D1, so wie 10µl Negativkontrolle für die Wells E1 und F1 wiederholt.

Testdurchführung Fleischsaft:

80µl Probenpuffer werden in die Wells A1 bis F1 der Mikrotiterplatte des Prionics Priocheck Toxoplasma Ab Testkits pipettiert. Daraufhin überführt man je 20µl der entsprechenden verdünnten Kontrollen aus der Verdünnungsplatte in die Wells A1 bis F1 der Testplatte. Anschließend werden 90µl Probenpuffer und 10µl Fleischsaftprobe in die restlichen Wells gegeben. Die MTP wird 60 Sekunden mit dem Plattenvortexer geschüttelt. Die Mikrotiterplatte wird danach über 60 Minuten inkubiert.

Nach 60 Minuten folgt ein Waschgang mittels ELx50 Auto Strip Washer nach vorprogrammiertem Protokoll. Der Waschvorgang besteht aus 4 Waschdurchgängen, wobei jeweils jedes Well mit 300µl Waschpuffer gespült wird.

Nach dem Waschschrift werden 100µl der nach Anleitung hergestellten Konjugatgebrauchslösung in jedes Well pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird erneut über 60 Minuten inkubiert.

Es folgt ein weiterer Waschgang (siehe oben). Anschließend werden 100µl Substrat (TMB) in jedes Well pipettiert und im Dunklen inkubiert.

Nach 15 Minuten werden 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge wie TMB in jedes Well pipettiert. Es gibt einen Farbumschlag von blau zu gelb.

5 Minuten später wird die Extinktion mit dem Plattenphotometer EL800 Universal Microplate Reader bei 450nm gemessen. Die Messungen werden automatisch in das Bearbeitungsprogramm KC4 übertragen und können direkt am Computer ausgewertet werden. Für jede MTP wird mit KC4 ein elektronisches Protokoll angefertigt.

Testdurchführung Serum

Die Serumproben müssen vor Durchführung des Tests verdünnt werden. Hierzu werden je 90µl Probenpuffer in die 96 Wells einer Verdünnungsmikrotiterplatte pipettiert. Folgend pipettiert man 10µl der einzelnen Serumproben in die entsprechenden Wells (von G1 bis H12). Die Proben werden anschließend auf dem Plattenvortexer 1 Minute vermischt.

Danach werden je 80µl Probenpuffer in die Wells G1 bis H12 und je 20µl der verdünnten Serumproben aus der Verdünnungsmikrotiterplatte in die entsprechenden Wells der Testplatte pipettiert. In die Wells A1 und B1 werden je 100µl Negativ- und in die Wells C1 und D1 je 100µl der Positivkontrolle pipettiert. Die Testplatte wird 60 min inkubiert.

Die anschließende Testdurchführung entspricht dem Ablauf wie bei den Fleischsaftproben beschrieben wurde.

Auswertung nach Herstellerangaben:

Der Quotient aus OD_{450nm} Probe und OD_{450nm} Positivkontrolle multipliziert mit 100 ergibt x prozentuale Positivität (PP).

Ergebnisse $\geq 15PP$ sind positiv

Ergebnisse $< 15PP$ sind negativ

Validierung des Tests:

Mittlere OD_{450nm} Positivkontrolle $>1,2$

Mittlere prozentuale Positivität $>35\%$

Mittlere OD_{450nm} Negativkontrolle $<0,15$

Trifft dies nicht zu, ist der Test ungültig.

3.3.4. Der *Y. enterocolitica*-ELISA

PIGTYPE® YOPSCREEN

Labor Diagnostik Leipzig

Zur Detektierung von *Yersinia-Outer-Protein*-Antikörpern in Fleischsaft oder Serum.

Das Kit besteht aus folgenden Inhalten:

- Testplatte 96 Well
Verdünnungspuffer
60ml
- Positivkontrolle
gebrauchsfertig, 1,5ml
- Negativkontrolle
gebrauchsfertig, 1,5ml
- Waschpuffer
10x konzentriert, 125ml
- Konjugat
Anti-IgG-HRP, Ziege-anti-Schwein-IgG-Peroxidasekonjugat
Gebrauchsfertig, 12ml
- Chromogen (TMB) Substrat
12ml
- Stopplösung
0,5M Schwefelsäure
Gebrauchsfertig, 12ml

Vor Beginn der Testdurchführung wird der Waschpuffer angesetzt.

Herstellung der Waschpuffergebrauchslösung:

50ml Waschpuffer (10fach) werden zusammen mit 450ml destilliertem Wasser in ein Gefäß gegeben und gut vermischt. Anschließend wird der gebrauchsfertige Waschpuffer in den entsprechenden Behälter des ELx50 Auto Strip Washer überführt.

Testdurchführung Fleischsaft:

Es werden 90µl Probenpuffer in Wells E1 bis H12 pipettiert. Danach erfolgt das Pipettieren von 10µl Fleischsaftprobe direkt in die entsprechenden Wells. Anschließend werden 100µl Negativkontrolle in die Wells A1 und B1 und 100µl Positivkontrolle in die Wells C1 und D1 der Mikrotiterplatte des PIGTYPE® YOPSCREEN pipettiert.

Die Mikrotiterplatte wird im Plattenvortexer 60 Sekunden vermischt und anschließend über 60 Minuten inkubiert. Nach 60 Minuten folgt ein Waschgang entsprechend dem vorprogrammierten Protokolls des ELx50 Auto Strip Washer. Der Waschvorgang besteht aus 4 Waschküchungen, wobei jeweils jedes Well mit 300µl Waschluffer gespült wird.

Anschließend werden 100µl Konjugatgebrauchslösung in jedes Well pipettiert. Die Titerplatte wird folgend 30 Minuten inkubiert.

Es folgt ein weiterer Waschvorgang (siehe oben). Anschließend werden 100µl Substrat (TMB) in jedes Well pipettiert und 10 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Nach 10 Minuten wird 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge wie TMB in jedes Well gegeben und es gibt einen Farbumschlag von blau zu gelb. Nach weiteren 5 Minuten wird die Extinktion wie beim Toxoplasma-ELISA gemessen.

Testdurchführung Serum:

Vor Durchführung des Tests müssen die Serumproben verdünnt werden. Hierzu werden je 90µl Probenpuffer in die 96 Wells einer Verdünnungsmikrotiterplatte pipettiert. Folgend pipettiert man 10µl der einzelnen Serumproben in die entsprechenden Wells (von E1 bis H12). Nach dem Pipettieren werden die Proben auf dem Plattenvortexer vorsichtig 1 Minute vermischt.

Danach werden je 90µl Probenpuffer und 10µl der verdünnten Serumproben in die Wells E1 bis H12 pipettiert. Anschließend werden in die Wells A1 und B1 je 100µl Negativ- und in die Wells C1 und D1 je 100µl der Positivkontrolle pipettiert. Die Testplatte wird 60 min inkubiert.

Die weitere Testdurchführung entspricht dem Ablauf der Fleischsaftproben.

Auswertung nach Herstellerangaben:

Es wird der Mittelwert der OD-Werte der Negativ und der Positivkontrollen berechnet. Anschließend zieht man den OD-Mittelwert der Negativkontrollen jeweils vom OD-Mittelwert der Positivkontrolle und dem OD-Wert der Probe ab. Die so erhaltenen, korrigierten Werte für den OD der Probe und dem OD der Positivkontrolle werden miteinander dividiert und das Ergebnis wird mit 100 multipliziert um die Aktivität der Probe (OD%) zu ermitteln.

$$\text{Aktivität (OD\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{MW OD}_{\text{NK}}}{\text{MW OD}_{\text{PK}} - \text{MW OD}_{\text{NK}}} \times 100$$

Ergebnisse < 10 OD% sind positiv

Ergebnisse ≥ 10 OD% und < 20 OD% sind fraglich

Ergebnisse $\geq 20\%$ sind positiv

Laut Hersteller besteht die Möglichkeit, für spezielle Bestandsbewertungen die Cut-Off-Werte den eigenen Vorstellungen gemäß neu festzulegen. Die Auswertung im Rahmen dieser Arbeit erfolgte nach den oben angegebenen Herstellerangaben.

Validierung des Tests:

Beide OD_{450nm} der Positivkontrolle müssen $\geq 1,3$ sein.

Beide OD_{450nm} der Negativkontrolle müssen $\leq 0,15$ sein.

Trifft dies nicht zu, ist der Test ungültig.

3.3.5 Der *Salmonella*-ELISA

SALMOTYPE® Pig Screen

Labor Diagnostik Leipzig

Zur Detektierung von *Salmonella*-Antikörpern in Fleischsaft oder Serum für LPS-Antigene, deren Auswahl an den dänischen Mix ELISA angelehnt ist. Die in der weiteren Arbeit benutzte Bezeichnung *Salmonella* bezieht sich auf die mit diesem Test-Kit nachweisbaren Serovaren.

Das Kit besteht aus folgenden Inhalten:

- Testplatte 96 Well
Verdünnungspuffer
60ml
- Positivkontrolle
gebrauchsfertig, 1,5ml
- Negativkontrolle
gebrauchsfertig, 1,5ml
- Waschpuffer
10x konzentriert, 125ml
- Konjugat
Anii-IgG-HRP, anti-Schwein-IgG-Meerrettichperoxidasekonjugat
Gebrauchsfertig, 12ml
- Chromogen (TMB) Substrat
12ml
- Stopplösung
0,5M Schwefelsäure
Gebrauchsfertig, 12ml

Vor Beginn der Testdurchführung wird der Waschpuffer angesetzt.

Herstellung und Gebrauch der Waschpufferlösung entsprechen dem des PIGTYPE® YOPSCREEN. Die Testdurchführung Fleischsaft und Serum entspricht dem Verfahren wie zuvor für den PIGTYPE® YOPSCREEN beschrieben wurde.

Auswertung:

Es wird der Mittelwert der OD-Werte der Negativ und der Positivkontrollen berechnet. Anschließend zieht man den OD-Mittelwert der Negativkontrollen jeweils vom OD-

Mittelwert der Positivkontrolle und dem OD-Wert der Probe ab. Die so erhaltenen korrigierten Werte für den OD der Probe und dem OD der Positivkontrolle werden dividiert und das Ergebnis wird mit 100 multipliziert, um die Aktivität der Probe (OD%) zu ermitteln.

$$\text{Aktivität (OD\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{MW OD}_{\text{NK.}}}{\text{MW OD}_{\text{PK}} - \text{MW OD}_{\text{NK.}}} \times 72,1 \text{ OD\%}$$

Ergebnisse < 10 OD% sind positiv

Ergebnisse \geq 10 OD% und < 20 OD% sind fraglich

Ergebnisse \geq 20% sind positiv

Laut Hersteller besteht die Möglichkeit, für spezielle Bestandsbewertungen die Cut-Off-Wert den eigenen Vorstellungen gemäß neu festzulegen. Die Auswertung im Rahmen dieser Arbeit erfolgte nach den oben angegebenen Herstellerangaben.

Validierung des Tests:

Der Mittelwert der OD der Positivkontrolle dividiert durch den Mittelwert OD der Negativkontrolle muss einen Wert größer vier ergeben.

Trifft dies nicht zu, ist der Test ungültig.

3.4. Statistik

3.4.1. Die Datenbearbeitung

Die gewonnenen Daten wurden nach der photometrischen Messung automatisch vom Reader auf den PC übertragen und mittels KC4™ Software in Tabellen übertragen. KC4™ ermöglicht das anschließende exportieren der Daten in Exceltabellen. Mit Hilfe von Microsoft Excel® und KC4™ konnten sämtliche Ergebnisse mit den dazugehörigen Daten in einer Excel-Tabelle zusammengefasst werden.

Diese beinhaltet die einzelnen Bestände (codiert), die Haltungform während der Aufzucht und der Mast, die Ergebnisse OD und OD% und die Bewertung in positiv und negativ (anhand des Hersteller-Cut'off) der Fleischsaft und Serumuntersuchungen für alle drei Erreger. Zudem sind den Proben jeweils die einzelnen Mikrotiterplattennummern zugeordnet, mit denen sie bearbeitet wurden, um die Daten komplett zurückverfolgen zu können.

3.4.2. Statistische Aufarbeitung

Die Bearbeitung der Statistik erfolgte mittels IBM SPSS 20. Die vollständigen Daten wurden automatisch aus der Excel-Datei exportiert und eingelesen. Mittels SPSS 20 erfolgte die Berechnung der Häufigkeiten, Kennzahlen, Seroprävalenzen in den Beständen, den unterschiedlichen Haltungformen und den Regionen. Zudem wurde für jeden Bestand die Verteilung der OD%-Ergebnisse eines jeden Erregers bestimmt und graphisch dargestellt. Anschließend wurden die Ergebnisse, bezogen auf die Haltungformen und Regionen, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Veterinär-Epidemiologie und Biometrie des Fachbereichs Veterinärmedizin der FU Berlin weiter statistisch aufgearbeitet.

Ein Chi-Quadrat-Test wurde genutzt, um zu untersuchen, ob statistisch signifikant unterschiedliche Seroprävalenzen in Abhängigkeit von den Haltungformen vorhanden waren. Hierzu wurden die Betriebe als positiv oder negativ bewertet und je nach Haltungform einer von sechs Gruppen zugeordnet. Diese Gruppen wurden dann mit dem exakten Test nach Fisher miteinander verglichen, um herauszufinden, ob signifikante Unterschiede bestehen. Ein Betrieb wurde als positiv bewertet, sobald ein seropositives Tier nachgewiesen werden konnte.

Um die Seroprävalenzen der Regionen nachvollziehbar miteinander vergleichen zu können, wurde die statistische Betrachtung auf die beiden Gruppen „Alte-“ und „Neue-Bundesländer“ zusammengefasst.

So wurden die Ergebnisse der Einzeltierseroprävalenzen ihrer Herkunft nach der einen oder anderen Gruppe zugeordnet. Auch hier diente der Chi-Quadrat-Test der Ermittlung statistisch

nachvollziehbarer Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Zudem wurden die Odds-Ratios berechnet.

In einem zweiten, ausgelagerten Abschnitt der statistischen Aufbereitung wurde auf Grundlage dieser ELISA-Ergebnisse beim Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) eine TG-ROC-Analyse durchgeführt. Diese dient der Ermittlung des idealen Cut `off für die einzelnen Erreger und Probenmedien. Da diese Analyse nicht dem Standardverfahren zur Berechnung einer TG-ROC mittels mikrobiologischer Daten entspricht, dienen die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Werte dieser TG-ROC nur dazu, beispielhaft gesonderte Fragestellungen und deren Spezifität oder Sensitivität im Rahmen dieser Arbeit zu beantworten. Die vom BfR berechneten TG-ROC Analysen geben somit nicht den seitens des ELISA-Kit Herstellers ermittelten Verlauf der Spezifität und Sensitivität wieder, konnten aber helfen, bestimmte Fragestellungen und Problematiken dieser Arbeit zu veranschaulichen. Es wurden keine Seroprävalenzberechnungen mit den durch das BfR erarbeiteten TG-ROC durchgeführt.

In einem dritten Schritt wurde der Median der Einzeltierergebnisse für jeden Herkunftsbetrieb mittels SPSS berechnet und grafisch dargestellt. Zudem wurde ein Kategorisierungsschlüssel mit Hilfe der TG-ROC-Analysen erstellt, um ein neues Verfahren zur Bewertung der berechneten Mediane anschaulich vorzustellen zu können. Mittels der TG-ROC konnte je nach Fragestellung der Cut`off in Bezug auf die Spezifität und die Sensitivität geändert werden. Diese Werte gingen in den Kategorisierungsschlüssel ein.

4. Ergebnisse

4.1. Häufigkeiten und statistische Kennzahlen

Zur Untersuchung kamen insgesamt 2004 Tiere aus 41 Betrieben. Die Betriebe teilten sich auf 7 Bundesländer auf.

4.1.1. Nachweis von *T. gondii* (Hersteller Cut'off)

Insgesamt standen für die Untersuchung des Fleischsafts Proben von 1977 Tieren zur Verfügung. Davon waren 141 Proben positiv und 1836 Proben negativ. Dies entspricht einer Gesamtprävalenz von 7,1% in den untersuchten Regionen. Insgesamt 1961 Tiere wurden auf *Toxoplasma*-Antikörper im Serum untersucht. Davon waren 189 Tiere positiv, dies entspricht 9,6%. Dem gegenüber stehen 1772 negative Tiere (Tabelle 4.1). Beim Vergleich der Fleischsaft und Serumergebnisse mittels Chi-Quadrat-Test wurde ein $p=0,005$ berechnet, womit ein signifikant höherer Nachweis positiver Tiere mittels Serum erfolgte.

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Untersuchung auf *T. gondii*

	Fleischsaft		Serum	
	Häufigkeit	Prozent	Häufigkeit	Prozent
neg	1836	92,9	1772	90,4
pos	141	7,1	189	9,6
Gesamt	1977	100	1961	100

1911 Tiere konnten sowohl über Fleischsaft als auch über das Serum untersucht werden. Übereinstimmende Ergebnisse aus beiden Probenqualitäten gab es für 1637 negativ und 45 positiv getestete Tiere. Dem gegenüber stehen 140 im Serum positive Reagenten, die mittels Fleischsaft nicht nachgewiesen werden konnten und 89 positive Tiere (Fleischsaft), die im Serum unauffällig blieben. Somit stehen insgesamt 1682 Übereinstimmungen für Serum und Fleischsaft 239 Proben gegenüber, deren Ergebnisse im Fleischsaft von denen des Serums abweichen.

Die OD% der Untersuchung des Fleischsafts variierten dabei von einem Minimum von minus 1,1492% bis zu einem Maximum von 194,48%, bezogen auf die OD% der Herstellerkontrollen. Dabei lagen 75% der Ergebnisse unter 6,8983%. Der Median aller Fleischsaftproben betrug 4,4508%. Von 183 der 2004 Tieren stand keine Fleischsaftprobe zur Untersuchung auf *T. gondii* zur Verfügung (Tabelle.4.2).

Tabelle 4.2: Kennzahlen der OD% aller auf *T. gondii* untersuchten Proben

		Fleischsaft	Serum
N	Gültig	1977	1961
	Fehlend	183	199
Median		4,4508	7,0057
Minimum		-1,1492	0,8159
Maximum		194,48	163,31
		25	4,8789
Perzentile		75	6,8983
			10,152

Bezogen auf die OD% bei den Serumuntersuchungen lag der Median bei 7,0057%. Insgesamt verteilten sich die OD%-Werte hier von einem Minimum von 0,8159% bis zu einem Maximum von 163,31%. 75% aller Serumproben hatten eine OD% unter 10,152%. (Tabelle 4.2).

4.1.2. Nachweis von *Y. enterocolitica* (Hersteller Cut'off)

Mit 66,2% serologisch positiven Proben wies mehr als die Hälfte der untersuchten 1900 Tiere Antikörper gegen *Y. enterocolitica* im Fleischsaft auf. Nur 21,3% der Tiere waren negativ, 12,6% fraglich. Wie bei *T. gondii* konnte auch bei *Y. enterocolitica* mit einem berechneten $p < 0,001$ eine signifikant stärkere Reaktion im Serum nachgewiesen werden. 82,4% der 1937 getesteten Tiere waren mittels Serumproben positiv. Nur 4,9% der untersuchten Serumproben waren eindeutig negativ (Tabelle 4.3).

Es gab 45 negativ, 1127 positiv und 36 fraglich übereinstimmende Proben zwischen den Untersuchungen von Fleischsaft und Serum.

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Untersuchung auf *Y. enterocolitica*

	Fleischsaft		Serum	
	Häufigkeit	Prozent	Häufigkeit	Prozent
neg	404	21,3	94	4,9
pos	1257	66,2	1597	82,4
fraglich	239	12,6	246	12,7
Gesamt	1900	100	1937	100

Tabelle 4.4 zeigt die hohe Prävalenz von *Y. enterocolitica* mit im Vergleich zu *T.gondii* deutlich höheren OD%. Der Median im Fleischsaft betrug für *Y. enterocolitica* 30,2685%. Der Median und die 75 Perzentile der OD% der untersuchten Serumproben lagen mit 48,842 und 68,7315 höher als im Fleischsaft.

Tabelle 4.4: Kennzahlen der OD% aller auf *Y. enterocolitica* untersuchten Proben

		Fleischsaft	Serum
N	Gültig	1900	1937
	Fehlend	260	223
Median		30,2685	48,842
Minimum		-1,22	-1,05
Maximum		98,678	118,41
		25	25,673
Perzentile		75	45,98525
			68,7315

4.1.3. Nachweis von *Salmonella* (Hersteller Cut'off)

193 Tiere und damit 9,6% der untersuchten 2001 Fleischsaftproben wiesen eine OD% von $\geq 20\%$ auf und waren damit als positiv zu bewerten. Dem stehen 76,2% negative und 14,2% fragliche Proben gegenüber. Im Gegensatz zu den Untersuchungen auf *Toxoplasma* und *Yersinia* konnte bei den Ergebnissen der Serumproben auf *Salmonella* keine höhere Prävalenz als im Fleischsaft ermittelt werden. Mit 6% von 1932 Tieren lag der Wert 3,6% unter dem der Fleischsaftuntersuchung. Im Serum waren 87,8% Proben negativ (Tabelle 4.5).

In Fleischsaft und Serum vergleichend waren 1362 Proben negativ. 68 Proben waren in beiden Medien positiv. 21 fragliche Übereinstimmungen konnten gefunden werden. Somit stimmten die Ergebnisse von 1451 der insgesamt 1902 mittels Fleischsaft und Serum untersuchten Proben überein.

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Untersuchung auf *Salmonella*

	Fleischsaft		Serum	
	Häufigkeit	Prozent	Häufigkeit	Prozent
neg	1524	76,2	1697	87,8
pos	193	9,6	115	6
fraglich	284	14,2	120	6,2
Gesamt	2001	100	1932	100

Die OD% der Fleischsaftuntersuchung lagen zwischen -2,747% und 121,584%. Der Median betrug 4,603%. Der Median der OD% der Serumproben lag mit 1,188 unter dem des Fleischsaft. Auch das Maximum und die 75 Perzentil lagen unter den Werten, die für die Fleischsaftuntersuchung ermittelt werden konnten (Tabelle 4.6).

4. Ergebnisse

Tabelle 4.6: Kennzahlen der OD% aller auf *Salmonella* untersuchten Proben

		Fleischsaft	Serum
N	Gültig	2001	1932
	Fehlend	159	228
Median		4,603	1,188
Minimum		-2,747	-3,514
Maximum		121,584	112,395
Perzentile	25	1,528	-0,51725
	75	9,498	4,67425

4.2. Nachweise in den Beständen

Die Ergebnisse der Untersuchungen der einzelnen Erreger wurden auch in Bezug auf die Einzelbetriebe ausgewertet.

4.2.1. Nachweis von *T. gondii* in Fleischsaft und Serum (Hersteller Cut'off)

Tabelle 4.7 stellt eine Auflistung der Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchungen für alle 41 Betriebe dar. Gegenübergestellt sind Serum und Fleischsaft, die Ergebnisse sind in absoluten Zahlen und Prozent bezogen auf den einzelnen Betrieb angegeben.

Tabelle 4.7: Bestandsbezogene Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchungen auf *T. gondii*

Bestand	Serum		Proben je Bestand	Fleischsaft		Proben je Bestand
	neg	pos		neg	pos	
1	91 90,1%	10 9,9%	101	94 96,9%	3 3,1%	97
2	5 100,0%	0 0,0%	5	5 100,0%	0 0,0%	5
3	16 94,1%	1 5,9%	17	16 100,0%	0 0,0%	16
4	77 98,7%	1 1,3%	78	64 97,0%	2 3,0%	66
5	12 92,3%	1 7,7%	13	12 85,7%	2 14,3%	14
6	11 100,0%	0 0,0%	11	10 90,9%	1 9,1%	11
7	31 100,0%	0 0,0%	31	30 96,8%	1 3,2%	31
8	7 100,0%	0 0,0%	7	7 100,0%	0 0,0%	7
9	0 0,0%	15 100,0%	15	0 0,0%	15 100,0%	15
10	19 100,0%	0 0,0%	19	19 100,0%	0 0,0%	19
11	113 97,4%	3 2,6%	116	111 99,1%	1 0,9%	112
12	26 76,5%	8 23,5%	34	34 100,0%	0 0,0%	34
13	16 100,0%	0 0,0%	16	16 100,0%	0 0,0%	16
14	15 100,0%	0 0,0%	15	15 100,0%	0 0,0%	15
15	23 100,0%	0 0,0%	23	23 100,0%	0 0,0%	23
16	112 98,2%	2 1,8%	114	107 97,3%	3 2,7%	110
17	49 87,5%	7 12,5%	56	49 89,1%	6 10,9%	55

4. Ergebnisse

Fortsetzung der Tabelle 4.7: Bestandsbezogene Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchungen auf *T. gondii*

Bestand	Serum		Proben je Bestand	Fleischsaft		Proben je Bestand
	neg	pos		neg	pos	
18	66 81,5%	15 18,5%	81	63 75,0%	21 25,0%	84
19	140 87,5%	20 12,5%	160	145 90,6%	15 9,4%	160
20	17 77,3%	5 22,7%	22	21 95,5%	1 4,5%	22
21	51 79,7%	13 20,3%	64	67 95,7%	3 4,3%	70
22	70 100,0%	0 0,0%	70	70 98,6%	1 1,4%	71
23	2 100,0%	0 0,0%	2	2 100,0%	0 0,0%	2
24	86 88,7%	11 11,3%	97	91 91,9%	8 8,1%	99
25	147 88,0%	20 12,0%	167	164 95,3%	8 4,7%	172
26	21 95,5%	1 4,5%	22	20 95,2%	1 4,8%	21
27	173 91,5%	16 8,5%	189	194 98,5%	3 1,5%	197
28	127 96,9%	4 3,1%	131	132 97,8%	3 2,2%	135
29	16 84,2%	3 15,8%	19	19 100,0%	0 0,0%	19
30	28 60,9%	18 39,1%	46	38 79,2%	10 20,8%	48
31	3 100,0%	0 0,0%	3	3 100,0%	0 0,0%	3
32	19 86,4%	3 13,6%	22	24 100,0%	0 0,0%	24
33	30 96,8%	1 3,2%	31	31 100,0%	0 0,0%	31
34	37 90,2%	4 9,8%	41	40 95,2%	2 4,8%	42
35	22 100,0%	0 0,0%	22	22 100,0%	0 0,0%	22

4. Ergebnisse

Fortsetzung der Tabelle 4.7: Bestandsbezogene Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchungen auf *T. gondii*

Bestand	Serum		Proben je Bestand	Fleischsaft		Proben je Bestand
	neg	pos		neg	pos	
36	4 80,0%	1 20,0%	5	5 100,0%	0 0,0%	5
37	5 100,0%	0 0,0%	5	6 100,0%	0 0,0%	6
38	25 100,0%	0 0,0%	25	19 73,1%	7 26,9%	26
39	30 93,8%	2 6,3%	32	16 50,0%	16 50,0%	32
40	6 100,0%	0 0,0%	6	3 50,0%	3 50,0%	6
41	9 100,0%	0 0,0%	9	5 55,6%	4 44,4%	9
Gesamt	1757 90,5%	185 9,5%	1942	1812 92,8%	140 7,2%	1952

Es wurden folgende Aussagen getroffen:

- 19 Betriebe wurden positiv bewertet (mindestens 1 positives Tier in Serum und Fleischsaft),
- 6 Betriebe wurden mittels Serum positiv bewertet, mittels Fleischsaft negativ (mindestens 1 positives Tier im Serum),
- 6 Betriebe wurden mittels Fleischsaft positiv bewertet und mittels Serum negativ (mindestens 1 positives Tier im Fleischsaft),
- in 10 Betrieben konnten übereinstimmend kein positives Tiere in Serum und Fleischsaft gefunden werden. Diese galten als negativ.

Die höchste Prävalenz mit 100% im Serum positiv getesteten Tieren hatte Betrieb 9. Das Probenvolumen war mit N=15 allerdings gering. Das Ergebnis konnte im Fleischsaft mit ebenfalls 15 positiven Reagenten bestätigt werden.

4. Ergebnisse

4.2.2 Nachweis von *Y. enterocolitica* in Fleischsaft und Serum (Hersteller Cut'off)

In Tabelle 4.8 sind die Häufigkeiten der positiven, negativen und fraglichen Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchung für jeden der 41 Betriebe einzeln gegenübergestellt.

Tabelle 4.8: Bestandsbezogene Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchungen auf *Y. enterocolitica*

Bestand	Serum			Proben je Bestand	Fleischsaft			Proben je Bestand
	neg	pos	fraglich		neg	pos	fraglich	
1	0 0,0%	95 94,1%	6 5,9%	101	6 6,2%	68 70,1%	23 23,7%	97
2	0 0,0%	5 100,0%	0 0,0%	5	0 0,0%	4 80,0%	1 20,0%	5
3	0 0,0%	17 100,0%	0 0,0%	17	14 82,4%	2 11,8%	1 5,9%	17
4	5 6,4%	38 48,7%	35 44,9%	78	64 90,1%	3 4,2%	4 5,6%	71
5	0 0,0%	12 92,3%	1 7,7%	13	2 14,3%	10 71,4%	2 14,3%	14
6	6 54,5%	4 36,4%	1 9,1%	11	8 72,7%	2 18,2%	1 9,1%	11
7	2 6,5%	26 83,9%	3 9,7%	31	1 3,2%	25 80,6%	5 16,1%	31
8	0 0,0%	6 85,7%	1 14,3%	7	1 14,3%	4 57,1%	2 28,6%	7
9	2 13,3%	12 80,0%	1 6,7%	15	6 40,0%	8 53,3%	1 6,7%	15
10	3 15,8%	15 78,9%	1 5,3%	19	6 31,6%	11 57,9%	2 10,5%	19
11	22 19,0%	48 41,4%	46 39,7%	116	90 80,4%	11 9,8%	11 9,8%	112
12	0 0,0%	34 100,0%	0 0,0%	34	0 0,0%	33 97,1%	1 2,9%	34
13	0 0,0%	16 100,0%	0 0,0%	16	2 12,5%	12 75,0%	2 12,5%	16
14	0 0,0%	13 86,7%	2 13,3%	15	6 40,0%	8 53,3%	1 6,7%	15
15	1 4,3%	14 60,9%	8 34,8%	23	22 95,7%	1 4,3%	0 0,0%	23
16	0 0,0%	113 99,1%	1 ,9%	114	8 7,1%	97 86,6%	7 6,3%	112
17	3 5,4%	51 91,1%	2 3,6%	56	4 7,3%	38 69,1%	13 23,6%	55
18	6 8,3%	35 48,6%	31 43,1%	72	43 55,8%	13 16,9%	21 27,3%	77
19	5 3,2%	147 93,0%	6 3,8%	158	7 4,7%	122 81,9%	20 13,4%	149
20	0 0,0%	22 100,0%	0 0,0%	22	1 4,5%	12 54,5%	9 40,9%	22
21	1 1,5%	55 84,6%	9 13,8%	65	1 1,5%	58 85,3%	9 13,2%	68

4. Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 4.8: Bestandsbezogene Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchungen auf *Y. enterocolitica*

Bestand	Serum			Proben je Bestand	Fleischsaft			Proben je Bestand
	neg	pos	fraglich		neg	pos	fraglich	
22	1 1,4%	57 81,4%	12 17,1%	70	13 18,8%	53 76,8%	3 4,3%	69
23	0 0,0%	2 100,0%	0 0,0%	2	1 50,0%	1 50,0%	0 0,0%	2
24	0 0,0%	92 96,8%	3 3,2%	95	3 3,0%	89 89,9%	7 7,1%	99
25	2 1,2%	164 98,2%	1 0,6%	167	1 0,6%	166 96,5%	5 2,9%	172
26	0 0,0%	22 100,0%	0 0,0%	22	0 0,0%	20 95,2%	1 4,8%	21
27	3 1,6%	183 97,3%	2 1,1%	188	7 4,0%	157 88,7%	13 7,3%	177
28	24 19,8%	42 34,7%	55 45,5%	121	72 52,9%	32 23,5%	32 23,5%	136
29	0 0,0%	19 100,0%	0 0,0%	19	0 0,0%	11 91,7%	1 8,3%	12
30	0 0,0%	45 97,8%	1 2,2%	46	0 0,0%	22 91,7%	2 8,3%	24
31	0 0,0%	3 100,0%	0 0,0%	3	0 0,0%	3 100,0%	0 0,0%	3
32	0 0,0%	19 86,4%	3 13,6%	22	0 0,0%	8 53,3%	7 46,7%	15
33	0 0,0%	30 96,8%	1 3,2%	31	0 0,0%	27 87,1%	4 12,9%	31
34	0 0,0%	40 97,6%	1 2,4%	41	1 2,4%	30 71,4%	11 26,2%	42
35	1 4,5%	21 95,5%	0 0,0%	22	1 4,5%	18 81,8%	3 13,6%	22
36	1 20,0%	1 20,0%	3 60,0%	5	1 20,0%	2 40,0%	2 40,0%	5
37	1 20,0%	4 80,0%	0 0,0%	5	0 0,0%	6 100,0%	0 0,0%	6
38	3 12,0%	21 84,0%	1 4,0%	25	1 3,8%	22 84,6%	3 11,5%	26
39	1 3,1%	27 84,4%	4 12,5%	32	0 0,0%	29 90,6%	3 9,4%	32
40	0 0,0%	2 33,3%	4 66,7%	6	3 50,0%	2 33,3%	1 16,7%	6
41	1 11,1%	8 88,9%	0 0,0%	9	0 0,0%	8 88,9%	1 11,1%	9
Gesamt	94 4,9%	1580 82,3%	245 12,8%	1919	396 21,1%	1248 66,4%	235 12,5%	1879

Es ergaben sich folgende Aussagen:

- Alle 41 Betriebe wurden als positiv bewertet (mindestens 1 positives Tier in Fleischsaft und Serum),
- die Anzahl positiv getesteter Tiere je Bestand war durchweg hoch,
- in 9 Betrieben wurden mittels Serum alle Tiere positiv getestet,
- in 2 Betrieben wurden mittels Fleischsaft alle Tiere positiv getestet,
- in einem Betrieb waren sowohl im Serum als auch im Fleischsaft alle Tiere positiv.

Die größte Diskrepanz zwischen Serum und Fleischsaft fand sich in Betrieb Nummer 3. Basierend auf der Untersuchung des Serums waren alle Tiere, mittels Fleischsaft nur 11,8% positiv für den Erreger.

4. Ergebnisse

4.2.3 Nachweis von *Salmonella* in Fleischsaft und Serum (Hersteller Cut'off)

Tabelle 4.9 gibt die Häufigkeiten der positiven, negativen und fraglichen Ergebnisse der 41 Betriebe wieder.

Tabelle 4.9: Bestandsbezogene Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchungen auf *Salmonella*

Bestand	Serum			Proben je Bestand	Fleischsaft			Proben je Bestand
	neg	pos	fraglich		neg	pos	fraglich	
1	89 88,1%	3 3,0%	9 8,9%	101	86 85,1%	6 5,9%	9 8,9%	101
2	3 60,0%	1 20,0%	1 20,0%	5	4 80,0%	0 0,0%	1 20,0%	5
3	10 58,8%	2 11,8%	5 29,4%	17	16 94,1%	1 5,9%	0 0,0%	17
4	76 97,4%	0 0,0%	2 2,6%	78	77 96,3%	1 1,3%	2 2,5%	80
5	13 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	13	14 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	14
6	11 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	11	11 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	11
7	31 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	31	28 90,3%	1 3,2%	2 6,5%	31
8	7 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	7	7 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	7
9	13 86,7%	0 0,0%	2 13,3%	15	9 60,0%	1 6,7%	5 33,3%	15
10	11 57,9%	4 21,1%	4 21,1%	19	11 57,9%	3 15,8%	5 26,3%	19
11	79 68,1%	20 17,2%	17 14,7%	116	62 53,9%	27 23,5%	26 22,6%	115
12	0 0,0%	33 97,1%	1 2,9%	34	0 0,0%	33 97,1%	1 2,9%	34
13	4 25,0%	11 68,8%	1 6,3%	16	3 18,8%	10 62,5%	3 18,8%	16
14	15 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	15	14 93,3%	0 0,0%	1 6,7%	15
15	22 95,7%	0 0,0%	1 4,3%	23	23 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	23
16	101 88,6%	3 2,6%	10 8,8%	114	65 72,2%	9 10,0%	16 17,8%	90
17	56 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	56	52 92,9%	0 0,0%	4 7,1%	56
18	81 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	81	74 87,1%	0 0,0%	11 12,9%	85
19	150 93,8%	2 1,3%	8 5,0%	160	133 81,1%	7 4,3%	24 14,6%	164
20	17 77,3%	1 4,5%	4 18,2%	22	21 95,5%	0 0,0%	1 4,5%	22
21	61 93,8%	2 3,1%	2 3,1%	65	64 90,1%	3 4,2%	4 5,6%	71

4. Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 4.9, Bestandsbezogene Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchungen auf *Salmonella*

Bestand	Serum			Proben je Bestand	Fleischsaft			Proben je Bestand
	neg	pos	fraglich		neg	pos	fraglich	
22	67 97,1%	0 0,0%	2 2,9%	69	60 81,1%	5 6,8%	9 12,2%	74
23	2 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	2	2 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	2
24	87 89,7%	4 4,1%	6 6,2%	97	80 80,0%	6 6,0%	14 14,0%	100
25	147 93,6%	3 1,9%	7 4,5%	157	127 73,8%	11 6,4%	34 19,8%	172
26	20 90,9%	2 9,1%	0 0,0%	22	15 71,4%	5 23,8%	1 4,8%	21
27	153 88,4%	5 2,9%	15 8,7%	173	138 68,7%	26 12,9%	37 18,4%	201
28	128 97,7%	1 0,8%	2 1,5%	131	123 89,1%	1 0,7%	14 10,1%	138
29	17 89,5%	0 0,0%	2 10,5%	19	18 94,7%	1 5,3%	0 0,0%	19
30	19 41,3%	13 28,3%	14 30,4%	46	17 34,7%	20 40,8%	12 24,5%	49
31	3 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	3	3 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	3
32	19 86,4%	2 9,1%	1 4,5%	22	14 58,3%	5 20,8%	5 20,8%	24
33	28 90,3%	2 6,5%	1 3,2%	31	28 90,3%	0 0,0%	3 9,7%	31
34	41 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	41	37 88,1%	0 0,0%	5 11,9%	42
35	22 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	22	18 81,8%	0 0,0%	4 18,2%	22
36	5 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	5	4 80,0%	1 20,0%	0 0,0%	5
37	5 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	5	1 16,7%	3 50,0%	2 33,3%	6
38	25 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	25	18 69,2%	0 0,0%	8 30,8%	26
39	30 93,8%	0 0,0%	2 6,3%	32	18 56,3%	1 3,1%	13 40,6%	32
40	6 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	6	3 50,0%	1 16,7%	2 33,3%	6
41	8 88,9%	0 0,0%	1 11,1%	9	5 55,6%	1 11,1%	3 33,3%	9
Gesamt	1682 87,8%	114 5,9%	120 6,3%	1916	1503 76,2%	189 9,6%	281 14,2%	1973

Es konnten folgende Aussagen getroffen werden:

- 16 Betriebe wurden als *Salmonella* positiv eingestuft (mindestens 1 positives Tier in Fleischsaft und Serum),
- 12 Betriebe waren übereinstimmend *Salmonella* negativ in beiden Probenmedien.

Tabelle 4.10 gibt die Anzahl der Betriebe kategorisiert nach der Schweine-Salmonellen-Verordnung wieder. Zusätzlich wurden für die genauere Darstellung in der Tabelle die Betriebe zusätzlich in selbst gewählte *Salmonella*-Seroprävalenzbereiche unterteilt.

Nach Untersuchung des Fleischsafts gehörten 8 Betriebe mit über 20% positiven Schlachtkörpern in die Kategorien 2 oder 3 der Schweine-Salmonellen-Verordnung. Davon hatten 4 Betriebe über 40% positive Tiere (Kategorie 3). Bei alleiniger Untersuchung des Serums würden 2 dieser Betriebe aus der Kategorie 3 in Kategorie 2 eingeordnet werden, da ihre Seroprävalenz im Gegensatz zur Fleischsaftuntersuchung unter 40% lag. Dies verdeutlicht, dass das Ergebnis des ELISA und damit die Kategorisierung der Betriebe vom Probenmaterial abhängig sind, wobei beide Matrices im Rahmen der Schweine-Salmonellen-Verordnung zugelassen sind.

Tabelle 4.10: Anzahl der Betriebe mit bestimmten *Salmonella* Seroprävalenzen

<i>Salmonella</i> - Prävalenzbereich	Anzahl Betriebe Fleischsaft	Anzahl Betriebe Serum	Kategorie nach Schw- SalmoV
negativ	15	22	1
>0 und <20%	18	14	1
>20 und <40%	4	3	2
>40 und <80%	3	1	3
>80%	1	1	3

4.2.4. *T. gondii* in den Beständen unabhängig vom Hersteller Cut'off

Um auch optisch zu erkennen, wie deutlich negativ oder positiv sich die einzelnen Werte darstellten, wurden die Ergebnisse der OD% aller Tiere ohne Berücksichtigung des Hersteller Cut'off für jeden Betrieb graphisch dargestellt (Abbildung 4.1. Serum und Abbildung 4.2. Fleischsaft). Auf der x-Achse sind die Betriebe aufgetragen, die y-Achse beschreibt die OD% (die y-Achse ist exponentiell aufgetragen). Jeder Kreis steht für das Ergebnis einer Probe. Die Verteilung der Ergebnisse ist in beiden Abbildungen ähnlich. Die Mehrzahl der Proben konzentriert sich in dem Bereich unter 10 OD% und damit deutlich unter dem Hersteller Cut'off von OD 15%.

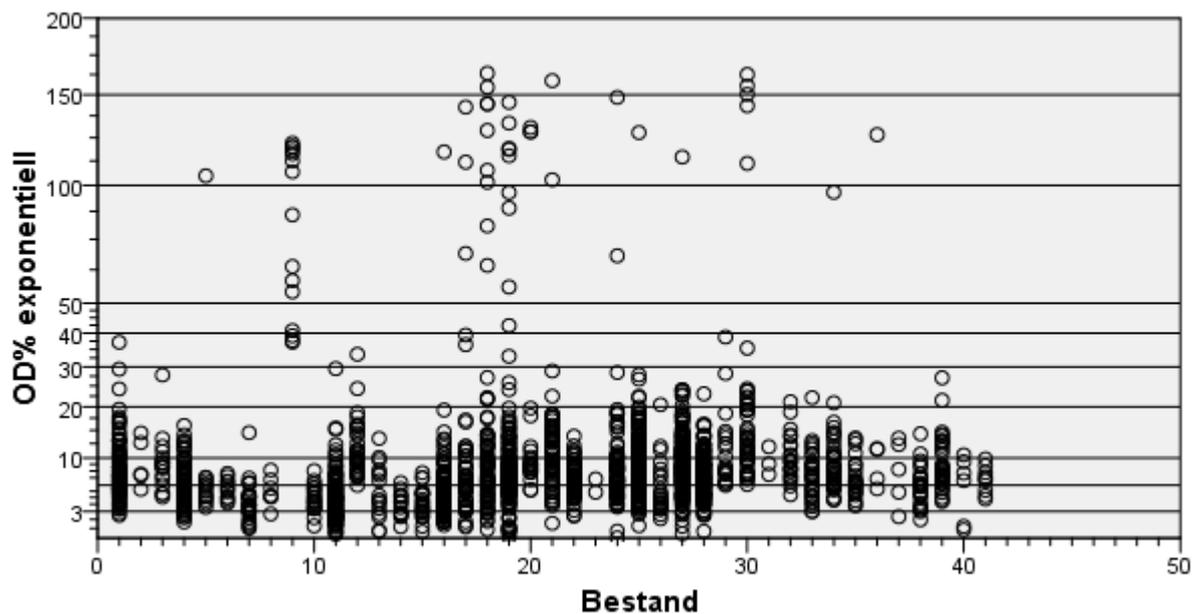


Abbildung 4.1.: OD% der Serumproben für *T. gondii*, einzeln für jeden Betrieb

4. Ergebnisse

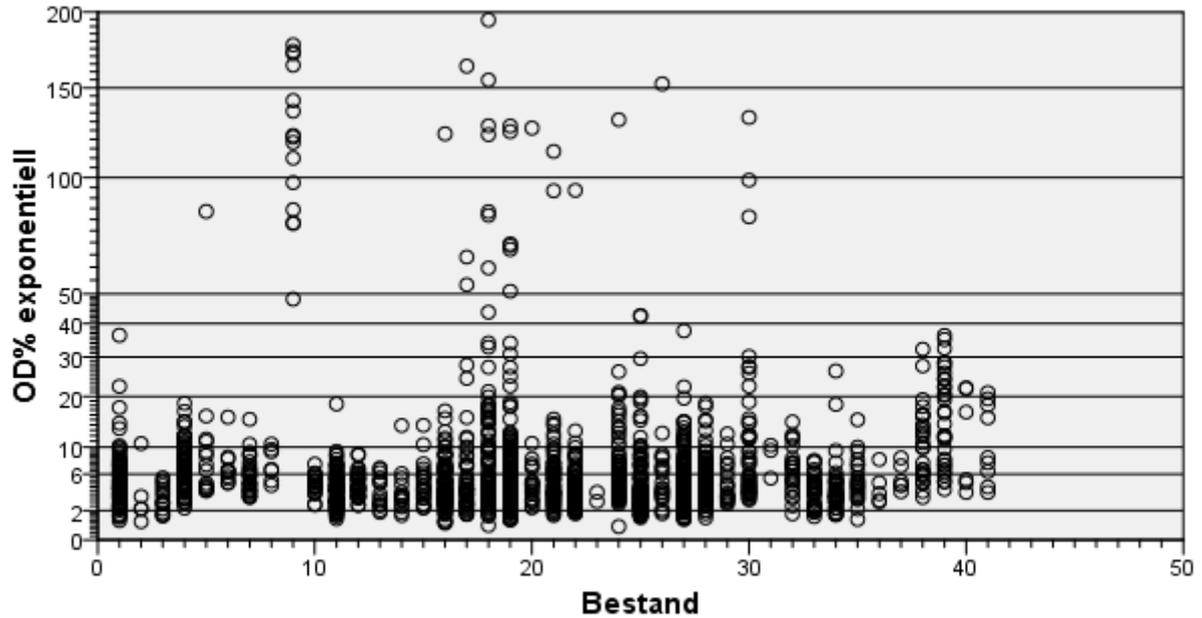


Abbildung 4.2.: OD% der Fleischsaftproben für *T. gondii*, einzeln für jeden Betrieb

Zusätzlich wurde der Median der dargestellten OD%-Ergebnisse für jeden Betrieb einzeln berechnet und die Serum- und Fleischsaftwerte graphisch dargestellt (Abbildungen 4.3. und 4.4.). Auf der x-Achse wurden die Bestände, auf der y-Achse die OD%-Werte aufgetragen. Hier ist die y-Achse linear.

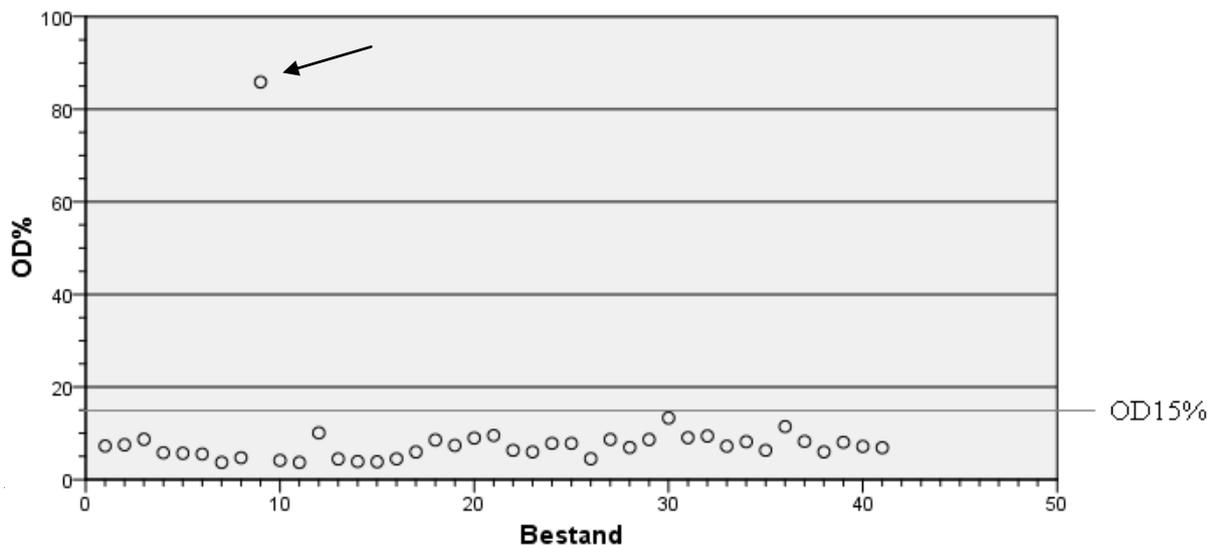


Abbildung 4.3.: Graphische Darstellung des Medians der OD% der Serumproben, für jeden Betrieb

4. Ergebnisse

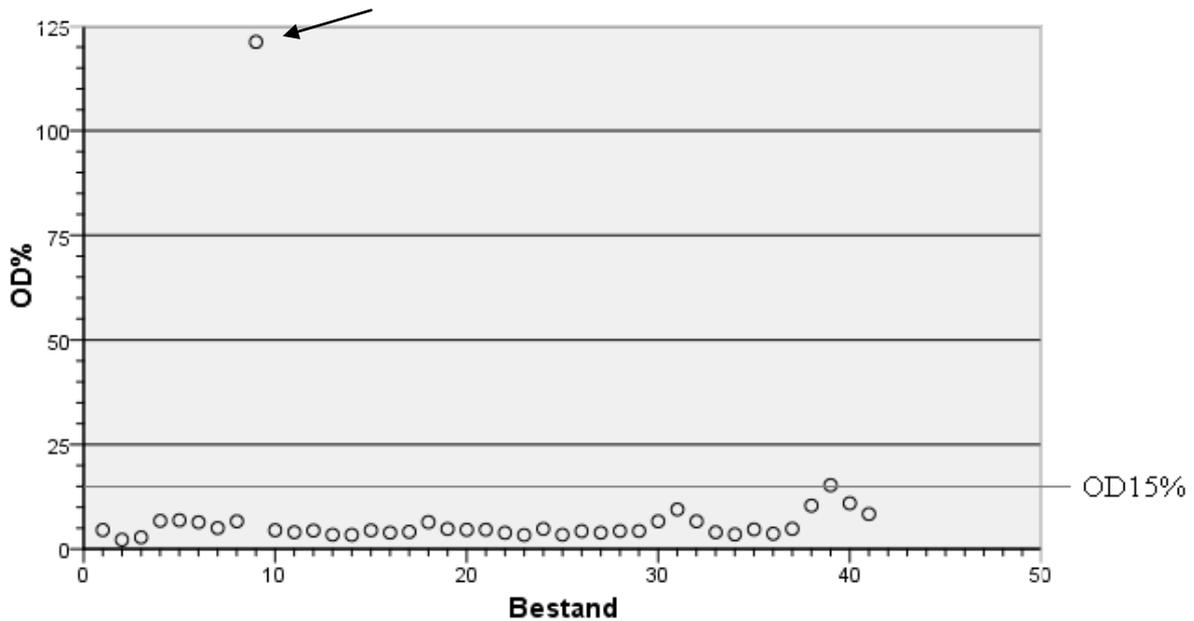


Abbildung 4.4.: Graphische Darstellung des Medians der OD% der Fleischsaftproben, für jeden Betrieb

In beiden Abbildungen bestätigt sich, dass der Betrieb 9 als positiv zu bewerten ist (Pfeil). Der Betrieb 30 tangiert den Cut 'off bei den Serumproben, die Fleischsaftwerte liegen darunter. Betrieb 39 muss nach Untersuchung des Fleischsafts positiv, nach Untersuchung des Serums als negativ bewertet werden. Insgesamt liegen die Ergebnisse im Serum dichter am Hersteller Cut 'off, als bei der Fleischsaftuntersuchung.

4.2.5. *Y. enterocolitica* in den Beständen unabhängig vom Hersteller Cut'off

In Abbildung 4.5. und 4.6. sind die Ergebnisse der OD%-Werte der Einzelproben für jeden Bestand dargestellt. Auch hier ist die y-Achse exponentiell aufgetragen. Aus Abbildung 4.5. läßt sich die Verteilungen der OD% im Serum ablesen. Es wird deutlich, dass die Mehrzahl der Proben oberhalb des Hersteller Cut'off (OD% $\geq 20\%$.) liegen. Insgesamt gibt es eine große Streuung der Ergebnisse. Gleiches gilt für Abbildung 4.6. mit den Ergebnissen des Fleischsaft-ELISA. Die Ergebnisse liegen jedoch etwas tiefer als beim Serum-ELISA.

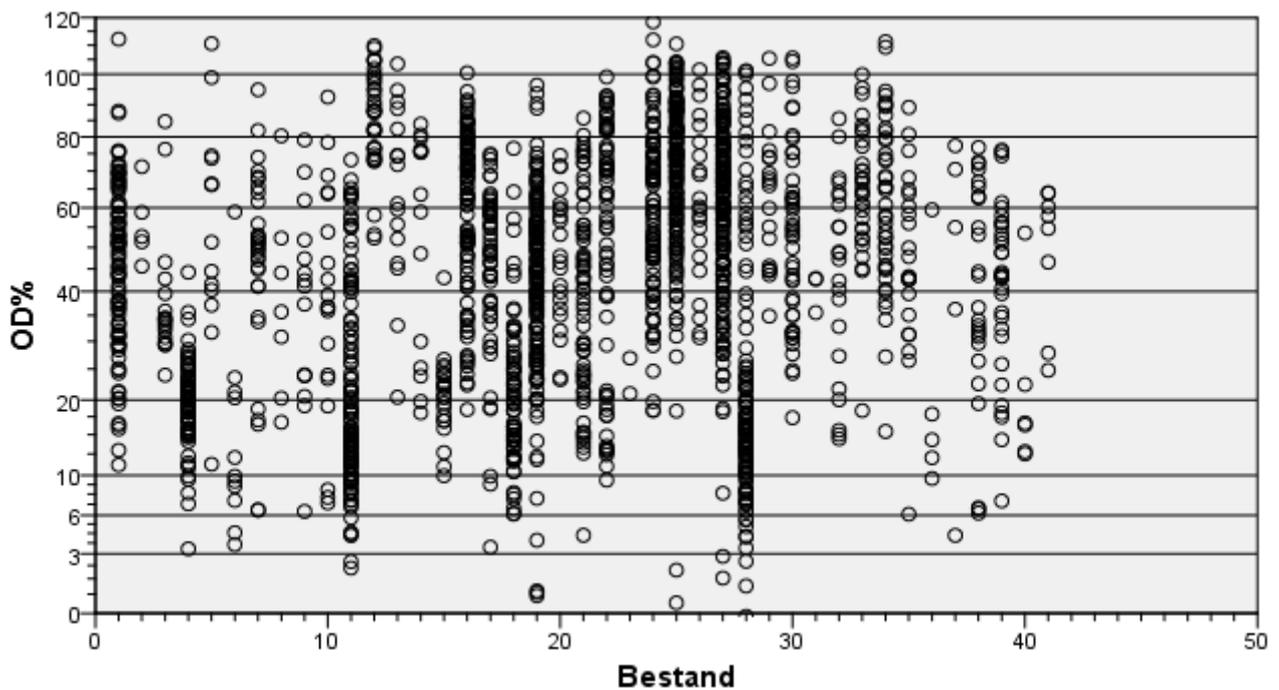


Abbildung 4.5.: OD% der Serumproben für *Y. enterocolitica*, einzeln für jeden Betrieb

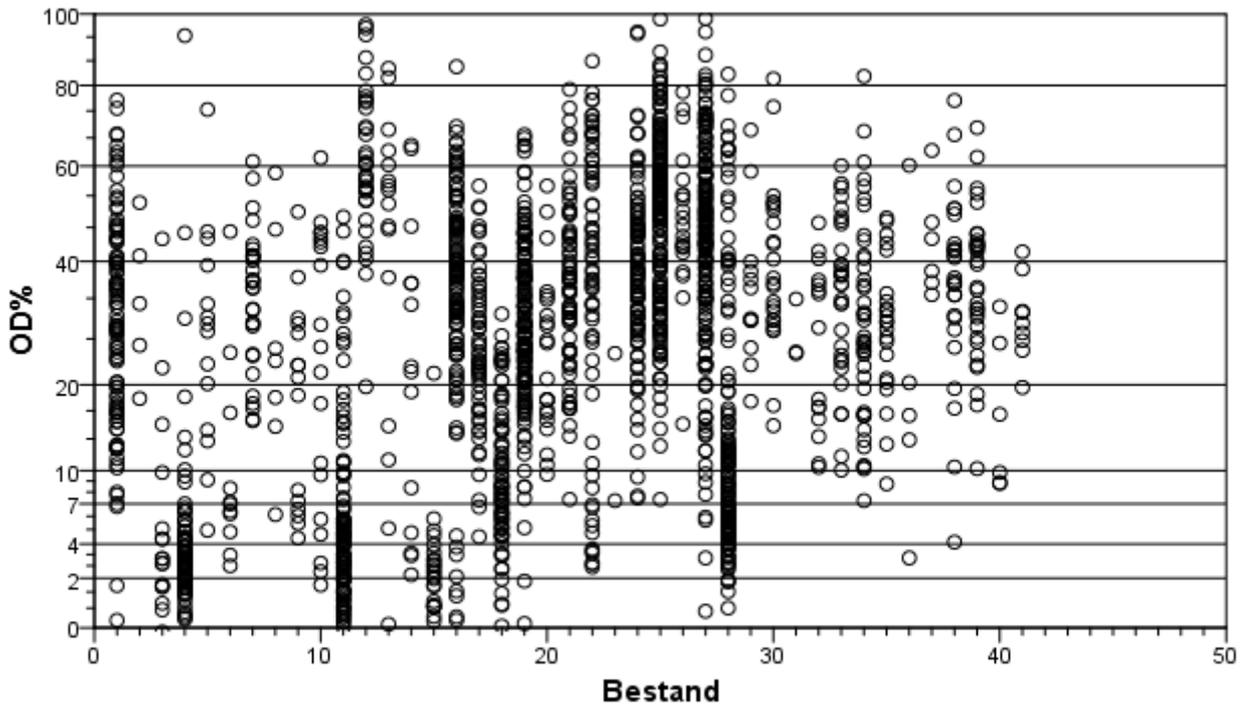


Abbildung 4.6.: OD% der Fleischsaftproben für *Y. enterocolitica*, einzeln für jeden Betrieb

Zur Bestandsbewertung wurde auch der Median der OD%-Werte berechnet und die Serum- und Fleischsaftuntersuchung graphisch dargestellt (Abb. 4.7. und Abb. 4.8.). Die OD% wurden linear auf der y-Achse aufgetragen.

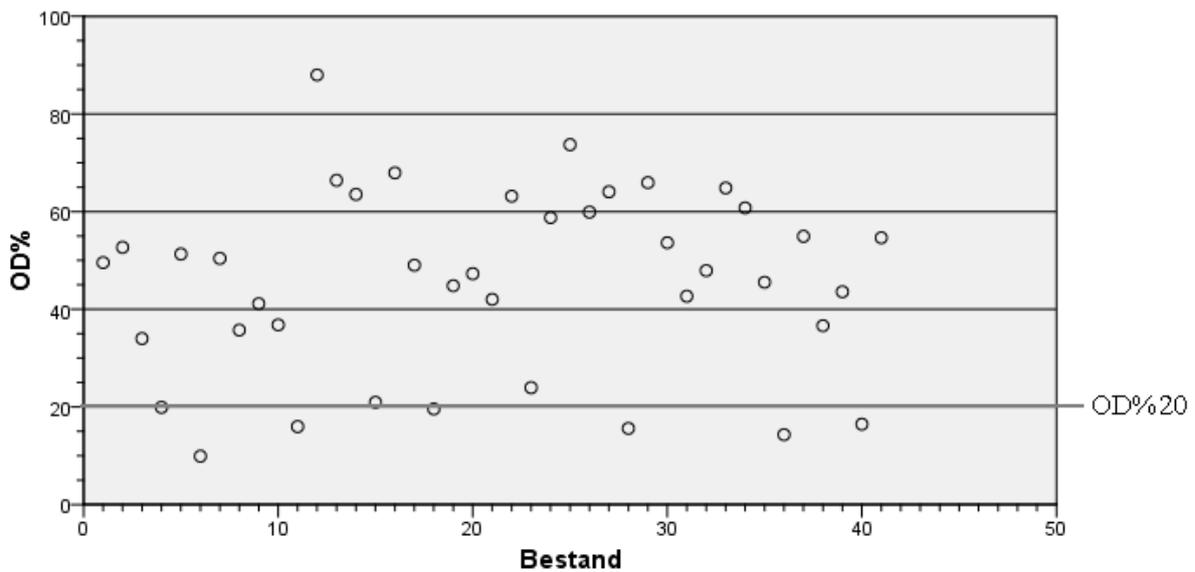


Abbildung 4.7.: Graphische Darstellung des Median der OD% der Serumproben für jeden Betrieb

4. Ergebnisse

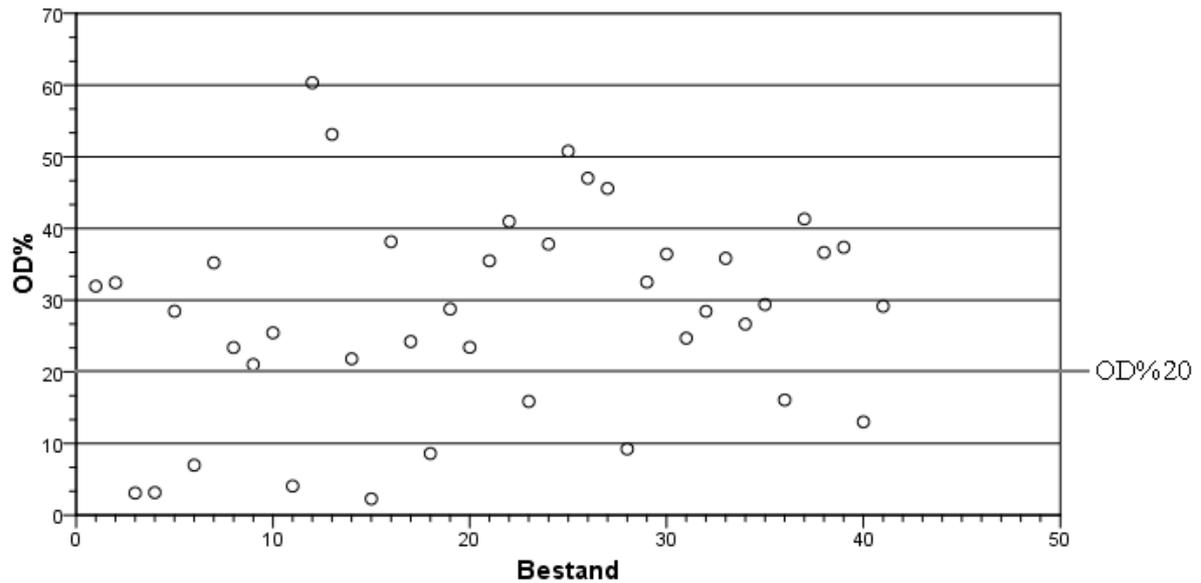


Abbildung 4.8.: Graphische Darstellung des Median der OD% der Fleischsaftproben für jeden Betrieb

Unter Berücksichtigung lediglich des Medians aller OD% eines Betriebes sind mittels Serumproben 7 Betriebe als negativ oder fraglich, mittels Fleischsaft 7 Betriebe als negativ und als 3 fraglich zu beurteilen. Das Maximum im Serum lag bei 90 OD%, im Fleischsaft bei 60 OD%, beide für den Betrieb Nummer 12.

4.2.6. *Salmonella* in den Beständen unabhängig vom Hersteller Cut 'off

Bei der graphischen Darstellung der OD% der Einzelergebnisse je Bestand (Abbildungen 4.9. und 4.10) war die Mehrzahl der Proben unterhalb des Hersteller Cut 'off einzuordnen. Das Verteilungsmuster der Ergebnisse ist in beiden Abbildungen ähnlich. Nur wenige Proben kummulieren um den Hersteller Cut 'off. Die y-Achse ist erneut exponentiell aufgetragen.

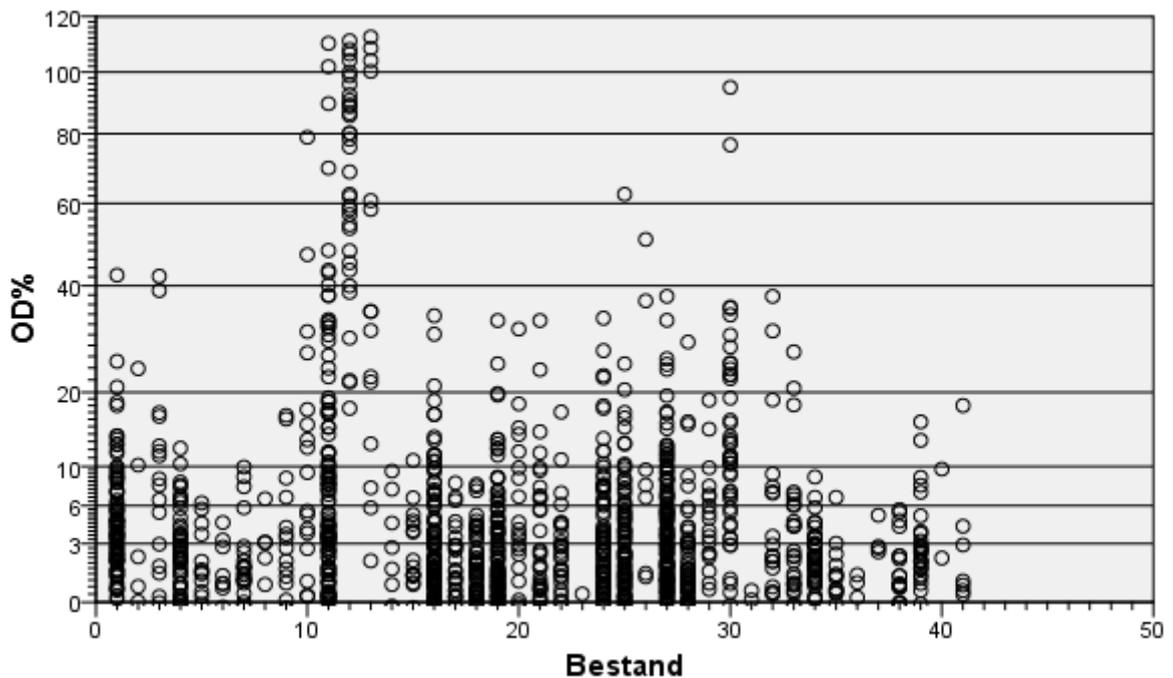


Abbildung 4.9.: OD% der Serumproben für *Salmonella*, einzeln für jeden Betrieb

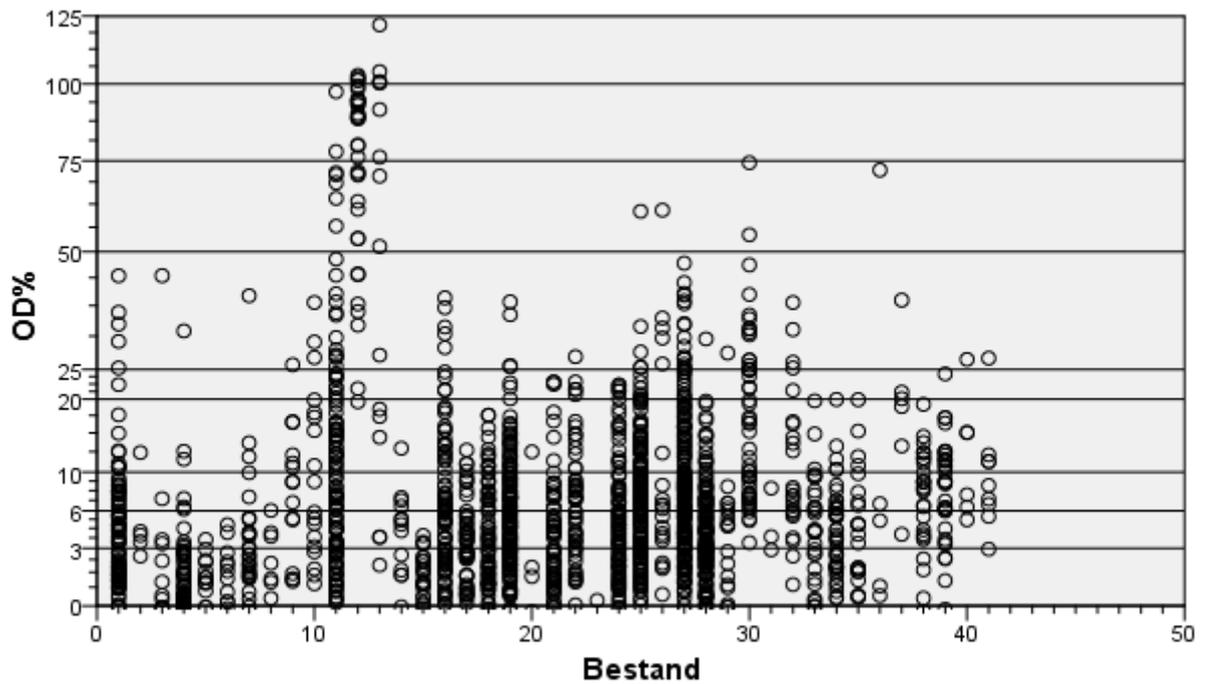


Abbildung 4.10.: OD% der Fleischsaftproben für *Salmonella*, einzeln für jeden Betrieb

Der Median aller OD% für jeden einzelnen Betrieb (Serum und Fleischsaft) zeigt, dass 2 Betriebe deutlich positiv sind. Die OD% der meisten positiven Proben lagen nur knapp oberhalb des Hersteller Cut off's (Abbildungen 4.11. und 4.12.). Die OD% auf der y-Achse sind exponentiell aufgetragen.

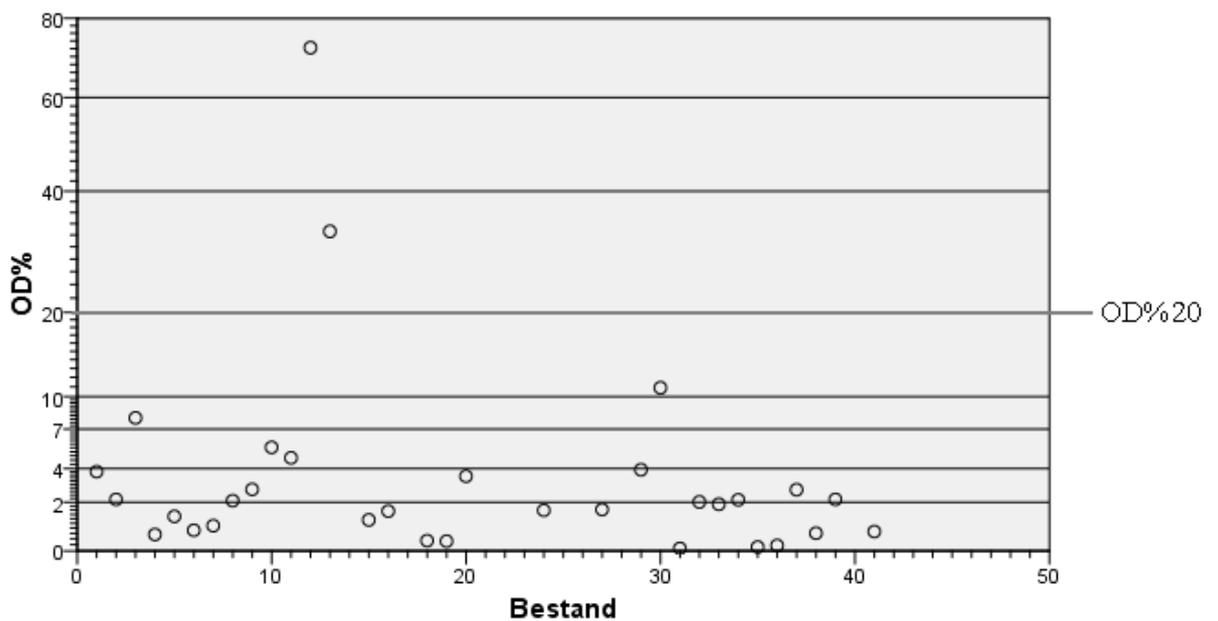


Abbildung 4.11.: Graphische Darstellung des Median der OD% der Serumproben für jeden Betrieb

4. Ergebnisse

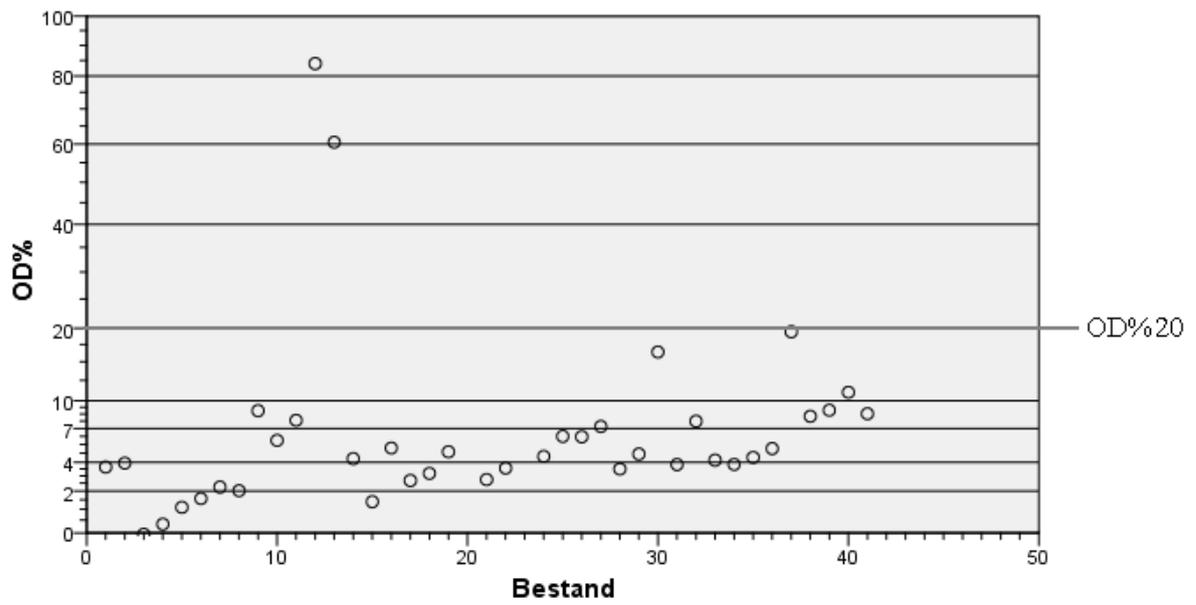


Abbildung 4.12.: Graphische Darstellung des Median der OD% der Fleischsaftproben für jeden Betrieb

4.3. Einzelnachweise bezogen auf die Region (Hersteller Cut´off)

Die 41 untersuchten Betriebe verteilten sich auf 7 Bundesländer (Tabelle 4.11). 19 Serum- bzw. 25 Fleischsaftproben konnten keiner Region zugeordnet werden, wurden jedoch trotzdem auf den Erreger untersucht.

Tabelle 4.11: Verteilung der Proben auf die Bundesländer

Region	Bestände	Tiere Gesamt
Brandenburg	5	222
Meckl.Vorp.	5	204
Niedersachsen	23	1278
NRW	5	78
Sachsen	1	116
Sachsen Anhalt	1	6
Schlesw.-H.	1	100
Gesamt	41	2004

Es bleibt festzuhalten, dass es sich bei den Regionen um künstlich gezogene Ländergrenzen und nicht um geografische Aufteilungen handelt. Äußere Faktoren wie zum Beispiel klimatische Bedingungen variieren allerdings innerhalb einzelner Bundesländer stark. Um einen regionalen Vergleich statistisch nachvollziehbar zu gestalten, wurden die Bundesländer den zwei Gruppen Alte und Neue Bundesländer zugeordnet. Mittels Chi-Quadrat-Test wurde überprüft, ob signifikante Unterschiede bei den Seroprävalenzen vorhanden waren. Über die Berechnungen der Odds ratio wurde ermittelt, um wie viel höher die Wahrscheinlichkeit liegt, dass ein Tier in den Alten oder Neuen Bundesländern seropositiv auf den jeweiligen Erreger ist.

4.3.1 Nachweis von *T. gondii* bezogen auf die Bundesländer in Serum und Fleischsaft

Lediglich in Sachsen-Anhalt wurden alle Tiere negativ getestet. Die Ergebnisse von Serum und Fleischsaft stimmten für dieses Bundesland überein. Das Probenaufkommen ist mit 5 im Serum und 6 im Fleischsaft jedoch keinesfalls repräsentativ. Nordrhein Westfalen war die Region mit den meisten positiven Nachweisen im Verhältnis zur Probenzahl innerhalb der Region. In Serum und Fleischsaft waren über 20% der Tiere positiv. Niedersachsen ist mit 133 positiven Serum und 104 positiven Fleischsaftproben das Bundesland mit der Anzahl der

4. Ergebnisse

meisten positiven Reagente. Dieses Bundesland lieferte allerdings das mit Abstand höchste Probenaufkommen.

In der Tabelle 4.12 sind die positiven und negativen Nachweise der Untersuchung auf *T. gondii* für jede Region aufgeführt. Zusätzlich sind hier die Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchung gegenübergestellt. Neben den absoluten Zahlen sind die relativen Zahlen innerhalb der Region und bezogen auf das gesamte Probenvolumen aufgeführt.

Tabelle 4.12: Ergebnisse der Serum und Fleischsaftuntersuchung auf *T.gondii* bezogen auf die Region in relativen und absoluten Zahlen

Region		Serum		Gesamt	Fleischsaft		Gesamt
		neg	pos		neg	pos	
unbekannt	Anzahl	15	4	19	24	1	25
	% Region	78,9%	21,1%	100,0%	96,0%	4,0%	100,0%
	% Gesamt	0,8%	0,2%	1,0%	1,2%	0,1%	1,3%
Brandenburg	Anzahl	208	12	220	198	5	203
	% Region	94,5%	5,5%	100,0%	97,5%	2,5%	100,0%
	% Gesamt	10,6%	0,6%	11,2%	10,0%	0,3%	10,3%
Meckl.Vorp.	Anzahl	192	10	202	195	3	198
	% Region	95,0%	5,0%	100,0%	98,5%	1,5%	100,0%
	% Gesamt	9,8%	0,5%	10,3%	9,9%	0,2%	10,0%
Niedersachsen	Anzahl	1092	133	1225	1152	104	1256
	% Region	89,1%	10,9%	100,0%	91,7%	8,3%	100,0%
	% Gesamt	55,7%	6,8%	62,5%	58,3%	5,3%	63,5%
NRW	Anzahl	61	16	77	59	19	78
	% Region	79,2%	20,8%	100,0%	75,6%	24,4%	100,0%
	% Gesamt	3,1%	0,8%	3,9%	3,0%	1,0%	3,9%
Sachsen	Anzahl	113	3	116	111	1	112
	% Region	97,4%	2,6%	100,0%	99,1%	0,9%	100,0%
	% Gesamt	5,8%	0,2%	5,9%	5,6%	0,1%	5,7%
Sachsen-Anhalt	Anzahl	5	0	5	6	0	6
	% Region	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%
	% Gesamt	0,3%	0,0%	0,3%	0,3%	0,0%	0,3%
Schlesw.-H.	Anzahl	86	11	97	91	8	99
	% Region	88,7%	11,3%	100,0%	91,9%	8,1%	100,0%
	% Gesamt	4,4%	0,6%	4,9%	4,6%	0,4%	5,0%
Gesamt	Anzahl	1772	189	1961	1836	141	1977
	% Region	90,4%	9,6%	100,0%	92,9%	7,1%	100,0%
	% Gesamt	90,4%	9,6%	100,0%	92,9%	7,1%	100,0%

4.3.2 Nachweis von *T. gondii* bezogen auf Alte und Neue Bundesländer

In den Alten Bundesländern wurden 131 seropositive und 1302 seronegative Tiere mittels Fleischsaft nachgewiesen. Dem stehen 9 seropositive und 510 seronegative Tiere in der Gruppe der Neuen Bundesländer gegenüber. Dies ergab mit $p < 0,001$ einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Das Odds ratio beträgt 5,7 für die Gruppe der Alten Bundesländer. Die Chance ein seropositives Tier mittels Fleischsaft in den Alten Bundesländern zu detektieren war somit 5,7 mal höher als in den Neuen Bundesländern.

Die Ergebnisse der Serumuntersuchung auf *T. gondii* ergaben bei 160 seropositiven und 1239 seronegativen in der Gruppe der Alten und 25 seronegativen und 518 seropositiven Tieren in der Gruppe der Neuen Bundesländer ebenfalls mit $p < 0,001$ einen signifikanten Unterschied der Seroprävalenzen beider Regionen. Das Odds ratio fällt mit 2,68 für die Gruppe der Neuen Bundesländer allerdings geringer aus als im Fleischsaft. Die Chance, ein seropositives Tier nachzuweisen war in Proben aus den Alten Bundesländern somit 2,68 mal größer als in denjenigen aus den Neuen Bundesländern.

4.3.3. Nachweis von *Y. enterocolitica* bezogen auf die Region im Serum und Fleischsaft

Bezogen auf die Regionen konnte bei 18 der Serum und 21 der Fleischsaftproben keine Zuordnung der untersuchten Proben vorgenommen werden. Sachsen war hier das Bundesland mit der innerhalb der Region niedrigsten Nachweisrate für den Erreger, dies im Serum wie auch im Fleischsaft. 41,4% der aus Sachsen stammenden Tiere waren im Serum *Y. enterocolitica* positiv, nur 9,8% wurden mittels Fleischsaft detektiert.

Schleswig-Holstein war die Region mit den meisten positiven Proben. Dies gilt für die Untersuchung der Serum-, als auch der Fleischsaftproben. Im Serum konnte kein negatives Tier gefunden werden.

Für die Gesamtuntersuchung der Regionen gilt, dass mittels Serum mehr positive Tiere gefunden wurden als mittels Fleischsaft. Die Ergebnisse sind der Tabelle 4.13 zu entnehmen. Die einzelnen Regionen sind mit ihren absoluten und relativen Zahlen sowie dem relativen Anteil an den Gesamtnachweisen aufgeführt. Serum und Fleischsaft sind in der Tabelle gegenüber gestellt.

4. Ergebnisse

Tabelle 4.13: Ergebnisse der Serum und Fleischsaftuntersuchung auf *Y. enterocolitica* bezogen auf die Region in relativen und absoluten Zahlen

Region		Serum			Gesamt	Fleischsaft			Gesamt
		neg	pos	fraglich		neg	pos	fraglich	
unbekannt	Anzahl	0	17	1	18	8	9	4	21
	% Region	0,0%	94,4%	5,6%	100,0%	38,1%	42,9%	19,0%	100,0%
	% Gesamt	0,0%	0,9%	0,1%	0,9%	0,4%	0,5%	0,2%	1,1%
Brandenburg	Anzahl	8	170	42	220	90	88	31	209
	% Region	3,6%	77,3%	19,1%	100,0%	43,1%	42,1%	14,8%	100,0%
	% Gesamt	0,4%	8,8%	2,2%	11,4%	4,7%	4,6%	1,6%	11,0%
Meckl.Vorp.	Anzahl	1	190	11	202	38	151	11	200
	% Region	0,5%	94,1%	5,4%	100,0%	19,0%	75,5%	5,5%	100,0%
	% Gesamt	0,1%	9,8%	0,6%	10,4%	2,0%	7,9%	0,6%	10,5%
Niedersachsen	Anzahl	52	1016	136	1204	157	854	164	1175
	% Region	4,3%	84,4%	11,3%	100,0%	13,4%	72,7%	14,0%	100,0%
	% Gesamt	2,7%	52,5%	7,0%	62,2%	8,3%	44,9%	8,6%	61,8%
NRW	Anzahl	10	60	7	77	18	49	11	78
	% Region	13,0%	77,9%	9,1%	100,0%	23,1%	62,8%	14,1%	100,0%
	% Gesamt	0,5%	3,1%	0,4%	4,0%	0,9%	2,6%	0,6%	4,1%
Sachsen	Anzahl	22	48	46	116	90	11	11	112
	% Region	19,0%	41,4%	39,7%	100,0%	80,4%	9,8%	9,8%	100,0%
	% Gesamt	1,1%	2,5%	2,4%	6,0%	4,7%	0,6%	0,6%	5,9%
Sachsen-Anhalt	Anzahl	1	4	0	5	0	6	0	6
	% Region	20,0%	80,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
	% Gesamt	,1%	,2%	0,0%	,3%	0,0%	0,3%	0,0%	0,3%
Schlesw.-H.	Anzahl	0	92	3	95	3	89	7	99
	% Region	0,0%	96,8%	3,2%	100,0%	3,0%	89,9%	7,1%	100,0%
	% Gesamt	0,0%	4,7%	,2%	4,9%	0,2%	4,7%	0,4%	5,2%
Gesamt	Anzahl	94	1597	246	1937	404	1257	239	1900
	% Region	4,9%	82,4%	12,7%	100,0%	21,3%	66,2%	12,6%	100,0%
	% Gesamt	4,9%	82,4%	12,7%	100,0%	21,3%	66,2%	12,6%	100,0%

4.3.4 Nachweis von *Y. enterocolitica* bezogen auf Alte und Neue Bundesländer

In der Gruppe der Alten Bundesländer waren mittels Fleischsaftuntersuchung 992 Tiere seropositiv und 360 seronegativ. In den Proben aus den Neuen Bundesländern wurden hingegen 256 seropositive und 271 seronegative Tiere detektiert. Mit dem Chi-Quadrat-Test konnte mit $p < 0,001$ ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Das Odds ratio für die Proben aus den Alten Bundesländern beträgt 2,92, womit die Chance, bei Fleischsaftuntersuchungen ein *Y. enterocolitica* seropositives Tier zu finden 2,92 höher war als in Proben aus den Neuen Bundesländern.

In der Untersuchung der Serumproben mit 1168 seropositiven und 208 seronegativen Ergebnissen in den Alten und 412 seropositiven und 131 seronegativen Ergebnissen in den Neuen Bundesländern ergab sich trotz der höheren Anzahl an seropositiven Tieren in den Neuen Bundesländern ein $p < 0,001$ beim Vergleich beider Gruppen. Somit wurden signifikant mehr Tiere in den Alten Bundesländern mittels Serum-ELISA *Y. enterocolitica*-positiv getestet. Das Odds ratio beträgt im Vergleich zu der Fleischsaftuntersuchung nur 1,79.

4. Ergebnisse

4.3.5. Nachweis von *Salmonella* bezogen auf die Region im Serum und Fleischsaft

Tabelle 4.14 zeigt die Bundeslandbezogenen Ergebnisse der *Salmonella*-Untersuchung. In Mecklenburg-Vorpommern wurden mit 23,3% und 29,2% die meisten positiven Proben innerhalb einer Region nachgewiesen. Nordrhein-Westfalen hatte die wenigsten Reagenten. In diesem Bundesland waren im Fleischsaft 2, im Serum keine positiven Tiere zu finden.

Auffallend ist das Ergebnis der Tiere aus Sachsen-Anhalt. Im Serum waren alle Tiere negativ. Dem gegenüber stehen 3 positiv und 2 fraglich bewertete Ergebnisse im Fleischsaft.

Tabelle 4.14: Ergebnisse der Serum und Fleischsaftuntersuchung auf *Salmonella* bezogen auf die Region in relativen und absoluten Zahlen

Region		Serum			Gesamt	Fleischsaft			Gesamt
		neg	pos	fraglich		neg	pos	fraglich	
unbekannt	Anzahl	15	1	0	16	21	4	3	28
	% Region	93,8%	6,3%	0,0%	100,0%	75,0%	14,3%	10,7%	100,0%
	% Gesamt	0,8%	0,1%	0,0%	0,8%	1,0%	0,2%	0,1%	1,4%
Brandenburg	Anzahl	189	10	21	220	194	11	17	222
	% Region	85,9%	4,5%	9,5%	100,0%	87,4%	5,0%	7,7%	100,0%
	% Gesamt	9,8%	0,5%	1,1%	11,4%	9,7%	0,5%	0,8%	11,1%
Meckl.Vorp.	Anzahl	142	47	13	202	105	52	21	178
	% Region	70,3%	23,3%	6,4%	100,0%	59,0%	29,2%	11,8%	100,0%
	% Gesamt	7,3%	2,4%	0,7%	10,5%	5,2%	2,6%	1,0%	8,9%
Niedersachsen	Anzahl	1105	33	61	1199	992	88	194	1274
	% Region	92,2%	2,8%	5,1%	100,0%	77,9%	6,9%	15,2%	100,0%
	% Gesamt	57,2%	1,7%	3,2%	62,1%	49,6%	4,4%	9,7%	63,7%
NRW	Anzahl	75	0	2	77	69	2	7	78
	% Region	97,4%	0,0%	2,6%	100,0%	88,5%	2,6%	9,0%	100,0%
	% Gesamt	3,9%	0,0%	0,1%	4,0%	3,4%	0,1%	0,3%	3,9%
Sachsen	Anzahl	79	20	17	116	62	27	26	115
	% Region	68,1%	17,2%	14,7%	100,0%	53,9%	23,5%	22,6%	100,0%
	% Gesamt	4,1%	1,0%	0,9%	6,0%	3,1%	1,3%	1,3%	5,7%
Sachsen-Anhalt	Anzahl	5	0	0	5	1	3	2	6
	% Region	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	16,7%	50,0%	33,3%	100,0%
	% Gesamt	0,3%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%	0,1%	0,1%	0,3%
Schlesw.-H.	Anzahl	87	4	6	97	80	6	14	100
	% Region	89,7%	4,1%	6,2%	100,0%	80,0%	6,0%	14,0%	100,0%
	% Gesamt	4,5%	0,2%	0,3%	5,0%	4,0%	0,3%	0,7%	5,0%
Gesamt	Anzahl	1697	115	120	1932	1524	193	284	2001
	% Region	87,8%	6,0%	6,2%	100,0%	76,2%	9,6%	14,2%	100,0%
	% Gesamt	87,8%	6,0%	6,2%	100,0%	76,2%	9,6%	14,2%	100,0%

4.3.6 Nachweis von *Salmonella* bezogen auf Alte und Neue Bundesländer

Bei der Untersuchung des Fleischsaftes auf *Salmonella* waren 96 Tiere in den Alten Bundesländern seropositiv und 1356 Tiere seronegativ. In den Neuen Bundesländern waren 93 von 521 untersuchten Tieren seropositiv, 428 waren seronegativ. Das ergab mit $p < 0,001$ einen signifikanten Unterschied zwischen den vergleichenden Gruppen. Die Berechnung der Odds ratio ergab, dass die Chance, ein seropositives Tier bei der Untersuchung von Fleischsaft in Proben aus den Neuen Bundesländern zu detektieren 3,07 mal so hoch war wie in den Proben aus den Alten Bundesländern.

Gleiches gilt für die Serumuntersuchung. Auch hier wurde mit $p < 0,001$ bei 37 seropositiven und 1336 seronegativen Tieren in den Alten und 77 seropositiven und 466 seronegativen Tieren in den Neuen Bundesländer ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Regionen berechnet. Das Odds ratio für die Neuen Bundesländer beträgt 5,97. Somit war die Chance, ein *Salmonella*-seropositives Tier im Serum in den Proben der Neuen Bundesländer nachzuweisen, 5,97 mal höher als in denjenigen aus den Alten Bundesländern.

4.4. Einzelnachweise bezogen auf die Haltungsart in Aufzucht und Mast

In den Betrieben kamen unterschiedliche Aufstellungsmöglichkeiten während Aufzucht und Mast vor. Es wurden die Seroprävalenzen der Haltungsformen in der Kombination Aufzucht und Mast berechnet. Es ergaben sich 10 Kombinationen der Auslaufmöglichkeiten (Tabelle 4.15). Um eine statistische Auswertung durchzuführen, wurden die Aufzucht und die Mast mittels des exakten Tests nach Fischer, einer Variante des Chi-Quadrat-Tests, getrennt voneinander betrachtet.

Tabelle 4.15: Halkungskombinationen aus Aufzucht und Mast

Kombination	Aufzucht	Mast
1	Beton	Beton
2	Beton	Freiland
3	Freiland	Beton
4	Freiland	Hütten
5	Freiland	Stall
6	Freiland mit Hütten	Beton
7	Gras	Gras
8	Hütten	Beton
9	Hütten	Stall
10	Stall	Stall

4.4.1. Nachweis von *T. gondii* bezogen auf die Haltungsart

Serum:

In der Serumuntersuchung wurden in 5 der 10 unterschiedlichen Haltungsformen keine Reagenten nachgewiesen (Tab. 4.15). In der Kombination 6 aus Freilandhaltung mit Hütten in der Aufzucht und Beton in der Mast konnten mit 39,1% Tieren innerhalb der Haltungsform am meisten positive Reagenten im Serum gefunden werden. Mit nur 46 Tieren ist die Stichprobe im Vergleich zu anderen Haltungsformen gering. Betonhaltung in Aufzucht und Mast (Kombination 1) ist mit 1544 Serumproben am häufigsten vertreten.

Fleischsaft:

Im Fleischsaft waren in 2 der 10 Haltungsformen nur negative Proben vertreten. Mit 50% positiven Tieren stellt die Kombination 8 aus Hüttenhaltung in der Aufzucht und Beton in der Mast die Haltungsform mit den meisten Toxoplasmanachweisen innerhalb einer Haltung im Fleischsaft dar. Von der Kombination 1, Betonhaltung in Aufzucht und Mast, standen mit 1542 am meisten Proben zur Untersuchung zur Verfügung.

4. Ergebnisse

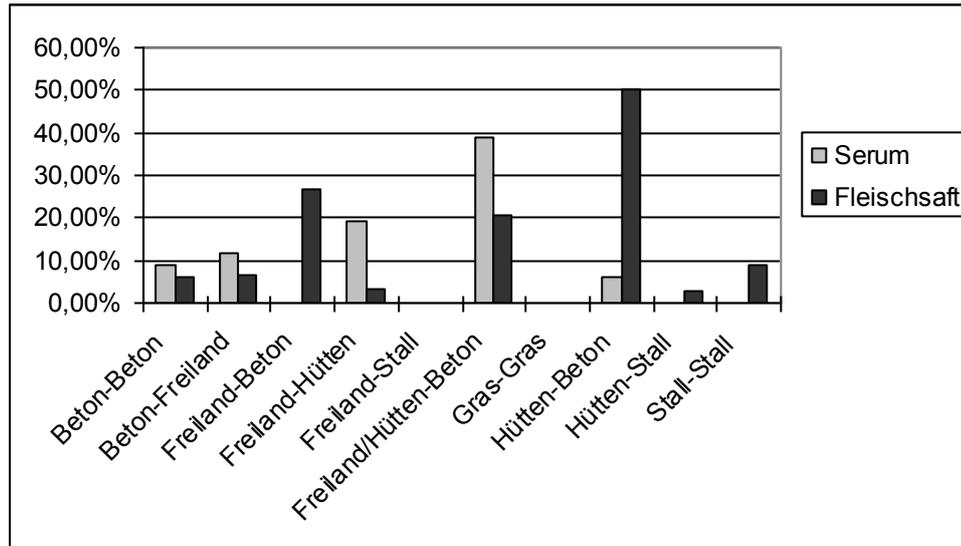


Abbildung: 4.13.: *T. gondii* in Fleischsaft und Serum bezogen auf die Haltungsform

Abbildung 4.13. stellt diese Ergebnisse in einem Säulendiagramm graphisch dar. Die Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftuntersuchungen sind für die Haltungs kombinationen gegenübergestellt.

In der Tabelle 4.16 sind die Häufigkeiten der *T. gondii* positiven und negativen Tiere bezogen auf die Haltungsform dargestellt. Serum und Fleischsaftergebnisse sind gegenüber gestellt.

4. Ergebnisse

Tabelle 4.16: Ergebnisse der Serum und Fleischsaftuntersuchung auf *T.gondii* bezogen auf die Haltungsart

Boden Aufzucht - Mast	Serum		Gesamt	Fleischsaft		Gesamt
	neg	pos		neg	pos	
unbekannt	15 78,9%	4 21,1%	19 100,0%	24 96,0%	1 4,0%	25 100,0%
Beton-Beton	1409 91,3%	135 8,7%	1544 100,0%	1448 93,9%	94 6,1%	1542 100,0%
Beton-Freiland	107 88,4%	14 11,6%	121 100,0%	116 93,5%	8 6,5%	124 100,0%
Freiland-Beton	25 100,0%	0 0,0%	25 100,0%	19 73,1%	7 26,9%	26 100,0%
Freiland-Hütten	67 80,7%	16 19,3%	83 100,0%	86 96,6%	3 3,4%	89 100,0%
Freiland-Stall	19 100,0%	0 0,0%	19 100,0%	19 100,0%	0 0,0%	19 100,0%
Freiland/Hütten-Beton	28 60,9%	18 39,1%	46 100,0%	38 79,2%	10 20,8%	48 100,0%
Gras-Gras	23 100,0%	0 0,0%	23 100,0%	23 100,0%	0 0,0%	23 100,0%
Hütten-Beton	30 93,8%	2 6,3%	32 100,0%	16 50,0%	16 50,0%	32 100,0%
Hütten-Stall	38 100,0%	0 0,0%	38 100,0%	37 97,4%	1 2,6%	38 100,0%
Stall-Stall	11 100,0%	0 0,0%	11 100,0%	10 90,9%	1 9,1%	11 100,0%
Gesamt	1772 90,4%	189 9,6%	1961 100,0%	1836 92,9%	141 7,1%	1977 100,0%

Beim statistischen Vergleich der Haltungsformen getrennt nach Aufzucht und Mast ergaben sich bei der Untersuchung der Fleischsaftproben für die Aufzucht mit $p=0,7883$ und für die Mast mit $p=0,6756$ keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Haltungsformen. Anders stellt es sich bei der Untersuchung der Serumproben dar. Mit $p=0,0035$ in der Aufzucht und $p=0,0044$ in der Mast gibt es signifikante Unterschiede zwischen den angegebenen Haltungsformen, womit die Aussage getätigt werden kann, dass die Bodenart sowohl in der Aufzucht als auch in der Mast einen Einfluss auf die Seroprävalenz hatte.

4.4.2. Nachweis von *Y. enterocolitica* bezogen auf die Haltungsart

Serum:

In jeder Haltungsform wurden positive Proben detektiert. Bei der Untersuchung der Serumproben auf *Y. enterocolitica* konnten mit 97,8% die meisten positiven Nachweise innerhalb einer Haltungsform für die Kombination 6 aus Freilandhaltung mit Hütten in der Aufzucht und Beton in der Mast festgestellt werden. In Kombination 10 (Stall-Stall) wurden die wenigsten positiven Tiere nachgewiesen. Die Probenzahl war mit N=11 gering.

Fleischsaft:

Im Fleischsaft waren 91,7% der Tiere aus der Kombination Freilandhaltung mit Hütten in der Aufzucht und Beton in der Mast positiv. Somit war Kombination 6 auch im Fleischsaft die Haltungsform mit den meisten positiven Reagenten. Die geringste Anzahl positiver Proben im Fleischsaft fand sich wie im Serum in der Kombination 10, Stall-Stall. Es wurden jedoch nur 11 Tiere dieser Haltungsform beprobt. Abbildung 4.14. gibt in Form eines Säulendiagramms einen graphischen Überblick.

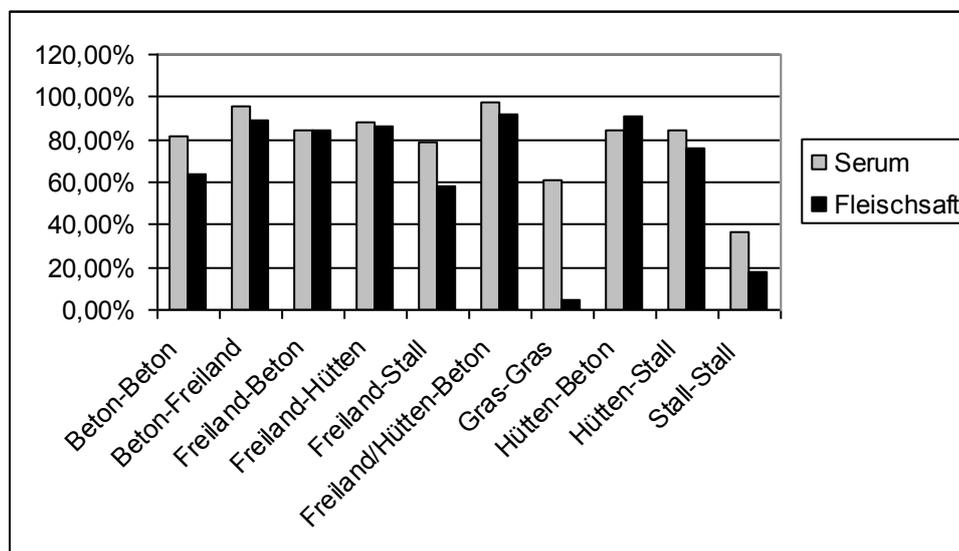


Abbildung: 4.14.: *Y. enterocolitica* in Fleischsaft und Serum bezogen auf die Haltungsform

4. Ergebnisse

In Tabelle 4.17 werde die Ergebnisse für die Haltungskombinationen der Serum- und Fleischsaftuntersuchung gegenübergestellt.

Tabelle 4.17: Ergebnisse der Serum und Fleischsaftuntersuchung auf *Y. enterocolitica* bezogen auf die Haltungsart

Boden Aufzucht - Mast	Serum			Gesamt	Fleischsaft			Gesamt
	neg	pos	fraglich		neg	pos	fraglich	
unbekannt	0 0,0%	17 94,4%	1 5,6%	18 100,0%	8 38,1%	9 42,9%	4 19,0%	21 100,0%
Beton-Beton	75 4,9%	1234 81,1%	213 14,0%	1522 100,0%	353 23,5%	952 63,4%	197 13,1%	1502 100,0%
Beton-Freiland	2 1,7%	114 95,8%	3 2,5%	119 100,0%	3 2,4%	111 89,5%	10 8,1%	124 100,0%
Freiland-Beton	3 12,0%	21 84,0%	1 4,0%	25 100,0%	1 3,8%	22 84,6%	3 11,5%	26 100,0%
Freiland-Hütten	1 1,2%	74 88,1%	9 10,7%	84 100,0%	1 1,3%	69 86,3%	10 12,5%	80 100,0%
Freiland-Stall	3 15,8%	15 78,9%	1 5,3%	19 100,0%	6 31,6%	11 57,9%	2 10,5%	19 100,0%
Freiland/Hütten-Beton	0 0,0%	45 97,8%	1 2,2%	46 100,0%	0 0,0%	22 91,7%	2 8,3%	24 100,0%
Gras-Gras	1 4,3%	14 60,9%	8 34,8%	23 100,0%	22 95,7%	1 4,3%	0 0,0%	23 100,0%
MHütten-Beton	1 3,1%	27 84,4%	4 12,5%	32 100,0%	0 0,0%	29 90,6%	3 9,4%	32 100,0%
Hütten-Stall	2 5,3%	32 84,2%	4 10,5%	38 100,0%	2 5,3%	29 76,3%	7 18,4%	38 100,0%
Stall-Stall	6 54,5%	4 36,4%	1 9,1%	11 100,0%	8 72,7%	2 18,2%	1 9,1%	11 100,0%
Gesamt	94 4,9%	1597 82,4%	246 12,7%	1937 100,0%	404 21,3%	1257 66,2%	239 12,6%	1900 100,0%

Es gab keine *Y. enterocolitica*- negativen Betriebe. Somit konnte kein Chi-Quadrat-Test berechnet werden. In allen Haltungsformen wurden seropositive Tiere nachgewiesen.

4.4.3. Nachweis von *Salmonella* bezogen auf die Haltungsart

Serum:

Insgesamt wurden im Serum in 5 Haltungsformen keine positiven Tiere nachgewiesen. Die Haltungskombination 6 aus Freiland mit Hütten in der Aufzucht und Beton in der Mast war mit 28,3% der 46 mittels Serum getesteten Tiere die Haltungskombination mit den meisten positiven Nachweisen.

Fleischsaft:

Im Fleischsaft wurden in 3 Haltungsformen keine als positiv einzustufenden Reagenten gefunden. 40,8% der 49 mittels Fleischsaft getesteten Tiere der Kombination 6 hatten im ELISA ein OD% über 20. Dies ist die höchste Prävalenz für die Untersuchung auf *Salmonella*. Abbildung 4.15. verschafft einen graphischen Überblick über die Ergebnisse. Die Ergebnisse der Serum- und Fleischsaftproben sind für die Haltungskombinationen gegenübergestellt.

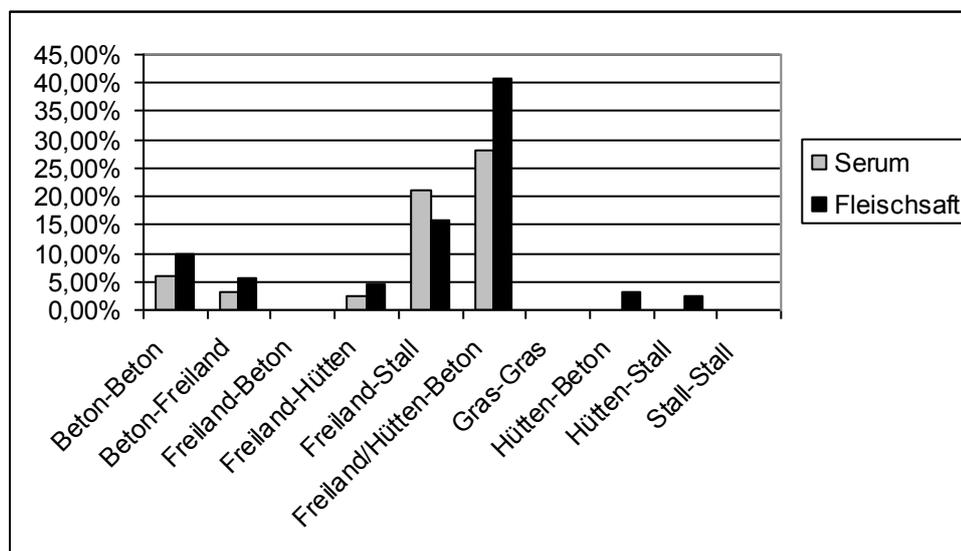


Abbildung: 4.15.: *Salmonella* in Fleischsaft und Serum bezogen auf die Haltungsform

Tabelle 4.18 stellt alle Ergebnisse der Untersuchung der Haltungskombinationen für *Salmonella* dar. Dabei sind die Zahlen der Serum- und Fleischsaftuntersuchung gegenübergestellt.

4. Ergebnisse

Tabelle 4.18: Ergebnisse der Serum und Fleischsaftuntersuchung auf *Salmonella* bezogen auf die Haltungsart

Boden Aufzucht - Mast	Serum			Gesamt	Fleischsaft			Gesamt
	neg	pos	fraglich		neg	pos	fraglich	
unbekannt	15 93,8%	1 6,3%	0 0,0%	16 100,0%	21 75,0%	4 14,3%	3 10,7%	28 100,0%
Beton-Beton	1337 88,1%	91 6,0%	89 5,9%	1517 100,0%	1189 76,2%	153 9,8%	218 14,0%	1560 100,0%
Beton-Freiland	111 91,7%	4 3,3%	6 5,0%	121 100,0%	99 79,2%	7 5,6%	19 15,2%	125 100,0%
Freiland-Beton	25 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	25 100,0%	18 69,2%	0 0,0%	8 30,8%	26 100,0%
Freiland-Hütten	78 92,9%	2 2,4%	4 4,8%	84 100,0%	82 91,1%	4 4,4%	4 4,4%	90 100,0%
Freiland-Stall	11 57,9%	4 21,1%	4 21,1%	19 100,0%	11 57,9%	3 15,8%	5 26,3%	19 100,0%
Freiland/Hütten-Beton	19 41,3%	13 28,3%	14 30,4%	46 100,0%	17 34,7%	20 40,8%	12 24,5%	49 100,0%
Gras-Gras	22 95,7%	0 0,0%	1 4,3%	23 100,0%	23 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	23 100,0%
Hütten-Beton	30 93,8%	0 0,0%	2 6,3%	32 100,0%	18 56,3%	1 3,1%	13 40,6%	32 100,0%
Hütten-Stall	38 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	38 100,0%	35 92,1%	1 2,6%	2 5,3%	38 100,0%
Stall-Stall	11 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	11 100,0%	11 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	11 100,0%
Gesamt	1697 87,8%	115 6,0%	120 6,2%	1932 100,0%	1524 76,2%	193 9,6%	284 14,2%	2001 100,0%

Die Berechnung des p-Wertes der Fleischsaftproben ergab mit $p=0,1728$ für die Aufzucht und $p=0,6756$ für die Mast keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Haltungsformen. Gleiches galt auch für die untersuchten Serumproben. Für die Aufzucht ergab sich ein $p=0,1056$, für die Mast ein $p=0,2129$.

5. Diskussion

5.1. Der Versuchsaufbau

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Schlachtkörper aus 41 verschiedenen Outdoorschweinebetrieben am Schlachthof beprobt und mittels ELISA (Serum und Fleischsaft) auf *T. gondii*, *Y. enterocolitica* und *Salmonella* untersucht. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet und bewertet. Ziel war es, die Seroprävalenz von *T. gondii*, *Y. enterocolitica* und *Salmonella* in einer größeren Anzahl von Outdoorschweinen zu bestimmen und diese Betriebe bezüglich ihrer Erregerprävalenz einzustufen. Dabei sollten Einzeltierergebnisse eine untergeordnete Rolle spielen.

Es soll eine schnelle Aussage im Rahmen von Bestandsuntersuchungen über das Erregerspektrum eines Betriebes ermöglicht werden.

5.1.1. Die Probenqualität

Untersucht wurden Fleischsaft- und Serumproben. Beide Probenmaterialien werden bereits im Rahmen der Verordnung zur Verminderung der Salmonellenverbreitung durch Schlachtschweine (SchwSalmoV) eingesetzt. Festzuhalten ist, dass der Antikörpergehalt zwischen Serum und Fleischsaft variiert. WILHELM et al. (2007) konnten im Serum höhere OD% messen als im Fleischsaft, RÖSLER et al. (2011) bestätigten diese Aussage.

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten die beiden unterschiedlichen Probenmaterialien bei der Untersuchung auf *T. gondii* und *Y. enterocolitica* statistisch signifikante Unterschiede. So standen 7,1% *Toxoplasma*-positive Tiere im Fleischsaft 9,6% positiven Tieren im Serum gegenüber ($p=0,005$). Bei der Untersuchung auf *Y. enterocolitica* konnten 66,2% positive Tiere im Fleischsaft und 82,4% positive Tiere im Serum gefunden werden ($p<0,001$). Laut DAVIES et al. (2003) haben tiergesundheitliche Faktoren wie Stress und Dehydratation einen Einfluss auf Schwankungen des Antikörpergehaltes innerhalb der unterschiedlichen Gewebe eines Tieres.

Da die Fleischsaftproben nur aus dem Zwerchfellpfeiler stammten, können keine Aussagen zur Abhängigkeit der serologischen Ergebnisse innerhalb dieser Probenmatrix von der Lokalität der Entnahmestelle, wie von anderen Autoren beschrieben (NOBMANN et al. 2011) getätigt werden.

Eine weitere Schwierigkeit bei der abschließenden Bewertung der beiden Probenmatrices ergibt sich aus den von den ELISA-Testkits angegebenen Bewertungsschlüsseln. Mit dem *Y. enterocolitica*- und *Salmonella*-ELISA werden Ergebnisse mit einer $OD\% \geq 10$ und < 20 als fraglich bewertet. Die Anzahl fraglicher Proben kann auf die Bewertung der Serum- und

Fleischsaftergebnisse in dieser Arbeit Einfluss genommen haben. Eine erneute Untersuchung fraglicher Proben, die nahe dem jeweiligen Cut'off liegen, könnte die Anzahl an positiv und negativ getesteten Tieren verändern und somit zu einer anderen Bewertung führen. In dem vorgenommenen Vergleich von Serum und Fleischsaft wurden fragliche Ergebnisse nicht einbezogen. Dies führte zum Ausschluss einer nicht geringen Anzahl von beprobten Tieren und könnte eine Erklärung dafür sein, warum bei der Untersuchung auf *Salmonella* im Fleischsaft mehr Tiere positiv bewertet wurden als im Serum. Eine endgültige Aussage über den Vergleich der Sensitivität beider Probenmatrices kann somit nicht abschließend getroffen werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

5.1.2. Die Probenzahl

Von 2004 Tieren aus 41 Beständen wurden während 22 Ausfahrten je eine Fleischsaft und eine Serumprobe (N=4008) entnommen. Trotzdem stand nicht für jedes Tier je eine Fleischsaft und eine Serumprobe zur Untersuchung auf alle drei Erreger zur Verfügung. Dieser Umstand erklärt sich dabei durch Verluste an Probenmaterial bei der Gewinnung durch

- Verluste an Serum beim Abzentrifugieren,
- zu trockene Fleischproben,
- Verluste an Fleischsaft im Trichter.

Zusätzlich kam es durch die mehrmalige Untersuchung einer Probe (3 Erreger) zu Verlusten an Probenmaterial. Ausgehend vom ursprünglichen Volumen der einzelnen Probe konnte dies dazu führen, dass für weitere Untersuchungen nicht mehr genügend Material zur Verfügung stand. Als Konsequenz wurde vorher aliquotiert.

Um dem entgegenzuwirken, wäre auch eine Vorauswahl der zu untersuchenden Proben möglich. Proben mit zu geringem Volumen würden dann verworfen werden. Hierzu müsste die Probenanzahl jedoch deutlich über der statistisch festgesetzten Probenmenge liegen. Ebenfalls könnte das Volumen der entnommenen Fleischsaft- und Serumprobe bei der Gewinnung erhöht werden.

5.1.3. Die Bestandsauswahl

Bei den 41 beprobten Beständen handelte es sich ausschließlich um Bestände mit Outdoorhaltung in Aufzucht und/oder Mast, wobei verschiedene Aufstallungsformen berücksichtigt wurden. Angesichts der Größe und der regionalen Verteilung von extensiven Schweinehaltungen bestand eine unregelmäßige Verteilung der Probenzahl pro Bestand und Bundesland. Zudem war die Beprobung abhängig von der Anzahl der an den Schlachthof gelieferten Tiere zum Zeitpunkt der Probennahme und somit zufällig, mit der Folge, dass nur

bedingt statistische Bewertungen der Ergebnisse durchgeführt werden konnten, da die Probenzahl pro Bestand, Bundesland und Haltungsformen zum Teil stark variierten. Gerade auf dem Gebiet der regionalen Verteilung von Seroprävalenzen, sowie dem Einfluss von Haltungsbedingungen bedeutete dies eine Limitierung der Datenanalyse und es besteht weiterer Untersuchungsbedarf.

5.1.4. Die gewählte Nachweisttechnik

Verfahren mittels ELISA gelten als etabliert. So wird unter Anderem seit 2007 der Danish-Mixed-ELISA standardmäßig im Rahmen von Monitoringprogrammen für *Salmonella* in der Schweinemast eingesetzt (Schweine-Salmonellen-Verordnung). Die kommerziellen Test-Kits für eine Vielzahl unterschiedlicher Zoonoseerreger machen das Verfahren zu Zwecken der Bestandscharakterisierung interessant (LANGKABEL 2011).

Auch im Rahmen dieses Projektes stellte sich die Technik als kostengünstiges, schnell durchführbares und reproduzierbares Verfahren für große Probenzahlen dar. Die Beprobung mittels Serum und Fleischsaft lässt sich in den Schlachtbetriebsablauf implementieren. Die Untersuchung von 90 Proben ist durch eine Person in ca. drei Stunden möglich. Aufgrund der Möglichkeit, mehrere Test-Kits parallel zu bearbeiten, vervielfacht sich die Stückzahl. Zudem vereinfacht und beschleunigt die Automatisierung einzelner Arbeitsschritte die Testdurchführung. Dies ermöglichte es, mehrere Betriebe an einem Tag auf einen Erreger zu testen.

Die Bewertung der Ergebnisse ist allerdings nicht immer eindeutig. So werden mit Test-Kits unterschiedlicher Hersteller unterschiedliche Ergebnisse erzielt, da die Tests in ihrer Sensitivität und Spezifität variieren (RÖSLER et al. 2011, SZABO 2008; VICO et al. 2010). Zudem zeigten sich in dieser Arbeit signifikante Unterschiede zwischen den Probenmedien Fleischsaft und Serum, wie sie bereits von anderen Autoren genannt werden (WILHELM et al. 2007, RÖSLER et al. 2011). Außerdem gilt es zu klären, wie mit Ergebnissen umgegangen werden soll, die nahe dem, durch den Hersteller definierten, Cut'off liegen und daher bei wiederholten Untersuchungen leicht eine andere Bewertung erfahren können, oder die in dem vom Hersteller definierten „fraglichen“ Bereich liegen.

In der vorgelegten Arbeit dient der ELISA zur Bestandscharakterisierung. Dies relativiert durch höhere Probenzahlen den Einfluss fraglicher Einzeltiererergebnisse. Problematisch stellen sich hier nur Betriebe mit kleinen Tierzahlen da. Auch in dieser Arbeit gab es Betriebe, von denen nur geringe Probenzahlen zur Untersuchung kamen. Entgeltige Aussagen zur Bestandssituation sind dann schwer möglich oder müssen vorsichtig interpretiert werden.

5.1.5. Ziel der Arbeit

Die von NOLLET et al. (2005) bezweifelte Nutzung des ELISA zur Einzeltierdiagnostik spielt bei der Bestandscharakterisierung eine untergeordnete Rolle. Jedoch zeigten sich in früheren Untersuchungen Abhängigkeiten der Bewertung der Ergebnisse durch den vom Hersteller festgelegten Cut'off und der damit verbundenen Spezifität und Sensitivität unterschiedlicher Test-Kits (RÖSLER et al. 2011). Dies kann auch Einfluss auf Bestandesebene haben.

Dem sollte durch den im Rahmen dieser Arbeit erstellten Kategorisierungsschlüssel als Bewertungsmöglichkeit Rechnung getragen werden. Dafür wurden die Einzeltierergebnisse durch Berechnung des Median zu einem Bestandsergebnis zusammengefasst. Die Bewertung erfolgte dann mittels Einstufung in unterschiedliche Risikogruppen, welche durch eine vorherige TG-ROC Analyse des jeweiligen Test-Kits definiert wurden. Die Bewertung der Bestände wurde dadurch unabhängig vom Hersteller Cut'off und konnte der Fragestellung von Untersuchungen angepasst werden.

5.2. Die Seroprävalenzen der Erreger unter Nutzung des Hersteller Cut'off

Die Seroprävalenzen wurden jeweils für die Fleischsaft- und Serumuntersuchungen bezogen auf das Einzeltier, die Bestände, die Region und die Haltungsform an Hand des Hersteller Cut'offs erhoben. Dabei wurden die Ergebnisse beider Probenmaterialien verglichen.

5.2.1. *T. gondii*

T. gondii kann in deutschen Mastschweinen nachgewiesen werden. Von den 1977 in dieser Arbeit mittels Fleischsaft beprobten Tieren waren 7,1% serologisch positiv für *T. gondii*. Dem stehen 9,6% positive Tiere im Serum gegenüber (Tabelle 4.1). Die Ergebnisse bestätigen vorangegangene Untersuchungen von SCHULZIG et al. (2005) mit einer Prävalenz von 5,6% bei 374 und LUDEWIG et al. (2007) mit ermittelten 3,9% bei 4999 untersuchten Schweinen. In derselben Studie wurden mit 2,8% (N=180) für konventionelle Schweinemastbetriebe mit Outdoorhaltung und 11,7% (N=60) für ökologisch gehaltene Mastschweine ähnliche Prävalenzen ermittelt (LUDEWIG et al. 2007).

Andere Untersuchungen zeigten mit 15% aus ökologischer und 52% aus Kleinhaltungen (1-20 Tiere) höhere Prävalenzen (FEHLHABER et al. 2003). Die extensive Haltung, freier Zugang von Katzen und Schädigern und ein daraus resultierender, höherer Infektionsdruck werden von mehreren Autoren als Ursache für höhere Seroprävalenzen in diesen Betrieben beschrieben (ASSADI-RAD et al. 1995, WEIGEL et al. 1995, GAMBLE et al. 1999).

In den Niederlanden fanden sich in extensiver Haltung mit 2,9% positiven Tieren höhere Prävalenzen als bei Proben aus konventioneller Haltung (0%) (KIJLSTRA et al. 2004). Die Zahlen waren jedoch insgesamt niedrig.

Frühere Untersuchungen anderer Autoren lagen mit 20,4% bei 1013 Tieren (FEHLHABER et al. 2003) und 19% bei 2041 Tieren (DAMRIYASA et al. 2004) höher als in der vorliegenden Arbeit. Die abweichenden Zahlen können durch die unterschiedlichen Nutzungsgruppen dieser und der vorliegenden Arbeit erklärt werden. Im Vergleich zur vorgestellten Arbeit, bei der Masttiere zur Untersuchung kamen, beprobten DAMRIYASA et al. (2004) nur Sauen. WEIGEL et al. (1995) und WYSS et al. (2000) begründen aufgrund des höheren Alters zum Zeitpunkt der Schlachtung von Sauen höhere Toxoplasmaprävalenzen innerhalb dieser Tiergruppe.

Aufgrund der Persistenz im Tier in Form von Gewebssystemen muss somit davon ausgegangen werden, dass der Parasit in die Lebensmittelkette gelangt (FEHLHABER et al. 2003; SCHULZIG 2005; BfR Stellungnahme 2005). Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen, dass *T. gondii* auch in Outdoorhaltungen vorkommt und damit auch durch Tiere aus diesen Haltungen der Eintrag in die Lebensmittelkette möglich ist.

5.2.2. *Y. enterocolitica*

Die Untersuchung der 1900 Fleischsaft- und 1937 Serumproben ergab hohe Seroprävalenzen für *Y. enterocolitica*: 66,2% der Tiere waren mittels Fleischsaft- und 82,4% waren nach Serumuntersuchung positiv. Dazu kommen 12,6% in Fleischsaft und 12,7% in Serum fragliche Proben, diese besitzen eine OD% ≥ 10 und < 20 , sie waren somit nicht sicher zuzuordnen. Insgesamt waren unter Beachtung beider Parameter 404 (21,3%) der mittels Fleischsaft beprobten Tiere eindeutig negativ. Dem stehen 94 Tiere (4,9%) der Serumuntersuchung als eindeutig negativ gegenüber (Tabelle 4.3).

Auch andere Autoren kommen zu ähnlich hohen Ergebnissen. LANGKABEL (2011) gibt 62,9% und HENSEL et al. (2004) 45,5% der zur Untersuchung gekommenen Tiere als serologisch positiv an. FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001) fanden 60% positive Tiere bei konventionellen Untersuchungen von Tonsillentupfern frischer Schlachtschweinen. In Deutschland muss somit von einer hohen Seroprävalenz von *Y. enterocolitica* in der Schweinehaltung ausgegangen werden. Der Nachweis von Antikörpern in Fleischsaft und Serum in der vorliegenden, wie auch den Arbeiten anderer Autoren (HENSEL et al. 2004, LANGKABEL 2011), sowie der großen Zahl konventionell nachgewiesener Erreger am Schlachtkörper (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001) lässt darauf schließen, dass die hohen Seroprävalenzen zu einem tatsächlichen, auch mikrobiellen Eintrag in die Lebensmittelkette führen. Weitere serologische Untersuchungen der deutschen Schweinemastbestände sollten durchgeführt werden, um einen besseren Überblick über die Seroprävalenz in Deutschland zu erhalten und um ein Risiko für die Konsumenten präziser abschätzen zu können.

5.2.3. *Salmonella*

In der Untersuchung auf *Salmonella* waren 9,6% der 2001 mittels Fleischsaft beprobten Tiere positiv. Im Serum waren 6% positiv (Tabelle 4.5).

Bestätigung findet dieses Ergebnis in einer Studie aus dem Jahr 2001, in der von 11.711 Schlachtschweinen 8,9% positiv getestet wurden (LUDEWIG und FEHLHABER 2001). Andere Studien erbrachten deutlich höhere Prävalenzen. 2007 wurden serologisch 32,3% der vom BfR untersuchten 2482 Tiere positiv getestet (BfR 2008). LANGKABEL (2011) wies mittels ELISA 23,9% positive Mastschweine bei einer Probenzahl von 2818 Tieren nach.

Vergleichende Untersuchungen in den USA in konventioneller und Outdoor/Antibiotikafreier (ABF) Haltung erbrachten eine Prävalenz in den Outdoor/ABF-Betrieben von 54%, die somit höher war als in konventionellen Schweinemastbetrieben mit 39%. Die Diskrepanz kann durch die vorliegende Untersuchung nicht bestätigt werden. Die Gesamtseroprävalenz der vorliegenden Untersuchung von Outdoortieren mittels Fleischsaft und Serum, verglichen mit

den Nachweisen aus konventioneller Haltung (LANGKABEL 2011; BfR 2008), stützt die Aussage von CALLAWAY et al. (2005), die ebenfalls keine signifikant höheren Nachweise in Outdoorhaltung fanden. Dies kann Folge unterschiedlicher, gegebenenfalls auch mangelnder Biosicherungsmaßnahmen in den Indoor-Betrieben sein. Auch ist es abhängig von der Definition eines Outdoorbetriebs. In dieser Arbeit wurden Outdoorbetriebe mit unterschiedlichen Haltungssystemen untersucht (zum Vergleich der Haltungsbedingungen und den daraus resultierenden Seroprävalenzen siehe Kapitel 5.5.).

5.3. Seroprävalenzen der Erreger in den Betrieben

5.3.1. Seroprävalenz von *T. gondii* in den Betrieben

Von 41 untersuchten Betrieben wurden mittels Serum und Fleischsaft je 19 positive Einrichtungen gefunden (mind. 1 Tier mit OD%>15). In 12 Betrieben fand sich in jeweils einem der Probenmedien mindestens ein positiv getestetes Schwein. In 10 Betriebe konnten weder im Serum noch im Fleischsaft positive Tiere gefunden werden. Somit waren 24,4% der Bestände eindeutig *T. gondii* negativ.

Vergleicht man die Seroprävalenzen der als positiv bewerteten Betriebe untereinander, zeigen sich deutliche Unterschiede. So hatte Betrieb Nr. 9 mit je 100% im Serum und Fleischsaft positiv getesteten Tieren die höchste Seroprävalenz. Das Probenvolumen war mit N=15 allerdings niedrig. Im Fleischsaft hatten 6 Betriebe mehr als 25% positive Tiere, im Serum nur 2. Dem stehen 17 der 25 positiven Betriebe im Fleischsaft und 13 der 25 Serum-positiven Betriebe mit einer Seroprävalenz unter 10% gegenüber.

Diese Ergebnisse bestätigen andere Autoren mit ihrer Aussage, dass große Unterschiede zwischen den Betrieben bestehen (WIEGEL et al. 1995; WYSS et al. 2000; FEHLHABER et al. 2003; LUDEWIG et al. 2007). Als Ursachen dafür wird die Bestandsstruktur eines Mastbetriebes genannt. Bestände mit einer großen Tierzahl haben geringere Prävalenzen (FEHLHABER et al. 2003). DAMRIYASA et al. (2004) fanden bei Sauen in der Ferkelproduktion eine größere Zahl *T. gondii*-positiver Tiere als in reinen Aufzucht- oder Mastbetrieben. Das Alter der Tiere scheint eine Rolle zu spielen. Bestände mit älteren Tieren wie z.B. Zuchtsauen haben eine höhere Seroprävalenz.

Weitere Faktoren sind der Zugang von Katzen und Schädigern und anderen Tierarten, die *T. gondii* übertragen können (ASSADI-RAD et al. 1995, GARCIA-BOCANEGRA et al. 2010). Auch die Fütterung scheint eine Rolle zu spielen (DUBEY et al. 1992).

Die in der Literatur beschriebenen Umstände zum Eintrag von *T. gondii* in Schweinbestände können die Unterschiede der Seroprävalenzen in den untersuchten Betrieben dieser Arbeit erklären. Es kamen Bestände mit unterschiedlichen Tierzahlen, unterschiedlichen Haltungssystemen und aus unterschiedlichen geographischen Regionen zur Untersuchung. Im Umkehrschluss lässt sich vermuten, dass durch geeignete Maßnahmen die Zahl der positiven Tiere in einem Bestand gesenkt werden kann (VAN KNAPEN et al. 1995). Zusammengefasst verdeutlichen die Zahlen, dass man nicht von einer einheitlichen Verbreitung in den deutschen Schweinebeständen ausgehen kann und es weiteren Informationsbedarf über den Zusammenhang zwischen den Strukturen der Mastbetriebe und dem Vorkommen von *T. gondii* gibt.

5.3.2. Seroprävalenz von *Y. enterocolitica* in den Betrieben

Alle 41 beprobten Betriebe hatten mindestens einen positiven Reagenten im Serum und im Fleischsaft. Betrieb 36 hatte auf dieser Basis die geringste Seroprävalenz (20%). Die Anzahl der Proben war mit N=5 jedoch niedrig. Die Zahl von 60% als fraglich beurteilten Tieren lässt eine höhere Seroprävalenz innerhalb dieses Betriebes vermuten.

Zusammengefasst ist festzustellen, dass die Anzahl der positiven Reagenten pro Betrieb hoch war. 34 Betriebe hatten im Serum mehr als 50% positive Tiere, mittels Fleischsaft waren es 31. Mehr als 80% positive Tiere pro Betrieb konnten für 30 Bestände über Serum und 18 über Fleischsaft nachgewiesen werden. In 9 Betrieben waren alle Serumproben, in 2 Betrieben alle Fleischsaftproben positiv.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass bei *Y. enterocolitica* von einer hohen Seroprävalenz in den Tierbeständen ausgegangen werden muss. Sie bestätigen andere Autoren, die ebenfalls hohe Prävalenzen in ihren Arbeiten angeben (HENSEL et al. 2004; LANGKABEL 2011; MÜLLER 2010). *Yersinia*-Antikörper sind nach Infektion durch *Y. enterocolitica* zwar sehr lange im Blut der Tiere nachweisbar (NIELSEN et al. 1996), jedoch können auch am Schlachtkörper über die konventionelle Anzucht viele *Y. enterocolitica*-positive Tiere detektiert werden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001). Eventuell muss man tatsächlich davon ausgehen, dass trotz der langen Antikörperpersistenz in den Geweben eine große Zahl der seropositive Tiere den Erreger noch ausscheiden. Zudem lässt sich vermuten, dass wenige infizierte Tiere genügen, um den Erreger innerhalb eines Bestandes zu verbreiten. Dies erklärt auch, warum einfache Maßnahmen wie der Einsatz von Isolierboxen für erkrankte Tiere die Prävalenz für *Y. enterocolitica* innerhalb von Tierbeständen minimieren (FUKUSHIMA et al. 1990). Die Verbreitung von *Y. enterocolitica* in den Schweinemastbeständen, ob Outdoorhaltung oder konventionell sollte weiter untersucht werden, um die Verbreitung des Erregers besser abschätzen zu können.

5.3.3. Seroprävalenz von *Salmonella* in den Betrieben

Untersuchungen von LUDEWIG und FEHLHABER (2001) zeigten mit Betriebsprävalenzen von 0 bis 93,3% eine große Spannweite.

Dieses Ergebnis kann bestätigt werden: auch hier variierten die Seroprävalenzen innerhalb der 41 untersuchten Betriebe. In 15 Betrieben konnte mittels Fleischsaft kein positives Tier gefunden werden, mittels Serum waren es 22 negative Betriebe. In beiden Probenmaterialien betrug die höchste Seroprävalenz 97,1%. Die Unterschiede lassen vermuten, dass der einzelne Schweinemastbetrieb Einfluss auf die *Salmonella*-Prävalenz hat. Dies lässt sich durch verschiedene Autoren bestätigen, die bestandsbezogene Management- und

Hygienemaßnahmen als relevant für den Erregereintrag und die Persistenz im Betrieb erachten (BLAHA 2001; BODE 2007).

Tabelle 4.8 stellt die Ergebnisse der Fleischsaft- und Serumuntersuchung gegenüber. Hierzu wurden die Betriebe den festgelegten Seroprävalenzbereichen zugeordnet. Zusätzlich erfolgte eine Zuordnung zu den drei Kategorien der „Schweine-Salmonellen-Verordnung“. Vergleicht man die Ergebnisse von Fleischsaft und Serum, zeigt sich eine unterschiedliche Anzahl Betriebe in den Kategorien eins, zwei und drei sowie in den selbstgewählten Seroprävalenzbereichen. Dies verdeutlicht, dass das Ergebnis des ELISA und damit auch die Kategorisierung der Betriebe vom Probenmaterial abhängig sind, wobei beide Matrices im Rahmen der Verordnung zugelassen sind. Bereits andere Autoren beschrieben unterschiedliche OD% zwischen Serum und Fleischsaft (RÖSLER et al. 2011; WILHELM et al. 2007). Inwieweit das Probenmedium Einfluss auf die Ergebnisbewertung und damit die Kategorisierung eines Betriebes hat, kann hier nicht abschließend geklärt werden, jedoch sollte diese Frage Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5.4. Seroprävalenzen der Erreger in den untersuchten Bundesländern

Die Auswahl der Bundesländer für diese Arbeit ist auf die regionale Verteilung der Betriebe zurückzuführen, aus denen Tiere zur Beprobung am Schlachthof zur Verfügung standen. Dies begründet auch die unterschiedlichen Probenzahlen in den einzelnen Bundesländern. Die Probenzahlen waren somit nicht repräsentativ und schwer bis gar nicht statistisch miteinander zu vergleichen. Insgesamt bleibt zu berücksichtigen, dass viele Faktoren Einfluss auf die Verbreitung von Erreger haben können. Dazu gehören allgemein die Tierzahl, die Bestandsdichte, klimatische und geografische Bedingungen, die regionale Infrastruktur oder die Betriebsstruktur. Aufgrund dessen wurden die Seroprävalenzen nicht auf Ebene der einzelnen Bundesländer, sondern für die Regionen Alte und Neue Bundesländer verglichen. Aufgrund der unterschiedlichen kulturellen, strukturellen und landwirtschaftlichen Entwicklung beider Regionen erscheint ein Vergleich zumindest nicht abwegig. Die Betrachtung erfolgt statistisch unter Vorbehalt. Somit kann eine regionale Betrachtung, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, nur den Weg für weitere Untersuchungen bereiten.

5.4.1. Seroprävalenz von *T.gondii*

Die Seroprävalenz des Erregers variierte zwischen den Bundesländern. Der Vergleich mit den wenigen Angaben aus der Literatur fiel allerdings schwer. So konnten in der vorliegenden Arbeit in Sachsen-Anhalt keine positiven Tiere gefunden werden. Hier war jedoch die Probenzahl für eine statistische Betrachtung zu gering. Andere Autoren mit größeren Probenaufkommen geben 4,2% für dieses Bundesland an (LUDEWIG et al. 2007).

Niedersachsen stellte den Hauptanteil der Proben, die Anzahl beeinflusst somit das Gesamtergebnis der Untersuchung. Von 1256 mittels Fleischsaft und 1225 mittels Serum untersuchten Tieren waren 8,3% und 10,9% Tiere positiv. LUDEWIG et al. (2007) untersuchten 1591 Mastschweine aus Niedersachsen, von denen mit 1,6% signifikant weniger Tiere ($p < 0,001$) serologisch positiv waren.

Im Vergleich der Alten mit den Neuen Bundesländer wurden sowohl mittels Fleischsaft und Serum signifikant mehr seropositive Tiere in den Alten Bundesländer nachgewiesen ($p < 0,001$). Zieht man die Zahlen anderer Autoren heran und berechnet die Seroprävalenzen für die benannten Gruppen, finden sich keine signifikanten Unterschiede (LUDEWIG et al. 2007). Diese Autoren beschreiben, dass vor allem einzelne Betriebe mit hohen Seroprävalenzen und damit verbundenen Haltungsbedingungen und Managementfaktoren Einfluss auf die Ergebnisse hatten. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Tierbestände mit unterschiedlichen Haltungssystemen untersucht. Inwieweit regionale Bedingungen einen Einfluss auf die Seroprävalenz eines Schweinemastbetriebes haben, kann somit nicht

abschließend geklärt werden. Insgesamt liegt hierzu zu wenig Datenmaterial vor, so dass in diesem Bereich in Zukunft weitere Untersuchungen folgen sollten.

5.4.2. Seroprävalenz von *Y. enterocolitica*

Die hohen Nachweisraten in den einzelnen Bundesländern waren vergleichbar (Abbildung 4.2.). Die Tiere aus Sachsen mit 9,8% im Fleischsaft und 40% im Serum stellen eine Ausnahme dar.

Tabelle 4.12 zeigt die genauen Zahlen der einzelnen Bundesländer und stellt die Ergebnisse gegenüber. Auch hier zeigt sich, dass aufgrund der unterschiedlichen Probenzahlen der einzelnen Bundesländer die Ergebnisse für eine Seroprävalenzstudie nicht repräsentativ sind. Sie vermitteln aber den Eindruck, dass von einem flächendeckenden Vorkommen des Erregers ausgegangen werden muss. Beim Vergleich der Alten mit den Neuen Bundesländern zeigten sich jedoch regionale Unterschiede. Sowohl mittels Fleischsaft als auch mittels Serum wurden statistisch signifikant mehr seropositive Tiere in den Alten Bundesländern detektiert. Das Odds ratio beträgt für die Fleischsaftuntersuchung 2,92 und für die Serumuntersuchung 1,79, was auf eine größere Chance hinweist, ein seropositives Tier in den Alten Bundesländern zu detektieren. Betrachtet man allerdings die vorliegenden Ergebnisse auf Bestandsebene, so bleibt festzuhalten, dass bei jedem der untersuchten Betriebe mindestens ein seropositives Tier gefunden wurde. Die in der Literatur beschriebenen Faktoren zur Ausbreitung von *Y. enterocolitica* innerhalb eines Tierbestandes (FUKUSHIMA et al. 1990) und des kontinuierlichen Anstiegs von seropositiven Tieren im Laufe einer Mastperiode (MÜLLER 2010) zeigen auf, dass man auch bei wenigen positiven Reagenten innerhalb eines Betriebes von einer zunehmenden Seroprävalenz bei späteren Beprobungen ausgehen kann. Es stellt sich somit die Frage, wie aussagekräftig die angegebenen statistischen Unterschiede zwischen den Alten und Neuen Bundesländern sind, wenn man den Umstand hinzu zieht, dass in jedem Betrieb, unabhängig von der Region, seropositive Tiere nachzuweisen waren. Somit lässt sich die Aussage treffen, dass auf das Einzeltier bezogen ein signifikanter Unterschied bestand, bei Betrachtung der Betriebe dies jedoch nicht zutrif.

5.4.3. Seroprävalenz von *Salmonella*

Regionsbezogen fanden sich in Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen und Sachsen-Anhalt Seroprävalenzen über 20%. Die Anzahl der zur Untersuchung gekommenen Tiere variierte jedoch. So wurden aus dem Bundesland Sachsen-Anhalt nur 5 Tiere beprobt. Eine korrekte statistische Betrachtung ist damit unmöglich. Niedersachsen stellte 1274 Fleischsaft- und 1199 Serumproben, die Seroprävalenz lag bei 6,9 (Fleischsaft) und 2,8% (Serum). Eine große

Zahl der untersuchten Tiere lag in dem vom Hersteller des ELISA-Kits angegebenen fraglich zu bewertenden Bereich. Dies könnte Einfluss auf die abschließenden Ergebnisse zur Seroprävalenz gehabt haben (Tabelle 4.13).

Auch für *Salmonella* wurde aufgrund der vorliegenden Probenzahlen pro Bundesland die vergleichende Betrachtung der Gruppen Alte und Neue Bundesländer gewählt. Diese Betrachtung kann auch aufgrund der historisch bedingten, strukturellen Unterschiede der Schweinemastbetriebe in beiden Regionen sinnvoll sein. In den Neuen Bundesländern entwickelten sich eher als in den Alten Bundesländern Betriebe mit größeren Tierzahlen und auch die Betriebsdichte in den Neuen Bundesländern ist geringer (SÄCHSISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT 2001).

Tatsächlich stellte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen heraus. Sowohl bei der Untersuchung des Fleischsafts wie auch des Serums waren signifikant mehr Tiere in den Neuen Bundesländern positiv ($p < 0,001$). Die Chance, ein positives Tier in den Neuen Bundesländern zu detektieren, war mittels Fleischsaft 3,07 mal, mittels Serum 5,97 mal so hoch. Diese Ergebnisse decken sich nicht mit den Daten der zuvor untersuchten Erreger. In der Literatur finden sich zahlreiche Angaben der Seroprävalenz von *Salmonella* bezogen auf die gesamte Bundesrepublik (BfR 2008) wie auch auf einzelne Bundesländer (CZERNY et al. 2001; LUDEWIG et al. 2001, PENNER 2004). Diese Untersuchungen zielten jedoch nicht auf den Vergleich mit anderen Regionen ab, so dass es schwer fällt, die eigenen Daten sicher mit denen aus der Literatur zu vergleichen. Gleichwohl stehen eine Vielzahl an Daten auch durch die Monitoringprogramme zur Verfügung, deren Auswertung in Hinblick auf den Vergleich der Seroprävalenz der Alten und Neuen Bundesländer interessant wären, jedoch aufgrund des gewählten Schwerpunktes der vorliegenden Arbeit in dem Umfang nicht möglich waren. Somit stellt sich auch für zukünftige Arbeiten die Frage, in wie weit der strukturelle Unterschied zwischen den Alten und Neuen Bundesländern einen Einfluss auf die Seroprävalenzen von *Salmonella* hat.

5.5. Seroprävalenzen der Erreger bezogen auf die Haltungssysteme

Die Diskussion um die intensive Nutztierhaltung in Bezug auf artgerechtere und dem Tierschutzgedanken angepasste Haltungen fördert auch die Outdoorhaltung. Verschiedene Untersuchungen kommen zu dem Schluss, dass die Prävalenz von Zoonoseerregern wie *T. gondii* und *Salmonella* in Outdoorhaltung ansteigt (KIJLSTRA et al. 2004; V.D. GIESSEN et al. 2007; GEBREYES et al. 2008; DAVIES 2011). Andere Autoren fanden für *Salmonella* keinen Hinweis auf steigende Prävalenzen in Outdoorbeständen (CALLAWAY et al. 2005).

5.5.1. Vergleich Outdoor-Indoor-Haltung

Fasst man die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zusammen, ergaben sich für *T. gondii* mit 7,1% (Fleischsaft) und 9,6% (Serum) signifikant höhere Gesamtseroprävalenzen in Outdoor- im Vergleich zu konventionellen Haltungs- und Mastsystemen (3,8% seropositive Tiere, LUDEWIG et al. 2007). In den Niederlanden gelang es in konventioneller Haltung, die Seroprävalenz sogar gegen 0% zu senken (VAN KNAPEN et al. 2005). SCHULZIG und FEHLHABER (2005) untersuchten 3 konventionelle Aufzucht- und Mastbetriebe sowie einen ökologisch arbeitenden Betrieb: die Seroprävalenz der konventionellen Betriebe lag bei 5,6%, die des ökologischen Betriebs hingegen bei 0%. Dieses Ergebnis widerspricht einer Reihe anderer Autoren, die durch die naturnahe Haltung und den freien Zugang von Ungeziefer, Nagetieren und Katzen eine potentielle Gefahr für den Eintrag des Erregers sehen (ASSADI-RAD et al. 1995, GARCIA-BOCANEGRA et al. 2010; PATTON et al. 1999; WEIGEL et al. 1995). Dieser Einfluss konnte jedoch nicht in jeder Studie belegt werden (DAMRIYASA et al. 2005). Auch die eigenen Untersuchungen decken sich mit Aussagen aus der Literatur, dass allein durch die Haltungsbedingung gegebenenfalls keine Rückschlüsse auf das Vorkommen von *T. gondii* gezogen werden können, sondern vielmehr der Einzelbetrieb betrachtet werden muss (HINTERSDORF 2013). So liegen auch bei der eigenen Untersuchung die Betriebsseroprävalenzen bei 0% bis 100%.

Die Prävalenz von *Y. enterocolitica* in der konventionellen Schweinehaltung wird von LANGKABEL (2011) mit 62,9% bei 1773 Tieren angegeben. Mit 66,2% mittels Fleischsaft positiv getesteten Tieren ist für *Y. enterocolitica* in dieser Untersuchung eine signifikant höhere Gesamtseroprävalenz im Vergleich zu konventionell gehaltenen Tieren zu erkennen (mittels Chi-Quadrat-Test, Vergleich der Zahl untersuchten und seropositiven Tiere beider Arbeiten, $p=0,038$). Gleiches gilt für die Serumuntersuchung mit 82,4% positiven Tieren ($p<0,001$). Auch bei der Untersuchung von MÜLLER (2010) waren trotz der hohen Zahl seropositiver Tiere signifikant weniger Tiere positiv als bei den eigenen Untersuchungen ($p<0,001$). Bestätigt werden diese Aussagen durch die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung von FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001), die mit 60% positiven von 50 getesteten Tieren ($p<0,001$) ebenfalls signifikant weniger positive Tiere angegeben. Von

verschiedenen Autoren wird beschrieben, dass bestimmte Betriebssituationen Einfluss auf die *Y. enterocolitica*-Prävalenz in einem Betrieb haben können. Dazu gehören Faktoren wie Schadnager, Vögel oder Strohhaltung (FOSSE et al. 2009; MÜLLER 2010), die aufgrund der naturnahen Haltung in ökologisch arbeitenden oder Outdoorbetrieben häufiger anzutreffen sind als in einer konventionellen Schweinehaltung. Eine größere Verbreitung von *Y. enterocolitica* ist in dieser Art der Schweinemast also denkbar, obgleich auch in der konventionellen Schweinehaltung von einer hohen Seroprävalenz ausgegangen werden muss. Weitere Untersuchungen mit dem Vergleich der Haltungsbedingungen sollten erfolgen, um die Ergebnisse der eigenen Untersuchung zu bestätigen oder zu widerlegen.

Die in dieser Arbeit ermittelte Gesamtseroprävalenz der Outdoor-Betriebe für *Salmonella* beträgt 9,6% (Fleischsaft) und 6,0% (Serum) und liegt damit deutlich unter den Ergebnissen des Bundesinstituts für Risikobewertung mit 32,3% aus einer Erhebung aus dem Jahr 2008 (BfR 2008). MÜLLER (2010) beprobte in seiner Untersuchung dieselben Tiere eines konventionelle Betriebes zweimal zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Mast und fand eine Gesamtseroprävalenz von 6,8% und 10,8% bei einem Cut'off von $\geq 20\text{OD}\%$. Somit zeigt sich, dass der korrekte Vergleich der Daten unterschiedlicher Untersuchungen neben den Haltungsbedingungen auch von weiteren Faktoren abhängig ist. In einer älteren Arbeit von PENNER (2004) wurde eine ähnliche Gesamtprävalenz von 6,5% bei 1920 untersuchten Tieren beschrieben. Allerdings wurden im Vergleich zur eigenen sowie zur Arbeit von MÜLLER (2010) alle Tiere mit einer $\text{OD}\% \geq 40\%$ als positiv bewertet, was den Vergleich der Daten erschwert. Zusammenfassend bestätigt die vorliegende Arbeit die Untersuchung von anderen Autoren. Auch CALLAWAY et al. (2005) fanden keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz von *Salmonella* zwischen konventioneller und Outdoorhaltung. Dies widerspricht den Ergebnissen von GEBREYES et al. (2008), die signifikant höhere Prävalenzen in der Outdoor/ABF-Haltung fanden. Dies würde Bestätigung finden in einer Arbeit von MEYER (2004), in der der Übertrag von Salmonellen auf das Erdreich, aber auch auf die Tränken und das Futter eine wichtige Rolle für ein erhöhtes Salmonellenrisiko für Schweine in Freilandhaltungen spielt. Die beschriebenen Unterschiede der Probenentnahmezeitpunkte, der Nachweismethoden und des Cut'offs machen einen Vergleich der einzelnen Studien jedoch schwierig.

Zudem zeigt sich die Abhängigkeit der Gesamtseroprävalenz von einzelnen Betrieben. Die Betriebsseroprävalenzen der 41 Einzelbetriebe variierten stark. Für *T. gondii* lag die Spanne der Betriebsseroprävalenzen von 0 bis 100%, bei *Y. enterocolitica* von 4,3 bis 100% und für *Salmonella* von 0 bis 97%.

5.5.2. Haltung in Aufzucht und Mast

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen auch unterschiedliche Lebensabschnitte der Tiere in unterschiedlichen Haltungssystemen zur Untersuchung. Zwar lagen Angaben zu den Betrieben nur im begrenzten Rahmen vor. Bekannt waren allerdings die Boden- und Einstallungsformen in Aufzucht und Mast. Somit wurde anschließend eine vergleichende Untersuchung folgender Haltungskombinationen (Aufzucht-Mast) durchgeführt:

1. Beton-Beton
2. Beton-Freiland
3. Freiland-Beton
4. Freiland-Hütten
5. Freiland-Stall
6. Freiland mit Hütten-Beton
7. Gras-Gras
8. Hütten-Beton
9. Hütten-Stall
10. Stall-Stall

Für die statistische Auswertung wurden die Aufzucht und die Mast auf Ebene der Betriebsseroprävalenzen getrennt voneinander mittels des exakten Tests nach Fischer betrachtet. Dabei zeigte sich für die Fleischsaftuntersuchung auf *T. gondii* mit $p=0,7883$ für die Aufzucht und $p=0,6756$ für die Masthaltung kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Haltungsformen. Bei der Bewertung der Serumergebnisse errechneten sich jedoch signifikante Unterschiede, sowohl für die Haltungen in der Aufzucht und in der Mast. Wie bei den eigenen Ergebnissen wird auch von anderen Autoren beschrieben, dass die Serumuntersuchung sensitiver als die der Fleischsaftproben ist (RÖSLER et al. 2011; WILHELM et al. 2007). Das könnte die gegenläufigen Ergebnisse von der Fleischsaft- und der Serumuntersuchung erklären. Somit ist nicht ausgeschlossen, dass die Art der Haltung innerhalb der Gruppe „Outdoorhaltung“ ebenfalls Einfluss auf die *T. gondii*-Seroprävalenz hat. Das bedeutet zum einen, dass der oberflächliche Vergleich zwischen konventioneller und Outdoorhaltung ohne genauer Definition des Begriffs „Outdoor“ in unterschiedlichen Studien nur bedingt aussagekräftig ist und zum anderen in zukünftigen Untersuchung weiter geklärt werden sollte, welche Outdoorhaltungsformen zu einem größeren Risiko von *T. gondii* in den Schweinebeständen führen können.

Anders stellte es sich bei *Y. enterocolitica* dar. Da alle Betriebe seropositiv bewertet wurden, war eine statistische Berechnung nicht möglich. Somit muss anhand der vorliegenden Daten davon ausgegangen werden, dass es keinen Unterschied zwischen den benannten

Haltungsarten gibt. In der Literatur werden jedoch unterschiedliche Haltungs- und Managementfaktoren beschrieben, die einen Einfluss auf die *Y. enterocolitica*-Prävalenz in einem Schweinebestand haben (FOSSE et al. 2009; MÜLLER 2010), weshalb weitere Untersuchungen notwendig sind um zu beurteilen, ob die Aussage der eigenen Untersuchung bestätigt werden kann.

Für *Salmonella* konnten weder unter statistischer Bewertung der Fleischsaft- noch der Serumergebnisse signifikante Unterschiede zwischen den Haltungsformen gefunden werden. Es ist bekannt, dass viele Hygiene- und Managementmaßnahmen Einfluss auf den Erreger in einem Schweinemastbetrieb haben (BLAHA 2001; BODE 2007). Es ist zu vermuten, dass auch die Haltungsart dazu gehört, im Gesamtkonstrukt eines Schweinebestandes aber nur einer von vielen Faktoren ist.

Insgesamt muss davon ausgegangen werden, dass die Haltungsart nicht allein für das Auftreten von bestimmten Keimen verantwortlich ist. Nutztierbetriebe, besonders wenn es sich um Outdoorhaltungen handelt, müssen als Bestandteil ihrer gesamten Umwelt gesehen werden, so dass neben der Bodenbeschaffung auch andere belebte und unbelebte Vektoren für den Eintrag und die Persistenz von Zoonoseerregern verantwortlich sind. Auch die Interaktion zwischen den Zoonoseerregern untereinander ist nicht hinreichend geklärt und sollte Thema weiterer Untersuchungen sein.

5.6. Bewertung der Ergebnisse eines ELISA

Die ELISA-Technik hat sich als schnelles Diagnostik- und Untersuchungsverfahren für große Tierzahlen etabliert. Testverfahren für eine Vielzahl von tierpathogenen und Zoonoseerregern sind technisch möglich. Es bleibt zu klären, wie mit der Flut an gewonnenen Daten umgegangen werden kann.

Es ist bekannt, dass ELISA-Kits für *Salmonella* unterschiedlicher Hersteller zu unterschiedlichen OD% führen (RÖSLER et al. 2011; VICO et al. 2010). Bei nicht eindeutigen OD%-Werten kann es bei festgelegtem Cut'off zur Bewertung einer Probe kommen, die durch die Festlegung des Herstellers und nicht durch die Gegebenheit bedingt ist. Ist ein Cut'off von 20% angegeben, bedeutet dies, dass Tiere mit einer OD% <20 negativ, mit einer OD% ≥20 positiv für den jeweiligen Erreger zu bewerten sind. Dies kann bedeuten, dass Proben mit grenzwertigen Ergebnissen um die 20 OD%, oder eine jeweils andere als Cut'off gewählte OD, je nach benutztem Kit positiv und negativ bewertet werden können.

Gleiches gilt für das Probenmaterial. In der vorliegenden Arbeit wurden von allen Tieren Fleischsaft- und Serumproben entnommen und untersucht. Die Ergebnisse sind nicht immer identisch, was die Aussagen anderer Autoren bestätigt (DAVIES 2003; WILHELM et al. 2007; RÖSLER et al. 2011). Dies kann zu unterschiedlichen Bewertungen eines Tieres mittels Serum und Fleischsaft führen.

Die Bewertung der Ergebnisse fällt somit schwer. Auf Grund des nicht geringen Anteils fraglicher Tiere bei den Untersuchungen auf Yersinien und Salmonellen ist zu entscheiden, wie mit diesen Zahlen umgegangen werden soll.

Mit dem Gedanken der präventiven Tiermedizin verbunden sind Monitoring- und „Surveillance“-Programme zur Kontrolle von Betriebsprävalenzen und von Managementmaßnahmen zur Keimreduzierung, was zur Eindämmung von „foodborne diseases“ beitragen kann. Der ELISA stellt hierzu ein geeignetes Untersuchungsverfahren dar. Da der ELISA als ungeeignet für die Einzeltierdiagnostik angesehen wird (NOLLET et al 2005), kann nur die Bestandskategorisierung anhand der Bewertung der Einzeltiere in negativ und positiv sinnvoll sein, beziehungsweise sind die Ergebnisse vor dem Hintergrund der vorher festgelegten Kategorisierung des Testkits zu interpretieren.

Die Prävalenzen der Bestände werden über die Anzahl an positiven und negativen Tieren ermittelt. Zusätzlich kann eine Bewertung durch die Kategorisierung der Schweinebestände vorgenommen werden (am Beispiel der Schweine-Salmonellen-VO). Wie beschrieben sind diese Prävalenzen zum Teil abhängig vom benutzten Test-Kit und vom Probenmedium.

Denkbare weitere Bewertungsansätze wären auch die Voll-Negativität eines Betriebes oder auch die Bewertung des Ergebnisses unter Anlegen eines höheren Cut'off (LANGKABEL 2011). Auch die Kombination von Doppelbefunden aus Fleischsaft und Serum wäre möglich. Tiere, die in Fleischsaft und Serum positiv waren, können eindeutig als positiv bewertet werden. Tiere, die in beiden Materialien negativ waren, gelten als negativ. Alle anderen müssen als fraglich eingestuft werden. Angeschlossen werden könnte eine Nachbeprobung.

5.7. Beispiel einer vom Hersteller-Cut'off unabhängigen Bewertung in 2 Schritten

In der folgenden Bewertung und Kategorisierung wurden Einzeltierergebnisse nicht berücksichtigt. Betrachtet wurden nicht die Tiere eines Bestandes, sondern der Betrieb als solcher. Dies beinhaltet die Möglichkeit, verschiedene Kategorien zu generieren.

5.7.1. Bestandsbewertung mittels Median der OD%-Ergebnisse des Einzelbetriebs

Es wird der Median aller OD% der Einzeltierergebnisse berechnet. Der erhaltene Wert gibt den OD% des Bestandes wieder.

Mittels Median als statistischem Mittel fallen Einzeltiere mit Ausreißerwerten bei der Bewertung weniger ins Gewicht. Fragliche Bestände, die viele Einzeltierergebnisse knapp ober und unterhalb des Cut'off haben, können in der Folge einem OD-Wert zugeordnet werden. Dies kann den Vergleich der Bestände untereinander sowie die Einteilung in Risikogruppen oder Kategorien erleichtern.

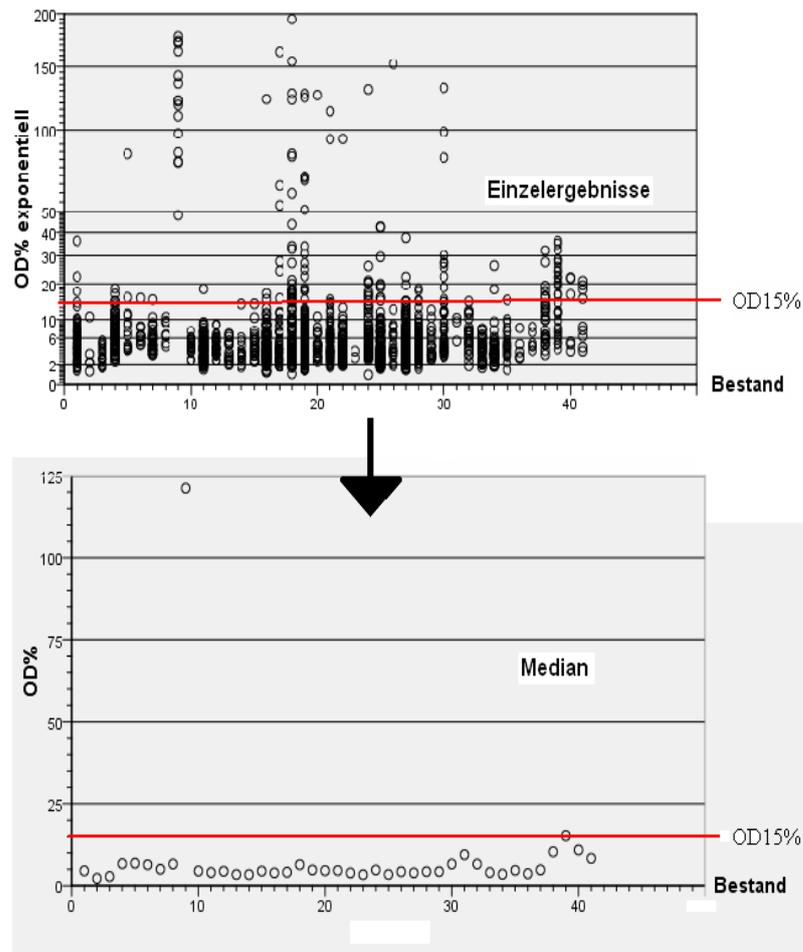


Abbildung: 5.1.: vergleichende Darstellung der Einzeltier OD% für *T. gondii* aller 41 Bestände mit den Medianen der OD%

Die Abbildung 5.1. stellt den Schritt vom OD% der Einzeltiere zum OD% der Betriebe am Beispiel der Fleischsaftuntersuchung auf *T. gondii* aller 41 Betriebe graphisch dar. Die Abbildung verdeutlicht, wie der Median die Beurteilung und den Vergleich der Betriebe untereinander vereinfacht. Anstelle einer Masse an Einzeltierergebnissen ergibt sich für jeden Bestand ein Wert und es lässt sich direkt erkennen, dass die Mehrzahl aller Einzelproben unterhalb des Cut'off liegen und nur in 2 Beständen die Mehrzahl der Tiere positiv für *Toxoplasma* sind (hohe Prävalenz). Eine Aussage, wie sich die positiv getesteten Einzeltiere auf alle Beständen verteilen, lässt sich nur in Kombination beider Graphen der Abbildung 5.7. treffen.

5.7.2. Erstellung und Nutzung eines Kategorisierungsschlüssels mittels TG-ROC

Der über den Median der Einzeltier-OD% berechnete OD% des Betriebes wird in der Folge anhand eines Kategorisierungsschlüssel in Risikostufen eingeteilt. Diese Risikostufen werden durch OD%-Bereiche abgeleitet, die durch die TG-ROC des ELISA-Kits ermittelt werden. Die TG-ROC gibt an, wie sensitiv und spezifisch der ELISA bei einer bestimmten OD% ist. Daraus ergibt sich prinzipiell der vom Hersteller des ELISA-Kits angegebene Cut'off Wert bei einer OD% mit einem optimalen Kompromiss aus Sensitivität (Se) und Spezifität (Sp). Prinzipiell gilt, je spezifischer der Test, desto weniger sensitiv ist er und umgekehrt. Dies bedeutet, dass wenn ein Betrieb einen hohen OD%-Wert hat, dieser in einen Bereich des Kategorisierungsschlüssels fällt, der eine hohe Spezifität, aber eine geringere Sensitivität besitzt. Somit ist das Risiko, dass dieser Betrieb positiv für den Erreger ist, hoch.

Der hier vorgestellte Kategorisierungsschlüssel ist ein Beispiel und orientiert sich an der Einteilung von LANGKABEL (2011). Neu ist die Begründung der einzelnen Kategorien durch die Spezifität und Sensitivität der einzelnen OD%-Grenzen, ermittelt mit der TG-ROC der einzelnen ELISA-Kits. Dies bedeutet, dass man auf die TG-ROC-Daten des ELISA-Herstellers angewiesen, oder eine TG-ROC-Analyse des genutzten ELISA-Kits im Vorfeld der Bewertung unumgänglich ist, da sie eine definierte Einteilung der Kategorien ermöglicht. Abbildung 5.2., 5.3. und 5.4. stellen die drei für die vorliegende Arbeit erstellten und genutzten Kategorisierungsschlüssel vor. Die Spalte „OD%Bestand“ gibt die OD%-Grenzen der einzelnen Kategorien an. Die Werte wurden durch die TG-ROC der einzelnen Testkits ermittelt. Der Spalte „Begründung mit TG-ROC“ sind die Werte der Sensitivität (Se) und Spezifität (Sp) des Testkits an dem jeweiligen OD%-Wert zu entnehmen. Die hier festgelegten Grenzen sind als Beispiel anzusehen und können je nach beabsichtigter Gewichtung und Fragestellung nach Sensitivität oder Spezifität frei gewählt werden.

OD% Bestand (Median)	Kategorie	Begründung mit TG-ROC
≤15	Risikoarm	θ_0
≤20	geringgradiges Risiko	Se 0,7; Sp 1
≤26	mittelgradiges Risiko	Se 0,5; Sp 1
≤40	hochgradiges Risiko	Se 0,3; Sp 1
>40	extrem hochgradiges Risiko	Se 0,0; Sp1

Abbildung 5.2.: Kategorisierungsschlüssel für *T. gondii*

OD% Bestand (Median)	Kategorie	Begründung mit TG-ROC
≤20	Risikoarm	θ_0
≤40	geringgradiges Risiko	Se 0,75; Sp 1
≤55	mittelgradiges Risiko	Se 0,5; Sp 1
≤70	hochgradiges Risiko	Se 0,3; Sp 1
>70	extrem hochgradiges Risiko	Se 0,0; Sp1

Abbildung 5.3.: Kategorisierungsschlüssel für *Y. enterocolitica*

OD% Bestand (Median)	Kategorie	Begründung mit TG-ROC
≤20	Risikoarm	θ_0
≤33	geringgradiges Risiko	Se 0,75; Sp 1
≤45	mittelgradiges Risiko	Se 0,5; Sp 1
≤70	hochgradiges Risiko	Se 0,3; Sp 1
>70	extrem hochgradiges Risiko	Se 0,0; Sp1

Abbildung 5.4.: Kategorisierungsschlüssel für *Salmonella*

Es ist zu bedenken, dass, entgegen den hier vorliegenden Beispielen, für gewöhnlich die Spezifität mit sinkender Sensitivität steigt. Dass dies hier nicht der Fall ist, könnte an der Berechnung der TG-ROC, die mittels eigener Daten am Bundesinstitut für Risikobewertung anhand serologischer Ergebnisse und nicht wie erforderlich mittels mikrobiologischer Daten durchgeführt wurde, liegen. Der genaue Kurvenverlauf der TG-ROC-Analyse durch den Kit-Hersteller war nicht verfügbar und könnte von den für diese Arbeit vorliegenden Graphen abweichen. Daher sind die hier vorgestellten Grenzen und Werte rein beispielhaft.

Ein derartiges Bewertungssystem ermöglicht einen objektiven Vergleich zwischen Ergebnissen aus unterschiedlichen Betrieben, da die Einteilung von der Anzahl deutlich positiver Tiere abhängig ist und die Faktoren ELISA-Kit-Hersteller und Probenmaterial, die zu unterschiedlichen Prävalenzen führen konnten, bei dieser Art der Bewertung an Gewichtung verlieren. Die Gefahr falsch-positiver oder –negativer Bewertungen von Einzeltieren und die damit verbundene Fehlbewertung der Seroprävalenz ist somit niedriger. Die Einteilung in Risikostufen berücksichtigt, dass einzelne Tiere trotz risikoarm beurteilter Bestands-OD% serologisch positiv sein können.

Ein weiterer Vorteil der Nutzung einer TG-ROC zur Erstellung eines Kategorisierungsschlüssels könnte darin liegen, dass im Rahmen von Verlaufskontrollen nach Maßnahmen zur Keimreduzierung, die Bestandsbewertung neu angegangen werden kann: Wenn im Rahmen eines regionalen Monitoringprogrammes „hochgradige Risiko“-Mastbetriebe in der Folge von Bestandsuntersuchungen und Keimreduzierungsmaßnahmen zu einem „geringgradigen Risiko“ eingestuft wurden, können die Kategorien durch Anpassung der Sensitivität und Spezifität verfeinert werden. Die Folge wäre eine genauere Suche nach Problembetrieben und eine angepasste Zielsetzung innerhalb einer Region.

5.7.3. Neubewertung der Betriebe

Beispielhaft werden die mittels Hersteller Cut'off erarbeiteten Ergebnisse für die Betriebe (Einteilung in positiv und negativ) mit der neu vorgestellten Mediankategorisierung verglichen.

5.7.3.1. T. gondii

Bislang wurden Betriebe mit mindestens einem positiv gewertet Tier in beiden Probenmedien (Serum und Fleischsaft) als positiv kategorisiert, das waren 19. Weitere 6 Betriebe waren im Serum, aber nicht im Fleischsaft und weitere 6 Betriebe waren im Fleischsaft, aber nicht im Serum positiv. Somit waren 12 Betriebe aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse in den

Probenmedien nicht sicher zuzuordnen. Die restlichen 10 Betriebe waren in beiden Medien übereinstimmend negativ.

Unter Verwendung des Medians der OD%, waren mittels Serum und Fleischsaft jeweils 2 der positiv bewerteten Betriebe besonders auffällig.

Betrieb 9 weist nach herkömmlichem Verfahren eine Seroprävalenz von 100% auf. Dieser Betrieb wurde nach Mediankategorisierung als „extrem hochgradiger Risiko“-Betrieb bezeichnet, was die hohe Seroprävalenz bestätigt. Betrieb 39 wurde mit „geringgradigem Risiko“ im Fleischsaft, Betrieb 30 als „geringgradiges Risiko“ im Serum bewertet. Die anderen, mittels herkömmlicher Bewertung als positiv beurteilten Betriebe hatten zwar einzelne positive Tiere, wurden aber aufgrund der OD% der Einzeltierergebnisse (nahe dem Hersteller Cut'off) oder der geringen Anzahl an Reagenten als „risikoarm“ kategorisiert (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Anzahl der Betriebe je Kategorie für Serum und Fleischsaft (Mediankategorisierung)

OD% Bestand (Median)	Kategorie	Anzahl Betriebe Serum	Anzahl Betriebe Fleischsaft
≤15	Risikoarm	39	39
≤20	geringgradiges Risiko	1	1
≤26	mittelgradiges Risiko	0	0
≤40	hochgradiges Risiko	0	0
>40	extrem hochgradiges Risiko	1	1

Es lässt sich zusammenfassen, dass bei der Beurteilung der Ergebnisse mit dem Hersteller-Cut'off 19 Betriebe in Serum und Fleischsaft als positiv gewertet wurden. Dem gegenüber stehen mittels Mediankategorisierung im Serum und Fleischsaft lediglich je 2 Bestände die mit einem erhöhtem „Risiko“ bewertet wurden. Dies erklärt sich daraus, dass die positiven Einzeltierergebnisse dicht am Hersteller-Cut'off liegen. Die Bewertung mittels Hersteller-Cut'off ist deutlich sensitiver, aufgrund der „Unsicherheit“ der Einzeltierergebnisse (DAVIES 2003; NOLLET et al. 2005; WILHELM et al. 2007; RÖSLER et al. 2011) ist sie möglicherweise nicht sehr spezifisch. Ein Nachteil der Mediankategorisierung ist jedoch, dass nicht ersichtlich ist, wie viele Tiere nahe dem Hersteller-Cut'off lagen und als positiv zu bewerten waren. Handelt sich um eine größere Anzahl Proben, wird das Ergebnis mittels OD%-Median des Betriebs besser dargestellt, als es tatsächlich ist. Dies ist allerdings das Prinzip des Medians.

5.7.3.2. *Y. enterocolitica*

Mittels Hersteller-Cut'off hatten alle 41 Betriebe mindestens ein als positiv zu bewertendes Tier im Serum und Fleischsaft. Somit waren nach herkömmlicher Betrachtung alle 41 Bestände positiv.

Zusammengefasst konnten mit dem Serum deutlich höhere Bestandsseroprävalenzen als mittels Fleischsaft erfasst werden. Es gilt jedoch für beide Matrices, dass die Betriebsseroprävalenzen sehr hoch waren.

Mittels Mediankategorisierung wurden 7 Betriebe nach Untersuchung des Serums und 10 nach Untersuchung des Fleischsafts als „risikoarm“ bewertet. Somit konnten 34 (Serum) und 31 (Fleischsaft) Betriebe höheren Risikokategorien zugeordnet werden. Die Tabelle 5.2 gibt einen Überblick über die Kategorien.

Tabelle 5.2: Anzahl der Betriebe je Kategorie für Serum und Fleischsaft (Mediankategorisierung)

OD% Bestand (Median)	Kategorie	Anzahl Betriebe Serum	Anzahl Betriebe Fleischsaft
≤20	Risikoarm	7	10
≤40	geringgradiges Risiko	6	24
≤55	mittelgradiges Risiko	14	6
≤70	hochgradiges Risiko	12	1
>70	extrem hochgradiges Risiko	2	0

Im Vergleich zur Untersuchung auf *T. gondii* werden die Betriebe nicht zwangsläufig besser, sondern vielmehr aufgrund der Einteilung in Risikokategorien differenzierter dargestellt. Hält man sich allein an den Hersteller-Cut'off, würden alle Bestände als positiv beurteilt. Somit lässt sich die Aussage treffen, dass, obwohl alle Betriebe *Y. enterocolitica* positiv sind (Beurteilung mittels Hersteller-Cut off), 7 (Serum), beziehungsweise 10 (Fleischsaft) Betriebe weniger Probleme mit dem Erreger hatten. Dies zeigt auch, dass durch die Kombination beider Bewertungsverfahren eine genauere Analyse der Bestände möglich war.

5.7.3.3. *Salmonella*

Hier werden die Ergebnisse zusätzlich in die 3 Kategorien der Schweine-Salmonellen-Verordnung eingeteilt (Tab. 4.10).

Im Rahmen der Untersuchung mittels Hersteller-Cut'off hatten 15 mittels Fleischsaft getestete Betriebe eine Seroprävalenz von 0%. Sie sind somit als *Salmonella*-negativ einzustufen. 18 Betriebe hatten im Fleischsaft eine Seroprävalenz zwischen 1% und 20%, was zusammen mit den 15 negativen Betrieben 32 Betriebe nach Kategorie 1 nach der Schweine-Salmonellen-Verordnung ergibt. 4 Betriebe müssen Kategorie 2 und 4 weitere Kategorie 3 der SchwSalmoV zugeordnet werden.

Im Serum hatten 22 Betriebe eine Seroprävalenz von 0%, bei 14 Betrieben lag die Seroprävalenz zwischen 0% und 20%, was zusammen 36 Betriebe in Kategorie 1 der SchwSalmoV ergibt. 3 Betriebe zählten zur Kategorie 2, 2 weitere zur Kategorie 3. Im Fleischsaft wurden 4 Betriebe als positiv bewertet, die im Serum negativ waren.

Nach Mediankategorisierung gehörten mittels Serumproben 37 Betriebe in die Kategorie „Risikoarm“. Betrieb 10 und 30 hatten eine Einstufung für ein „geringgradiges Risiko“, Betrieb 13 wurde als „mittelgradiges Risiko“, Betrieb 12 als „extrem hochgradiges Risiko“ eingestuft. Die beiden letztgenannten Betriebe hatten bei Betrachtung der Einzeltielergebnisse mittels Hersteller-Cut'off die höchste Prävalenz im Serum.

Die Fleischsaftergebnisse der Mediankategorisierung ergaben 34 „risikoarme“ Betriebe, 3 Betriebe mit einem „geringgradigen Risiko“, 1 mit einem „mittelgradigen Risiko“, 2 mit einem „hochgradigen Risiko“ und 1 mit „extrem hochgradigen Risiko“ (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3: Anzahl der Betriebe je Kategorie für Serum und Fleischsaft (Mediankategorisierung)

OD% Bestand (Median)	Kategorie	Anzahl Betriebe Serum	Anzahl Betriebe Fleischsaft
≤20	Risikoarm	37	34
≤33	geringgradiges Risiko	2	3
≤45	mittelgradiges Risiko	1	1
≤70	hochgradiges Risiko	0	2
>70	extrem hochgradiges Risiko	1	1

Vergleicht man die Untersuchung mittels Hersteller-Cut'off (inklusive Einteilung in die Kategorien der SchwSalmoV) mit der Mediankategorisierung, sind die Bewertungen der Betriebe ähnlich. 36 Bestände wurden mittels Hersteller-Cut'off und 37 mittels Mediankategorisierung der jeweils niedrigsten Bewertungsstufe zugeordnet. Dies gilt auch für die Fleischsaftuntersuchung mit 33 (Hersteller-Cut'off) und 34 (Mediankategorisierung)

Betriebe. Zudem wird der Betrieb 13 mittels Serum und Fleischsaft in Kategorie 3 nach SchwSalmoV (Hersteller-Cut'off), sowie als „extrem hochgradiges Risiko“ (Mediankategorisierung) eingestuft (Vergleich Tabelle 4.18 und Tabelle 5.3).

Zusammenfassend muss das vorgestellte Verfahren der Mediankategorisierung der Schweinebetriebe als alleiniges Werkzeug kritisch betrachtet werden. Für *T. gondii* zeigt sich, dass nur die Bewertung von Mediankategorisierung in Kombination mit den Ergebnissen mittels Hersteller-Cut'off den Sachverhalt adäquat wiedergibt. Wie die Untersuchung auf *Y. enterocolitica* zeigt, ist nur durch die Mediankategorisierung eine differenzierte Betrachtung aller positiven Betriebe möglich. Die Untersuchung auf *Salmonella* zeigt, dass sich beide Bewertungsverfahren gegenseitig bestätigen können.

Um einer beschönigten Bewertung durch die Mediankategorisierung entgegen zu wirken, wird die Kategorie mit dem niedrigsten OD% „Risikoarm“ benannt, da der Begriff realistisch ist. Es ist davon auszugehen, dass einzelne Tiere positiv für den nachzuweisenden Erreger sind, die Betriebssituation insgesamt aber dennoch gut ist. Der Vorteil des vorgestellten Kategorisierungsschlüssels ist darin zu sehen, dass die OD%-Grenzen mit bekannten Auswirkungen auf die Sensitivität und Spezifität der Analyse angepasst und eine aussagekräftigere Untersuchung durchgeführt werden kann.

5.8. Implementierung der Bestandsbewertung als Monitoringprogramm in die Lebensmittelkette

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden alle Proben am Schlachtbetrieb gewonnen. Die Entnahme von Fleischproben ist durch die Untersuchung auf *Trichinella spiralis* und die Beprobung auf *Salmonella* etabliert. Mittels ELISA können Proben in aussagekräftiger Stückzahl in vertretbar kurzer Zeit untersucht werden.

Das vorgestellte Bewertungssystem der Mediankategorisierung ermöglicht eine einfache, schnelle und anschauliche Ergänzung neben der herkömmlichen Analyse der Bestandssituation.

Regelmäßige Kontrollen in bestimmten Abständen, ob im Rahmen offizieller Monitoringprogramme oder durch den Landwirt selbst, ermöglichen es, das Zoonoseprofil eines Bestandes zu erstellen, Hygiene- und Managementmaßnahmen können somit reflektiert werden. Gerade die Erfassung mehrere Zoonoseerreger ermöglicht es, sich ein genaues Bild der Betriebssituation zu verschaffen.

Bei Verlaufsuntersuchungen kann das Bewertungssystem in Kombination mit einer TG-ROC-Analyse den neuen Bestandsgegebenheiten bezüglich Sensitivität und Spezifität angepasst werden.

Im herkömmlichen Verfahren werden anhand des jeweiligen Hersteller-Cut'offs die Einzeltierergebnisse negativ oder positiv bewertet. Bei Werten nahe dem Cut'off kann es bei unterschiedlichen Probenmedien bei den gleichen Tieren zu unterschiedlichen Bewertungen kommen, was zu unterschiedlichen Ergebnissen innerhalb eines Betriebes in Serum und Fleischsaft führen kann. Auch ist die Bewertung abhängig vom verwendeten ELISA-Kit. Die Nutzung eines Cut'off als Grenze zwischen positiv und negativ stellt zwar einen optimalen Kompromiss zwischen Sensitivität und Spezifität des genutzten Test-Kits dar, lässt aber die Bewertung von Ergebnissen im Bereich um den Cut'off recht anfällig erscheinen.

Dem gegenüber ist der Median mit anschließender Kategorisierung weniger anfällig, allerdings muss erwähnt werden, dass die Berechnung einer TG-ROC für ein ELISA-Kit eine aufwendige Labor- und statistische Arbeit darstellt. Allerdings haben die Ergebnisse auch eine reale Konsequenz.

Auch über den Median kann nur indirekt eine Aussage über die genaue Anzahl der Antikörper-positiven Tiere gemacht werden. Eine Kombination aus herkömmlicher Bewertung mittels Hersteller-Cut'off und Mediankategorisierung veranschaulichte in den vorgestellten Untersuchungen das Betriebsbild deutlich. Es gilt zukünftig zu klären, ob die Berechnung des Median oder andere statistische Aufbereitungen der Ergebnisse besser geeignet sind, um die einkommenden Datenmengen bewerten zu können.

Es hat sich gezeigt, dass je nach Verlauf der TG-ROC die einzelnen Kategorien sehr eng gewählt werden müssen, da die Sensitivität bei einigen ELISA sehr schnell abfällt. Die vorgestellte Einteilung soll die Praktikabilität und Durchführung anschaulich präsentieren und sollte als Beispiel zum besseren Verständnis angesehen werden.

6. Zusammenfassung**Unterschiedliche Bewertungsmöglichkeiten von Fleischsaft und Serum ELISA am Beispiel der Erfassung der Prävalenzen von *Toxoplasma gondii*, *Yersinia enterocolitica* und *Salmonella* in deutschen Outdoor Schweinehaltungen.**

Ziel dieser Arbeit war es, ELISA-Techniken zum Zwecke von Bestandscharakterisierungen in Hinblick auf verschiedene Zoonoseerreger einzusetzen, um ein einfaches, anschauliches und sicheres Bewertungssystem zu entwickeln.

Material & Methode

Von 2.004 Schweinen aus 41 Betrieben mit Outdoorhaltung wurden je eine Fleischsaft- und eine Serumprobe am Schlachtband gewonnen. Die Proben wurden im Institut für Fleischhygiene und -technologie mittels kommerzieller ELISA-Kits auf *T. gondii*, *Y. enterocolitica* und *Salmonella* untersucht. Einzeltierergebnisse, regionale und Bestandsprävalenzen wurden ermittelt. Anschließend wurden unterschiedliche Bewertungsmöglichkeiten der Bestandsprävalenzen (Hersteller Cut'off, Doppelbefundung von Serum und Fleischsaft, Mediananalyse und Kategorisierung) vorgestellt.

Ergebnisse

Schlachtschweine aus deutschen Outdoorbetrieben wurden positiv auf *T. gondii*, *Y. enterocolitica* und *Salmonella* in Serum und Fleischsaft getestet (Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1: Gesamtseroprävalenzen von *T. gondii*, *Y. enterocolitica* und *Salmonella* in Serum und Fleischsaft

	<i>T. gondii</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Salmonella</i>
Gesamtprävalenz Serum	9,6%	82,4%	6%
Gesamtprävalenz Fleischsaft	7,1%	66,2%	9,6%

Die Betriebsseroprävalenzen variierten deutlich. Insbesondere wurden hohe *Y. enterocolitica*-Seroprävalenzen festgestellt. Die Einzeltierergebnisse der positiven Tiere zur Berechnung der

Betriebsprävalenzen lagen für *T. gondii* und *Salmonella* häufig dicht oberhalb des Hersteller Cut'offs. Es zeigte sich, dass die Region sowie die Bodenart in der Haltung Faktoren darstellen, die Einfluss auf die Seroprävalenzen der Erreger haben können.

Bewertung

Zwei Bewertungsverfahren wurden praktisch verglichen. Ein Bestand mit einem positiven Nachweis mittels Hersteller-Cut'off galt als positiv für den Erreger. Zum Vergleich wurde aus dem Median der OD% der Einzeltierergebnisse eines Bestandes der OD% des Bestandes ermittelt und nach einem für die Fragestellung erstellten Kategorisierungsschlüssels bewertet (Mediankategorisierung), der die Bestandssituation eines Schweinebetriebes verdeutlicht. Die Kategorisierung erfolgte mittels Einteilung nach Sensitivität und Spezifität auf Grundlage einer beispielhaften TG-ROC-Analyse der verwendeten ELISA-Kits am Bundesinstitut für Risikobewertung.

Nach Medianberechnung und Kategorisierung wurden 2 Betriebe (jeweils Serum und Fleischsaft) als *T. gondii*-, 31 (Serum) und 34 (Fleischsaft) Betriebe als *Y. enterocolitica*- und 4 (Serum) und 7 (Fleischsaft) Betriebe als *Salmonella*- Risikobetriebe bewertet.

Die Ergebnisse der Mediankategorisierung konnten durch die herkömmlichen Prävalenzen weitestgehend bestätigt werden. Es zeigte sich, dass durch eine Kombination aus beiden Verfahren ein genaueres Bild der Bestandssituation entstand.

Fazit

Probennahmen durch vorhandene Monitoringprogramme am Schlachthof sind etabliert und führen zu keiner Behinderung des Schlacht- und Prozeßablaufes. Kommerzielle ELISA-Kits zum Nachweis verschiedener Zoonoseerreger sind erhältlich und praktikabel. Die ELISA-Ergebnisse konnten mit unterschiedlichen Bewertungsmöglichkeiten sinnvoll aufbearbeitet und interpretiert werden. Dies verdeutlicht, dass regelmäßige Bestandsuntersuchungen möglich und angezeigt sind, um eine genauere Aussage über die Seroprävalenz von Zoonoseerregern in deutschen Schweinebeständen zu treffen.

7. Summary

Different rating systems for meat juice and serum ELISA using prevalence data of *Toxoplasma gondii*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* in finishing pigs from German farms with outdoor-keeping.

The aim of this study was to test the use of ELISA-techniques as an easy-to-do, descriptive and reliable rating system for the seroprevalence of different zoonotic pathogens in livestock.

Material & Methods

Meat juice and serum samples from 2,004 finishing pigs were taken at the abattoir from 41 different establishments with outdoor-keeping. Samples were tested for *Toxoplasma gondii*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella*, using commercial ELISA-kits, in the Institute for Meat Hygiene and Technology. Results of single animals, regional prevalence and the Farm seroprevalence were determined. Subsequently, different systems for the assessment of farm-seroprevalence (manufacturer's cut'off, double-sampling of meatjuice and serum, median-analysis and categorization), were used.

Results

Pigs from German farms with outdoor-keeping tested positive for *Toxoplasma*, *Yersinia* and *Salmonella* in serum and meat juice (Table 7.1).

Table 7.1: Overall-seroprevalence of *T. gondii*, *Y. enterocolitica* and *Salmonella* in serum and meat juice

	<i>Toxoplasma</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Salmonella</i>
overall-prevalence serum	9,6%	82,4%	6%
overall-prevalence meat juice	7,1%	66,2%	9,6%

The farm-seroprevalence data were different; in particular, the prevalence of *Yersinia* was high. The individual results for *Toxoplasma* and *Salmonella* of positive animals, needed to calculate the farm-seroprevalence, were frequently located just above the manufacturer's cut'off.

As a result of median-analysis and categorization, 2 establishments were rated as farms under risk for *Toxoplasma*- (serum and meat juice), 31 (serum) and 34 (meat juice) for *Yersinia*- and 4 (serum) and 7 (meat juice) for *Salmonella*.

Assessment

Two rating systems were used. Farms with a positive (animal based) result via manufacturer's cut'off were categorized as positive for the respective pathogen. In comparison, the OD% of a farm was determined through the median OD% based on the individual animal data and subsequently assessed by a categorization-key (median-categorization). Such a broader approach may farm circumstances more precisely. The categories were developed based on sensitivity and specificity of the test and using the principle of a TG-ROC-analysis, which is statistically reproducible.

A combination of both systems may produce a accurate picture of the farm's situation.

Conclusions

Sampling at the abattoir is established with official monitoring programs and does not interfere with slaughter and processing. Commercial ELISA-kits for detection of different zoonosis pathogens are available and are used in practice. It was possible to assess the ELISA-results in a sensible way using the different procedures. Results illustrate the need of a periodical evaluation, in order to get a more accurate picture of *Toxoplasma gondii*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* in pig farms.

8. Literaturverzeichnis

8.1. wissenschaftliche Texte

ASSADI-RAD, A.M., J.C. NEW und S. PATTON (1995):

Risk factors associated with transmission of *Toxoplasma gondii* to sows kept in different management systems in Tennessee.

Veterinary Parasitology 57, 289-297

BARIL, L., T. ANCELLE, V. GOULET, P. THULLIEZ, V. TIRARD-FLEURY und B. CARME (1999):

Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 31, 305-309

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG - BfR. (2008):

Grundlagenstudie zur Erhebung der Prävalenz von Salmonellen in Mastschweinen.

Bericht des BfR vom 20. Februar 2008

www.bfr.bund.de/cm/343/grundlagenstudie_zur_erhebung_der_praevalenz_von_salmonellen_in_mastschweinen.pdf

zuletzt besucht am 20.06.2013

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG - BfR (2013):

Yersinien in Lebensmitteln: Empfehlungen zum Schutz vor Infektionen.

Stellungnahme Nr. 002/2013 des BfR vom 18 Januar 2013

www.bfr.bund.de/cm/343/yersinien-in-lebensmitteln-empfehlung-zum-schutz-vor-infektionen.pdf

zuletzt besucht 20.06.2013

BLAHA, T. (2008):

Salmonellenbekämpfung in der EU und in Deutschland unter besonderer Berücksichtigung der Ökologischen Tierhaltung

Tagungsband: Neues aus der Ökologischen Tierhaltung 2008, 45-52

G. Raham & U. Schumacher (Hrsg.)

BLAHA, T. (2001):

Die Bekämpfung von Salmonellen starten.

Fleischwirtschaft 10, 15-18

BOCH, J. und B. NEUROHR (1982):

Vorkommen latenter Toxoplasma-Infektionen bei Schweinen in Süddeutschland und deren Nachweis mit IFTA und IHA.

Tierärztliche Umschau 37, 820-826

BOCH, J., M. ROMMEL und K. JANITSCHKE (1964):

Beiträge zur Toxoplasmose des Schweines: 2. Untersuchungen von Schlachtschweinen auf Toxoplasma-Infektionen.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 77, 244-247

BOCH, J., M. ROMMEL und K. JANITSCHKE (1965):

Beiträge zur Toxoplasmose des Schweines: 3. Untersuchungen über die Möglichkeit konnataler Infektionen

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 78, 115-120

BODE, K. (2007):

Serologische und epidemiologische Untersuchungen zur Salmonellendynamik in Schweinebeständen für die Optimierung des Salmonellenmonitorings beim Schwein.

Vet. med. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover Außenstelle für Epidemiologie

elib.tiho-hannover.de/dissertation/bodek_ws07.pdf

BOTTONE, E. J. (1999):

Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates.

Microbes and Infection 1, 323-333

CALLAWAY, T. R., J. L. MORROW, A. K. JOHNSON, J. W. DAILEY, F. M. WALLACE, E. A. WAGSTROM, J. J. MC GLONE, A. R. LEWIS, S. E. DOWD, T. L. POOLE, T. S. EDRINGTON, R. C. ANDERSON, K. J. GENOVESE, J. A. BYRD, R. B. HARVEY und D. J. NISBET (2005):

Environmental prevalence and persistence of *Salmonella* spp. in outdoor swine wallows.

Foodborne Pathogens & Disease 2, 263-273

CAUTEREN, VAN D., N. JOURDAN-DA SILVA, F. X. WEILL, L. KING, A. BRISABOIS, G. DELMAS, V. VAILLANT und H. DE VALK (2009):

Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Muenster infections associated with goat's cheese, France, March 2008.

Euro Surveillance: Bulletin Europeen sur les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin. 14, 2202-2206

COOK, A.J., R. E. GILBERT, W. BUFFOLANO, J. ZUFFEREY, E. PETERSEN, P. A. JENUM, W. FOULON, A. E. SEMPRINI und D. T. DUNN (2000):

Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study.

British Medical Journal 321, 142-147

CORNELIS, G.R., A. BOLAND, A.P. BOYD, C. GEUIJEN, M. IRIARTE, C. NEYT, M. SORY und I. STAINIER (1998):

The Virulence Plasmid of *Yersinia*, an Antihost Genome

Microbiol Mol Biol Rev. 62, 1315-1352

CZERNY, C. P., K. OSTERKORN, G. WITTKOWSKI und M. HUBER (2001):

Meat juice ELISA for determination of *Salmonella* incidence in slaughter pig herds in Bavaria.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 114, 35-39

DABRITZ, H. A., M. A. MILLER, E. R. ATWILL, I. A. GARDNER, C. M. LEUTENEGGER, A. C. Melli und P. A. Conrad (2007):

Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden.

Journal of the American Veterinary Medical Association 231, 1676-1684

DAMRIYASA, I. M., C. BAUER, R. EDELHOFER, K. FAILING, P. LIND, E. PETERSEN, G. SCHARES, A. M. TENTER, R. VOLMER und H. ZAHNER (2004):

Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows.

Veterinary Parasitology 126, 271-286

DAVIES, R. H., P. J. HEATH, S. M. COXON und A. R. SAYERS (2003):
Evaluation of the use of pooled serum, pooled muscle tissue fluid (meat juice) and pooled faeces for monitoring pig herds for *Salmonella*.
Journal of Applied Microbiology 95, 1016-1025

DAVIES, P. R. (2011):
Intensive swine production and pork safety.
Foodborne Pathogens & Disease 8, 189-201

DESMONTS, G. und J. S. REMINGTON (1980):
Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: Method for increasing sensitivity and specificity.
Journal of Clinical Microbiology 11, 562-568

DUBEY, J. P. (1986):
A review of toxoplasmosis in pigs.
Veterinary Parasitology 19, 181-223

DUBEY, J. P. (1995a):
Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats.
Journal of Parasitology 81, 410-415

DUBEY, J. P. (1996a):
Infectivity and Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* Oocysts for Cats.
The Journal of Parasitology 82, 957-961

DUBEY, J. P. (1996b):
Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans.
Veterinary Parasitology 64, 65-70

DUBEY, J. P. (1997):
Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0.85-6% NaCl solutions at 4-20 °C.
Journal of Parasitology 83, 946-949

DUBEY, J. P. (2004):

Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis.

Veterinary Parasitology 126, 57-72

DUBEY, J. P. (2009)

History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*.

International Journal for Parasitology 39, 877-882

DUBEY, J. P., H. R. GAMBLE, A. O. RODRIGUES und P. THULLIEZ (1992):

Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spiralis* in 509 pigs from 31 farms in Oahu, Hawaii.

Veterinary Parasitology 43, 57-63

DUBEY, J. P., D. S. LINDSAY und C. A. SPEER (1998):

Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts.

Clinical Microbiology Reviews 11, 267-299

DUBEY, J. P. und P. THULLIEZ (1993):

Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts.

American Journal of Veterinary Research 54, 270-273

DUBEY, J. P., R. M. WEIGEL, A. M. SIEGEL, P. THULLIEZ, U. D. KITRON, M. A. MITCHELL, A. MANNELLI, N. E. MATEUS-PNILLA, S. K. SHEN, O. C. KWOK und K. S. TODD (1995b):

Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois.

Journal of Parasitology 81, 723-729

EFSA (2011):

The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009.

EFSA Journal 2090.

www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/2090.pdf

zuletzt besucht 20.06.2013

FEHLHABER, K., P. HINTERSDORF und G. KRÜGER (2003):

Prävalenz von *Toxoplasma gondii* - Untersuchungen bei Schlachtschweinen aus verschiedenen Haltungsformen und in handelsüblichen Hackfleischproben.

Fleischwirtschaft 83, 97-99

FOLEY, S. L. und A. M. LYNNE (2008):

Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance.

Journal of Animal Science 86, 173-187

FOSSE, J., H. SEEGER und C. MAGRAS (2009):

Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: a review.

Zoonoses Public Health 56, 429-454

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., M. BUCHER, C. HANK, A. STOLLE und H. KORKEALA (2001):

High Prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on Pig offal in Southern Germany: A Slaughtering Technique Problem.

Systematic and Applied Microbiology 24, 457-463

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., U. KOCH, C. KLEMM, M. BUCHER und A. STOLLE (2004):

Different genotypes of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains widely distributed in butcher shops in the Munich area.

International Journal of Food Microbiology 95, 89-94

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., C. MEYER, R. BONKE, E. STUBER und S. WACHECK (2010):

Characterization of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 isolates from tonsils of Bavarian slaughter pigs.

Letters in Applied Microbiology 50, 412-418

FRENKEL, J. K., A. RUIZ und M. CHINCHILLA (1975):

Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica.

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene 24, 439-443

FRIES, R., C. HILBERT, D. JAEGER und M. OETJEN (2002)

Zoonoseerreger in der Gewinnung von Schweinefleisch – Herkunftsbezogene Aufschlüsselung.

In: Proceedings 43. DVG Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ Garmisch-Partenkirchen, 326-331

FRIES, R. (2009):

Nutztiere in der Lebensmittelkette

Eugen Ulmer KG, Stuttgart

ISBN 978-3-8252-2975-7 (UTB)

FUKUSHIMA, H., K. MARUYAMA, I. OMORI, K. ITO und M. IORIHARA (1990):

Contamination of pigs with *Yersinia* at the slaughterhouse.

Fleischwirtschaft. 70, 1300–1302

GAMBLE, H.R., J. P. DUBEY und D. N. LAMBILLOTTE (2005):

Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma* infection in the domestic pig.

Veterinary Parasitology 128, 177-181

GARCIA-BOCANEGRA, I., J. P. DUBEY, M. SIMON-GRIFE, O. CABEZON, J. CASAL, A. ALLEPUZ, S. NAPP und S. ALMERIA (2010):

Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in pig farms from Catalonia, north-eastern Spain.

Research in Veterinary Science 89, 85-87

GEBREYES, W. A., P. B. BAHNSON, J. A. FUNK, J. MC KEAN und P. PATCHANEE (2008):

Seroprevalence of *Trichinella*, *Toxoplasma*, and *Salmonella* in antimicrobial-free and conventional swine production systems.

Foodborne Pathogens & Disease 5, 199-203

GIRAUDON, I., S. CATHCART, S. BLOMQUIST, A. LITTLETON, S. SURMAN-LEE, A. MIFSUD, S. ANARAKI und G. FRASER (2009):

Large outbreak of *Salmonella* phage type 1 infection with high infection rate and severe illness associated with fast food premises.

Public Health 123, 444-447

GRIMONT, P. A. D. und F.-X. WEILL (2007):

Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th Edition

WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella

Institut Pasteur, Paris, Frankreich

www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089

zuletzt besucht 20.06.2013

HENSEL, A., K. NIKOLAOU, C. BARTLING, T. PETRY, T. ARNOLD, U. RÖSLER, C. P. CZERNY, U. TRUYEN und H. NEUBAUER (2004):

Zur Prävalenz von Anti-*Yersinia*-Outer-Protein-Antikörpern bei Schlachtschweinen in Bayern.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 117, 30-38

HILL, D. E., S. CHIRUKANDOTH, J. P. DUBEY, J. K. LUNNEY und H. R. GAMBLE (2006):

Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine.

Veterinary Parasitology 141, 9-17

HINTERSDORF, P. (2013)

Untersuchungen zur Prävalenz von *Toxoplasma-gondii*-Antikörpern bei Schlachtschweinen aus verschiedenen Haltungformen und in handelsüblichen Hackfleischproben in der Region Halle/Wittenberg.

Vet. med. Diss., Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Lebensmittelhygiene.vetmed.uni-leipzig.de/de/Dissertationen

HOLT, J. G., N. R. KRIEG, P. H. A. SNEATH, J. T. STANLEY und S. T. WILLIAMS Eds. (1994):

Bergey's Manual of determinative bacteriology.

9th edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, S.186ff

ISBN 0-683-00603-7

HOWE, D. K. und L. D. SIBLEY (1995):

Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease.

Journal of Infectious Diseases 172, 1561-1566

HUTCHISON, W. M. (1965):

Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*.

Nature 206, 961-962

HUTCHISON, W. M., J. F. DUNACHIE und K. WORK (1968):

The faecal transmission of *Toxoplasma gondii*.

Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica 74, 462-464

HUTCHISON, W. M., J. F. DUNACHIE, K. WORK und J. C. SIIM (1971):

The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 65, 380-398

ISSACK, M. I., R. S. HENDRIKSEN, P. L. Lun, R. K. LUTCHUN und F. M. AARESTRUP (2009):

Salmonella enterica serovar Typhimurium in Mauritius linked to consumption of marlin mousse.

Foodborne Pathogens & Disease 6, 739-741

JACOBS, L., J. S. REMINGTON und M. L. Melton (1960):

The Resistance of the Encysted Form of *Toxoplasma gondii*.

The Journal of Parasitology 46, 11-21

JOHANNESSEN, G. S., G. KAPPERUD und H. KRUSE (2000):

Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Norwegian pork products determined by a PCR method and a traditional culturing method.

International Journal of Food Microbiology 54, 75-80

KAPPERUD, G. (1991):

Yersinia enterocolitica in food hygiene.

International Journal of Food Microbiology 12, 53-65

KAPPERUD, G., P. A. JENUM, B. STRAY-PEDERSEN, K. K. MELBY, A. ESKLID und J. ENG (1996):

Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway.

American Journal of Epidemiology 144, 405-412

KIJLSTRA, A., O. A. EISSEN, J. CORNELISSEN, K. MUNNIKSMA, I. EIJCK und T. KORTBEEK (2004):

Toxoplasma gondii infection in animal-friendly pig production systems.

Investigative Ophthalmology & Visual Science 45, 3165-3169

KIJLSTRA, A. und E. JONGERT: (2009):

Toxoplasma-safe meat: close to reality?

Trends in Parasitology 25, 18-22

KILIC, A., O. BEDIR, N. KOCAK, B. LEVENT, C. P. EYIGUN, O.F. TEKBAS, L. GORENEK, O. BAYLAN und BASUSTA OGLU (2010):

Analysis of an outbreak of *Salmonella enteritidis* by repetitive-sequence-based PCR and pulsed-field gel electrophoresis.

Internal Medicine 49, 31-36

KRAMER, N., C. LOFSTROM, H. VIGRE, J. HOORFAR, C. BUNGE und B. MALORNY (2010):

A novel strategy to obtain quantitative data for modelling: combined enrichment and real-time PCR for enumeration of *Salmonella* from pig carcasses.

International Journal of Food Microbiology 145, 86-95

LANGKABEL, N. (2011)

Verknüpfung ausgewählter Daten zur Bestandscharakterisierung beim Mastschwein

Vet. Med. Diss, Frei Universität Berlin

ISBN: 978-3-86387-026-3

LEHMANN, T., D. H. GRAHAM, E. DAHL, C. SREEKUMAR, F. LAUNER, J. L. CORN,
H. R. GAMBLE und J. P. DUBEY (2003):

Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm.

Infection, Genetics and Evolution 3, 135-141

LE MINOR, L. (1984):

Salmonella

In: N. R. KRIEG und J. G. HOLT (Eds.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Volume 1.

Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, S. 427–458

ISBN 0-683-04108-8

LINDSAY, D. S. und J. P. DUBEY (2009):

Long-term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater.

Journal of Parasitology 95, 1019-1020

LUDEWIG, M., K. DE BUHR und K. FEHLHABER (2007):

Toxoplasma gondii – Seroprävalenz in Mastschweinebeständen Ergebnisse aus einer deutschlandweiten Studie

Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2, 454-456

LUDEWIG, M. und K. FEHLHABER (2001):

Verbreitung von Salmonellen in der Schweinefleischerzeugungskette im Freistaat Sachsen.

2. Serologische Untersuchungen von Schlachttierkörpern.

Fleischwirtschaft 7, 96-98

LUNDEN, A. und A. UGGLA (1992):

Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking.

International Journal of Food Microbiology 15, 357-363

MEAD, P. S., L. SLUTSKER, V. DIETZ, L. F. McCAIG, J. S. BRESEE, C. SHAPIRO, P. M. GRIFFIN und R. V. TAUXE (1999):

Food-related illness and death in the United States.

Emerging Infectious Diseases 5, 607-625

MEHLHORN, H. (1995):

Grundriss der Zoologie.

2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

ISBN 978-3-8252-1521-7

MESSELHAUSSER, U., P. KAMPF, J. COLDITZ, H. BAUER, H. SCHREINER, C. HOLLER und U. BUSCH (2011):

Qualitative and quantitative detection of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in different food matrices at retail level in Bavaria.

Foodborne Pathogens & Disease 8, 39-44

MEYER, C. (2004):

Qualitative und quantitative Risikofaktoren für die Einschleppung und Verbreitung von Salmonellen in unterschiedliche Produktionsverfahren beim Schwein,

Vet. med. Diss., Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

ISSN: 0720-4272,

MONTOYA, J. G. and O. LIESENFELD (2004):

Toxoplasmosis.

Lancet 363, 1965-1976

MORRIS, G.K. und J. C. FEELEY (1976):

Yersinia enterocolitica: a review of its role in food hygiene.

Bull World Health Organ. 54, 79-85

MÜLLER, B. (2010):

Vergleichende Untersuchungen zum Vorkommen von *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. und *Yersinia* spp. bei Mastschweinen und deren Schlachtkörpern, unter Berücksichtigung von Haltungsfaktoren und Betriebsmanagement.

Vet. med. Diss., Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

https://edoc.ub.uni-muenchen.de/11840/2/Mueller_Benjamin.pdf

NEUBAUER, H., S. ALEKSIC, A. HENSEL, E. J. FINKE und H. MEYER (2000):

Yersinia enterocolitica 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups.

International Journal of Medical Microbiology 290, 61-64

NEUBAUER, H., L. D. SPRAGUE, H. SCHOLZ und A. HENSEL (2001):

Yersinia enterocolitica-Infektionen: 2. Bedeutung bei Menschen.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 114, 81-87

NESBAKKEN, T., E. NERBRINK, O. J. ROTTERUD und E. BORCH (1994):

Reduction of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria* spp. on pig carcasses by enclosure of the rectum during slaughter.

International Journal of Food Microbiology, 23, 197–208

NIELSEN, B., A. WINGSTRAND und C. HEISEL (1995):

Detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 specific antibodies in experimentally infected pigs by an indirect LPS ELISA

Contrib Microbiol Immunol. 13, 117-9

NIELSEN, C., HEISEL und A. WINGSTRAND (1996):

Time course of the serological response to *Yersinia enterocolitica*

Veterinary Microbiology. 48, 293–303

NOLLET, N., D. MAES, L. DUCHATEAU, V. HAUTEKIET, K. HOUF, J. VAN HOOFF, L. DE ZUTTERA, A. DE KRUIF und R. GEERS (2005):

Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the result of serological screening in slaughter pigs.

Veterinary Research 36: 545-555

PAULIN, S. M., A. JAGANNATHAN, J. CAMPBELL, T. S. WALLIS und M. P. STEVENS (2007):

Net replication of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Choleraesuis in porcine intestinal mucosa and nodes is associated with their differential virulence.

Infection & Immunity 75, 3950-3960

PENNER, K. (2004):

Untersuchungen zum Vorkommen von Salmonellen-Antikörpern bei Mastschweinen im Einzugsgebiet des Schlachthofes Karlsruhe im Hinblick auf die Einführung eines staatlichen Salmonellen-Monitoring

Vet. med. Diss., Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

https://edoc.ub.uni-muenchen.de/2660/1/Penner_Kirsten_B.pdf

PETTERSEN, E. K. (1979):

Destruction of *Toxoplasma gondii* by HCL solution.

Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica - Section B, Microbiology 87, 217-220

RKI (2011):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2010

Robert Koch-Institut (Hgs.), Berlin

ISBN 978-3-89606-118-6

www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2010.pdf?_blob=publicationFile

zuletzt besucht 20.06.2013

PROHASKA, S. N. (2009):

Entwicklung eines kombinierten Verfahrens zum Nachweis von pathogenen *Yersinia enterocolitica* in Schweinefleisch mittels Real-Time PCR und Kolonie-DNA-Hybridisierung.

Vet. med. Diss., Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

edoc.ub.uni-muenchen.de/9895

RÖSLER, U. (2009):

Überwachung und Bekämpfung der Salmonellen-Infektion beim Schwein.

Praktischer Tierarzt 90, 64-69

RÖSLER, U., I. SZABO, C. MATTHIES, K. ALBRECHT, M. LEFFLER, K. SCHERER, K. NÖCKLER, J. LEHMANN, U. METHNER, A. HENSEL und U. TRUYEN (2011):

Comparing validation of four ELISA-systems for detection of *Salmonella* Derby- and *Salmonella* Infantis-infected pigs.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 124, 265-271

SABIN A. B. und FELDMAN, H. A. (1948):

Dyes as microchemical indicators of a new immunochemical phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*).

Science 108, 660-663

SAEIJ, J. P., J. P. BOYLE und J. C. BOOTHROYD (2005):

Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host.

Trends in Parasitology 21, 476-481

SÄCHSISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT (2001):

Sschweineproduktion Managementunterlagen

Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.)

3.Auflage, August-Böckstiegel-Straße 1, 01326 Dresden

SCHULZIG, H. S., K. FEHLHABER (2005):

Longitudinalstudie zur Seroprävalenz der *Toxoplasma gondii*-Infektion in vier deutschen Schweineaufzucht- und Mastbetrieben.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 118, 399-403

SCHOERNER, C., K. WARTENBERG und M. RÖLLINGHOFF (1990):

Differentiation of serological responses to *Yersinia enterocolitica* Serotype O9 and *Brucella* Species by Immunoblot or Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using whole Bacteria and *Yersinia* Outer Membrane Proteins.

Journal of Clinical Microbiology 28, 1570-1574

SEINEKE, P. (1996):

Seroprävalenz von Antikörpern gegen *Toxoplasma gondii* bei Schafen, Ziegen und Schweinen in Niedersachsen.

Vet. med. Diss., Tierärztlich Hochschule Hannover

SELBITZ, H.-J. (2007a):

Bakterielle Krankheiten der Tiere – Gramnegative fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien - *Yersinia*

In: ROLLE/MAYR (Anton Mayr (Hrsg.)), Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

8. Auflage, Enke MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, S.452ff.

ISBN 3-8304-1060-3

ISBN 978-3-8304-1060-7

SELBITZ, H.-J. (2007b):

Bakterielle Krankheiten der Tiere – Gramnegative fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien - *Salmonella*

In: ROLLE/MAYR (Anton Mayr (Hrsg.)), Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

8. Auflage, Enke MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, S. 437ff.

ISBN 3-8304-1060-3

ISBN 978-3-8304-1060-7

SHARMA, S. P. und J. P. DUBEY (1981):

Quantitative survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in pepsin and in trypsin solutions.

American Journal of Veterinary Research 42, 128-130

SKJERVE, E., B. LIUM, B. NIELSEN und. T. NESBAKKEN (1998):

Control of *Yersinia enterocolitica* in pigs at herd level.

International Journal of Food Microbiology 45, 195-203

STEINBACH, G., P. BAHN, B. KREUTZER, D. PROTZ und C. STAAK (1999):

Necessity of double testing of meat juice samples from pigs using ELISA for the determination of *Salmonella* status in pig farms.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 112, 121-123

STOLL, L. und B. KRAFT (1976):

Detection of *Toxoplasma gondii* in lymph nodes of swine by the indirect fluorescent antibody technique.

Deutsche Tierärztliche Wochenschrift. 83, 137-140

STROTMANN, C. (2006):

Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von *Yersinia enterocolitica* DSM 11502 in künstlich kontaminiertem Schweinehackfleisch unter verschiedenen modifizierten Atmosphären.

Vet. med. Diss., Tierärztlich Hochschule Hannover.

[Elib.tiho-hannover.de/dissertations/strotmann_ws06.pdf](http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/strotmann_ws06.pdf)

TENTER, A. M., A. R. HECKEROTH und WEISS, L. M. (2000):

Toxoplasma gondii: from animals to humans.

International Journal for Parasitology 30, 1217-1258

VAN KNAPEN, F., A.F: KREMERS, J.H. FRANCHIMONT und U. NARUCK (1995):

Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and swine in The Netherlands: towards an integrate control of livestock production.

Vet Q. 17, 87-91

VICO J. P., B. ENGEL, W. G. BUIST und R.C. MAINER-JAIME (2010):

Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Salmonella* spp. in meat juice from finishing pigs in Spain.

Zoonoses and Public Health 57, 107-114

VILLARI, S., G. VESCO, E. PETERSEN, A. CRISPO und W. BUFFOLANO (2009):

Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy.

Veterinary Parasitology 161, 1-8

WEIGEL, R. M., J. P. DUBEY, A. M. SIEGEL, U. D. KITRON, A. MANNELLI, M. A. MITCHELL, N. E. MATEUS-PINILLA, P. THULLIEZ, S. K. SHEN und O. C. KWOK (1995):

Risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois.
Journal of Parasitology 81, 736-741

WILHELM, E., F. HILBERT, P. PAULSEN, F. J. SMULDERS und W. ROSSMANITH (2007):

Salmonella diagnosis in pig production: methodological problems in monitoring the prevalence in pigs and pork.
Journal of Food Protection 70: 1246-1248

WYSS, R., H. SAGER, N. MÜLLER, F. INDERBITZIN, M. KÖNIG, L. AUDIGE und B. GOTTSTEIN (2000):

Untersuchungen zum Vorkommen von *Toxoplasma gondii* und *Neosporum caninum* unter fleischhygienischen Aspekten.
Schweizer Archiv für Tierheilkunde 142, 95-108

YILMAZ, S. M. und S. H. HOPKINS (1972):

Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts.
Journal of Parasitology 58, 938-939

8.2. Gesetzestexte

Verordnung zur Verminderung der salmonellenverbreitung durch Schlachtschweine
(Schweine-Salmonellen-Verordnung)

Schweine-Salmonellen-Verordnung vom 13.März 2007 (BGBl. I S.322)

Verordnung (EG) 178/2002

ABI. der EU L 31/1 vom 28.01.2002

Verordnung (EG) 854/2004

ABI. der EU L 226/83 vom 29.04.2004

Verordnung (EG) 1244/2007

ABI. der EU L 281/12 vom 24 Oktober 2007

Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in Fachvorträgen vorgestellt und den dazugehörigen Vortragsbänden veröffentlicht

BERNARDT, H., IRSIGLER, H. und R. FRIES (2011):

Toxoplasma gondii in der Schweinhaltung

In Proceeding: 11. Fachtagung Fleisch- und Geflügelfleischhygiene für Angehörige der Veterinärverwaltung, Berlin, Koserstr. 20, 01. und 02.03.2011, Eigenverlag S. 9-13

ISBN 978-3-00-035067-2

BERNARDT, H., IRSIGLER, H. und R. FRIES (2013)

Toxoplasma gondii in der Schweinhaltung

In Proceeding: 13. Fachtagung Fleisch- und Geflügelfleischhygiene für Angehörige der Veterinärverwaltung, Berlin, Koserstr. 20, 05. und 06.03.2013, Eigenverlag S. 49-52

ISBN 978-3-00-042476-2

Danksagung

Möglich wurde diese Arbeit erst durch Herrn Prof. Dr. Fries. Und dies nicht nur als äußerst geduldiger Betreuer und Doktorvater mit offenem Ohr auf den letzten Metern. Herr Prof. Dr. Fries war es, der mich schon früh an die Fleischhygiene und den Bereich Veterinary Public Health heran führte und damit sicher eine Leidenschaft in mir geweckt hat, die ich nicht mehr ablegen werde.

Ich danke Ihnen für die Bereitstellung des Themas, für die Unterstützung im Fachlichen, wie auch Menschlichem und das Vertrauen, dass Sie mir immer wieder trotz so mancher Hürde entgegengebracht haben. So manche Tür wurde durch Ihr Dazutun geöffnet und so manche Sorge haben Sie mir abgenommen!

Frau Herlinde Irsigler war nicht minder bereit ihre Nerven für mich zu opfern, sie war immer fürsorglich für mich da und stand mir im Labor, aber auch danach stets mit fachlichem Rat, tollen Ideen und unglaublich viel menschlicher Wärme zur Seite.

Frau PD Dr. Roswitha Merle danke ich für die enorme Unterstützung, Hilfestellung und das große Verständnis bei der Überarbeitung der Statistik.

Dr. Yvonne Schneider danke ich für die moralische Unterstützung, Motivation, Freundschaft und Kritik. Gemeinsame Koch- und Kinoabende, verbunden mit lange Gesprächsstunden, lenkten ab und schafften Raum für neue Motivation.

Dank Frau Dr. Nina Langkabel verlor ich die Angst vor der Statistik, wurde mit der Nase auf neue Paper und Ideen gestupst und stets warm und herzlich im Institut empfangen und unterstützt.

Für die Unterstützung von männlicher Seite bedanke ich mich bei Dr. Tobias Gäng. Immer wieder etwas anderes, wenn ein weiterer Mann mit im Hause ist. Danke für so manche Ablenkung.

Ilona Kern danke ich für die nette Begrüßung am Morgen, wenn man in das Labor kommt, obwohl die Sonne noch nicht einmal scheint und dafür, dass ich bedenkenlos Utensilien aus dem Laborschrank nehmen konnte, ohne das sie jemals alle wurden (obwohl ich mir sicher bin, dass abends immer sehr viel dreckig war!).

Frau Dorothea Jaeger, Dr. Iman Sharif, Dr. Tongkorn Meeyam und Dr. Arsooth Sanguankiat danke ich für die liebe Unterstützung auf fachlicher wie menschlicher Ebene und dafür, dass ich immer wieder gerne in das Institut zurück kam und mich auch nach meiner beruflichen Anstellung immer als Teil der Mannschaft gefühlt habe.

Frau Lilo Bräutigam gilt noch ein zusätzlicher Dank für die Bereitstellung eines sehr bequemen Gästebettes, ohne das die Nächte einen Sommer lang recht hart gewesen wären.

Frau Dr. Carolin Riedel danke ich dafür, immer einen sehr gute Freundin in Berlin zu haben, die es mir ermöglichte, die Stadt noch aus dem Blickwinkel eines Nichtfleischhygienikers zu betrachten.

Zu danken habe ich, und ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen, meinen lieben Kollegen aus Bielefeld: Dr. Anne Sander, Dr. Hannes Burmeier und Dr. Imke Glass habe ich sehr viel Arbeit mit meinen Reisen nach Berlin aufgehalst und niemals auch nur ein böses Wort geerntet. Ihr habt mir den Rücken freigehalten und seit immer noch meine Freunde. Da fällt mir nichts mehr zu ein..., vielen Dank!

Mein Dank gilt ebenso Dr. Peter Hettling, der zu einer für mich schwierigen Zeit sicher ein Wagnis mit meiner Einstellung einging und mir erst die Möglichkeit gab, abgesichert und bedenkenlos diese Arbeit in Angriff zu nehmen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Vater, der es trotz unglaublicher Hürden alleine geschafft hat, mich sorgenfrei erwachsen werden zu lassen und ich so nur durch ihn die Möglichkeit erhielt, Tierarzt zu werden. Er hat mir beigebracht, dass so manches im Leben mit Arbeit und Entbehrungen verbunden ist. Und dass wir uns davon nicht abhalten lassen!

Liebe Imke, ich danke dir dafür, dass du diese zum Teil nicht immer leichte Zeit mit mir durchgestanden hast, mir des öfteren böse Blicke zugeworfen hast, weil ich längere Zeit nichts geschrieben habe und mir die Zuversicht gegeben hast, dass aus dieser Arbeit tatsächlich mal was wird. Mit dem Beenden dieser Arbeit freue ich mich auf den neuen Abschnitt unseres Lebens, der mit dem Abschluss der Promotion für uns beide und den Murkeln beginnt.

Meinem Sohn Mika danke ich dafür, dass der Laptop, auf dem diese Arbeit entstand, das einzige technische Gerät war, dass er nicht formatiert, durch die Gegend geworfen oder mit Brei bekleckert hat. Und für die Ablenkung, Motivation und sowie die Korrektur meiner Sichtweisen auf die wirklich wichtigen Dinge des Lebens.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, die vorliegende Arbeit

„Unterschiedliche Bewertungsmöglichkeiten von Fleischsaft und Serum ELISA am Beispiel der Erfassung der Seroprävalenzen von *Toxoplasma gondii*, *Yersinia enterocolitica* und *Salmonella* in deutschen Outdoor Schweinehaltungen.“

selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Literatur verfasst zu haben.

Bergen auf Rügen, den 25.04.2017

Henry Bernardt