



Doctoral Thesis

Development of a risk-based surveillance program for *Trichinella SPP.* in domestic swine and wildlife in Switzerland

Author(s):

Schuppers, Manon Esther

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006231164> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH N° 19145

**DEVELOPMENT OF A RISK-BASED SURVEILLANCE PROGRAM
FOR *TRICHINELLA* SPP. IN DOMESTIC SWINE AND WILDLIFE IN
SWITZERLAND**

A dissertation submitted to
ETH Zürich

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

MANON ESTHER SCHUPPERS
M.Sc., Wageningen University, The Netherlands

Date of birth 6 February 1978

Citizen of
The Netherlands

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wolfgang Langhans
Prof. Dr. Caspar Wenk
Prof. Dr. Paul Torgerson
Prof. Dr. Ulrich Kihm

2010

Executive summary

Trichinella spp. is the causative agent of trichinellosis in humans, and can occur in many different animal species. Infection between hosts is transmitted via oral intake of tissue containing infective larvae. In line with European regulations, Switzerland implemented a meat inspection program for domestic pigs to protect public health. However, data indicated that *Trichinella* infections did not occur in pigs in Switzerland, and therefore an alternative, equally effective but more efficient surveillance approach should be considered. The goal of this dissertation was to develop a risk-based surveillance system for *Trichinella* spp. in Switzerland.

Serology was considered as a diagnostic tool for a risk-based surveillance system. Available serological techniques, in particular ELISA, had the disadvantage of having a specificity of less than 100%, thus leading to false-positive results. A Western Blot was therefore evaluated as a serological confirmatory method. In a first study, the sensitivity and specificity of a Western Blot assay based on somatic *Trichinella spiralis* muscle stage (L1) antigen was evaluated using Bayesian modeling techniques. A total of 295 meat juice and serum samples from pigs negative for *Trichinella* larvae by artificial digestion, including 74 potentially cross-reactive sera of pigs with other nematode infections, and 93 meat juice samples from pigs infected with *Trichinella* larvae were included in the study. The diagnostic sensitivity and specificity of the Western Blot ranged from 95.8 to 96.0% and from 99.5 to 99.6%, respectively. A sensitivity analysis showed that the model outcomes were hardly influenced by changes in the prior distributions, providing a high confidence in the outcomes of the models. This validation study demonstrated that the Western Blot is a suitable method to confirm samples that reacted positively in an initial ELISA.

Then, the test characteristics of an in-house and a commercial ELISA for *Trichinella* diagnostics were assessed. Neither of the tests could be considered a true gold standard, and Bayesian techniques were used to evaluate tests in the absence of a gold standard. A total of 875 *Trichinella* larvae–negative samples of pigs and 93 *Trichinella* larvae–positive samples of both naturally and experimentally infected pigs were included in the study. Bayesian modeling techniques were used to correct for the absence of a perfect reference test. The sensitivity and specificity of the in-house ELISA were 97.0-97.4% and 99.4-99.6%, respectively. The sensitivity and specificity of the commercial ELISA was 97.1-97.8% and 99.5-99.8%, respectively. Sensitivity analysis demonstrated a high stability of the models.

In order to assess the prevalence of *Trichinella* infections in wildlife, samples from 1,298 foxes, 55 lynxes and 1,458 wild boar were tested. The fox and lynx samples were tested by artificial digestion only and the wild boar samples were tested both by artificial digestion and serology. Any recovered larvae were tested by a multiplex PCR to determine the species and/or genotype. *Trichinella* spp. was found in 21 foxes (1.6%) and in 15 lynxes (27.3%). Multiplex-PCR performed on recovered larvae yielded *T. britovi* as infecting species in all cases. No larvae were recovered from wild boar, but 3 wild boar were seropositive ((seroprevalence: 0.2% (95% CI 0.07%-0.60%)).

A study was conducted to demonstrate the absence of infection in Swiss domestic pigs. An ELISA was used as the initial screening test, and sera reacting in ELISA were further investigated using both a Western Blot for serology and an artificial digestion test with 20 grams of diaphragm tissue for larval detection. A total of 7,412 adult pigs, 9,973 finishing pigs and 2,779 free-ranging pigs were tested. Samples from 17 (0.23%) adult pigs, 16 (0.16%) finishing pigs and 9 (0.32%) free-ranging pigs were ELISA-positive, but all of these sera were subsequently negative by Western Blot and by the artificial digestion method. Based on these findings, an absence of *Trichinella* infections in adult pigs (target prevalence 0.04%) and finishing pigs (target prevalence 0.03%) can be concluded. The results also demonstrated that the prevalence of *Trichinella* infections does not exceed 0.11% in free-ranging pigs, the group with the highest risk of exposure.

In order to evaluate the probability of human exposure to *Trichinella* spp. in Switzerland, a qualitative risk assessment was conducted. The risk assessment was conducted according to the standards of the World Organisation for Animal Health. Various relevant meat sources were considered, including game meat, pork and imported meat. Inactivation steps for raw meat were not included in the assessment. The risk assessment demonstrated, the probability of human exposure through wild boar meat used for private consumption and through pork from free-range pigs was very low. No data were available to assess the importance of privately imported game meat. To reduce the overall probability of human exposure to *Trichinella* spp., monitoring and meat inspection activities should be targeted at free-range pigs. Also, awareness of hunters and travellers should be increased regarding the risks related to the consumption of game meat that was not tested for *Trichinella* spp. and possibilities for risk reduction.

Finally, an epidemiological model was designed to evaluate the results from the current meat inspection program for domestic pigs and to compare those with the results of a possible future risk-based surveillance in pigs. First, the results from artificial digestion tests in

Switzerland were evaluated over a time period of 15 years to determine by when freedom from infection based on these data could be confirmed. Freedom was defined as a 95% probability that the prevalence of infection was below 0.0001%. Freedom was demonstrated after 12 years at the latest. A new risk-based surveillance approach was then developed based on serology. Risk-based surveillance was also assessed over 15 years, starting in 2010. It was shown that by using this design, the sample size could be reduced by at least a factor of four when compared with the traditional testing regime, without lowering the level of confidence in the *Trichinella*-free status of the pig population.

This dissertation demonstrated that it is possible to design a serological, risk-based surveillance system for domestic pigs in Switzerland without lowering the standards for public health protection, even though infected wildlife is known to be present. Within the pig population, free-range pigs have the highest probability of exposure to and infection with *Trichinella* spp., therefore surveillance activities should be focused on this risk group.

Zusammenfassung

Humane Trichinellose wird von dem Parasiten *Trichinella* spp. verursacht, einem Parasiten, der viele verschiedene Tierarten befallen kann. Die Ansteckung findet über die orale Aufnahme von trichinellenhaltigem Gewebe statt. In der Schweiz wurde zum Schutz der öffentlichen Gesundheit ein Fleischuntersuchungsprogramm gegen Trichinellose in Hausschweinen umgesetzt, das den Europäischen Richtlinien entspricht. Verfügbare Daten weisen allerdings darauf hin, dass Trichinelleninfektionen bei Hausschweinen in der Schweiz nicht vorkommen, und aus diesem Grund soll die Möglichkeit für eine alternative Trichinellenüberwachung geprüft werden. Dieser neue Ansatz soll eine gleichwertige Effektivität aber eine höhere Effizienz als die heutige Fleischuntersuchung aufweisen. Ziel dieser Dissertation war es, ein risikobasiertes Überwachungssystem für *Trichinella* spp. in der Schweiz zu entwickeln.

Als diagnostische Methode für eine risikobasierte Überwachung wurde die Serologie in Betracht gezogen. Die zur Verfügung stehenden serologischen Tests, insbesondere ELISA, wiesen alle eine Spezifität von weniger als 100% auf, was zu unerwünschten falsch-positiven Testergebnissen führen kann. Um das zu verhindern, wurde ein Western Blot als serologischer Bestätigungstest evaluiert und validiert, der auf der Verwendung von somatischem Antigen der *Trichinella spiralis* Muskelphase (L1) Larven beruht. Die Sensitivität und Spezifität dieses Western Blots wurden evaluiert und die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels bayesischer Modellierung. Es wurden 295 Fleischsaft- und Serumproben von Schweinen getestet, die vorgängig mittels der künstlichen Verdauungstechnik als *Trichinella*-negativ eingestuft worden waren. Darunter waren 74 Serumproben von Schweinen, die andere Nematodeninfektionen hatten, die zu serologischen Kreuzreaktionen führen könnten. Zusätzlich wurden 93 Fleischsaftproben von *Trichinella*-positiven Schweinen getestet. Die diagnostische Sensitivität und Spezifität des Western Blots lagen zwischen 95.8% und 96.0%, beziehungsweise zwischen 99.5% und 99.6%. Eine Sensitivitätsanalyse zeigte, dass die Modellierungsergebnisse kaum von Änderungen in den *a priori* Verteilungen beeinflusst wurden, was zu einer hohen statistischen Genauigkeit in die Ergebnisse führte. Diese Validierung zeigte, dass der Western Blot für Proben, die vorgängig in einem ELISA-test positiv getestet wurden, eine geeignete Bestätigungsmethode ist.

In einem nächsten Schritt wurden die Sensitivität und Spezifität eines nicht-kommerziellen sowie eines kommerziellen ELISAs evaluiert. Keiner dieser Tests konnte als Goldstandard

betrachtet werden, und aus diesem Grund wurden auch hier bayesische Modellierungstechniken verwendet. Insgesamt wurden 875 Proben von *Trichinella*-negativen Schweinen und 93 Proben von natürlich wie auch von künstlich infizierten Schweinen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass der *in-house* ELISA eine Sensitivität von 97.0% bis 97.4% und eine Spezifität von 99.4% bis 99.6% aufwies. Die Sensitivität des kommerziellen ELISAs lag zwischen 97.1% und 97.8% und dessen Spezifität zwischen 99.5% und 99.8%. Auch hier zeigte die Sensitivitätsanalyse eine hohe statistische Stabilität der Modelle.

Um die Prävalenz der Trichinelleninfektion in der Schweizer Wildtierpopulation zu ermitteln, wurden Proben bei 1'298 Füchsen, 55 Luchsen und 1'458 Wildschweinen entnommen und getestet. Die Proben der Füchse und Luchse wurden nur mittels der künstlichen Verdauungsmethode untersucht, die Proben der Wildschweine wurden zusätzlich serologisch untersucht. Isolierte Larven wurden mittels multiplex PCR untersucht, um die genaue Spezies und/oder den genauen Genotyp zu bestimmen. Eine Trichinelleninfektion wurde bei 21 Füchsen (1.6%) und 15 Luchsen (27.3%) festgestellt. Alle isolierte Larven waren Larven der Spezies *T. britovi*. Aus keiner der Wildschweinproben wurden Trichinellenlarven isoliert, dennoch waren 3 Wildschweine serologisch positiv (Seroprävalenz 0.2% (95% Konfidenzintervall 0.07%-0.60%)).

Es wurde eine weitere Studie durchgeführt, um die Abwesenheit von Trichinelleninfektionen in Schweizer Hausschweinen zu belegen. Ein ELISA wurde als *screening* Test eingesetzt, und ELISA-positive Proben wurden anschliessend mit einem Western Blot bestätigt. Zusätzlich wurde von ELISA-positiven Proben 20 Gramm Zwerchfellgewebe mit der künstlichen Verdauungsmethode untersucht, um einen Direktnachweis der Larven zu ermöglichen. Es wurden 7'412 Zuchtsauen und -eber, 9'973 Mastschweine und 2'779 Schweine aus Freilandhaltung untersucht. Proben von 17 (0.23%) Zuchtsauen und -ebnern, von 16 (0.16%) Mastschweinen und von 9 (0.32%) Schweinen aus Freilandhaltung waren ELISA-positiv, aber keine dieser Proben war positiv im anschliessenden Western Blot oder im künstlichen Verdauungstest. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Abwesenheit von Trichinelleninfektionen in Zuchtsauen und -ebnern (Zielprävalenz 0.04%) und in Mastschweinen (Zielprävalenz 0.03%) belegt. Die Ergebnisse zeigten zudem, dass die Trichinellenprävalenz in Schweinen aus Freilandhaltung, die Gruppe mit dem höchsten Infektionsrisiko, nicht über 0.11% lag.

Um die Wahrscheinlichkeit einer Trichinellenexposition für den Menschen in der Schweiz zu ermitteln, wurde eine qualitative Risikoabschätzung durchgeführt. Die Risikoabschätzung wurde gemäss der Richtlinien der Welttiergesundheitsorganisation durchgeführt.

Verschiedene relevante Fleischsorten wurden berücksichtigt, darunter einheimisches Wildfleisch und Schweinefleisch, sowie importiertes Fleisch. Schritte in der Fleischproduktion und -zubereitung, die zu einer Inaktivierung oder Tötung der Trichinellenlarven führen könnten, wurden in dieser Risikoabschätzung nicht berücksichtigt. Die Risikoabschätzung zeigte, dass die Wahrscheinlichkeit einer Exposition für den Menschen durch Wildschweinefleisch, das für den privaten Konsum benutzt wird, sowie durch Fleisch von Schweinen aus Freilandhaltung sehr gering war. Die Rolle von privat importiertem Wildfleisch konnte mangels Daten nicht evaluiert werden. Damit die Wahrscheinlichkeit einer Exposition gesenkt werden kann, sollten die Überwachungsaktivitäten für Schweine aus Freilandhaltung verstärkt werden. Zudem soll das Bewusstsein von Jägern und Reisenden erhöht werden, zu welchen Risiken der Konsum von nicht auf Trichinellen untersuchtem Wildfleisch führen kann, und welche Massnahmen getroffen werden können, um dieses Risiko zu senken.

Schliesslich wurde ein epidemiologisches Modell entwickelt, um die Ergebnisse der heutigen Fleischuntersuchung für Hausschweine zu evaluieren, und sie mit den Ergebnissen eines möglichen zukünftigen risikobasierten Überwachungsprogramms zu vergleichen. Zuerst wurden die Ergebnisse der künstlichen Verdauungstests über einen Zeitraum von 15 Jahren beurteilt, um festzustellen ab wann die Infektionsfreiheit in der Hausschweinepopulation aufgrund dieser Daten belegt werden konnte. Infektionsfreiheit wurde als Wahrscheinlichkeit definiert, dass die Prävalenz unter 0.0001% lag. Diese Freiheit konnte spätestens nach 12 Jahren belegt werden. Zweitens wurde ein risikobasiertes Modell entwickelt, das auf Serologie beruht. Die risikobasierte Überwachung wurde wiederum über einen Zeitraum von 15 Jahren beurteilt, mit Start im 2010. Es wurde gezeigt, dass die benötigte Probenzahl um mindestens den Faktor 4 im Vergleich zum heutigen Überwachungsmodell gesenkt werden konnte, ohne dass das Vertrauen in der Status der *Trichinella*-Freiheit der Hausschweinpopulation abnehmen würde.

Diese Dissertation hat gezeigt, dass ein serologisches, risikobasiertes Überwachungsprogramm für Trichinellen bei Hausschweinen in der Schweiz möglich ist, ohne dass der Schutz der öffentlichen Gesundheit gesenkt werden muss, auch wenn *Trichinella* spp. in der Wildtierpopulation vorkommt. Vor allem Schweine aus Freilandhaltung haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine Exposition und eine allfällige Infektion mit *Trichinella* spp., und das zukünftige Überwachungsprogramm sollte dieses erhöhte Risiko berücksichtigen.