



# **Das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)**



**Nachweis von  
Infektiösen Fortpflanzungsstörungen beim Schwein  
K.-H. Bogner, LGL Erlangen**

# Fertilitätsdiagnostik beim Schwein

## Material:

- Blut
- Abstriche
- Feten, Nachgeburten

# Methoden für Fertilitätsdiagnostik beim Schwein

- **serologischer Antikörpernachweis**
- **direkter Erregernachweis in Form von klassisch oder mit Immunomethoden gefärbten Abstrichen, Erregervermehrung, ELISAs oder molekularbiologischen Methoden**

## Wende in der Diagnostik der letzten Jahre beim Erregernachweis:

### Früher:

- Erregernachweis häufig schwierig und langwierig oder nicht möglich (z.B. PCV2, PRRS)
- Erreger mußte in vermehrungsfähiger Form vorhanden sein
- Erreger mußte vergleichsweise leicht kultivierbar sein
- Es waren Tierversuche erforderlich (Chlamydien)
- Aufwendige Methoden nur in Speziallabors möglich (PRRS)
- „Schnellmethoden“ waren nicht sensitiv genug oder lieferten falsch positive Ergebnisse (z.B. Chlamydien, von der Färbung bis zum Antigen-ELISA; Schweinepest-Antigen-ELISA)

### Heute:

- (Real-Time-) PCR praktisch in jedem Labor verfügbar
- Erregernachweis vergleichsweise einfach, („Geheimniskrämerei in vielen Bereichen vorbei“), Methodik in der Breite verfügbar

### Zukunft:

- Chip-Technologie

## Einschränkungen und Nachteil der Methoden mit und ohne Abhängigkeit vom Erreger

### Serologie:

- Serokonversion erst nach 10-20 Tagen, diagnostische Lücke bei Brucellose
- Kreuzreaktion mit anderen Erregern
- Verfügbarkeit: nicht auf jedem Gebiet existieren kommerzielle Diagnostika in vernünftiger Qualität zu einem vernünftigen Preis
- Qualität: Diagnostika häufig nicht oder unzureichend im Feld validiert, Qualität von selbstentwickelten „Hausmethoden“
- Impfungen weit verbreitet, Status oft nicht bekannt
- Abgrenzung von Impfungen außer bei DIVA-Impfstoffen meist nicht möglich

### Erregernachweis:

- Erreger muß zum Untersuchungszeitpunkt im Material vorhanden und nachweisbar sein (Problem: Lebenszyklus (Herpesvirus) Einwirkung des Immunsystems (maternale Antikörper), intermittierende Ausscheidung, inhomogene Verteilung)
- Schwankungen der Sensitivität von wenig sensitiv (z.B. gefärbter Ausstrich) bis zum Nachweis weniger, nicht mehr vermehrungsfähiger Nukleinsäurefragmente nach Behandlung

## Vorteile der Methoden

### Serologie:

- **Erregerkontakt noch lange nach dem Ereignis nachweisbar, auch wenn Erreger bereits eliminiert ist**

### Erregernachweis:

- **Erregernachweis ist heute schnell und ohne aufwendige Methodik möglich**

## Vergleich des Kostenfaktors ergibt etwa Gleichwertigkeit

- **ELISA kostet 25-40 % einer PCR**
- **PCR holt gegenüber Serologie durch Poolbildung auf (PCV2, PRRS, KSP) und kann billiger sein**

## Fragestellungen in der Diagnostik

- (1) hatte das Tier jemals Kontakt mit dem Erreger**
- (2) Lag eine Impfung vor, lässt sich diese von Feldinfektionen abgrenzen?**
- (3) Sind vorhandene Antikörper relevant für die Situation im Bestand und / oder für das Einzeltier?**
- (4) Ist der Erreger im Moment vorhanden?**
- (5) Ist das Vorhandensein des Erregers relevant für das momentane klinische Problem?**



# Fragestellungen in der Diagnostik

## (1) hatte das Tier jemals Kontakt mit dem Erreger ?

- Hervorragend zu lösen mittels Serologie, auch in Zukunft !!!!
- Basis der klassischen Serologie
- Grundlage der staatlichen Tierseuchenbekämpfung mit Ausmerzungen der Reagenten
- Nicht relevante Fragestellung bei weit verbreiteten Erregern, häufig nur Negativergebnis aussagekräftig, oft fehlende Abgrenzbarkeit zu Impfungen

## Fragestellungen in der Diagnostik

(2) lag eine Impfung vor, lässt sich diese von Feldinfektionen abgrenzen?

- Vergleichsweise hervorragend gelöst serologisch in der Tierseuchenbekämpfung bei AK
- Noch nicht gelöst für Schweinepest, da geeigneter wirksamer DIVA-Impfstoff fehlt
- Molekularbiologische Alternative bei Schweinepest zum Freiprüfen von Beständen liegt vor mit Abgrenzung des C-Stamm-Impfstoffs
- In vielen Bereichen außerhalb der Seuchen kein kommerziell verfügbares DIVA-Konzept, weder beim Impfstoff, noch in der Diagnostik (z. B. Influenza (Schwein) PPV, PRRS, PCV2,)
- **Kenntnis des Impfstatus außer bei entsprechenden Seuchenerregern daher sehr wichtig!**

## Fragestellungen in der Diagnostik

(3) Sind vorhandene Antikörper relevant für die Situation im Bestand (B) und / oder für das Einzeltier (E) ?

- Beachtung der Serokonversionszeiten wichtig !!!
- Tierseuchenbekämpfung: B+, E+
- Aussagekraft von Chlamydiennachweisen
- Aussagekraft von Antikörpern gegen PCV2, PRRS, PPV, außer ggf. zur Bestimmung des Infektionszeitpunkts (B-/+, E-)
- Überprüfung der Impfung: nachgewiesene Serumantikörper bedeuten nicht unbedingt protektiven Schutz (Influenza B+E+, PRRS B-E-)

## Fragestellungen in der Diagnostik

(4) ist der Erreger im Moment vorhanden? Erregernachweis

- **Blut:**  
Nachweis nur im Stadium der Virämie möglich (AK, KSPV {neues Konzept der KSP-Freiprüfung}, PRRS)
- **Abstriche:**  
Abhängigkeit von Qualität der Probennahme und verwendetem Transportmedium

## Fragestellungen in der Diagnostik

(5) Ist das Vorhandensein des Erregers relevant für das momentane klinische Problem? Erregernachweis

- Ja, wenn Klinik zum Erreger passt
- Ja, wenn Erregerfreiheit in der Seuchenbekämpfung gefordert wird (KSP)
- Schwierig, wenn Relevanz des Erregers nicht klar ist (Chlamydien beim Schwein)
- Schwierig, wenn Erregers z.B. nach Behandlung nicht mehr lebensfähig sind, aber in der PCR noch nachgewiesen werden (Chlamydien, bakterielle Erreger)
- Schwierig, wenn Erreger weit verbreitet und nur in großen Mengen relevant sind (PCV2)

## Beispiel: Relevanz des PCV2-Nachweises

- Eindeutig PCV2-assoziierte Erkrankungen (PMWS und PDNS) traten im ausgewerteten Untersuchungsmaterial erst ab  $10^{9,8}$  DNA-Kopien pro Gramm Gewebe (ct=23) auf
- Mit steigenden Virusmengen stieg der Anteil der spezifisch erkrankten Tiere
- Quantitative Befundmitteilung ist wichtig, insbesondere bei Blutproben, um Aussagen über die Relevanz der gefundenen Virusmenge zu machen
- Nicht jeder PCV2-Nachweis muß bedeuten, daß das Tier auch erkrankt ist, aber er ist ernst zu nehmen, wenn die Menge groß ist.

**Gegenüberstellung von gruppierten PCV2-Nachweisen und PCV2-assozierten Befunden bei 69 Absatzferkeln und Läufern und einem Mastschwein, bei denen Lymphknotenhistologie durchgeführt wurde oder PDNS vorlag**

<b>ct-Wert-Gruppe</b>	<b>Virusmenge (DNA-Kopien pro g Gewebe)</b>	<b>Fallzahl</b>	<b>Tiere mit PMWS-typischen Lymphknotenveränderungen oder PDNS</b>	<b>Bemerkungen</b>
-	-	21	-	-
<b>23 bis 37 + bis (+)</b>	<b>10<sup>5,6</sup> bis 10<sup>9,8</sup></b>	9	-	-
<b>13 bis 23 ++</b>	<b>10<sup>12,8</sup> bis 10<sup>9,8</sup></b>	<b>30</b>	<b>19 (63 %)</b>	<b>15 x PMWS 4 x PDNS</b>
<b>8 bis 13 +++</b>	<b>10<sup>14,6</sup> bis 10<sup>12,8</sup></b>	<b>10</b>	<b>9 (90 %)</b>	<b>9 x PMWS</b>
<b>gesamt</b>		70	28 (40 %)	24 x PMWS 4 x PDNS

# Hat die Serologie noch Zukunft ?

**Ja, aber die Bedeutung hat sich durch die PCR verschoben !**



## Wichtigste Aussage

- **Jede Methode hat ihre Stärken und Schwächen**
- **Es ist sehr wichtig, diese zu kennen**
- **Es ist wichtig, die Aussagefähigkeit von Methoden zu kennen**
- **Dieses Wissen ermöglicht es, zur Abklärung von klinischen Befunden**
  - ➔ **eine klare, zielgerichtete Fragestellung zu definieren,**
  - ➔ **die geeignete Untersuchungsmethode zu wählen und**
  - ➔ **die Untersuchungsergebnisse entsprechend im Bezug auf diese und auf die klinischen Befunde zu interpretieren**
- **Dabei kann eine sinnvolle Kombination verschiedener Methoden je nach Fragestellung sicher helfen**

## Problemstellung im LGL:

- **10 Proben**
- **Vorbericht: „Fertilitätsstörungen“**
- **Erwartungen: „LGL mach mal!“**
- **Vorstellung LGL:**
  - ➔ **mehr Angaben (Impfregime, klin. Geschehen, Zukäufe etc.)**

## Virale Abortusursachen beim Schwein

- **Klassische Schweinepest (KSP-Virus)**
- **Porzine Parvovirose (PPV)**
- **Aujeszky'sche Krankheit (AK-Virus)**
- **Porcines Respiratorisches und Reproduktives Syndrom (PRRS-Virus)**
- **Porcines Circovirus 2 (PCV2)**

## Untersuchungszahlen am LGL 2008 - Viruskrankheiten

Krankheit		Untersuchung auf Erreger	davon positiv	Untersuchung auf Antikörper	davon positiv
<b>Aujeszkysche Krankheit</b>	<b>A</b>	<b>382</b>	<b>-</b>	<b>20.697</b>	<b>-</b>
<b>Klassische Schweinepest</b>	<b>A</b>	<b>779</b>	<b>-</b>	<b>3.188</b>	<b>-</b>
<b>Porcines Parvovirus</b>		<b>29</b>	<b>-</b>	<b>344</b>	<b>244</b>
<b>Porcines Circovirus 2</b>		<b>2.801</b>	<b>488</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>PRRS</b>		<b>3.815</b>	<b>180</b>	<b>8.856</b>	<b>3.038</b>

## Bakterielle Abortusursachen beim Schwein

- **Brucellose**
- **Leptospirose**
- **Chlamydien**
- **„fakultativ“ pathogene Bakterien**

## Untersuchungszahlen am LGL 2008 – Bakterielle Krankheiten

Krankheit		Untersuchung auf Antikörper	davon positiv
<b>Brucellose</b>	<b>A</b>	<b>2.595</b>	<b>-</b>
<b>Leptospirose</b>	<b>M</b>	<b>32.298</b>	<b>600</b>
<b>Chlamydia spp.</b>		<b>1.848</b>	<b>75</b>

## Erregernachweis bei Klassischer Schweinepest (KSP-Virus)

### Serologie aus Blut

- Methode ELISA / Serumneutralisationstest
- Aussagekraft hoch, aber Kreuzreaktionen mit BVD

### Erregernachweis sinnvoll

- Tupfer
- Blut (EDTA besser)
- Fetus / Eihäute
- Methode
  - Anzucht
  - PCR
  - Immunofluoreszenz

## Erregernachweis bei Aujeszky'scher Krankheit (AK-Virus)

### Serologie aus Blut

- Methode ELISA (Serumneutralisationstest)
- Aussagekraft hoch

### Erregernachweis kaum möglich, außer bei echter Klinik

- Fetus / Eihäute
- Methode
  - Anzucht



## Erregernachweis bei Porziner Parvovirose (PPV)

### Serologie aus Blut

- Methode HAH / ELISA
- Aussagekraft gering, da fast alle Betriebe geimpft

### Erregernachweis sinnvoll, aber kaum Nachweise

- Fetus / Eihäute

- Methode

- Anzucht
- PCR

# Erregernachweis bei Porcinem Respiratorischem und Reproduktivem Syndrom (PRRS-Virus)

## Serologie aus Blut

- Methode ELISA
- Aussagekraft vorhanden, wenn nicht geimpft

## Erregernachweis sinnvoll

- Blut
- Tupfer
- Fetus / Eihäute
  
- Methode
  - PCR - Unterscheidung EU/US-Typ

## Erregernachweis bei PCV2

### Serologie aus Blut

- Methode ELISA
- Man versucht, Aussagekraft hineinzudeuteln

### Erregernachweis sinnvoll

- Blut
  - Tupfer
  - Fetus / Eihäute
- 
- Methode  
PCR

# Erregernachweis bei Brucellose

## Serologie aus Blut

- Methode RBT (KBR)
- Aussagekraft hoch

## Erregernachweis nicht üblich, kaum klin. Fälle, sinnvoll

- Fetus / Eihäute
- Methode
  - Anzucht

## Erregernachweis bei Leptospirose

### Serologie aus Blut

- Methode MAR
- Aussagekraft hoch bei höherem Titer

### Erregernachweis möglich, aber nicht verbreitet

- Fetus / Eihäute
- Methode
  - Kultur
  - PCR

## Chlamydien beim Schwein

Neue Artenbezeichnung	Alte Artenbezeichnung
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<i>Chlamydia muridarum</i>	
<i>Chlamydia suis</i>	
<i>Chlamydophila psittaci</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>
<i>Chlamydophila abortus</i>	
<i>Chlamydophila caviae</i>	
<i>Chlamydophila felis</i>	
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
<i>Chlamydophila pecorum</i>	<i>Chlamydia pecorum</i>

## Chlamydien beim Schwein

Chlamydia suis	Respiratorische Erkrankungen
Chlamydophila psittaci	Durchfall
Chlamydophila abortus	Erkrankungen des Urogenitaltrakts
Chlamydophila pecorum	Arthritiden

# Chlamydien beim Schwein

- **Ein echter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Erkrankungen mit Nachweis von Chlamydien und gleichzeitiger Chlamydienfreiheit von Kontrollgruppen konnte nicht erbracht werden**
- **Je mehr geforscht wird, umso weniger weiß man**



## Erregernachweis bei Chlamydien

### Serologie aus Blut

- Methode KBR / ELISA
- Aussagekraft gering, da häufig kein Bezug zur Klinik

### Erregernachweis sinnvoll

- Blut
- Tupfer
- Fetus / Eihäute
- Methode
  - (Anzucht)
  - PCR

# Erregernachweis bei Bakterien

## Erregernachweis sinnvoll

- Tupfer
- Fetus / Eihäute
- Methode
  - Anzucht

**Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!**

