

Bericht aus der AG PRA:

1. Vergleichsuntersuchungen 2014 (nach 2009, 2010 u. 2012)

2. Monitoring von Zuchtbetrieben

Michael Alt¹ und Katrin Beckmann²

¹Fachbereich 3.5.5 – Tiergesundheit, Schweinegesundheitsdienst,
Landwirtschaftskammer Niedersachsen

²Institut für Tiergesundheit, LUFA Nord-West, Oldenburg

1. Klinische Untersuchung
2. Bakteriologische Untersuchung mit Toxin-Nachweis
3. Serologische Untersuchung
4. Pathologisch-anatomische Untersuchung

Kriterien: 1. Sensitivität (Empfindlichkeit, sensitivity)
2. Spezifität (specificity)

Fragen: Prävalenz im infizierten Betrieb
predictive value, Confidence level
Stichprobenumfang
Häufigkeit der Untersuchung
Untersucher (SGD, Hoftierärzte, Organisation)

Kriterien: 1. Verhalten

- a. Niesen
- b. Schniefen
- c. Unruhe

2. Nasen- und Augenausfluß, Sekretbahnen mit Verschmutzung

- a. serös
- b. mukopurulent
- c. blutig

3. Morphologische Veränderungen

- a. Asymmetrie des Oberkiefers
- b. Auftreibungen, Faltenbildung
- c. Verkürzung des Oberkiefers
- d. Verbiegung des Oberkiefers

Klinische Untersuchung



Auftreibungen

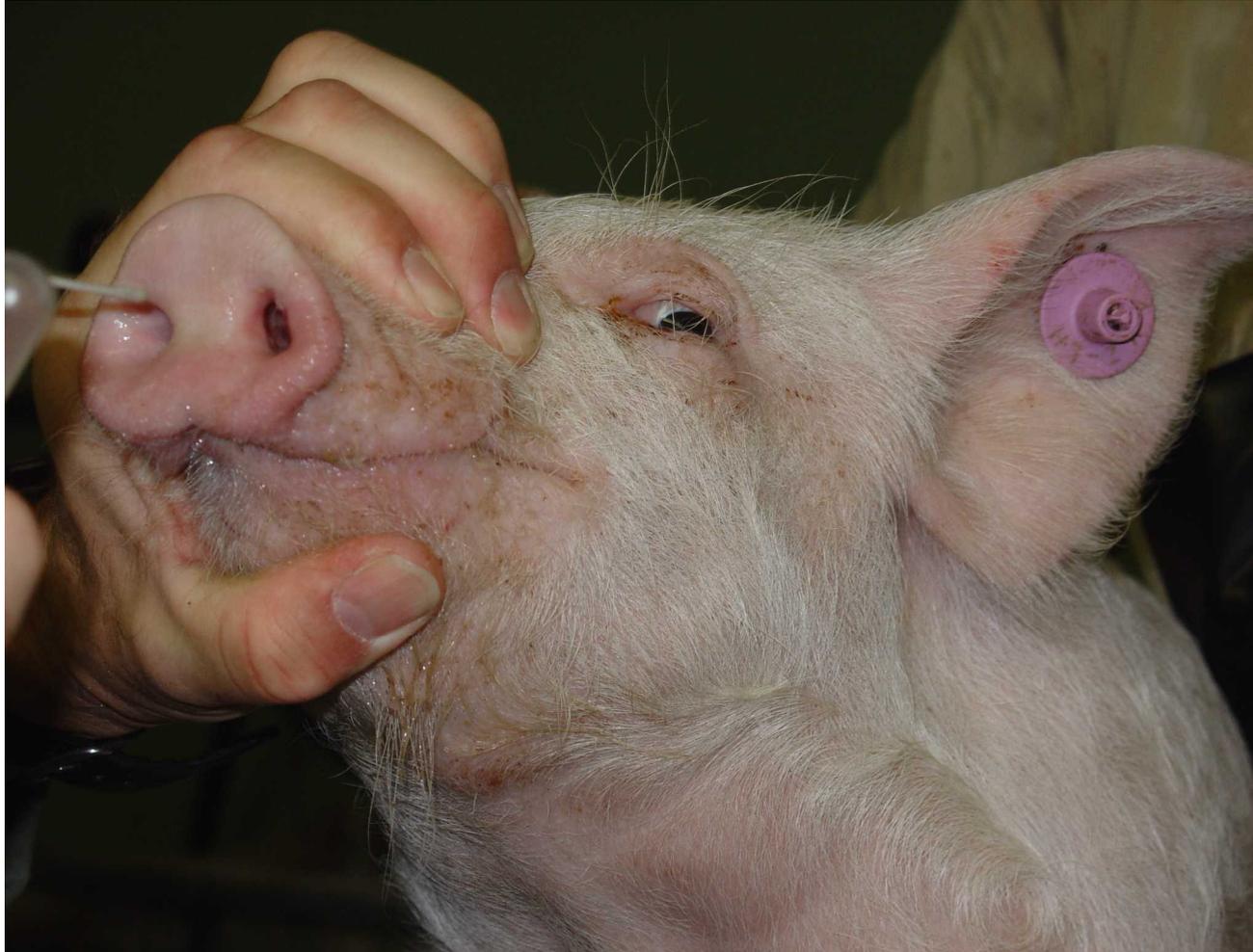
Verkrümmung



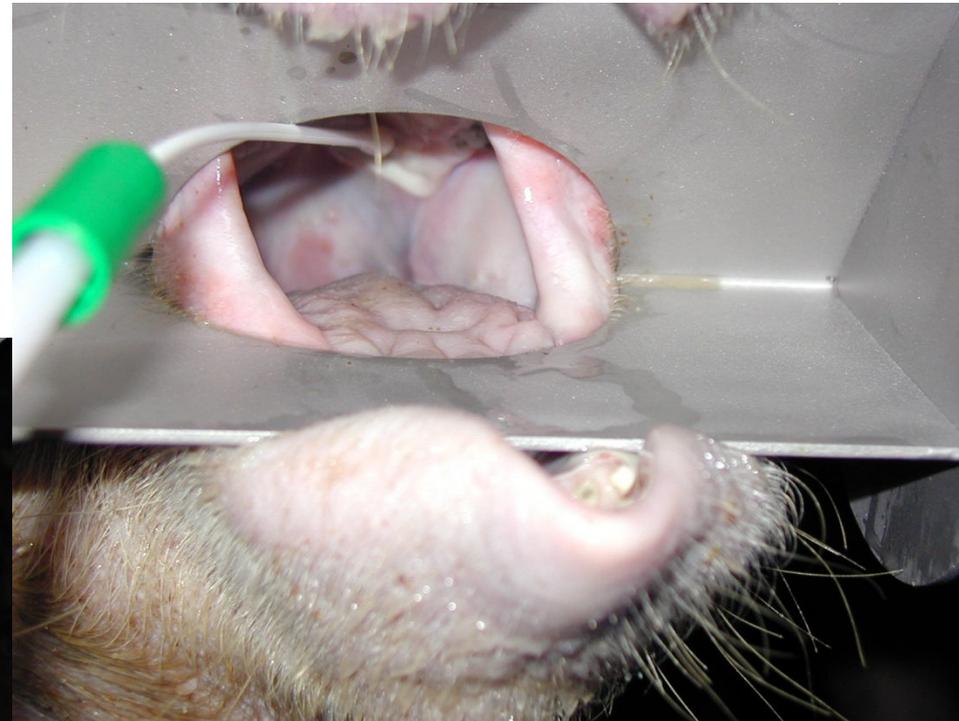
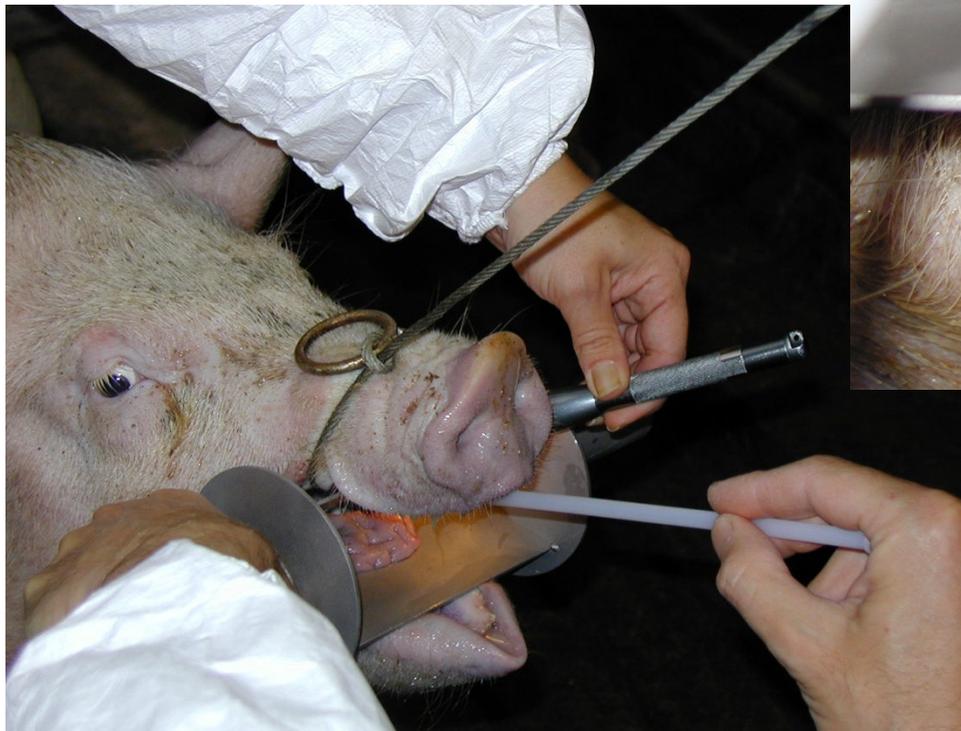
Klinische Untersuchung



Nasentupfer - Entnahme



Rachentupfer - Entnahme





Bakteriologische Untersuchung: ELISA (zuvor Dako® und Oxoid®)

- Ausstreichen auf Selektiv-Agar
- Bebrütung 24 h bei 37 ° C
- Abschwemmung des Überstandes
- Kühlung bei 4 ° C oder Weiterverarbeitung
- Einsatz von 200 µl Überstand in den ELISA
- Inkubation
- Waschen
- Zugabe von Konjugat und Chromogen
- Auswerten

Ergebnisse aus positiven Einsendungen des IfT der Lufa Nord-West 2005:

Einsendungen	Proben	pos.	%
31	526	147	28

Neuer Hersteller des ELISA Kits: Thermo Fisher Scientific, Wesel

Bakteriologische Untersuchung: PCR

- Ausstreichen auf Selektiv-Agar
- Bebrütung 24 h bei 37 ° C
- Abschwemmung des Überstandes
- Kühlung bei 4 ° C oder Weiterverarbeitung
- Durchführung der PCR nach Hotzel et al. (1997) mit Nachweis des DNT-Gens

Ergebnisse aus positiven Einsendungen des IfT 2007-2008:

Einsendungen	Proben	pos.	%
15	186	83	44

Serologische Untersuchung ELISA

- Zentrifugieren
- Neutralisation mit definierter Toxinmenge
- Inkubation über Nacht im Kühlschrank bei 4 ° C
- Durchführung des ELISA mit Verdünnungsstufen
- Auswertung: Sofern der OD – Wert 50 % des OD-Wertes der neg. Kontrolle unterschreitet, gilt die Reaktion als positiv.
- Auswertung: Fraglich gilt ein Titer von 1:1, positiv ein solcher von 1:2.

Ergebnisse aus positiven Einsendungen des IfT 2005-2008:

Einsendungen	Proben	pos.	%
15	163	52	31 (incl. 2 Einsendungen aus Impfbetrieben)
13	92	11	12

Fazit: Nur als zusätzliche Untersuchung, für Quarantäne-Tiere und zum Ausschluss der Impfung geeignet.

Erforderlicher Probenumfang

Population Size (Detecting One or More Positives)

Prevalence Estimate (% Positive)		Confidence Level	100	200	400	600	800	1000	2000	4000
>15%	70%		9	9	9	9	9	9	9	9
	80%		11	11	11	11	11	11	11	11
	90%		15	15	15	16	16	16	16	16
	95%		18	19	20	20	20	20	20	20
	99%		26	28	29	29	29	29	30	30
>20%	70%		7	7	7	7	7	7	7	7
	80%		8	9	9	9	9	9	9	9
	90%		11	12	12	12	12	12	12	12
	95%		14	14	15	15	15	15	15	15
	99%		20	21	22	22	22	22	22	22
>25%	70%		6	6	6	6	6	6	6	6
	80%		7	7	7	7	7	7	7	7
	90%		9	9	9	9	10	10	10	10
	95%		11	12	12	12	12	12	12	12
	99%		16	17	17	17	17	17	18	18

Vergleichsuntersuchung Dez. 2009

Teilnehmende Labore: Ift der LUFA Nord-West
LUFA NRW, Münster
LLLF Rostock
DNA-Diagnostik Rostock
LUA Chemnitz
LUA Leipzig
LUA Dresden
TGD Bayern, Grub
CVUA Stuttgart
VFL Herzogenburg, A
GD Deventer, NL

Methoden: ELISA, PCR mit Anreicherung, PCR direkt

Proben: Je 5 „identische“ Proben wurden verschickt:

Einmal unspezifischer Keimgehalt

Zweimal unspezifischer Keimgehalt und tox. P.m.

Zweimal tox. P. m. in Reinkultur

Ergebnisse: In 11 Laboren wurden je 5 Proben untersucht:

53 Proben mit richtigem Ergebnis

1 Probe unspezifischer Keimgehalt und tox. P.m. nicht erkannt

1 Probe tox. P.m. in Reinkultur nicht erkannt

Die beiden falsch negativen Ergebnisse entstanden je einmal im ELISA und in der PCR.

Daraus kann man ableiten : Sensitivität 95 %, Spezifität 100 %.

Neun von elf Laboren (82 %) lieferten ausschließlich richtige Resultate.

Vergleichsuntersuchung Dez. 2010

Teilnehmende Labore:

- Ift der LUFA Nord-West
- LUFA NRW, Münster
- LLLF Rostock
- DNA-Diagnostik Rostock
- LUA Leipzig
- LUA Dresden
- TGD Bayern, Grub
- CVUA Stuttgart
- VFL Herzogenburg, A
- GD Deventer, NL

Neue Teilnehmer: Bioscreen, Münster
Synlab Leipzig
IVD Hannover

Methoden: ELISA, PCR mit Anreicherung, PCR direkt

PRA-Vergleich

Lab-Schlüssel	Probe 1 tox. P.m.	Probe 2 tox.P.m. UKG	Probe 3 tox.P.m.UKG	Probe 4 UKG P-	Probe 5 UKG	
A	4	5	6	7	8	
B	11	13	15	17	19	
C	21	23	25	27	29	
D	39	37	35	33	31	
E	43	45	47	49	51	
F	60	59	57	55	53	
G	61	63	65	67	69	
H	79	77	75	73	71	
I	80	82	84	86	88	
J	98	96	94	92	90	nicht unters.
K	111	112	113	114	115	falsch fragl.
L	1054	1058	1060	1062	1064	
M	120	119	118	117	116	

Von insgesamt 65 Proben wurden 63 (97 %) mit richtigem Ergebnis untersucht.

Eine negative Probe mit hohem unspezifischem Keimgehalt wurde als fraglich beurteilt (ELISA).

Eine negative Probe wurde wegen mangelnder Eignung nicht untersucht.

Es wurden weder falsch positive noch falsch negative Ergebnisse geliefert. Alle Untersuchungsmethoden (ELISA, PCR mit oder ohne Voranreicherung) führten zu ausschließlich nicht falschen Ergebnissen.

Wenn die Proben aus Schweinebeständen entnommen worden wären, hätten die Ergebnisse in allen Fällen zu einer richtigen Beurteilung geführt.

Die Sensitivität kann mit 100 % und die Spezifität mit 96 % angegeben werden.

Elf von dreizehn Laboren (85 %) lieferten ausschließlich richtige Ergebnisse.

Von insgesamt 120 Proben wurden 116 (96,6 %) richtig erkannt.

PCR und ELISA nahezu gleichwertig

3 (2,5 %) Proben von 120 Proben falsch; eine (0,8 %) nicht untersucht.

Geschätzte Sensitivität: > 97 %

Geschätzte Spezifität: > 97 %

Bei stark verschmutzten Proben besteht die Gefahr von fraglichen oder falsch positiven Ergebnissen, obwohl in den meisten Fällen die Diagnostik nicht gestört wird.

Jedes Labor erhielt 5 Proben:

- 1. tox. P.m. in Reinkultur**
- 2. tox. P.m. mit unspezifischem Keimgehalt**
- 3. tox. P.m. mit unspezifischem Keimgehalt**
- 4. Nicht tox. P.m. mit unspezifischem Keimgehalt**
- 5. Unspezifischer Keimgehalt**

Vergleichsuntersuchung 2012

Labore

GD Deventer, NL
Herzogenburg, A
LVA Schleswig-Holstein
LLLF Rostock
Vaxxinova
LUFA Oldenburg
Bioscreen
Inst. f. Mikrobiologie, Tiho H
IVD, H
LUFA Münster
LUA Leipzig
LUA Dresden
LUA Koblenz
CVUA Stuttgart
CVUA Freiburg
TGD Bayern
Ergebnis: Alle Proben wurden richtig erkannt!

Methoden

PCR
PCR, ELISA
PCR
ELISA
PCR
PCR
PCR
PCR
ELISA
ELISA
ELISA
ELISA
ELISA
ELISA
ELISA

Vergleichsuntersuchung 2012

Labore

GD Deventer, NL
Herzogenburg, A
LVA Schleswig-Holstein
LLLF Rostock
Vaxxinova
LUFA Oldenburg
Bioscreen
Inst. f. Mikrobiologie, Tiho H
IVD, H
LUFA Münster
LUA Leipzig
LUA Dresden
LUA Koblenz
CVUA Stuttgart
CVUA Freiburg
TGD Bayern

Methoden

PCR
PCR, ELISA
PCR
ELISA
PCR
PCR
PCR
PCR
PCR
ELISA
ELISA
ELISA
ELISA
ELISA
ELISA
ELISA

Ergebnis:

**Alle Proben
wurden richtig
erkannt !**

14 Labore

Herzogenburg, A
LVA Schleswig-Holstein
LLLF Rostock
Vaxxinova
LUFA Nord West, Oldenburg
Bioscreen
Inst. f. Mikrobiologie, Tiho H
IVD, H
LUA Leipzig
LUA Dresden
LUA Rheinland-Pf., Koblenz
CVUA Stuttgart
CVUA Freiburg
TGD Bayern

Methoden

PCR, ELISA

PCR

ELISA

PCR

PCR

PCR

PCR

PCR

ELISA

ELISA

ELISA

ELISA

ELISA

ELISA

Ergebnis:

**Nur ein falsch
positives Ergebnis;**

**Alle anderen 69
Proben wurden richtig
erkannt !**

Fazit Vergleichsuntersuchungen 2012 u. 2014

-
- **149 Proben richtig erkannt, eine falsch negative Probe**
 - **Sensitivität und Spezifität liegen rechnerisch bei 99 %**
 - **ELISA und PCR liefern gleichermaßen gute Ergebnisse**
 - **Verzögerungen beim Versand werden in Grenzen toleriert**
 - **Schmutzkeime stören nur wenig**
 - **Insgesamt sehr hohe Zuverlässigkeit**

Vielen Dank:

Die Durchführung wurde durch das Safe Guard AP 2.2B unterstützt!

Tabelle Deutsch. Tierärztebl. 11/2011

Tab. 2: Spezifische Anforderungen an die regelmäßigen, weiterführende Untersuchungen zum Nachweis verschiedener Infektionserreger in Schweinebeständen

Erreger	Alter der Schweine	Anzahl der Schweine	Untersuchungsintervall	Untersuchungsmaterial*	Untersuchungsmethode	Besonderheiten**
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	JS, AS	15	3 Monate	Serum, ggf. Tonsillentupfer	ELISA, ggf. PCR oder Kultur	KEINE Impfung
<i>Ascaris suum</i>	AF, LS, JS, AS	15	3 Monate	Kot	Flotation	zzgl. Befund vom Schlachthof
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	AF, LS, JS	15	6 Monate	Kot	Kultur, ggf. PCR	
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	LS, JS	15	3 Monate	Serum, ggf. Tonsillentupfer	ELISA, ggf. PCR	KEINE Impfung
<i>Pasteurella multocida</i> (Typ D, toxinbildend)	AF, LS, JS, AS	15	3 Monate	Serum, ggf. Nasentupfer	ELISA, ggf. PCR	KEINE Impfung
PRRSV	SF, AF, JS	15	2 Monate	Serum	ELISA + PCR	KEINE Impfung
<i>Salmonella</i> spp.	JS	15	3 Monate	Serum, ggf. Kot	ELISA, ggf. Kultur oder PCR	KEINE Impfung mit lebendem Erreger
<i>Sarcoptes suis</i>	AS	15	6 Monate	Serum, ggf. Kratzproben	ELISA, ggf. Mikroskopie	

SF = Saugferkel; AF = Absetzferkel; LS = Läuferschwein; JS = Jungsau; AS = Altsau

* Grundsätzlich wird Serum bzw. Kot untersucht. Alle Proben sind einzeln zu untersuchen. Andere Material- und Methodenkombinationen (hier mit „ggf.“ gekennzeichnet) sind zu verwenden, wenn die Untersuchung von Serum bzw. Kot zu einem fraglichen und/oder vermutlich falsch positivem Ergebnis geführt hat

** Für alle Erreger gilt: Während des Zeitraums von 14 Tagen vor der Probenentnahme dürfen bei den Schweinen, von denen Proben entnommen werden sollen, keine gegen den Erreger wirkende Mittel zur Prophylaxe, Metaphylaxe und/oder Therapie eingesetzt worden sein.

-
- 1. Nasentupfer sind weiterhin das bevorzugte Untersuchungsmaterial**
 - 2. Serumproben nur in Ausnahmefällen und ergänzend sinnvoll**
 - Quarantäne
 - Ausschluss von Impfungen
 - Bestandssanierungen
 - 3. Bevorzugte Altersgruppe : Tiere von 2 bis 4 Monaten**
 - 4. Andere Altersgruppen können zusätzlich mit herangezogen werden
(klinischer Verdacht, Zukauf, Quarantäne)**
 - 5. In Niedersachsen werden z. B. BHZP- und TOPIGS-Norsvin-Betriebe
mit 4 x 15 bzw. 16 (> 3000 Tiere/Bestand) Proben überwacht**

Vielen Dank!

michael.alt@lwk-niedersachsen.de

