

Feldvalidierung einer real-time PCR zum Nachweis von *Mycoplasma hyopneumoniae* in Nasentupfermaterial von lebenden Schweinen

F. Zeeh¹, P. Kuhnert², R. Miserez², M. G. Doherr³, W. Zimmermann¹

¹Departement für klinische Veterinärmedizin, Abteilung für Schweinemedizin und ³Abteilung Klinische Forschung und ²Institut für Veterinär-Bakteriologie der Universität Bern

Zusammenfassung

Die durch *Mycoplasma hyopneumoniae* verursachte Enzootische Pneumonie (EP) der Schweine ist in der Schweiz eine meldepflichtige Tierseuche. Seit 2003 wird sie gesamtschweizerisch bekämpft. Die Diagnose EP erfolgt bis jetzt anhand der Kombination von verschiedenen diagnostischen Verfahren. Klinik, epidemiologische Daten, der Erregernachweis mittels Immunfluoreszenz oder Giemsa-Färbung, Serologie sowie die makroskopische und histologische Untersuchung veränderter Lungen bilden Teile der sogenannten Mosaikdiagnose. Mit der kürzlichen Entwicklung eines real-time PCR (rtPCR) Tests mit zwei Zielsequenzen stand eine neue Nachweismethode für *M. hyopneumoniae* zur Verfügung. Diese wurde auf die Anwendbarkeit an Nasentupfern lebender Tiere getestet. In 74 Beständen wurden durchschnittlich 10 Schweine untersucht. Mittels Mosaikdiagnose wurden 22 der untersuchten Herden als EP positiv und 52 als EP negativ klassifiziert. Anhand der gesammelten 730 Nasentupfer konnte gezeigt werden, dass die verwendete rtPCR 100% spezifisch und im Fall von Husten auf Betriebsebene auch 100% sensitiv ist. Auf Einzeltierebene und in chronisch oder latent infizierten Betrieben wies die rtPCR tiefere Werte für die Sensitivität auf. In diesen Fällen wäre nur ein positives Resultat beweisend für eine Infektion mit *M. hyopneumoniae*. Unsere Untersuchung zeigt, dass die rtPCR im Fall von Husten eine schnelle und sichere Diagnose am lebenden Tier erlaubt.

Schlüsselwörter: *Mycoplasma hyopneumoniae*, Diagnose, real-time PCR, Nasentupfer, lebende Schweine

Field validation of a real-time PCR test for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine nasal swabs of live pigs

Enzootic pneumonia (EP) of pigs, caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* has been a notifiable disease in Switzerland since May 2003. The diagnosis of EP has been based on multiple methods, including clinical, bacteriological and epidemiological findings as well as pathological examination of lungs (mosaic diagnosis). With the recent development of a real-time PCR (rtPCR) assay with 2 target sequences a new detection method for *M. hyopneumoniae* became available. This assay was tested for its applicability to nasal swab material from live animals. Pigs from 74 herds (average 10 pigs per herd) were tested. Using the mosaic diagnosis, 22 herds were classified as EP positive and 52 as EP negative. From the 730 collected swab samples we were able to demonstrate that the rtPCR test was 100% specific. In cases of cough the sensitivity on herd level of the rtPCR is 100%. On single animal level and in herds without cough the sensitivity was lower. In such cases, only a positive result would be proof for an infection with *M. hyopneumoniae*. Our study shows that the rtPCR on nasal swabs from live pigs allows a fast and accurate diagnosis in cases of suspected EP.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, diagnosis, real-time PCR, nasal swabs, live pigs

Einleitung

Seit Mai 2003 ist die Enzootische Pneumonie (EP) der Schweine gesamtschweizerisch eine meldepflichtige Seuche (Tierseuchenverordnung vom 27. Juni 1995, [SR 916.401], Technische Weisungen über die Entnahme von Proben und deren Untersuchung auf die Enzootische Pneumonie der Schweine vom 14. April 2003). Die EP wird durch *Mycoplasma hyopneumoniae* verursacht und ist durch Husten im klinischen Stadium und verminderte Tageszunahmen während der Wachstumsphase charakterisiert (Ross, 1992). Die Diagnose einer Infektion mit *M. hyopneumoniae* ist komplex und beruht auf verschiedenen Methoden, deren Ergebnisse in einer sogenannten Mosaikdiagnose kombiniert werden. Bestandteile der Mosaikdiagnose sind klinische Beobachtungen, epidemiologische Abklärungen sowie makroskopische, histopathologische und bakteriologische Befunde (Giger et al., 1977; Nicolet et al., 1980; Ross, 1992; Zimmermann et al., 1986). Die einzelnen Diagnostikmethoden haben ihre charakteristischen Nachteile wie geringe Sensitivität und Spezifität und eine eingeschränkte Anwendbarkeit. Sie sind zeitaufwendig und teilweise widersprechen sich die Resultate. Ausserdem konnte bis anhin der Erreger nicht am lebenden Tier nachgewiesen werden. Somit bot sich die PCR als neue Diagnostikmethode an (Abiven et al., 1992; Stärk et al., 1998; Verdin et al., 2000, Sachse, 2003). Von Dubosson et al. (2004) wurde ein real-time PCR Test (rtPCR) entwickelt und an Lungenmaterial getestet. Er besteht aus der kombinierten Detektion zweier Zielsequenzen (REP und ABC) und zeigte sehr hohe Werte für die Sensitivität und Spezifität (Dubosson et al., 2004). Allerdings wird für diese Untersuchung Material von geschlachteten oder eigens dafür getöteten Tieren benötigt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Prüfung der Anwendbarkeit der rtPCR an Nasentupfermaterial von lebenden Tieren und die Eignung der rtPCR als Ersatz für die bisherigen Diagnostikmethoden.

Tiere, Material und Methoden

In 74 Schweizer Betrieben wurden von insgesamt 730 Schweinen Nasentupferproben entnommen. Einerseits wurden gezielt Betriebe mit durch die Mosaikdiagnose nachgewiesener *M. hyopneumoniae* Infektion beziehungsweise streng überwachte, EP negative Betriebe (A-R Betriebe) ausgewählt. Andererseits wurden auch Betriebe besucht, die sich in der laufenden Abklärung eines EP-Verdaches befanden oder bei denen aus anderen Gründen eine Blutentnahme notwendig war. Die Einteilung der Betriebe in EP negativ und EP positiv erfolgte anhand der

Mosaikdiagnose gemäss den Technischen Weisungen über die Entnahme von Proben und deren Untersuchung auf die Enzootische Pneumonie der Schweine vom 14. April 2003 (Goldstandard).

Während der Betriebsbesuche wurden Daten zur Anamnese, der Klinik und dem Alter der Tiere erhoben und Blutproben für die Serologie entnommen. Bei der Erfassung klinischer Symptome wurde darauf geachtet, ob das untersuchte Tier hustete, vereinzelt Schweine im Stall husteten oder ob gar kein Husten beobachtet werden konnte. Für die Probenentnahme wurden kleinere Schweine von einer Hilfsperson hochgehoben und festgehalten. Bei grösseren Tieren erfolgte die Fixation mit der Oberkieferschlinge. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schlinge weit nach hinten geschoben wurde, um die Nasenlöcher nicht zuzuschnüren. Nach gründlicher Reinigung der Rüsselscheibe mit einer trockenen Gaze wurde der Tupfer so tief wie möglich in die Nase eingeführt, dort leicht hin und her bewegt und wieder in die Hülle verbracht. Es wurden sterile Tupfer ohne Medium, wenn möglich mit Plastikstielen, verwendet (Eurotubo® Collection swab, VWR International, Dietikon, Schweiz). Die Blutentnahme erfolgte an der Vena jugularis.

Die Nasentupfer wurden im Labor in eine Pufferlösung gegeben und lysiert (Dubosson et al., 2004). Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Lysate bei -20°C aufbewahrt. Falls die Tupfer nicht am selben Tag in das Labor gebracht und weiterverarbeitet werden konnten, wurden sie im Kühlschrank (4°C) zwischengelagert. Jede Probe wurde immer mit beiden von Dubosson et al. (2004) beschriebenen Zielsequenzen parallel getestet. Die Vorbereitung der Reagenzlösungen und der Reaktionsplatten für die rtPCR sowie die Auswertung der rtPCR Resultate erfolgte ebenfalls nach Angaben von Dubosson et al. (2004). Die Standardbedingungen des TaqMan® wurden bis auf die Zykluszahl, die auf 50 erhöht wurde, beibehalten. Ein Betrieb wurde als rtPCR positiv klassifiziert, wenn das rtPCR Resultat mindestens einer Probe für eine oder beide Zielsequenzen (REP, ABC) positiv war. In rtPCR negativen Betrieben waren alle Proben für beide Zielsequenzen negativ. Eine in jeder Reaktion mitgeführte interne Kontrolle erlaubte, negative von inhibierten Proben zu unterscheiden.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel und Win Episcope 2.0. Als Goldstandard wurde das Ergebnis der Mosaikdiagnose verwendet. Mittels einer Vier-Felder-Tafel wurden die Sensitivität, Spezifität und die prädiktiven Werte mit einem Konfidenzintervall von 95% für die rtPCR im Vergleich zum Goldstandard berechnet.

Ergebnisse

Sechs besonders verschmutzte Tupfer, die in der rtPCR inhibiert waren und 2 Tupfer mit nicht korrekter Probenentnahme wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Es konnten somit insgesamt 722 Tupferproben analysiert werden. Von den 74 Betrieben wurden 52 anhand der Mosaikdiagnose nach den Technischen Weisungen als EP negativ klassifiziert. Alle 495 zugehörigen Nasentupferproben reagierten in der rtPCR negativ. Dadurch ergab sich eine Einzeltier- und Herdenspezifität von 100% und ein positiver prädiktiver Wert (NPW) von ebenfalls 100%. In 22 Betrieben mit 227 Proben wurde mittels Mosaikdiagnose eine Infektion mit *M. hyopneumoniae* nachgewiesen. Einundzwanzig dieser Betriebe waren auch rtPCR positiv. Damit ergab sich auf Betriebsebene eine Sensitivität von 95.5% und ein negativer prädiktiver Wert (NPW) von 98.1% (Tab.1 und 2).

Tabelle 1: Ergebnisse der rtPCR zum Nachweis von *M. hyopneumoniae* in allen Schweinebetrieben der Studie.

Untersuchungsmaterial	Anzahl Proben	
	gesamt	rtPCR positiv (%)
Betriebe EP infiziert ¹		
Betriebe	22	21 (96)
Einzeltiere	227	107 (47)
Betriebe EP frei ¹		
Betriebe	52	0 (0)
Einzeltiere	495	0 (0)

¹ Die Einteilung der Betriebe in EP infiziert und EP frei erfolgte anhand der Technischen Weisungen über die Entnahme von Proben und deren Untersuchung auf die Enzootische Pneumonie der Schweine vom 14. April 2003.

Da Husten das Leitsymptom der EP ist, wurden 48 Betriebe, in denen Husten beobachtet worden war, noch einmal separat ausgewertet. Dabei wurde nicht unterschieden, ob Husten nur gehört oder das

hustende Tier auch untersucht wurde. Alle 18 nach den Technischen Weisungen als EP positiv klassifizierten Betriebe mit Husten waren auch rtPCR positiv. Somit ergab sich eine Herdensensitivität von 100%. Von den 175 Tupfern in den EP positiven Betrieben waren 102 rtPCR positiv. Durchschnittlich 56% der Tupfer eines Betriebes mit hustenden Tieren waren rtPCR positiv (Tab. 3).

Tabelle 3: Ergebnisse der rtPCR in 48 Betrieben mit hustenden Schweinen.

Untersuchungsmaterial	Anzahl Proben	
	gesamt	rtPCR positiv (%)
Betriebe EP infiziert ¹		
Betriebe	18	18 (100)
Einzeltiere	175	102 (58)
Betriebe EP frei ¹		
Betriebe	30	0 (0)
Einzeltier	284	0 (0)

¹ Die Einteilung der Betriebe in EP infiziert und EP frei erfolgte anhand der Technischen Weisungen über die Entnahme von Proben und deren Untersuchung auf die Enzootische Pneumonie der Schweine vom 14. April 2003.

Weiterhin wurde der Anteil rtPCR positiver Nasentupfer in EP positiven Betrieben hinsichtlich der unterschiedlichen Klinik ausgewertet. Bei den Schweinen ohne Husten waren 9.6% der Proben rtPCR positiv. Wenn Husten im Stall beobachtet wurde, waren es 43.2% und wenn von hustenden Tieren Nasentupfer entnommen wurden, waren 76.3% der Proben in der rtPCR positiv (Abb.1). In 4 Betrieben ohne hustende Tiere konnte die Infektion mit *M. hyopneumoniae* durch die Mosaikdiagnose nachgewiesen werden. Von diesen 4 Betrieben war ein Betrieb rtPCR negativ, allerdings konnten hier nur 8 anstatt 10 Tupferproben entnommen werden. Drei Betriebe hatten rtPCR positive Proben, allerdings war der Anteil sehr klein und schwankte zwi-

Tabelle 2: Ergebnisse von Untersuchungen auf *M. hyopneumoniae* an Lungen- und Nasentupfermaterial.

Methode	Sensitivität		Spezifität		Positiver prädiktiver Wert		Negativer prädiktiver Wert	
	Einzeltier	Betrieb	Einzeltier	Betrieb	Einzeltier	Betrieb	Einzeltier	Betrieb
Makroskopie ¹	77%	89%	59%	51%	37%	29%	89%	95%
Histologie ¹	77%	87%	52%	45%	34%	27%	88%	94%
Immunfluoreszenz ¹	62%	69%	74%	80%	49%	24%	82%	88%
rtPCR ²								
(Proben aus allen Betrieben)	47%	96%	100%	100%	100%	100%	81%	98%
rtPCR ²								
(Proben aus Betrieben mit Husten)	58%	100%	100%	100%	100%	100%	80%	100%

¹ Daten der von Neuenschwander (2004) retrospektiv ausgewerteten Untersuchungsmethoden an EP-verdächtigen Lungen (wahre Prävalenz gemäss Goldstandard zwischen 19 und 30%)

² Eigene Ergebnisse der rtPCR aus Nasentupfermaterial (wahre Prävalenz gemäss Goldstandard zwischen 30 und 38%).

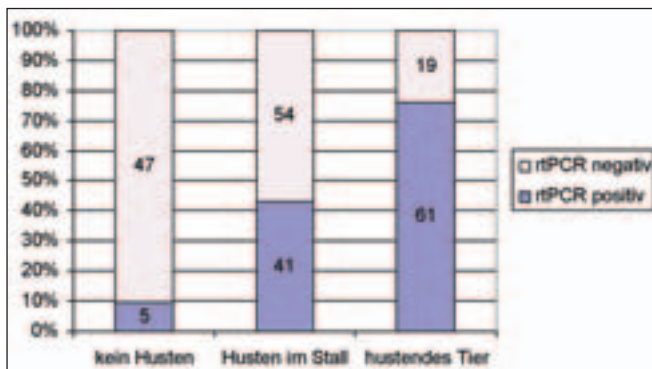


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Ergebnisse der rtPCR bei 227 Einzeltieren aus EP positiven Betrieben in verschiedenen Gruppen. Die Zahlen stellen die jeweilige Anzahl Nasentupfer dar.

schen 1 bis 3 positiven Tupfern von jeweils 10. Für eine korrekte statistische Auswertung war dieser Stichprobenumfang zu klein.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine rtPCR Methode mit zwei Zielsequenzen anhand von Nasentupfermaterial lebender Schweine getestet. An getöteten Tieren oder Schlachtlungen bietet die rtPCR die Möglichkeit, mit sehr hoher Sensitivität und Spezifität den Erreger der EP in Bronchialabstrichen nachzuweisen. Ein sicherer Nachweis des Erregers ist für die Bekämpfung und Überwachung der EP, wie sie in der gesamten Schweiz seit Mai 2003 durchgeführt wird, unabdingbar (Hege et al., 2002). Die bis anhin verwendeten Diagnosemethoden zeigten bezüglich Sensitivität und Spezifität schlechtere Testcharakteristiken. So erreichten die durch Neuschwander (2004) ausgewerteten Methoden Immunfluoreszenz (IF), makro- und mikroskopische Pathologie eine Sensitivität zwischen 61.5 und 88.8%. Auf Einzeltierebene ist die Sensitivität der rtPCR mit 47.1% auch nicht optimal. Im Rahmen der EP Bekämpfung ist jedoch die Bestandesdiagnose und nicht die des Einzeltieres von Bedeutung. Auf Betriebsebene erreichte die rtPCR eine Sensitivität von 95.5%, im Fall von Husten sogar 100%. Die Spezifitätswerte für die durch Neuschwander (2004) beschriebenen Methoden liegen jeweils deutlich unter der Spezifität der rtPCR (100%).

Der positive prädiktive Wert (PPW) beschreibt, wie viele der im Test positiv reagierenden Tiere tatsächlich erkrankt sind. Der PPW für die von Neuschwander (2004) ausgewerteten Methoden lag für die einzelne Lunge unter 50%, auf Herdenebene sogar unter 30%. Der PPW der rtPCR liegt jedoch bei 100% und bedeutet, dass alle Tiere oder Betriebe, die rtPCR positiv sind, tatsächlich mit *M. hyopneumoniae* infiziert

sind. Der negative prädiktive Wert (NPW) beschreibt analog den Anteil der Tiere, die ein negatives Testresultat aufweisen und tatsächlich nicht infiziert sind. Der NPW der Pathologie und der IF lag zwischen 81.9 und 95.2%. Dabei ist zu beachten, dass das ausgewertete Material verdächtige Lungen waren, die gezielt zur EP Abklärung eingeschickt wurden. Die rtPCR erreichte negative prädiktive Werte zwischen 79.6 bis 100% (Tab. 2). Daher ist ein negatives Ergebnis in der rtPCR auf Herdenebene im Fall von Husten aussagekräftig und es darf in diesen Fällen davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt der Probenentnahme keine Infektion mit *M. hyopneumoniae* vorlag. Auf Einzeltierebene und in Betrieben ohne Husten können negative rtPCR Resultate eine EP nicht sicher ausschliessen.

Die unterschiedlichen Werte der Sensitivität (hustend, nicht hustend) lassen sich mit der schwankenden Erregermenge am Entnahmeort erklären. *M. hyopneumoniae* wird aerogen übertragen und über die Nase aufgenommen, siedelt sich dann in den tieferen Atemwegen an und wird durch Husten wieder durch die Nase in die Umwelt abgegeben. Somit ist nachvollziehbar, dass sich der Erreger in Fällen von Husten deutlich besser nachweisen lässt. Auch Tiere, die sich noch in der Inkubationsphase befinden, lassen sich gegebenenfalls als infiziert identifizieren.

Die Serologie ist eine an sich gute Methode, hat aber wesentliche Nachteile, die sie als alleinige Diagnosemöglichkeit ausschliessen. In akut versuchten Betrieben kann sie erst nach der Serokonversion genutzt werden. Je nach Autor können frühestens 8 bis 56 Tage nach der Infektion Antikörper im Blut nachgewiesen werden (Calsamiglia et al., 1999; Leon et al., 2001). Dieser Zeitverlust kann einerseits eine längere Sperre des Betriebes oder im ungünstigeren Fall eine Gefährdung der Kontaktbetriebe zur Folge haben. In chronisch infizierten Beständen ist die Blutserologie bei Tieren im Alter von ca. 3 Wochen bis 4 Monaten oft weniger aussagekräftig. Im Kolostrum hingegen scheint es eine gewisse Anreicherung der Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* zu geben (Zimmermann und Tschudi, 1989). Dies ist auch von Bedeutung, wenn Zuchttiere, die sich vor einer Sanierung schon auf dem Betrieb befanden, in einem Verdachtsfall untersucht werden und positiv reagieren. Eine Unterscheidung zwischen persistierenden Antikörpern und einer Reaktion auf eine Neuinfektion ist somit nicht möglich. Ein weiterer ungünstiger Aspekt der Milchserologie ist die Verfügbarkeit des Kolostrums, die nur in Zuchtbetrieben und nur bis maximal 1 Tag pp. gegeben ist. Weiterhin ist die Spezifität der Serologie, bedingt durch das für den ELISA benutzte Antigen, teilweise unbefriedigend.

Ausser der Serologie kann keine der bisherigen Diagnosemethoden am lebenden Tier angewendet werden. Diese Möglichkeit bietet nun die hier beschriebene rtPCR aus Nasentupfern. Ein weiterer Vorteil der Nasentupfer ist die einfache Handhabung, wobei allerdings auf eine korrekte Probenentnahme zu achten ist. Die Oberkieferschlinge muss weit nach hinten über den knöchernen Teil der Nase gezogen werden, damit der Tupfer gut und ausreichend tief eingeführt werden kann. Der grosse Vorteil der rtPCR mit Nasentupfermaterial ist ihre schnelle Einsatzmöglichkeit. Sofort wenn Husten auftritt, können und sollten die Proben genommen werden.

Da es keine aktuellen Daten zur Herdenprävalenz von EP in der Schweiz gibt, konnte der notwendige Stichprobenumfang für die Diagnostik nicht berechnet werden. Die aus der Arbeit von Dubosson et al. (2004) übernommene Zahl von 10 Proben pro Betrieb scheint in EP-Ausbrüchen mit Husten aber ausreichend zu sein. In chronischen Fällen konnte zwar in 3 von 4 Betrieben die Infektion mit der rtPCR nachgewiesen werden, allerdings war der Anteil der rtPCR positiven Tupfer mit 1–3 pro Betrieb äusserst gering. Daraus ist zu schliessen, dass in Fällen von Verdacht auf chronische oder latente EP (ohne Husten) nur positive rtPCR Resultate aussagekräftig sind. Ein positiver rtPCR Befund spricht für EP. Ein negatives Resultat hingegen schliesst eine Infektion mit *M. hyopneumoniae* in latenten Fällen nicht sicher aus. Es wäre abzuklären, ob ein grösserer Probenumfang die Sensitivität erhöhen würde. Allerdings ist dies auch eine Frage der Kosten. Die Interpretation der Ergebnisse chronischer Fälle ist klar von derjenigen während klinischer Stadien abzugrenzen. Sobald Husten beobachtet wird und bevorzugt bei hustenden Tieren die Tupfer korrekt entnommen werden, sind sowohl positive als auch negative rtPCR Resultate eindeutig.

Von Dubosson et al. (2004) wurde beschrieben, dass die Ergebnisse der beiden Zielsequenzen (REP und ABC) nicht immer übereinstimmen, sondern dass es EP positive Betriebe gab, in denen die rtPCR nur für eine der Sequenzen positiv war. Aus diesem Grund wurden die Nasentupfer immer auf beide Zielsequenzen parallel untersucht. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Betriebe zeigten deutliche Unterschiede bezüglich der positiven Zielsequenzen. Durch epidemiologische Nachforschungen liess sich feststellen, dass es Zusammenhänge zwischen dem Tierverkehr und den Resultaten der rtPCR gab. Beispielsweise stimmten die Ergebnisse mehrerer Betriebe eines AFP-Ringes (nur ABC positiv) ebenso wie die Ergebnisse eines Züchters und die seines angeschlossenen Mastbetriebes (nur REP positiv) überein. Dies lässt vermuten, dass es mögli-

cherweise verschiedene Stämme von *M. hyopneumoniae* in der Schweiz gibt, welche mit der rtPCR unterschiedlich gut erkannt werden.

Eine andere Fragestellung unserer Arbeit war, ob die rtPCR die bestehenden Diagnostikmethoden ersetzen kann. Neben dem Zeitfaktor spielt auch die Rentabilität der Methode eine Rolle. Ein Nachweis mit der rtPCR kann innerhalb eines Tages nach Erhalt der entsprechenden Proben stattfinden. Für die Untersuchungen fallen derzeit nicht unerhebliche Kosten an. Die serologische Analyse von 20 Blutproben kostet knapp 300 Schweizer Franken. Eine routinemässig eingesandte, veränderte Schlachtlunge verursacht Laborkosten von rund 105 Schweizer Franken zusätzlich Versand. Bei eigens organisierten Probeschachtungen kommen noch der organisatorische Aufwand und eventuelle Schlachtabzüge hinzu. Wenn ein Tier für diagnostische Zwecke euthanasiert werden muss, entfällt der Schlachterlös ganz, dafür fallen Entsorgungskosten von durchschnittlich 35 Schweizer Franken an. Die Untersuchung von 10 Nasentupfern mit der rtPCR hingegen kostet derzeit am Institut für Veterinär bakteriologie Bern 290.50 Schweizer Franken. Diese Kosten könnten durch die momentan laufende Optimierung der Methode noch massiv gesenkt werden. Dadurch könnte die rtPCR nicht nur betreffend Spezifität, Sensitivität und Zeit sondern auch finanziell deutlich attraktiver als die herkömmliche Mosaikdiagnose sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die rtPCR aus Nasentupfermaterial mehrere Vorteile aufweist. Sie ist sofort bei einem Hustenausbruch einsetzbar. Nasentupfer sind einfach zu entnehmen. Es muss kein Tier getötet oder eine Schlachtung abgewartet werden. Die rtPCR ist, bedingt durch die hohe Sensitivität und Spezifität, sehr sicher. Sie ist gegenwärtig die einzige Methode, die schnell eine Unterscheidung zwischen einer Infektion mit *M. hyopneumoniae* und beispielsweise einer Influenza treffen kann. Durch die schnelle Diagnose verringert sich auch das Gefährdungspotential für die Nachbarbetriebe. Die Kosten für eine Untersuchung von Nasentupfer sind schon jetzt nicht höher als die für die bisherige Mosaikdiagnose. Somit eignet sich die rtPCR aus Nasentupfermaterial hervorragend für die Abklärung von EP-Ausbrüchen.

Dank

Die vorliegende Arbeit wurde durch den Forschungsfond des Departements für Klinische Veterinärmedizin der Vetsuisse Fakultät Bern finanziert.

Validation sur le terrain d'une PCR en temps réel pour la mise en évidence de *Mycoplasma hyopneumoniae* dans du matériel d'écouvillonnage nasal de porcs vivants

La pneumonie enzootique causée par *Mycoplasma hyopneumoniae* est une maladie à déclaration obligatoire en Suisse. Depuis 2003 elle est combattue au plan national. Jusqu'à maintenant, le diagnostic est posé sur la base d'une combinaison de différents procédés. L'examen clinique, les données épidémiologiques, la mise en évidence de l'agent par immunofluorescence ou coloration de Giemsa, la sérologie ainsi que l'examen macroscopique et histologique des poumons altérés forment des éléments de ce diagnostic mosaïque. Avec le récent développement d'une PCR en temps réel (real-time PCR/rtPCR) une nouvelle méthode de diagnostic de *Mycoplasma hyopneumoniae* est à disposition. La praticabilité de cette méthode sur des écouvillons nasaux d'animaux vivants a été testée. Dans 74 exploitations on a examiné en moyenne 10 porcs. Le diagnostic mosaïque a permis de classer 22 exploitations comme positives et 52 comme négatives. Sur la base des 730 écouvillons nasaux collectés, on a pu montrer que la rtPCR est spécifique à 100% et également sensible à 100% en cas de toux dans l'exploitation. Sur des exploitations détenant des animaux isolés ainsi que dans celles infectées de façon chronique ou latente, la rtPCR présente des valeurs de sensibilité plus faible. Dans ces cas, seul un résultat positif prouve une infection à *Mycoplasma hyopneumoniae*. Notre recherche montre que la PCR en temps réel permet, en cas de toux, un diagnostic rapide et sûr sur les animaux vivants.

Validazione in campo di un real-time-PCR per dimostrare la presenza di *Mycoplasma hyopneumoniae* nel in campioni di tamponi nasali di suini vivi

In Svizzera si è tenuto all'obbligo generale di notifica dell'animale infetto in caso di polmonite enzootica (PE) nei suini provocata dal *Mycoplasma hyopneumoniae*. Dal 2003 viene combattuta su tutto il territorio svizzero. Finora la diagnosi PE risultava in base alla combinazione di diversi procedimenti diagnostici. Aspetti clinici, dati epidemiologici, dimostrazione della presenza dell'agente tramite immunofluorescenza o colorazione Giemsa, analisi sierologiche così come l'analisi macroscopia e istologica dei polmoni lesionati sono le parti della cosiddetta diagnosi a mosaico. Con il recente sviluppo di un test real-time-PCR (rtPCR) con due sequenze target d'arrivo si ha a disposizione un nuovo metodo di indagine per rilevare il *M. hyopneumoniae*. L'applicabilità di quest'ultimo è stata testata con tamponi nasali di animali vivi. Nelle 74 mandrie sono stati analizzati in media 10 suini. Tramite la diagnosi a mosaico, 22 dei focolai esaminati sono stati classificati PE positivi e 52 quali negativi. In base ai 730 tamponi nasali raccolti si può mostrare che il rtPCR utilizzato è specifico nel 100% e in caso di tosse a livello delle aziende pure sensitivo al 100%. A livello di animali singoli infettati e aziende infettate in modo cronico o latente, il rtPCR dimostra valori bassi per la sensibilità. In questi casi solo un risultato positivo dimostra l'infezione da *M. hyopneumoniae*. La nostra ricerca mostra che il rtPCR nei casi di tosse consente una diagnosi rapida e sicura sull'animale vivo.

Literatur

Abiven P., Blanchard B., Daillard C., Kobisch M., Bove J.M.: A specific DNA probe for detecting *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected piglets. Mol. Cell. Probes 1992, 6: 423–429.

Calsamiglia M., Pijoan C., Trigo A.: Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. J. Vet. Diagn. Invest. 1999, 11: 246–251.

Dubosson C.R., Conzelmann C., Miserez R., Boerlin P., Frey J., Zimmermann W., Häni H., Kuhnert P.: Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. Vet. Microbiol. 2004, 102: 55–65.

Giger T., Bruggmann S., Nicolet J.: Immunologische Methoden zum Nachweis von *Mycoplasma suis pneumoniae* in Gefrierschnitten und Bronchialabstrichen. Schweiz. Arch. Tierheilk. 1977, 119: 125–134.

Hege R., Zimmermann W., Scheidegger R., Stärk K.D.: Incidence of reinfections with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pig farms located in respiratory-disease-free regions of Switzerland—identification and quantification of risk factors. Acta. Vet. Scand. 2002, 43: 145–156.

Leon E.A., Madec F., Taylor N.M., Kobisch M.: Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from farrow-to-finish farms. Vet. Microbiol. 2001, 78: 331–341.

Neuenschwander J.: Retrospektive Auswertung von Laborbefunden bei Verdacht auf Enzootische Pneumonie in Beziehung zum Sanierungsentscheid. Dissertation, Universität Bern, 2004.

Nicolet J., Paroz P., Bruggmann S.: Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. Res. Vet. Sci. 1980, 29: 305–309.

Ross, R.F.: Mycoplasma diseases. In: Diseases of Swine. Hrsg. A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S.D'Alaires und D.J. Taylor, Wolf Publishing Ltd. 1992, 537–551.

Sachse K.E., Frey J.: PCR detection of microbial pathogens. In: Methods in molecular biology. Hrsg. J. M. Walker Vol 216. Humana Press, Totowa, New Jersey.

Stärk K.D., Nicolet J., Frey J.: Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64: 543–548.

Verdin E., Saillard C., Labbe A., Bove J.M., Kobisch M.: A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. Vet. Microbiol. 2000, 76: 31–40.

Zimmermann W., Tschudi P., Nicolet J.: ELISA-Serologie in Blut und Kolostralmilch: eine Möglichkeit zur Überwachung der enzootischen Pneumonie (EP) in Schweinebeständen. Schweiz. Arch. Tierheilk. 1986, 128: 299–306.

Zimmermann, W., Tschudi, P.: Kontrolle der Enzootischen Pneumonie beim Schwein mit der Milchserologie. Tierärztl. Prax. Suppl. 1998, 5:113–115.

Korrespondenzadresse

Friederike Zeeh, Dr. med. vet., Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern, Departement für Klinische Veterinärmedizin, Abteilung für Schweinemedizin, Postfach 8466, CH-3001 Bern, Schweiz; Tel. 0041 (0)31 631 23 35, Fax: 0041 (0)31 631 26 31; E-Mail: friederike.zeeh@knp.unibe.ch

Manuskripteingang: 10. Dezember 2004

Angenommen: 25. Mai 2005