

Diagnostik und Bekämpfung der progressiven atrophischen Rhinitis des Schweines

Peter Schöss

Tiergesundheitsamt D-Oldenburg

Zusammenfassung

In der Diagnostik der progressiven atrophischen Rhinitis (PAR) steht neben der klinischen Bestandsuntersuchung heute der direkte Nachweis der Erreger, toxinogener Stämme von *P. multocida*, im Vordergrund. Serologisch nachweisbares Antitoxin ist nur bei einem Teil der infizierten Schweine zu erwarten. Bei der Bekämpfung der Krankheit muß unterschieden werden zwischen Tilgen durch Totalausmerzungen mit anschließendem Neuaufbau des Bestandes und Sanieren durch Behandlung, Impfung und Verbessern der Haltungsbedingungen. Für die Bewertung von PAR-Vakzinen kommen neben klinischen Prüfungen an Schweinen besonders die serologische Bestimmung des Antitoxintiters bei geimpften Tieren und die Ermittlung des *P.m.*-Toxoid-Gehaltes einer Vakzine mittels ELISA in Betracht.

Summary: Diagnosis and control of progressive atrophic rhinitis (PAR) in pigs.

*The diagnosis of PAR is based mainly upon clinical herd inspections and demonstration of the causal agent, toxigenic *P. multocida*. Antitoxic antibodies are detectable in the serum of only a part of the infected pigs. Eradication of the disease is achieved by slaughtering the whole herd and repopulation with breeding stock free from toxigenic *P. multocida*. Treatment, vaccination and improvement of housing and feeding conditions reduce the symptoms and economical losses.*

*The evaluation of PAR vaccines is possible by: 1st vaccinating pregnant sows and observation of their experimentally infected piglets; 2nd testing the amount of antitoxin in vaccinated animals by means of serum neutralization in cell culture or blocking ELISA; 3rd quantification of toxoid in a vaccine by a sandwich ELISA using monoclonal antibodies against formaldehyde resistant epitopes of the *P. multocida* toxin.*

Keywords: pig, progressive atrophic rhinitis, vaccine test

Ätiologie der Krankheit

Die progressive atrophische Rhinitis (PAR, sog. Schnüffelkrankheit) ist international definiert als die durch toxinbildende Stämme von *Pasteurella multocida* (*P.m.*) verursachte Krankheit (Pedersen et al., 1988; de Jong und Nielsen, 1990). Der spezifische Virulenzfaktor, das dermonekrotisierende, hitzelabile, immunogene Eiweißtoxin, wird in der Na-

senhöhle aus zerfallenden *P.m.* Zellen frei, diffundiert durch die Schleimhaut und erzeugt die progressive

Atrophie der Nasenmuscheln (Abbildungen 1 und 2) und beeinflusst das Wachstum der knöchernen

Nasenkapsel, wodurch äußerlich sichtbare Rüsseldeformationen entstehen können (Abbildung 3).

Die Toxinproduktion ist eine konstante Eigenschaft bestimmter Stäm-

me der Kapseltypen D und A; sie ist chromosomal determiniert. Toxinogene *P.m.* sind nicht ubiquitär, sondern kommen meist im Zusammenhang mit klinischer PAR vor. Die Verbreitung der PAR wurde auf 10 bis 30% der Schweinebestände in Westdeutschland geschätzt (Schöss, 1983). Die Krankheit wird hauptsächlich durch den Handel mit klinisch unauffälligen Schweinen aus verseuchten Herden verschleppt. In einem davon betroffenen Bestand bleibt die PAR lange Zeit enzootisch. Entstehung und Verlauf werden durch unspezifische Faktoren beeinflusst; es handelt sich jedoch nicht um eine Faktorenkrankheit, sondern um eine faktorenabhängige Infektionskrankheit (Schöss, 1989).

Ostdeutschen und ungarischen Autoren zufolge kann in sehr großen Schweinebeständen mit einem hohen Infektionsdruck auch *Bordetella bronchiseptica* (*B.br.*) ein Krankheitsbild wie die PAR hervorrufen (Krüger und Horsch, 1983; Elias et al., 1988). In Nordwestdeutschland und in anderen Ländern sind Bordetellen weit verbreitet und erzeugen bei ungünstigen Haltungsbedingungen eine katarrhalische Rhinitis der Ferkel mit reversibler Conchen-Hypoplasie. Unstrittig ist *B.br.* ein wichtiger Schrittmacher für toxinogene Pasteurellen; oft wirken beide Bakterien zusammen.

Diagnostik

Die Diagnostik der PAR war früher ausschließlich auf klinische und pathologisch-anatomische Untersuchungen (Nasenquerschnitte) ange-

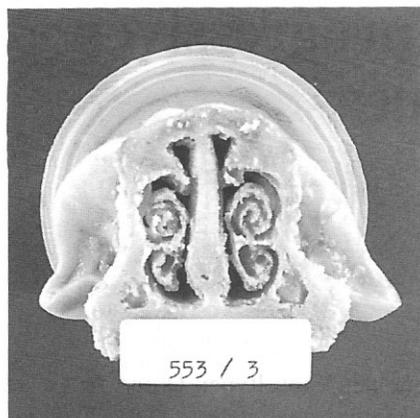


Abbildung 1: Normaler Nasenquerschnitt

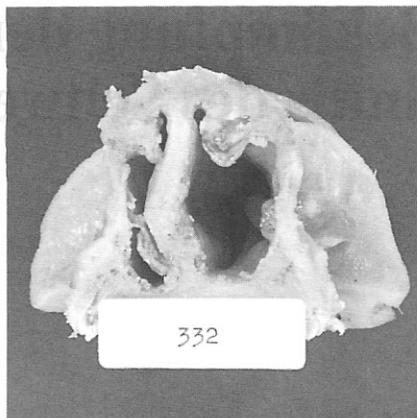


Abbildung 2: Atrophie der Nasenmuscheln



Abbildung 3: Deformation des Rüssels

wiesen. Seit 1980 wurde der direkte und in den letzten Jahren auch der indirekte Erreger-Nachweis möglich. Der direkte Nachweis erfolgt durch kulturelle Untersuchung von Nasen- oder Tonsillen-Tupferproben. Dabei werden *P.m.* Kolonien von den Agarplatten isoliert und die Subkulturen auf Toxinbildung geprüft. Dies geschah zuerst im Meerschweinchen-Hauttest (Thiel, 1983). Aus Tierschutzgründen und wegen der höheren Empfindlichkeit wurde so bald als möglich der Toxinachweis in Zellkulturen eingeführt (Bechmann und Schöss, 1988). Jetzt verwenden wir den *P.m.* Toxin-ELISA-Kit der Firma DAKO¹. Hiermit können auch Mischkulturen (Abschwemmungen von den Primärplatten) untersucht werden; dadurch erhöhen sich Schnelligkeit und Sicherheit der Untersuchung (Alt et al., 1993). Bei der Überwachung von Zuchtbeständen auf das Freisein von PAR untersuchen wir regelmäßig Nasentupfer.

Für die Serologie sind nicht die gegen die Kapsel- und somatischen Antigene von *P.m.* gerichteten Antikörper, sondern ist ausschließlich das Antitoxin wichtig. Dieses wird durch Serum-Neutralisationstest (SNT) nachgewiesen. Als anzeigendes System dient der *P.m.* Toxin-ELISA (Foged et al., 1990) oder die EBL-Zellkultur (Bechmann und

Schöss, 1991). In unserem Labor ist der SNT mit den EBL-Zellen empfindlicher als der mit dem ELISA kombinierte SNT (Alt et al., 1993). Beim SNT/ELISA oder *blocking* ELISA treten jedoch weniger unspezifische Reaktionen auf.

In einem mit toxinogenen *P.m.* infizierten Bestand können neutralisierende Antikörper nur bei einem Teil der Tiere nachgewiesen werden, und selbst Schweine mit äußerlicher Nasendeformation hatten nur zu 56% im SNT/EBL-Zellen nachweisbares Antitoxin (Bechmann und Schöss, 1991). Nach unseren Erfahrungen ist die Untersuchung einer genügend großen Stichprobe von Nasentupfern im allgemeinen zuverlässiger als die Serologie. Serologische Ergebnisse allein ergeben keine endgültige Bestandsdiagnose. In besonderen Fällen kombinieren wir beide Methoden (z.B. bei klinischem Verdacht, zur Untersuchung von Quarantänetieren).

Bekämpfung

Es ist zu unterscheiden zwischen Tilgen und Sanieren. Eine Tilgung der Krankheit und der ursächlichen Infektion ist nach den bisherigen Erfahrungen nur durch Bestandsausmerzungen und Neuaufbau über SPF- oder ähnliche Verfahren oder durch Ankauf von Zuchttieren aus überwachten, PAR-unverdächtigen Herden sicher zu erreichen. In den vom Schweinegesundheitsdienst in Nie-

dersachsen überwachten Zuchtbeständen darf nicht gegen PAR vakziniert werden, weil dies die Feststellung klinischer Krankheitssymptome und den Nachweis von toxinogenen *P.m.* erschwert. Auch entsprechende Überwachungsprogramme in den Niederlanden, in Dänemark und Großbritannien erlauben eine Impfung nicht (de Jong et al., 1988; Foged et al., 1990; Goodwin et al., 1990). Eine vorsorgliche Vakzination kann nicht die Ausbreitung der Infektion im Bestand verhindern, wenn diese eingeschleppt wird.

Bei der Sanierung, d.h. Verminderung des Auftretens von Krankheitssymptomen und der wirtschaftlichen Schäden infolge reduzierten Wachstums, spielt die Impfung jedoch neben Verbesserung der Haltungsbedingungen und Anwendung antibakterieller Medikamente eine hervorragende Rolle. Gegen eine Schleimhaut-Infektion liegt die lokale Immunisierung nahe. Ein intranasal verabreichter *B.br.* Stamm wirkte nicht befriedigend (de Jong und Rondhuis, 1982). Horsch et al. (1991) entwickelten einen *Bordetella* Lebendimpfstoff zur lokalen und subkutanen Anwendung und berichteten über günstige Ergebnisse.

Die gebräuchlichen PAR-Vakzinen sind jedoch überwiegend inaktivierte Impfstoffe zur parenteralen Injektion. Sie werden hauptsächlich bei tragenden Sauen angewendet, um die Ferkel durch kolostrale Immunisierung zu schützen. Eine dänische

¹ DAKO, Diagnostika GmbH, Postfach 700 407, D-22004 Hamburg

Arbeitsgruppe hat verschiedene Vakzintypen nach der gleichen Methode geprüft. Tragende SPF-Jungsaunen wurden zweimal *s.c.* oder *i.m.* vakziniert, die neugeborenen Ferkel zuerst mit *B.br.* und dann mit toxinogenen *P.m.* intranasal infiziert und im Alter von ca. 6 Monaten untersucht. Die wichtigsten Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

Die meisten Handelsvakzinen enthalten inaktivierte *B.br.* und toxinogene *P.m.* und/oder *P.m.* Toxoid. Als Immunogene wirken das hämagglutinierende *Bordetella* Fimbrienantigen (Hansen et al., 1983) und das *P.m.* Toxin oder Toxoid (Foged, 1992). Nach parenteraler Injektion treten die entsprechenden Antikörper nicht nur humoral, sondern auch im Nasenschleim auf. Sie hemmen die Anheftung der Bordetellen an das Epithel bzw. neutralisieren das *Pasteurella* Toxin. Elias et al. (1993) stellten nach *i.m.* Injektion von *P.m.* Toxoid im Nasenschleim höhere Mengen von Antitoxin fest als im Blutserum. Da das Toxin ein wichtiger Kolonisierungsfaktor für toxinogene *P.m.* ist, reduziert das Antitoxin die Stärke der Infektion, ohne sie jedoch zu eliminieren (Chanter und Rutter, 1990). Unklar ist, ob die Wirkung einer Vakzination hauptsächlich hierauf beruht oder mehr auf der Neutralisation des in den Körper eingedrungenen Toxins (Foged, 1992).

Durch parenterale Injektion von *P.m.* Toxin lassen sich wesentlich höhere Antitoxintiter im Serum erzeugen als durch intranasale Applikation des Toxins (Frymus et al., 1986). Ebenso stellt bei der natürlichen Infektion die oberflächliche Besiedlung der Nasenschleimhaut mit toxinogenen *P.m.* anscheinend nur einen geringen antigenen Reiz dar (Foged, 1992).

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis der immunogenen Wirkung von *P.m.* Toxoid-Vakzinen kommen folgende Möglichkeiten in Betracht:

1. Klinische Prüfung wie in den Versuchen der dänischen Arbeits-

Tabelle: Häufigkeit starker Nasenmuschel-Atrophien nach Vakzination von Sauen und experimenteller Infektion der Ferkel mit *B. bronchiseptica* und toxinogenen *P. multocida*

Vakzine	Starke Conchen-Atrophien in %			Autoren
	Kontroll-Gr.	Versuchs-Gr.	Reduktion	
<i>B.br.</i> (F.i.)	57	29	49	Pedersen und Barfod (1981)
<i>B.br.+tox.P.m.</i> (F.i.)	95	44	54	Barfod und Pedersen (1984)
<i>P.m.</i> Toxoid (gereinigt, F.i.)	90	6	93	Nielsen et al. (1991)
<i>P.m.</i> Toxin-Derivat (atoxisch, nativ, gentechn. erzeugt)	90	2	98	Nielsen et al. (1991)

F.i. = inaktiviert mit Formalin

gruppe oder wie von Voets (1990) beschrieben.

2. Bestimmung des Titers antitoxischer Antikörper bei Schweinen oder anderen vakzinierten Tieren im SNT mit EBL-Zellen oder im blocking ELISA. Die Höhe des durch passive Immunisierung erreichten Serumtiters entspricht dem Grad des Schutzes bei experimenteller Infektion mit toxinogenen *P.m.* (Nagy et al., 1986). Bei den Ferkeln vakzinierter Sauen stellten Nielsen et al. (1991) Antitoxin im Serum und weitgehenden Schutz gegen die Folgen einer intranasalen Infektion mit *B.bronchiseptica* und toxinogenen *P.m.* fest. Die von Frymus et al. (1989) durch Injektion von Hyperimmunserum erzeugten Antitoxintiter schützten Ferkel gegen die intranasale oder *i.m.* Applikation des Toxins. Das Antitoxin ist also der schützende Antikörper. Wenn es quantitativ bestimmt wird, ist ein Belastungsversuch unnötig. Nachteilig ist, daß die *Bordetella* Komponente einer Vakzine nicht erfaßt wird.
3. Bestimmung des Gehaltes an Formalin-inaktiviertem Toxin (Toxoid). Je mehr Toxoid eine Vakzine enthält, umso höhere Antitoxintiter sind zu erwarten. An dem Toxin-Molekül (Molekulargewicht ca. 143.000) stellte Foged (1991) eine Reihe unterschiedli-

cher Epitope fest, von denen einige weitgehend resistent gegen Formaldehyd waren. Wenn in einem Sandwich-ELISA zwei monoklonale Antikörper benutzt werden, die mit solchen Formalin-resistenten Epitopen reagieren, ist es möglich, die Konzentration sowohl von nativem als auch von Formalin-inaktiviertem Toxin zu bestimmen (Foged, 1992). Der auf diese Weise ermittelte Gehalt einer experimentellen Vakzine an Toxoid korrelierte eng mit der immunogenen Wirkung gegen *Pasteurella* Toxin in Mäusen (Foged, 1991). „...it is now possible to quantify the concentration of *P.m.* toxin and formaldehyde treated toxin throughout the process of toxoid production“ (Foged, 1992). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß sie ganz ohne Versuchstiere auskommt. Eine eventuelle *Bordetella* Komponente und die Wirkung von Adjuvantien werden jedoch nicht erfaßt.

Der im Handel befindliche PMT-ELISA K 009, produziert von DAKO A/S (Kopenhagen), ist hierfür nicht geeignet. Nach Mitteilung der Firma könnte ein ELISA zur Bestimmung von Formalin-inaktiviertem *P.m.* Toxin auf Anfrage produziert werden (Stender, 1994). Zu klären wäre jedoch, ob der Titer einer Toxoid-

Präparation in einem solchen ELISA stets ihrer Immunogenität entspricht.

Für die drei genannten Methoden müßten die von einer PAR-Vakzine zu erreichenden Mindestwerte ermittelt werden, die für praktische Anforderungen als ausreichend gelten können.

Literatur

- Alt, M., Bechmann, G. und Schöss, P. (1993). Vergleich von EBL-Zellen und ELISA in der kulturellen und serologischen Diagnostik der Rhinitis atrophicans des Schweines. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 100, 99–102.
- Barfod, K. und Pedersen, K. B. (1984). Influence of vaccination of sows with Bordetella-Pasteurella vaccines on the occurrence of atrophic rhinitis among their offspring after experimental infection with Bordetella bronchiseptica and toxigenic Pasteurella multocida. *Nord. Vet.-Med.* 36, 337–345.
- Bechmann, G. und Schöss, P. (1988). Untersuchungen über das Vorkommen toxinbildender Pasteurella-multocida-Stämme in Tosillen und Nasen von Ferkeln aus Rhinitis-atrophicans-unverdächtigen Zuchtbeständen. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 95, 283–285.
- Bechmann, G. und Schöss, P. (1991). Nachweis neutralisierender Antikörper gegen das Pasteurella multocida-Toxin bei Schweinen mit Rhinitis atrophicans. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 98, 310–312.
- Chanter, N. und Rutter, J. M. (1990). Colonisation by Pasteurella multocida in atrophic rhinitis of pigs and immunity to the osteolytic toxin. *Vet. Microbiol.* 25, 253–265.
- Elias, B., Boros, G. und Gergely, P. (1988). Studies on the epidemiology of atrophic rhinitis. XIII. Aetiology, epidemiology and immune response. *Magyar Allatorvosok Lapja* 43, 150–155. Ref. *Pig News Inf.* 10, 1059 (1989).
- Elias, B., Albert, M., Tuboly, S., Rafai, P., Ildiko Barna Vetro und Gergely, P. (1993). Die immunologische Wirkung des dermonekrotischen Toxins von Bordetella bronchiseptica und Pasteurella multocida auf SPF-Ferkel. *Mh. Vet.-Med.* 48, 349–354.
- Foged, N. T., Nielsen, J. P. und Barfod, K. (1990). The use of ELISA-determination of Pasteurella multocida toxin antibodies in the control of progressive atrophic rhinitis. *IPVS Congr. Lausanne, Proc.* 49.
- Foged, N. T. (1991). Detection of stable epitopes on formaldehyde detoxified Pasteurella multocida toxin by monoclonal antibodies. *Vaccine* 9, 817–824.
- Foged, N. T. (1992). Pasteurella multocida toxin. The characterization of the toxin and its significance in the diagnosis and prevention of progressive atrophic rhinitis in pigs. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 100, Suppl. No. 25.
- Frymus, T., Müller, E., Schulte, A., Kobatsch, B., Ueberschär, S. und Petzoldt, K. (1986). Studies in conventional and gnotobiotic piglets on the pathogenicity and immunogenicity of a toxin from Pasteurella multocida involved in atrophic rhinitis. *IPVS Congr. Barcelona, Proc.* 229.
- Frymus, T., Müller, E., Franz, B. und Petzoldt, K. (1989). Protection by toxoid-induced antibody of gnotobiotic piglets challenged with the dermonekrotic toxin of Pasteurella multocida. *J. Vet. Med. B* 36, 674–680.
- Goodwin, R. F. W., Chanter, N. und Rutter, J. M. (1990). Screening pig herds for toxigenic Pasteurella multocida and turbinate damage in a health scheme for atrophic rhinitis. *Vet. Rec.* 127, 83–86.
- Hansen, G. A., Pedersen, K. B. und Riising, H.-J. (1983). Protection against colonization of Bordetella bronchiseptica in the upper respiratory tract of the pig. In: European Communities-Commission, Report EUR 8643 EN, *Atrophic rhinitis in pigs* (89–97).
- Horsch, F., Krüger, M., Klie, H., Lux, R. und Dümichen, K. (1991). Erprobung einer lokal applizierten Bordetella-bronchiseptica-Lebendvakzine beim Schwein unter Feldbedingungen. *Mh. Vet.-Med.* 46, 783–786.
- Jong, M. F. de und Rondhuis, P. R. (1982). Difference between experimental and field trials with a live AR non-pathogen Bordetella bronchiseptica vaccine. *IPVS Congr. Mexico, Proc.* 118.
- Jong, M. F. de, Wellenberg, G., Schaake, J. und Frik, K. (1988). Selection of pigbreeding herds free from atrophic rhinitis by means of a bacteriological screening of pigs on DNT-producing Pasteurella multocida, a field evaluation from 1981 until 1987. *IPVS Congr. Rio de Janeiro, Proc.* 49.
- Jong, M. F. de und Nielsen, J. P. (1990). Definition of progressive atrophic rhinitis. *Vet. Rec.* 126, 93.
- Krüger, M. und Horsch, F. (1983). Zur Pathogenese und Immunprophylaxe der Bordetella-bronchiseptica-Infektion des Schweines (Übersichtsreferat). *Mh. Vet.-Med.* 38, 287–291.
- Nagy, L. K., MacKenzie, T. und Scarnell, J. (1986). Serum antibody values to Pasteurella multocida type D toxin and susceptibility of piglets to experimental challenge with toxigenic type D of P. multocida. *IPVS Congr. Barcelona, Proc.* 224.
- Nielsen, J. P., Foged, N. T., Sorensen, V., Barfod, K., Bording, A. und Petersen, S. K. (1991). Vaccination against progressive atrophic rhinitis with a recombinant Pasteurella multocida toxin derivative. *Can. J. Vet. Res.* 55, 128–138.
- Pedersen, K. B. und Barfod, K. (1981). The aetiological significance of Bordetella bronchiseptica and Pasteurella multocida in atrophic rhinitis of swine. *Nord. Vet.-Med.* 33, 513–522.
- Pedersen, K. B., Nielsen, J. P., Foged, N. T., Elling, F., Nielsen, N. C. und Willeberg, P. (1988). Atrophic rhinitis in pigs: proposal for a revised definition. *Vet. Rec.* 122, 190–191.
- Schöss, P. (1983). Atrophic rhinitis in West Germany. In: European Communities-Commission, Report EUR 8643 EN, *Atrophic rhinitis in pigs*, 61–64.
- Schöss, P. (1989). Die Rhinitis atrophicans des Schweines – eine Faktorenkrankheit? *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 102, 387–389.
- Stender, H. (1994): Persönl. Mitteilung. Microbiology Dept., DAKO A/S, Postbox 1359, DK-2600 Glostrup
- Thiel, C.-P. (1983). Untersuchungen über das Vorkommen toxinbildender Pasteurella multocida- und Bordetella bronchiseptica-Stämme bei der Rhinitis atrophicans des Schweines. Diss. Tierärztl. Hochschule Hannover.
- Voets, M. Th. (1990). Evaluation of the challenge model to test A.R. vaccines. *IPVS Congr. Lausanne, Proc.* 56.

Korrespondenzadresse

Peter Schöss
Osterkampsweg 96d
D-26131 Oldenburg