

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
und dem
Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
Klinik für Schweine / Leiterin: Univ.-Prof. Dr. Isabel Hennig-Pauka
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

**Wirksamkeit einer two-shot Vakzine nach experimenteller
Infektion von Endmastschweinen mit *Mycoplasma
hyopneumoniae***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Tanja Frey
aus Kaiserslautern

München 2014

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Gareis

Tag der Promotion: 08.02.2014

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	III-IV
1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1 Ätiologie	3
2.2 Epidemiologie.....	3
2.3 Pathogenese	5
2.4 Klinik	7
2.5 Pathologie	9
2.5.1 Makroskopische Veränderungen	9
2.5.2 Mikroskopische Veränderungen.....	10
2.6 Immunologie.....	10
2.7 Diagnose.....	11
2.7.1 Direkter Erregernachweis	11
2.7.1.1 Kultur.....	11
2.7.1.2 Immunologischer Nachweis aus dem Lungengewebe	12
2.7.1.3 In-situ Hybridisierung.....	13
2.7.1.4 PCR	13
2.7.2 Indirekter Erregernachweis.....	14
2.7.3 Vakzination	15
2.7.4 Therapie mit Antibiotika	17
2.7.5 Erregereliminierung	19
3. Material und Methoden	21
3.1 Versuchsbetrieb	21
3.2 Versuchstiere	22
3.3 Trachealabstrich.....	23
3.4 Nasentupfer.....	24
3.5 Blutprobenentnahme	24
3.6 Vakzine und Vakzination	24
3.7 Infektionsstall	25
3.8 Infektion	26
3.9 Direkter Erregernachweis.....	27
3.9.1 Erregernachweis mittels bakteriologischer Untersuchung	27
3.9.2 Erregernachweis mittels PCR	27
3.10 Indirekter Erregernachweis.....	28
3.10.1 Hustenindex.....	28
3.10.2 Gewichtsentwicklung	28
3.10.3 Serologie	28
3.10.4 Pathologie.....	29
3.10.4.1 Makroskopische Veränderungen der Lunge	30

3.10.4.2 Mikroskopische Veränderungen der Lunge.....	30
3.11 Genehmigung des Tierversuchs	31
3.12 Statistik	31
4. Ergebnisse.....	33
4.1 Direkter Erregernachweis	33
4.1.1 PCR Ergebnisse der Trachealabstriche und der Nasentupfer.....	33
4.1.2 Auswertung der bakteriologischen Untersuchung und der nPCR.....	33
4.2 Indirekter Erregernachweis.....	34
4.2.1 Ergebnisse der serologischen Untersuchungen.....	34
4.2.2 Auswertung der Mastleistungsdaten	36
4.2.3 Auswertung des Hustenindex	40
4.2.4 Vergleich des Hustenindex mit den PCR Ergebnissen.....	42
4.2.5 Auswertung der makroskopischen Lungenveränderungen.....	42
4.2.6 Vergleich des Hustenindex mit den makroskopischen Lungenveränderungen.....	43
4.2.7 Auswertung der mikroskopischen Lungenveränderungen.....	44
5. Diskussion.....	46
5.1 Monoinfektion mit <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	46
5.2 Infektionsmethode.....	47
5.3 Serologie.....	49
5.4 Durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme.....	51
5.5 Husten.....	53
5.6 Lungenveränderungen	54
5.7 Spätinfektion mit <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> bei experimenteller Infektion.....	57
6. Zusammenfassung.....	59
7. Summary.....	61
8. Literaturverzeichnis	63
9. Abbildungsverzeichnis	74
10. Tabellenverzeichnis	75
11. Anhang.....	76

Abkürzungsverzeichnis

a.p.	ante partum
AIAO	all in all out
BAL	bronchioalveoläre Lavage
BALT	bronchus-associated lymphoid tissue
BU	bakteriologische Untersuchung
CD4+	cluster of differentiation 4
CD8+	cluster of differentiation 8
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EP	enzootische Pneumonie
G	Erdbeschleunigung
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
KbE	Kolonie bildende Einheiten
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LT	Lebenstag
m	Meter
m ²	Quadratmeter
M. hyo	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
nPCR	nested PCR
OD	optische Dichte
One-shot	einmalig geimpft
p.i.	post infectionem
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCV 2	porcine circovirus type 2
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRDC	porcine respiratory disease complex
PRRSV	porcine reproductive and respiratory syndrome virus
p.p.	post partum
RU	relative ELISA-Units

SIV	swine influenza virus
S/P-Wert	Differenz der Extinktion von Probe und Negativkontrolle / Differenz der Extinktion von Positiv- und Negativkontrolle
TNF	Tumornekrosefaktor
TTSuV1	torque teno sus virus 1
QS-Programm	Qualitätssicherungsprogramm

1. Einleitung

Der für Schweine spezifische Erreger *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*) ist der Primärerreger der weltweit verbreiteten Enzootischen Pneumonie. Eine durch *Mycoplasma hyopneumoniae* verursachte Erkrankung führt zu erheblichen wirtschaftlichen Einbußen. In Ländern mit intensiver Schweineproduktion ist die Prävalenz von *Mycoplasma hyopneumoniae* hoch (THACKER, 2012). Der Erreger wird über die Schleimhäute des Atmungstrakts aufgenommen und siedelt sich auf den Zilien des respiratorischen Epithels an (ZIELINSKI und ROSS, 1993). Durch die folgende Schädigung der Zilien wird die mukoziliäre Clearance der Lunge herabgesetzt. Es kommt zur Infektion mit Sekundärerregern und somit zu einer EP (Enzootischen Pneumonie) (DEBEY und ROSS, 1994). Des Weiteren ist *Mycoplasma hyopneumoniae* neben anderen Erregern wie PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus), PCV2 (porcine circovirus 2) oder SIV (swine influenza virus) am Krankheitsbild des PRDC (porcine respiratory disease complex) beteiligt.

Eine Monoinfektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* äußert sich klinisch in trockenem, nicht produktivem Husten und einem verringertem Wachstum durch eine reduzierte Futteraufnahme. Durch bakterielle Sekundärinfektion kommt es zur fieberhaften Allgemeinerkrankung (THACKER, 2012).

Zur effektiven Vorbeugung und Bekämpfung der Enzootischen Pneumonie muss zunächst die Optimierung des Stallklimas angestrebt und das Betriebsmanagement verbessert werden. Mit Hilfe einer antibiotischen Therapie kann eine bereits ausgebrochene Erkrankung kontrolliert werden. Eine Erregerfreiheit ist durch einen Antibiotikaeinsatz nicht zu erzielen (MAES et al., 2008). Durch Vakzination kann eine Verbesserung der täglichen Gewichtszunahme um 2-8 % und eine Verbesserung der Futtermittelverwertung um 2-5 % erreicht werden. Auch eine Senkung der Mortalität ist durch eine Vakzination zu erzielen. Eine Impfung setzt somit nicht nur die Mastdauer herab, sondern verringert auch die klinische Symptomatik, reduziert Lungenveränderungen und führt somit zu geringeren Behandlungskosten (MAES et al., 1998, MAES et al., 1999).

Ziel dieser Untersuchung ist es, im experimentellen Versuch, die Wirksamkeit einer in der 1. und 3. Lebenswoche geimpften two-shot Vakzine bei einer späten Infektion an zuvor *Mycoplasma hyopneumoniae* naiven Endmastschweinen, zu evaluieren. Dazu wurden Schweine aus einem *Mycoplasma hyopneumoniae* unverdächtigen

Bestand mit 70 kg Körpergewicht in einen Infektionsstall verbracht und infiziert. Zur Evaluation der Wirksamkeit der Vakzine wurden Hustenindex, Gewichtsentwicklung sowie klinische und serologische Parameter erhoben. In der Sektion wurden makroskopische und mikroskopische Lungenveränderungen untersucht.

2. Literaturübersicht

2.1. Ätiologie

Der schweinespezifische Erreger *Mycoplasma hyopneumoniae* ist der primäre Verursacher der weltweit verbreiteten Enzootischen Pneumonie (THACKER, 2012). Mycoplasmen sind zellwandlose Bakterien (SELBITZ, 2010), die mit einer Größe von 0,4-1,2 µm Bakterienfilter passieren können (TAJIMA und YAGIHASHI, 1982). Aufgrund ihrer Cytoplasmenmembran mit laminarer Struktur nehmen sie keine gleichbleibende Form an (SELBITZ, 2010). Wegen ihrer geringen Größe gehören sie zu den kleinsten sich selbstständig vermehrenden Bakterien (RAZIN, 1992), die der Gattung *Mycoplasma*, der Familie *Mycoplasmataceae* und der Ordnung der *Mycoplasmatales* der Klasse *Mollicutes* zugeordnet sind (RAZIN et al., 1998). Ihr Genom besteht aus mehreren tausend Basenpaaren und weist mit 23-40 mol % einen hohen Anteil der Nucleinbasen Cytosin und Guanin auf (MINION, 2002). Mycoplasmen sind Prokaryoten und unterscheiden sich durch das Vorhandensein von DNA und RNA und durch ihre kulturelle Anzüchtbarkeit von Viren (KOBISCH, 1987). Neben *Mycoplasma hyopneumoniae* sind weitere schweinespezifische Mycoplasmen bekannt. *Mycoplasma hyorhinis* kann unter anderem Polyserositiden bei Absetzferkeln hervorrufen, *Mycoplasma hyosynoviae* spielt eine Rolle bei Arthritiden von Mast- und Zuchtschweinen und *Mycoplasma suis* ist der Erreger der infektiösen Anämie des Schweines (THACKER, 2012).

2.2. Epidemiologie

Mycoplasma hyopneumoniae kann weltweit in fast allen Schweine haltenden Beständen nachgewiesen werden und führt zu beachtlichen wirtschaftlichen Einbußen (THACKER, 2012).

Es wurden europaweit mehrere Studien zur Seroprävalenz von *Mycoplasma hyopneumoniae* durchgeführt. HORST et al. (1997) beschrieben, dass aus über 20 000 Blut- und Kolostrumproben, die in mehr als 200 Betrieben in Deutschland genommen wurden, 42,53 % auf *Mycoplasma hyopneumoniae* Antikörper positiv reagierten. Die Seroprävalenz der Blutproben von Jungsauen (63,02 %) und Mastschweinen (81,2 %) war deutlich höher als bei Ferkeln (32,73 %) und Altsauen (47,19 %). Regional gab es bezüglich der Seroprävalenz keine signifikanten Unterschiede (HORST et al., 1997). Im Jahr 2009 untersuchten GROSSE BEILAGE et al. (2009) 65 nordwestdeutsche Betriebe und konnten eine Seroprävalenz von

65 % bei Sauen nachweisen. In Frankreich wurden 2010 ungeimpfte Sauen aus 5 Betrieben serologisch auf *Mycoplasma hyopneumoniae* untersucht. Bei diesen Tieren konnte eine Seroprävalenz von 55 % nachgewiesen werden (FABLET et al., 2011).

Das Schwein gilt als einziger Wirt und somit gleichzeitig als einziger Überträger von *Mycoplasma hyopneumoniae* (WHITTLESTONE, 1976). Innerhalb einer infizierten Herde gibt es zwei Übertragungsmöglichkeiten. Zum einen die Übertragung durch direkten Tierkontakt zwischen infizierten Schweinen, zum anderen die indirekte aerogene Übertragung mittels Tröpfcheninfektion (SELBITZ, 2010).

Mycoplasma hyopneumoniae kann vertikal von der Muttersau auf die Ferkel übertragen werden. Ein höheres Risiko zu erkranken besteht dabei für Ferkel von Jungsauen, da Jungsauen über eine schlechtere Immunität verfügen und nicht ausreichend maternale Antikörper an ihre Ferkel weitergeben. Jung- und Altsauen sind zudem die häufigsten Ausscheider von *Mycoplasma hyopneumoniae*. Sauen können vom zweiten bis siebten Wurf persistent mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infiziert sein und so den Erreger auf ihre Ferkel übertragen (MAES et al., 1996, CALSAMIGLIA, 2000). Ab dem Absetzalter überträgt sich *Mycoplasma hyopneumoniae* vor allem bei kontinuierlicher Belegung horizontal über Buchtengenossen (THACKER, 2012). Die Wahrscheinlichkeit auf *Mycoplasma hyopneumoniae* positiv getestet zu werden und klinische Symptome einer EP zu entwickeln, ist bei Betrieben niedriger, bei denen während der Jungsaueneingliederung bereits der direkte Kontakt zu einem *Mycoplasma hyopneumoniae* positiven Schwein besteht (NATHUES et al., 2012a).

Des Weiteren haben epidemiologische Studien nachgewiesen, dass die aerogene Übertragung des Erregers zwischen einzelnen Betrieben ein großes Problem darstellt. Im Jahr 2009 konnte eine Übertragung von *Mycoplasma hyopneumoniae* über eine Entfernung von 4,7 km über die Luft nachgewiesen werden. 2010 wiesen OTAKE et al. (2010) eine Übertragung von über 9,1 km nach. DEE et al. (2010) fanden zudem heraus, dass die aerogene Übertragbarkeit von mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infizierten Luftpartikeln in den frühen Morgenstunden höher ist, wenn relative Luftfeuchte und Sonneneinstrahlung ansteigen und noch kühlere Temperaturen vorherrschen. SEGALES et al. (2012) stellten fest, dass die Wahrscheinlichkeit einer Serokonversion bei niedrigeren Außentemperaturen größer ist als bei hohen Außentemperaturen. Tiere, die im Herbst geboren, im Winter in die Mast umgestallt und im Frühjahr geschlachtet wurden, waren unter den getesteten

Mastdurchläufen am ehesten seropositiv auf *Mycoplasma hyopneumoniae*. Bei hohem wöchentlichen Niederschlag war die Wahrscheinlichkeit, dass die Schweine in der nPCR positiv auf *Mycoplasma hyopneumoniae* reagieren, ebenfalls höher (SEGALES et al., 2012).

Immunologisch naive Ferkel zwischen der 3. und 12. Lebenswoche sind empfänglich gegenüber Infektionen mit *Mycoplasma hyopneumoniae* (PIFFER und ROSS, 1984). In vielen Herden erfolgt die Infektion während der Säugezeit (RUIZ, 2003). Die Verbreitung des Erregers erfolgt sehr langsam, eine intrauterine Infektion oder eine lactogene Übertragung finden nicht statt (PRIKAZSKY, 1985).

NATHUES et al. (2013) konnten zeigen, dass verschiedene Faktoren die Wahrscheinlichkeit einer *Mycoplasma hyopneumoniae* Infektion bei Saugferkeln beeinflussen. Zähneschleifen und höhere Temperaturen im Ferkelnest in den ersten 2 Lebenswochen senkten das Infektionsrisiko, während eine PCV2 Impfung das Risiko einer Infektion erhöhte (NATHUES et al., 2013).

Die Wahrscheinlichkeit, dass *Mycoplasma hyopneumoniae* durch Gegenstände, die mit Sekreten des Atmungstrakts kontaminiert sind, übertragen wird, ist als gering einzuschätzen (MAES et al., 1996). GOODWIN (1985) konnte zeigen, dass obwohl *Mycoplasma hyopneumoniae* längere Zeit in flüssigen Medien überlebensfähig ist, keine Erreger mehr nachgewiesen werden konnten, sobald der kontaminierte Gegenstand wieder trocken war.

Experimentell infizierte Schweine konnten 80 bis 200 Tage nach ihrer eigenen Infektion *Mycoplasma hyopneumoniae* auf naive Sentineltiere übertragen. Tiere, die nach der Infektion zu konvaleszenten Trägern des Pathogens wurden, blieben für 200 Tage infektiös. Die Infektionsdauer von *Mycoplasma hyopneumoniae* beträgt weniger als 254 Tage (PIETERS et al., 2009). Auch geimpfte Sentineltiere, die in Kontakt mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infizierten Tieren standen, waren in der nPCR positiv, also vor einer Infektion nicht geschützt. Es gab keinen Unterschied zwischen der Übertragung des Erregers von klinisch unauffälligen infizierten Tieren auf geimpfte und ungeimpfte Sentineltiere (PIETERS et al., 2010).

2.3. Pathogenese

Nach der Aufnahme von *Mycoplasma hyopneumoniae* über die Schleimhäute des Atmungstrakts (ZIELINSKI und ROSS, 1993) bindet der Erreger spezifisch an die Rezeptoren der Zilien des respiratorischen Epithels (ZHANG, 1994). Sowohl *in Vivo* als auch *in Vitro* konnte diese Bindung nachgewiesen werden (DEBEY und ROSS,

1994, YOUNG et al., 2000). Durch YOUNG et al. (2000) wurde ein *in Vitro* System zur Kultivierung von porcinen Trachealepithelzellen entwickelt, um Aussagen über die Adhäsion von *Mycoplasma hyopneumoniae* treffen zu können. Ein pathogener Stamm hat die Fähigkeit sich an die Zilien zu heften und diese zu zerstören, wohingegen ein apathogener Stamm kein Bindungsvermögen mit den respiratorischen Zilien aufweist. Die Rezeptoren der Zilien des Respirationstrakts bestehen aus Glykokonjugaten (ZHANG, 1994), außerdem sind feine Fibrillen an der Bindung zwischen *Mycoplasma hyopneumoniae* und den Zilien beteiligt (SARRADELL et al., 2003).

Das Adhäsin P97 gilt als wichtiges Adhärenzmolekül von *Mycoplasma hyopneumoniae*, da es eine rasche Immunantwort hervorruft. Es wird nur von virulenten *Mycoplasma hyopneumoniae* Stämmen exprimiert, nicht aber von avirulenten Mykoplasmen. Ist ein pathogener Mykoplasmenstamm nicht in der Lage an die Zilien zu binden, erlischt seine Infektiösität (ZHANG et al., 1995). YANG et al. (2005) konnten Epitopstrukturen von *Mycoplasma hyopneumoniae* entschlüsseln und fanden heraus, dass die Mykoplasmen-Proteine 97 kDa, 56 kDa, 30 kDa und 23 kDa zur Immunantwort beitragen. SCHMIDT et al. (2004) fanden zusätzlich mit p65 ein immundominantes Oberflächen-Lipoprotein, das spezifisch nur während der Erkrankung des Tieres mit *Mycoplasma hyopneumoniae* nachgewiesen werden konnte. P65 weist eine Esterase- und Lipaseaktivität auf. Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung des Lipoproteins 65 ist, dass Kaninchen-Anti-p65-Antikörper das Wachstum von *Mycoplasma hyopneumoniae* hemmen. Welche Rolle diese Lipoproteine in der Pathogenese spielen, konnte noch nicht vollständig geklärt werden, aber man vermutet, dass sie unter anderem die Funktion des Surfactants der Lunge bei der Mykoplasmen induzierten Pneumonie herabsetzen (SCHMIDT et al., 2004).

Nachdem *Mycoplasma hyopneumoniae* mit Hilfe seiner Virulenzfaktoren an die Zilien des respiratorischen Epithels bindet, kommt es zur Ziliostase, zur Verklumpung der Zilien, in der Folge zur Deziliation und somit zum Verlust der mukoziliären Clearance (DEBEY und ROSS, 1994). MAES (2010) beschreibt, dass es durch lymphohistiozytäre Infiltrate zusätzlich zu atemwegsverengenden Läsionen kommt, welche durch Modulationen im Immunsystem das Tier anfälliger für Infektionen mit Sekundärerregern machen. Es findet zusätzlich eine Produktion von mukösem Sekret statt (MAES, 2010).

Mycoplasma hyopneumoniae kann die Transportmechanismen der Wirtszelle verändern. Die Unterbrechung der K⁺-Kanäle des Bronchialepithels bewirkt die Ziliostase (DEBEY und ROSS, 1994). PARK et al. (2002) fanden heraus, dass pathogene *Mycoplasma hyopneumoniae* Stämme Rezeptoren von trachealen Epithelzellen aktivieren und bewirken, dass Ca²⁺ aus dem Endoplasmatischen Retikulum der Zelle freigesetzt wird und es somit zu einem intrazellulären Ca²⁺ Anstieg kommt. Dies wird in der Studie als ein Signal für die Pathogenität von *Mycoplasma hyopneumoniae* angesehen (PARK et al., 2002).

2.4. Klinik

Eine Monoinfektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* wird als Mykoplasmosen bezeichnet. Bei zusätzlicher bakterieller Sekundärinfektion mit zum Beispiel *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis* oder *Actinobacillus pleuropneumoniae* entsteht das Krankheitsbild der Enzootischen Pneumonie. Ko-infektion mit Viren wie PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus), PCV2 (porcine circovirus type 2) oder SIV (swine influenza virus) werden als PRDC (porcine respiratory disease complex) bezeichnet (THACKER, 2012). Bei der MIRD (mycoplasma induced respiratory disease) werden zusätzlich die Umweltfaktoren, welche zur Erkrankung beitragen, mit berücksichtigt (MAES et al., 1996, SELBITZ, 2010). Begünstigende negative Umweltfaktoren können eine zu hohe Belegdichte, schlechte Ventilation, Temperaturschwankungen, kalte Bodenflächen, Luftzug oder ein zu hoher Schadgasgehalt sein (HEINRITZI, 2006). SEGALLES et al. (2012) beschreiben, dass die Wahrscheinlichkeit einer *Mycoplasma hyopneumoniae* Infektion bei niedrigen Temperaturen ansteigt, da die Flimmerbewegung der Zilien und die Lungenclearance herabgesetzt werden (HEINRITZI, 2006, SEGALLES et al., 2012). Eine Mykoplasmen Pneumonie ist eine chronische Erkrankung, die mit einer geringen Mortalität, aber hohen Morbidität einhergeht. Charakteristisch ist ein trockener, nicht produktiver Husten, der im Infektionsversuch 7-14 Tage *post infectionem* auftritt. Bei Feldinfektionen lässt sich der Zeitpunkt der Infektion nicht immer genau bestimmen (SØRENSEN et al., 1997). Husten kann durch Auftreiben erkrankter ruhender Schweine ausgelöst werden (SELBITZ, 2010). Treten klinische Symptome wie Fieber, Appetitlosigkeit, Dyspnoe oder Erschöpfung auf, sollte eine Infektion mit Sekundärerregern diagnostisch abgeklärt werden, da diese Symptome durch eine Monoinfektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* nicht hervorgerufen werden (MAES et al., 1996). Wirtschaftliche Schäden werden vor allem durch

langsames Wachstum und einer somit verlängerten Mastdauer verursacht. Weisen 10 % der Gesamtlunge pneumoniebedingte Veränderungen auf, wird die tägliche Gewichtszunahme um 5 % reduziert (STRAW et al., 1983). Eine schlechte Schlachtkörperqualität durch schlechtere Futtermittelverwertung und der erhöhte Behandlungsaufwand sind weitere negative Aspekte (MAES et al., 1996). Es können Schweine jeden Alters erkranken. Auskultatorisch fällt sowohl in- als auch expiratorisch ein bronchiales Atemgeräusch mit Giemen oder Rasseln bei bakterieller Sekundärinfektion auf (HEINRITZI, 2006).

FABLET et al. (2012) fanden heraus, dass bei 4-16 Wochen alten Schweinen ein Zusammenhang zwischen der Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* und einer Infektion mit PCV2 besteht. Dies geht einher mit Studien von DORR et al. (2007), die herausfanden, dass die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass Tiere, die in der späten Säugephase mit PCV2 infiziert werden auch mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infiziert sind. In experimentell mit *Mycoplasma hyopneumoniae* und PCV2 co-infizierten Schweinen erhöht eine *Mycoplasma hyopneumoniae* Infektion die Menge des PCV2 Genoms im Serum (OPRIESSNIG et al., 2004). Der Interaktionsmechanismus beider Erreger ist bis jetzt nicht geklärt (FABLET et al., 2012). Trotz einer simultanen experimentellen Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* und PCV2 konnten SIBILA et al. (2012) keine Potenzierung der klinischen Symptome und Lungenläsionen durch die jeweiligen Erreger feststellen.

THACKER (2001) fand heraus, dass das lokale respiratorische Immunsystem durch *Mycoplasma hyopneumoniae* und PRRSV derart modifiziert wird, dass es nicht mehr adäquat auf diese und andere Erreger reagieren kann. Die Empfänglichkeit für weitere Pathogene, die mit PRDC assoziiert sind, wird somit erhöht (THACKER, 2001). Tiere, die mit PRRSV und *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infiziert wurden, wiesen stärkere Lungenveränderungen auf als Tiere, die nur mit PRRSV infiziert wurden (THACKER et al., 1999).

Das torque teno sus virus 1 (TTSuV1) scheint ebenfalls eine Rolle als Co-Faktor bei PRDC Erkrankungen zu spielen und in Interaktion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* zu treten. In Proben der auf Atemwegserkrankungen verdächtigen Tiere konnte in 75 % der Fälle sowohl *Mycoplasma hyopneumoniae* als auch TTSuV1 nachgewiesen werden (RAMMOHAN et al., 2012).

Auch zwischen *Mycoplasma hyopneumoniae* und dem SIV Stamm H1N1 konnte ein Zusammenhang gefunden werden. Tiere, die mit *Mycoplasma hyopneumoniae* und

SIV infiziert wurden, zeigten stärkere Lungenveränderungen als Tiere, die nur mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infiziert wurden (YAZAWA et al., 2004).

Neben PCV2, PRRSV, TTSuV1 und SIV gibt es auch eine Korrelation zwischen APP und *Mycoplasma hyopneumoniae*. Eine einfache Mykoplasmosenose kann durch APP verkompliziert werden. Die stärksten Lungenveränderungen in einem experimentellen Versuch konnten dann beobachtet werden, wenn 4 Wochen nach einer *Mycoplasma hyopneumoniae* Infektion eine experimentelle APP Infektion erfolgte (MAROIS et al., 2009).

Der Endoparasit *Ascaris suum* beeinträchtigt den Impferfolg mit einer *Mycoplasma hyopneumoniae* Vakzine. Tiere, die mit *Ascaris suum* infiziert waren, wiesen trotz Impfung deutlich stärkere Lungenveränderungen auf als Tiere, die nur gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* geimpft und anschließend mit diesem Erreger infiziert wurden (STEENHARD et al., 2009).

2.5. Pathologie

2.5.1. Makroskopische Veränderungen

Im frühen Stadium einer *Mycoplasma hyopneumoniae* Infektion bildet sich in den ventralen Abschnitten der kranialen und mittleren Lungenlappen, im Lobus accessorius und im kranialen Abschnitt der kaudalen Lungenlappen eine katarrhalische Pneumonie aus. Der rechte kraniale Lungenlappen, der auf Grund eines separaten Bronchus in direkter Verbindung zur Trachea steht, und beide mittleren Lungenlappen sind von den Veränderungen am stärksten betroffen (FEENSTRA et al., 1994, THACKER, 2012). Wenn keine Sekundärinfektionen vorliegen, zeigen sich an den Lungenlappen fokale, sehr gut abgegrenzte Läsionen. Bei vorliegenden Sekundärinfektionen sind die Läsionen je nach Erreger eher diffus (THACKER, 2012). Häufig sind die bronchialen und mediastinalen Lymphknoten vergrößert (MAES et al., 1996).

Im chronischen Stadium der Infektion sind atelektatische lila-graue Veränderungen in den kranio-ventralen Abschnitten der Lunge sichtbar (STRASSER et al., 1992). Vier Wochen p.i. sind die makroskopischen Veränderungen maximal ausgeprägt. Wenn es nicht zur Infektion mit Sekundärerregern kommt, beginnt die Heilung acht Wochen nach der Infektion und zehn Wochen p.i. zeigen sich nur noch wenige makroskopisch sichtbare Läsionen (MAES et al., 1996).

2.5.2. Mikroskopische Veränderungen

Histologisch sind die Veränderungen einer *Mycoplasma hyopneumoniae* Infektion vor allem in Regionen der Bronchien, Bronchioli und Alveolen sichtbar (SARRADELL et al., 2003). Im Anfangsstadium der Infektion können mikroskopisch eine Hyperplasie des respiratorischen Epithels und Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten im Lumen von Bronchien und Bronchioli nachgewiesen werden (MAES et al., 1996). Im Infektionsverlauf sind entzündliche Veränderungen in peribronchialen, peribronchiolären und perivaskulären Räumen mit Ansammlungen von Lymphozyten und Monozyten sichtbar (THACKER, 2012). Als eine typische Veränderung des chronischen Verlaufs ist die BALT-Hyperplasie mit einer follikelartigen Zusammenlagerung von Lymphozyten an der Lamina propria von Bronchien, Bronchioli und Alveolen anzusehen. Dadurch kommt es zur Verlegung des Lumens der Bronchiolen und zur Atelektase der angrenzenden Alveolen (BASKERVILLE, 1972, MAES et al., 1996, SARRADELL et al., 2003). Die bedeutendste histologische Veränderung in den Bereichen des BALT ist die Hyperplasie von mononuklearen Zellen. B-Lymphozyten, dendritische Zellen und Makrophagen sind die wichtigsten zellulären Komponenten der Keimzentren. T-Lymphozyten werden vor allem in den perifollikulären Regionen des BALT, in der Lamina propria und im respiratorischen Epithel gefunden. IgG oder IgA enthaltende Plasmazellen findet man in der Peripherie des BALT, in der Lamina propria von Bronchien und Bronchiolen, in den Alveolarsepten und in den bronchialen Submukosadrüsen. Eine wichtige Rolle bei der Infektionsabwehr spielen auch CD4⁺ und CD8⁺ Zellen (SARRADELL et al., 2003).

Bei experimentell infizierten Schweinen beschrieben KWON et al. (2002) eine um Bronchien, Bronchiolen und Blutgefäße ausgeprägte „cuff“-Bildung (Manschettenbildung) mit Ausbildung von Keimzentren. Eine weitere wichtige histopathologische Veränderung ist die Hyperplasie der Typ II Pneumozyten, die vor allem in fortgeschrittenen Infektionsstadien auftritt (TAYLOR, 1996).

2.6. Immunologie

Durch die Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* kommt es zu einer Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten in das BALT (SARRADELL et al., 2003). OKADA et al. (2000) konnten in einem Infektionsversuch darstellen, dass bei geimpften Tieren deutlich weniger Lymphozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten in der BAL-Flüssigkeit vorhanden waren als bei ungeimpften Tieren.

Lungenläsionen, die Infiltration von Entzündungszellen in den luftleitenden Wegen und die Anlagerung von T-Lymphozyten an die Bronchi konnten verringert werden. Zusätzlich wurde eine geringere Konzentration an Tumornekrosefaktor (TNF) bei geimpften Tieren nachgewiesen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Impfung einen Beitrag zur Verringerung der TNF Produktion leistet, Entzündungsreaktionen unterdrückt werden und insgesamt weniger Lungenläsionen auftreten (OKADA et al., 2000, VRANCKX et al., 2012). THACKER et al. (2000) fanden heraus, dass eine Impfung gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* neben einer lokalen mukosalen Immunantwort in den Atemwegen von infizierten Schweinen eine humorale und zelluläre Immunantwort auslöst. Die Produktion von für *Mycoplasma hyopneumoniae* spezifischen IFN- γ sezernierenden Lymphozyten wird stimuliert (THACKER et al., 2000).

Nach experimentellen Infektionen mit *Mycoplasma hyopneumoniae* wiesen REDONDO et al. (2009) nach, dass es in bronchoalveolären Exsudaten zu einem signifikanten Anstieg der Cytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-8, TNF- α und TNF- γ und der lymphoiden Marker CD4⁺, CD8⁺, Muramidase, IgG und IgA kommt. LORENZO et al. (2006) konnten im BALT einen Anstieg der Cytokine IL-2, IL-4, IL-8, IL-10 und TNF- α beobachten. In Alveolarsepten und BAL-Flüssigkeit zeigte sich ein Anstieg der Cytokine IL-1 α und - β , IL-2, IL-4, IL-8 und IL-10 (LORENZO et al., 2006).

2.7. Diagnose

Es gibt verschiedene Methoden eine Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* nachzuweisen. Klinische Symptome wie Husten, verringerte Tageszunahmen, makroskopische und mikroskopische Veränderungen sind nicht pathognomonisch für eine *Mycoplasma hyopneumoniae* Infektion und dienen nur als Hinweis. Es müssen andere diagnostische Möglichkeiten ausgeschöpft werden (THACKER, 2012).

2.7.1. Direkter Erregernachweis

2.7.1.1. Kultur

Die kulturelle Anzucht von *Mycoplasma hyopneumoniae* ist langwierig, da die Kolonien 4-8 Wochen brauchen, um eine zur Interpretation geeignete Größe zu erreichen (FRIIS, 1975, THACKER, 2012). Der Erreger stellt außerdem hohe Ansprüche an das Nährmedium, welches zum Beispiel Zusatzstoffe wie Pferdeserum oder Hefeextrakte enthalten muss. Zusätzlich werden Hemmstoffe zur Unterdrückung nicht gewünschter Keimflora eingesetzt. Geeignet sind Penicilline, Nystatin und

Amphotericin B (SELBITZ, 2010). Es ist oft eine Überwucherung mit *Mycoplasma hyorhinis* zu beobachten, einem weiteren Erreger schweinespezifischer respiratorischer Erkrankungen. Zudem ist *Mycoplasma flocculare* häufig im Lungengewebe vorhanden und kulturell schwer von *Mycoplasma hyopneumoniae* zu differenzieren (ROSS, 1987, MAES et al., 1996). Als geeignete Nährmedien zur Anzucht behaupteten sich Medien von Friis und Hayflick. 2-10 Tage nach Beginn der Bebrütung werden Kolonien von unter 1 mm Durchmesser im Plattenmikroskop sichtbar. Eine besonders gute Anfärbung gelingt durch Giemsa-, Dienes und Orcein Färbungen (SELBITZ, 2010). Dass die kulturelle Untersuchung auf *Mycoplasma hyopneumoniae* mit Schwierigkeiten verbunden ist, zeigte sich in der Arbeit von HILTERMANN-LINDEN (2004). 53 % der entnommenen Lungenproben waren mit anderen Keimen kontaminiert und deshalb nicht auswertbar.

Trotz aller Schwierigkeiten wird die kulturelle Anzüchtung von *Mycoplasma hyopneumoniae* als Goldstandard angesehen, da in der Kultur nur vermehrungsfähige Erreger nachweisbar sind (THACKER, 2012).

Im Infektionsversuch verglichen MAROIS et al. (2007) Nasen-, Tonsillar-, Trachealtupfer und die bronchioalveoläre Lavage und stellten fest, dass Nasen- und Tonsillartupfer weniger gut zur Anzüchtung und dem Nachweis von *Mycoplasma hyopneumoniae* geeignet sind als Trachealtupfer und BAL-Flüssigkeit. Die bronchoskopische und transtracheale Lavage ist zur bakteriologischen und zytologischen Diagnostik besser geeignet als die endotracheale Lavage (HENNIG-PAUKA et al., 2007). In transtrachealen Spülproben waren dabei am wenigsten Epithelzellen und kontaminierende Bakterien zu finden (HENNIG-PAUKA et al., 2007).

2.7.1.2. Immunologischer Nachweis aus dem Lungengewebe

Mycoplasma hyopneumoniae kann sowohl mittels Immunfluoreszenz als auch immunhistochemisch nachgewiesen werden. Für den Immunfluoreszenztest wird in Polyethylenglycol eingebettetes und anschließend gefrorenes Gewebe benötigt. Die Gewinnung dieser Proben ist in der Praxis meist schwierig. Für die Immunhistochemie werden in Formalin fixierte Gewebeproben, die später in Paraffin eingebettet werden, verwendet. Wichtig ist, dass die Gewebeproben Bronchienabschnitte mit zilienbesetzten Epithelzellen enthalten, damit ein Nachweis von *Mycoplasma hyopneumoniae* erfolgen kann (SØRENSEN et al., 1997, THACKER, 2012).

MOORKAMP et al. (2010) etablierten ein neues immunhistochemisches Nachweisverfahren für *Mycoplasma hyopneumoniae*. Das Verfahren erwies sich durch den direkten, semiquantitativen Antigen-Nachweis als geeignet, stellt aber keine Alternative zur nPCR dar, da Tiere mit immunhistochemisch negativen Befunden in der nPCR positiv bewertet wurden. Als Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse können Stamm- und Virulenzunterschiede vermutet werden (MOORKAMP et al., 2010).

2.7.1.3. In-situ Hybridisierung

Zur *in-situ* Hybridisierung werden in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte verwendet (KWON und CHAE, 1999, KWON et al., 2002). Diese werden mit fluoreszierenden DNA Sonden markiert, welche spezifisch an die ribosomale RNA binden, und mittels Fluoreszenzmikroskop oder Durchflusszytometrie ausgewertet werden können (KRÜGER und SEIDLER, 2007). Durch die *in-situ* Hybridisierung ist es möglich die exakte Lokalisation der Mykoplasmen am Zielgewebe zu bestimmen (KWON und CHAE, 1999, KWON et al., 2002).

2.7.1.4. PCR

Gegenüber anderen diagnostischen Verfahren hat die PCR den großen Vorteil, dass sie anspruchsvolle Bakterien wie *Mycoplasma hyopneumoniae* sehr gut erfassen kann (KURTH et al., 2002). Die PCR verwendet Oligonucleotidprimer auf Basis von DNA-DNA Hybridisierungen. Zusätzlich stehen RNA-RNA Hybridisierungen mit spezifischen Gensonden zu Verfügung. Die Vorteile der PCR sind, dass sie sehr schnell, sensitiv, spezifisch, immunstatusunabhängig und automatisierbar ist und außerdem an Probenmaterial von lebenden und toten Tieren durchgeführt werden kann. Nachteile sind ihre hohe Kostenintensivität und Störanfälligkeit. Inaktive Erreger werden ebenfalls vervielfältigt, was die Interpretation der Ergebnisse meist erschwert (CALSAMIGLIA et al., 2000, KRÜGER und SEIDLER, 2007). Es wurden PCR Systeme, die mit einem und zwei Primern arbeiten, entwickelt (KURTH et al., 2002). Um die Sensitivität der PCR zu erhöhen, werden bei der nPCR zwei Primer nacheinander verwendet. Dies ermöglicht den Nachweis geringer Mengen *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA anteilig an der Gesamtmenge der vorhandenen DNA (THACKER, 2012). Bei der nPCR finden, im Gegensatz zu PCR-Testsystemen, die nur mit einem Primerset arbeiten, weniger Kreuzreaktionen mit anderen Mykoplasmenspezies statt (CALSAMIGLIA et al., 1999). Geeignetes Material zum Durchführen einer nPCR auf *Mycoplasma hyopneumoniae* stellen neben

Lungenproben und BAL-Flüssigkeit auch Nasentupfer dar, wie CALSAMIGLIA et al. (1999) in Feldstudien und Infektionsversuchen nachweisen konnten (CALSAMIGLIA et al., 1999, CALSAMIGLIA et al., 2000). STAERK et al. (1997) konnten mittels PCR *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA aus Luftproben von positiven Betrieben isolieren.

Auf Feldebene verglichen FABLET et al. (2010) Nasentupfer, Rachenabstrich, Trachealabstrich und BAL und kamen zu dem Ergebnis, dass die sensitivste Nachweismethode, um *Mycoplasma hyopneumoniae* in natürlich infizierten Tieren nachzuweisen, Trachealabstrich und BAL sind. Zwischen beiden Methoden ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Die nPCR aus Trachealtupfern ist 3,5 x sensitiver als die der Nasentupfer, welcher sich als die am schlechtesten geeignete Entnahmemethode zum Nachweis herausstellte (FABLET et al., 2010). KURTH et al. (2002) fanden heraus, dass BAL-Flüssigkeit und tracheobronchiale Tupfer gute Indikatoren für eine gelungene positive experimentelle Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* sind. Liefern Nasentupfer und Lungenproben in der nPCR positive Ergebnisse, ist eine tatsächlich erfolgte Infektion nicht sicher. Die nPCR ist hoch sensitiv und spezifisch, wobei eine hohe Sensitivität bei der geeigneten Wahl des Probenmaterials nicht unbedingt notwendig ist (KURTH et al., 2002). MOORKAMP et al. (2010) fanden bei Ferkeln einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *Mycoplasma hyopneumoniae* mittels nPCR aus BAL-Flüssigkeit und den für *Mycoplasma hyopneumoniae* typischen pathomorphologischen Lungenveränderungen. NATHUES et al. (2012b) stellten in einer Feldstudie einen positiven Zusammenhang zwischen dem Hustenindex, den *Mycoplasma hyopneumoniae* Antikörpern aus Blutproben und der mit Hilfe der PCR detektierten *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA aus der BAL-Flüssigkeit fest.

2.7.2. Indirekter Erregernachweis

Der *Mycoplasma hyopneumoniae* Status einer Herde wird am häufigsten durch eine serologische Untersuchung überprüft (THACKER, 2012). Als Probenmaterial sind neben Serum- auch Kolostrumproben geeignet (SELBITZ, 2010), die in hoher Anzahl gleichzeitig durch voll automatisierbare ELISA Systeme bearbeitet werden können (CALSAMIGLIA et al., 1999). Für die Routinediagnostik werden drei verschiedene ELISAs eingesetzt: die beiden indirekten, der Tween-20 ELISA und der HerdChek[®] *Mycoplasma hyopneumoniae* ELISA (Idexx Laboratories, Westbrook, Maine) und der

blocking ELISA von DAKO® (DAKO Corporation, Carpinteria, California) (SIBILA et al., 2009). Alle drei, in einer Studie von ERLANDSON (2005) getesteten Systeme, verfügen über eine sehr gute Spezifität und konnten somit richtig negative Proben erkennen. Die Sensitivität war bei Proben von experimentell infizierten Tieren um einiges niedriger und lag beim Tween-20 ELISA bei 35 % und beim HerdChek® ELISA bei 63 % (ERLANDSON, 2005). Mit dem DAKO® ELISA konnten am zuverlässigsten mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infizierte Schweine detektiert werden (THACKER, 2012). Ursachen für positive ELISA Ergebnisse können neben natürlichen Infektionen auch Impf- oder maternal übertragbare Antikörper sein (GROSSE BEILAGE et al., 2005), wobei die maternalen Antikörper bis zu einem Zeitpunkt von 1-2 Monaten nach der Geburt nachweisbar sind (YAGIHASHI et al., 1993). Die Serokonversion natürlich infizierter Schweine findet vor allem im Alter von vier Monaten statt (YAGIHASHI et al., 1993).

Die Interpretation der ELISA Ergebnisse wird dadurch verkompliziert, dass mittels ELISA keine Differenzierung zwischen maternalen Antikörpern und Impfantikörpern möglich ist (KOBISCH, 2000).

In Infektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass mit indirekten ELISA Systemen erst 21 Tage p.i. Antikörper gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* detektiert werden können. Der Tween-20 ELISA erkannte am 21. Tag p.i. 48 % der infizierten Tiere, der HerdChek® ELISA 61 % der infizierten Schweine (STRAIT und THACKER, 2006). Mit dem blocking ELISA konnten bei experimentell infizierten Tieren bereits 8 Tage p.i. die ersten Antikörper nachgewiesen werden, am Tag 46 waren alle Tiere serokonvertiert (SØRENSEN et al., 1997). Beim Vergleich von indirektem und blocking ELISA ließ sich feststellen, dass die Sensitivität des blocking ELISA vor allem in der frühen Infektionsphase höher ist (AMERI-MAHABADI et al., 2005).

In einem experimentellen Versuch von FANO et al. (2012) wurde der indirekte Tween-20 ELISA mit dem blocking DAKO® ELISA verglichen. Sowohl der blocking, als auch der indirekte ELISA waren zu 100% sensitiv bei der Entdeckung von *Mycoplasma hyopneumoniae* Antikörpern bei infizierten Schweinen. Der blocking ELISA war sensitiver während der akuten Phase der Infektion (FANO et al., 2012).

2.7.3. Vakzination

Kommerzielle Impfstoffe, die aus inaktivierten ganzzelligen Bakterien bestehen, sind weltweit verbreitet. In vielen Ländern findet in über 70 % der Betriebe eine Vakzination gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* statt. Durch diese ist eine Senkung

der Mortalität zu erreichen und es ergeben sich Verbesserungen bezüglich der täglichen Gewichtszunahme (2-8 %) und der Futtermittelverwertung (2-5 %). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Mastdauer herabgesetzt werden konnte, die Tiere weniger klinische Symptomatik zeigten, Lungenläsionen verringert und die Behandlungskosten reduziert werden konnten (MAES et al., 1998, MAES et al., 1999). Obwohl es durch Vakzination nicht zu einem vollständigen Schutz gegen die klinischen Symptome einer Pneumonie kommt und eine Impfung nicht vor der Besiedlung des respiratorischen Trakts schützt (THACKER, 1998), konnten einige Studien zeigen, dass die derzeit verwendeten Impfstoffe die Anzahl der Bakterien im Atmungstrakt verringern (MEYNS et al., 2006) und es durch eine verringerte Ausscheidung zu einem Rückgang der Infektion auf Herdenebene kommt (SIBILA et al., 2007). Der maximale positive Effekt der Impfung erfolgt erst Monate nach der Vakzination (HAESEBROUCK et al., 2004). Im Infektionsversuch konnte veranschaulicht werden, dass, obwohl ein handelsüblicher *Mycoplasma hyopneumoniae* Impfstoff die klinischen Symptome und Lungenbefunde signifikant reduzierte, nur eine geringe nicht signifikante Reduktion der Übertragung von *Mycoplasma hyopneumoniae* erreicht wurde. Daraus wurde geschlossen, dass es mit den derzeit verfügbaren Impfstoffen nicht möglich ist eine Elimination des Erregers innerhalb der infizierten Schweinebestände zu erreichen (MEYNS et al., 2006).

Sowohl one-shot als auch two-shot Vakzine werden zurzeit zur Vakzination von Ferkeln eingesetzt. Welche der beiden Impfstrategien angewendet wird, hängt von zahlreichen Faktoren, wie dem Gesundheitsstatus des Betriebes, dem Zeitpunkt der klinischen Manifestation der Erkrankung, dem maternalen Antikörpertiter und dem PRRSV Status der Herde ab (THACKER, 2012). Vor allem in den letzten Jahren wurden vermehrt one-shot Vakzine eingesetzt, da diese einen geringeren Arbeitsaufwand mit sich bringen und besser ins Management des Betriebes integriert werden können (BACCARO et al., 2006). Den Effekt der Sauenimmunisierung gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* auf die Ferkel untersuchten SIBILA et al. (2008) und konnten feststellen, dass Ferkel von geimpften Sauen signifikant geringere Lungenläsionen aufwiesen als Ferkel von nicht geimpften Sauen. Die Impfung hatte keinen Einfluss auf die Kolonisierung des Atmungstrakts von Ferkeln oder Sauen, es konnte aber eine erhöhte Anzahl seropositiver Sauen und Ferkel zum Zeitpunkt des Säugens beobachtet werden (SIBILA et al., 2008). In einer anderen Studie konnten MARTELLI et al. (2006) zeigen, dass unabhängig vom serologischen Status der Sau,

eine frühe Impfung der Ferkel gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* einen positiven Einfluss auf deren Antikörperantwort ausübt und somit einen wichtigen Teil zur Bekämpfung einer *Mycoplasma hyopneumoniae* Infektion beitragen kann.

Um eine Alternative zur intramuskulären (i.m.) Injektion von Impfstoffen zu finden, untersuchten TASSIS et al. (2012) die Effizienz einer intradermalen one-shot Vakzine und konnten feststellen, dass in der Endmast 10,4 % weniger *Mycoplasma hyopneumoniae* bedingte klinische Symptome wie Husten beim intradermalen Impfstoff gesehen werden konnten als bei der Kontrollgruppe. Beim intramuskulär verabreichten Impfstoff waren es 6 % weniger Symptome. Im Gegensatz zur intramuskulären Injektion zeigte die intradermale Injektion einen signifikant positiven Effekt auf Morbidität und Lungenläsionen (TASSIS et al., 2012).

LI et al. (2012) testeten die Schutzwirkung einer intranasalen Vakzine zur Prävention vor der Übertragung und Verbreitung von *Mycoplasma hyopneumoniae*, welche positive Ergebnisse lieferte. Hierfür wurden Schweine intranasal mit dem attenuierten M. hyo Stamm 168 und adjuvanter bakterieller DNA immunisiert. Bei intranasaler Applikation wurde neben der lokalen zellulären Immunantwort auch eine humorale Immunantwort ausgelöst (LI et al., 2012).

Neben Fehlapplikation des Impfstoffes und falscher Lagerung der Vakzine (THACKER, 2012) kann eine *Ascaris suum* Infektion die Wirkung eines *Mycoplasma hyopneumoniae* Impfstoffes herabsetzen (STEENHARD et al., 2009). Auch durch eine PRRSV Infektion zum Zeitpunkt der *Mycoplasma hyopneumoniae* Vakzination kann die Effektivität des *Mycoplasma hyopneumoniae* Impfstoffes reduziert werden (THACKER et al., 2000).

2.7.4. Therapie mit Antibiotika

Eine Erkrankung mit *Mycoplasma hyopneumoniae* kann durch den Einsatz von Antibiotika kontrolliert werden. Eine Erregerelimination erfolgt allerdings nicht. Therapeutisch sind Antibiotika wie Penicillin, Ampicillin, Amoxicillin und Cephalosporin, die mit der Zellwand von Erregern interagieren, gegen die zellwandlosen Mycoplasmen wirkungslos (THACKER, 2012). In einer Studie von CIPRIÁN et al. (2012) konnten bei experimentell mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infizierten Schweinen durch eine Futtermedikation mit Florfenicol bessere Tageszunahmen und geringere Lungenläsionen, als bei einer unbehandelten Kontrollgruppe, beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse konnten VICCA et al. (2005) in einem Infektionsversuch erzielen, in welchem Mastschweine

mittels Futtermedikation mit Tylosin behandelt wurden. Schweine, die experimentell mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infiziert und einmalig i.m. mit Tulathromycin oder dreimalig mit Enrofloxacin i.m. behandelt wurden, zeigten weniger Lungenläsionen, weniger Husten und bessere Tageszunahmen als Tiere der Kontrollgruppe. Im Vergleich zu mit Enrofloxacin behandelten Tieren gab es bei mit Tulathromycin behandelten Tieren keine signifikanten Unterschiede beim Lungengewicht und den Tageszunahmen. Der Hustenindex hingegen war bei mit Tulathromycin behandelten Tieren höher und die Lungenläsionen waren deutlicher ausgeprägt (MCKELVIE et al., 2005). Eine intramuskuläre Behandlung mit Marbofloxacin in therapeutischer Dosis führte im Infektionsversuch zu geringeren Lungenläsionen, die klinischen Zeichen reduzierten sich nicht signifikant (LE CARROU et al., 2006). Auch im Feldversuch konnte die Effektivität einer einmaligen Injektionsdosis Tulathromycin nachgewiesen werden. Der Therapieerfolg war bei mit Tulathromycin behandelten Tieren mit 71,1 % höher als bei mit Ceftiofur behandelten Tieren (NUTSCH et al., 2005). Auch Tiamulin reduziert den Schweregrad einer experimentellen und natürlich erworbenen Mycoplasmen Pneumonie (HANNAN et al., 1982). NANJIANI et al. (2005) bestätigten die Wirksamkeit von Tulathromycin, Florfenicol und Tiamulin zur Behandlung einer enzootischen Pneumonie. Bei Feldversuchen ist eine Infektion mit mehreren pathogenen Erregern wahrscheinlich, weshalb die Interpretation des Therapieerfolges mit Antibiotika erschwert ist. Bei einer Infektion mit Sekundärerregern werden häufig mehrere antibiotische Wirkstoffe zusammen eingesetzt (THACKER, 2012).

Zur Untersuchung der Resistenzlage von Antibiotika gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* wurden in einer Studie von VICCA et al. (2004) *in Vitro* 21 Feldisolate auf Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika getestet. Ein Isolat zeigte eine erworbene Resistenz gegen Lincomycin, Tilmicosin und Tylosin, fünf Isolate waren resistent gegen Flumequin und Enrofloxacin. Bis zu diesem Zeitpunkt war eine erworbene Resistenz gegen diese Antibiotika bei *Mycoplasma hyopneumoniae* Feldisolaten unbekannt (VICCA et al., 2004). In den 5 Isolaten, die gegen Flumequin und Enrofloxacin resistent waren, konnte eine Punktmutation im parC Gen gefunden werden, was zu einem Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Serin führt. Damit konnte der erste Mechanismus nachgewiesen werden, der eine stufenweise Resistenz gegen Fluoroquinolone verursacht (VICCA et al., 2007).

2.7.5. Erregereliminierung

Zur effektiven Vorbeugung und Kontrolle einer Mycoplasmen induzierten Pneumonie müssen optimale Haltungsbedingungen für die Schweine geschaffen werden. Hierzu gehören angemessene Luftqualität, Lüftung, Temperatur und ausreichend Platz für jedes Schwein (THACKER, 2012). Die Verbesserung des Managements sollte der erste Schritt sein, um eine Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* zu kontrollieren (MAES et al., 2008). Neben Haltungsbedingungen und Managementfaktoren bestimmen die verschiedenen *Mycoplasma hyopneumoniae* Stämme das Infektionsmuster und den klinischen Verlauf der Infektion (VICCA et al., 2002). Während häufiger Zukauf von Schweinen ein bedeutender Risikofaktor für das Auftreten von Pneumonien zu sein scheint (MEYNS et al., 2011), reduziert eine geringere Besatzdichte das Auftreten respiratorischer Erkrankungen (POINTON et al., 1985). Das Mischen verschiedener Tiergruppen bedeutet Stress und es kommt zu Rangordnungskämpfen. Aus diesem Grund sind Rein-Raus Systeme, bei denen Tiere in Gruppen umgestallt werden, Systemen mit Neugruppierungen vorzuziehen (CLARK et al., 1991). Werden Maßnahmen gemäß standardisierter Hygieneprotokolle durchgeführt, kommt es nicht zu einer Erregerübertragung von mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infizierten Schweinen auf naive Schweine, die regelmäßig in Kontakt miteinander stehen (BATISTA et al., 2004). Können durch Medikation und Vakzination andere respiratorische Erkrankungen wie PRRSV, PCV2 und Parasitenbefall vermieden werden, reduziert dies Lungenschäden und die Wahrscheinlichkeit einer Mycoplasmen induzierten Pneumonie (MAES et al., 2008). Durch Rein-Raus Systeme (AIAO) und die dadurch entstandenen Vorteile der Reinigung und Desinfektion kann der Zyklus der Pathogenübertragung von älteren auf jüngere Tiere unterbrochen werden.

In der Schweiz wurde ein Total- und Teilsanierungsprogramm eingeführt, welches unter dem Namen „the Swiss System“ bekannt war und der Eradikation von infektiösen Erkrankungen dient. Das Totalsanierungsprogramm schließt die komplette Leerung eines Stalles ein, indem die darin gehaltenen Tiere verkauft oder gemerzt werden. Das Teilsanierungsprogramm, welches sich vor allem für kleine Betriebe eignet, besteht aus einem zehnmonatigen jungsau- und ferkelfreien Intervall und einer Futtermedikation, die aus einer 10-14 tägigen Gabe von Tiamulin oder einer Kombination aus Chlortetrazyklinen und Sulfadimidin besteht (ZIMMERMANN, 1989). Eine andere Methode, die hauptsächlich in den USA

angewandt wurde, um *Mycoplasma hyopneumoniae* freie Schweine zu erzeugen, ist das „medicated early weaning“ (MEW), bei der durch eine intensive antibiotische Behandlung eine Infektionskettenunterbrechung angestrebt wurde. Die Sauen wurden vom Ende der Trächtigkeit bis kurz nach der Geburt antibiotisch behandelt. Die Ferkel wurden mit 5 Tagen früh abgesetzt und erhielten bis zum 10. Tag nach dem Absetzen Antibiotika (HARRIS und ALEXANDER, 1999).

Betriebe, die von 1996 bis 1999 in der Schweiz an einem Eradikationsprogramm teilgenommen hatten, wurden im Jahr 2000 getestet, um den *Mycoplasma hyopneumoniae* Status der Tiere zu erheben und gegebenenfalls eine Reinfektion festzustellen. Von 3983 Betrieben waren 107 wieder positiv. Die Inzidenz betrug für *Mycoplasma hyopneumoniae* 2,6 %. Verglichen mit den Reinfektionsraten vor dem Eradikationsprogramm ist dies eine Reduktion. Statistisch signifikante Risikofaktoren zur Reinfektion waren unter anderem infizierte Nachbarbetriebe und Parkplätze für Schweinetransporter in der Nähe des Betriebs. Solange es in der Schweiz Regionen mit infizierten und infektionsfreien Betrieben gab, stellten Schlachttransporter eine große Infektionsquelle dar. Deshalb musste sowohl die Routenplanung als auch die Reinigung und Desinfektion der Transporter verbessert werden (HEGE et al., 2002). Im Jahre 2005 betrug die Inzidenz einer EP in der Schweiz weniger als 1 %. Durch Transportbeschränkungen soll einem Eintrag von Atemwegserregern in die Schweiz vorgebeugt werden (STAERK et al., 2007). HEINONEN et al. (2011) zeigten, dass eine Eradikation auch ohne Depopulation möglich ist. *Mycoplasma hyopneumoniae* freie Läufer, die mit einer one-shot *Mycoplasma hyopneumoniae* Vakzine geimpft worden waren, wurden zur Mast in eine *Mycoplasma hyopneumoniae* infizierte Herde gestellt, welche zu diesem Zeitpunkt antibiotisch behandelt wurde. Ein positives Ergebnis war trotz Medikation und Vakzination nur durch ein strikt eingehaltenes Rein-Raus Verfahren und getrennte Lüftungs- und Güllesysteme möglich (HEINONEN et al., 2011). Als aerogen übertragbare Erreger können sich PRRSV und *Mycoplasma hyopneumoniae* über weite Strecken verbreiten. Deshalb testeten DEE et al. (2010) Filtersysteme, welche die Einschleppung verhindern sollten. Die aerogene Übertragung konnte dadurch unterbunden werden (DEE et al., 2010).

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsbetrieb

Der Betrieb mit 1350 Zuchtsauen und 2200 Mastplätzen gilt seit einer Bestandsanierung im Jahr 2008 als *Mycoplasma hyopneumoniae* unverdächtig. Dies wurde serologisch und anhand makroskopischer Beurteilungen der Schlachtlungen vor Versuchsbeginn überprüft und bestätigt. Zwei Wochen vor Versuchsbeginn wurden im Betrieb 120 Blutproben von 7 Tage alten Ferkeln, Aufzuchtschweinen und Mastschweinen mit dem IDEXX ELISA (Herd Chek[®] M.hyo, IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) auf *Mycoplasma hyopneumoniae* untersucht. Die S/P-Werte aller untersuchten Proben lagen unter dem Cut-off Wert von 0,4. Zusätzlich konnten anhand der Schlachtlungen keine Hinweise auf *Mycoplasma hyopneumoniae* oder andere Atemwegserreger festgestellt werden.

Die zugekauften Jungsaunen entstammten einer PIC-25 Genetik, in welche abwechselnd deutsches Edelschwein und deutsche Landrasse eingekreuzt wurden.

In diesem Betrieb wurden die Muttersauen 7 Tage *post partum* (p.p.) gegen Parvovirose und Rotlauf (Parvoruvac[®], Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) geimpft. Die Impfungen gegen *Escherichia coli* und *Clostridien* wurden 3 und 6 Wochen *ante partum* (a.p.) durchgeführt (Coliporc Plus, IDT Biologika GmbH, Dessau-Rosslau; Clostriporc A, IDT Biologika GmbH). Die Ferkel wurden in der dritten Lebenswoche gegen PCV2 geimpft (Ingelvac CircoFLEX[®], Boehringer Ingelheim, Ingelheim).

Die einzelnen Abferkelboxen verfügten über Kastenstand und Ferkelnest, sowie eine Fußbodenheizung. Das Flatdeck verfügte über Buchten, die für 10-25 Tiere geeignet waren, und der Mastbereich über Buchten für 20 Tiere. Über Breiautomaten wurde im Mastbereich ein Fertigfutter von Deuka (Deuka, Düsseldorf), welches ad libitum angeboten wurde, gefüttert. Die Wasserversorgung erfolgte über Nippeltränken. Die Belegung von Abferkelbuchten, Flatdeck und Mastbereich erfolgte abteilweise rein-raus im 1-Wochen-Rhythmus. Die Ferkel wurden mit 25 Tagen abgesetzt und später mit 35-40 Kilogramm und einem Alter von 9-10 Wochen in die Mast eingestallt. Die Eisengabe, das Einziehen der Ohrmarken und die Kastration fanden gemeinsam am 3. bis 4. Lebenstag statt, das Schleifen der Eckzähne erfolgte am 2. Lebenstag. Als Eisenpräparat verwendete der Betriebsleiter 1 ml Ursoferran 200 i.m. (Ursoferran 200 mg/ml, Medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg). Zur postoperativen Schmerzlinderung nach der Kastration wurde in diesem Betrieb gemäß QS-

Programm, 20 Minuten vor Beginn der Kastration, 0,4 ml pro 5 kg KGW Meloxicam (Metacam® 5mg/ml Injektionslösung für Rinder und Schweine, Boehringer Ingelheim, Ingelheim) i.m. appliziert.

3.2. Versuchstiere

Für den Versuch wurden 60 gleich alte klinisch gesunde Ferkel ausgewählt, die am Tag des Studieneinschlusses (7. Lebenstag) mindestens 2 kg wogen. Um Geschlechterunterschiede auszuschließen wurden ausschließlich männliche Ferkel eingeschlossen. Ausschlusskriterien waren ein zu geringes Gewicht und physische Abnormitäten. Die Ferkel wurden nach Gewicht randomisiert in 3 Gruppen à 20 Tiere aufgeteilt und durch individuelle Ohrmarken gekennzeichnet. Die Gruppen A und C wurden nicht gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* geimpft. Die Ferkel der Gruppe B wurden am 7. und 21. Lebenstag mit Stellamune Mycoplasma® vakziniert und am 137. Lebenstag, wie auch die ungeimpfte Gruppe C, mit dem Stamm M. hyo 232 infiziert. Der Gruppe A, als ungeimpfte Gruppe, wurde am 137. Lebenstag ein Placebo Medium appliziert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Gruppeneinteilung

Gruppe	n (Einschluss)	n (Versuch)	Bezeichnung	Impfung <i>M. hyo</i>	Infektion mit Stamm <i>M. hyo</i> 232
A	20	8	Negativkontrolle	-	-
B	20	8	Impfgruppe	x	x
C	20	8	Positivkontrolle	-	x

Die Tiere wuchsen zunächst im Betrieb auf. Dort wurden sie am 26., 75. und 118. Lebenstag gewogen und es wurden Blutproben entnommen, um den *Mycoplasma hyopneumoniae* Status zu überprüfen. Am 75. Lebenstag wurde bei 6 von 20 Tieren der jeweiligen Gruppen ein Trachealabstrich genommen. Am 130. Lebenstag erfolgte der Transport von 24 Tieren (8 Tiere pro Gruppe) in den Kontumazstall an die Vetmeduni Vienna. Hierfür wurde ein Transporter mit Luftfiltersystem verwendet (Fa. Berdex, Niederlande). Durch ein Überdrucksystem wurde die Zuluft durch einen Filter in eine mit UV-Bestrahlung ausgestattete Kammer, in der Erreger abgetötet wurden, gepumpt und gelangte anschließend in das Transportabteil. Bei Ankunft in den Infektionsstall wurde von allen 24 Tieren ein Nasentupfer entnommen. Nach

einer einwöchigen Eingewöhnungszeit wurden die Tiere der Gruppen B und C mit dem Stamm M. hyo 232 infiziert. Die Tiere der Gruppe A erhielten ein Placebo. In wöchentlichen Abständen wurden die Tiere gewogen und es wurden im Anschluss Blutproben entnommen. Am 165. Lebenstag wurden 3 von 8 Tieren jeder Gruppe seziert. Zwei Wochen später wurden alle verbleibenden Tiere euthanasiert und seziert (Abbildung 1). Ein Tier der Gruppe A verstarb am 137. Lebenstag infolge narkosebedingter Komplikationen.

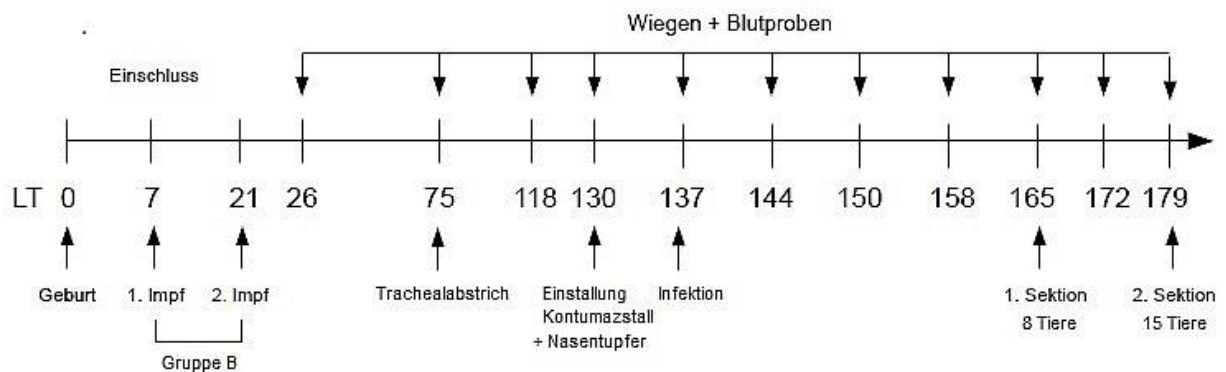


Abbildung 1: Studienverlauf

3.3. Trachealabstrich

Am 75. Lebenstag wurde im Betrieb von jeweils 6 zufällig ausgewählten Schweinen der 3 Versuchsgruppen je ein Trachealabstrich genommen. Dazu wurden die Schweine mittels Oberkieferschlinge fixiert, wobei darauf zu achten war, dass das jeweilige Schwein zusätzlich zwischen den Unterschenkeln der Hilfsperson auf Höhe der Flanken fixiert wurde und sein Kopf nach kaudodorsal überstreckt wurde. Anschließend wurde ein Maulkeil zwischen Ober- und Unterkiefer hinter die Eckzähne des Schweins geklemmt. Es wurde ein steriler Absaugkatheter mit 60 cm Länge (Braun AG, Melsungen) zwischen hartem Gaumen und Oberkieferschlinge Richtung Epiglottis vorgeschoben. Beim Einatmen des Tieres wurde der Absaugkatheter über die Epiglottis und zwischen den Stimmritzen hindurch so weit wie möglich in die Trachea vorgeschoben. Spontan ausgelöster Husten wurde als positives Zeichen für den richtigen Sitz des Absaugkatheters gewertet. Daraufhin konnte der Absaugkatheter aus der Trachea gezogen werden. Anschließend wurden die unteren 4-5 cm des Katheters mit einer Schere abgeschnitten und in ein steriles Probenröhrchen mit 1 ml PBS Medium verbracht. Die Röhrchen wurden gekühlt zur IVD GmbH (Hannover, Deutschland) versandt und es wurde jeweils eine multiplex-

PCR zum Nachweis von *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRSV, APP und SIV durchgeführt.

3.4. Nasentupfer

Am 130. Lebenstag wurde bei der Einstellung der 24 für den Infektionsversuch ausgewählten Tiere in den Infektionsstall jeweils ein Nasentupfer pro Tier entnommen und mittels PCR auf *Mycoplasma hyopneumoniae* untersucht. Zur Entnahme wurden die Schweine von einer Hilfsperson in der Oberkieferschlinge fixiert. Mit einem Trockentupfer wurde nacheinander in die beiden medialen Nasengänge des Schweins eingegangen. Alle Trockentupfer wurden gekühlt zur IVD GmbH schickt und mittels PCR auf *Mycoplasma hyopneumoniae* untersucht.

3.5. Blutprobenentnahme

Es fanden insgesamt 11 Blutentnahmen statt (Abbildung 1). Am 26. Lebenstag erfolgte die Entnahme aus der rechten *Vena cava cranialis*, spätere aus der rechten *Vena jugularis externa*. Für die Blutprobenentnahme wurden individuell beschriftete Serummonovetten (Primavette[®] V Serum, 10ml, KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht) und sterile Einmalkanülen (Sterican[®], Braun AG, Melsungen) verwendet. Die Größe der Einmalkanüle wurde an die Größe des Tieres angepasst. Das Vollblut wurde im Labor der Klinik für Schweine (Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleißheim) für 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert (Rotanta 460R, Hettlich Zentrifugen, Tuttlingen). Anschließend wurde das Serum in 1,5 ml-Reaktionsgefäße (1,5 ml safe-lock Tubes[®], Eppendorf) abpipettiert und bis zur endgültigen Analyse bei -20°C gelagert.

3.6. Vakzine und Vakzination

Zur Vakzination wurde Stellamune Mycoplasma[®], ein inaktiverter Impfstoff der Firma Elanco Animal Health (Bad Homburg), verwendet. Von dieser two-shot Vakzine wurde jedem Tier der Gruppe B am 7. und 21. Lebenstag eine Impfdosis von 2 ml verabreicht. Die Injektion fand kaudal des Ohrgrunds am Übergang von unbehaarter zu behaarter Haut auf der rechten Tierseite in horizontaler Stichrichtung in die Nackenmuskulatur statt. Eine Impfdosis enthält als wirksamen Bestandteil mindestens 6000 RU (relative ELISA-Units) inaktiviertes *Mycoplasma hyopneumoniae* Antigen. Als Adjuvans wurden 0,075 ml Drakeol 5 und 0,025 ml Amphigenbase als Konservierungsmittel maximal 0,21 mg Thiomersal verwendet.

3.7. Infektionsstall

Der Infektionsversuch wurde im Kontumazstall der Klinik für Schweine der Vetmeduni Vienna durchgeführt. Der Stall bestand aus zwei Hauptabteilen, die durch einen 2 m breiten Gang komplett voneinander getrennt waren. Jedes der zwei Hauptabteile war in einen Sektionsraum und zwei Stallungen unterteilt, die durch Filter- und Drucksysteme luftdicht voneinander abgetrennt waren. Das Betreten und Verlassen des Stalles war nur durch eine Hygieneschleuse mit Zwangsdusche möglich. Jeder Stall verfügte über einen planen Betonboden, zwei Nippeltränken und einen Fütterungsautomaten. Es gab in allen Ställen jeweils separate Abflüsse für Kot und Urin. Die Gülle wurde in einem gemeinsamen Sammeltank gesammelt und regelmäßig abgepumpt. Gruppe A wurde in Stall 1, Gruppe B in Stall 3 und Gruppe C in Stall 4 aufgestellt. Gruppe A und C standen in den beiden größeren Abteilen. Die Grundfläche des Stallabteils 3 betrug 7,5 m². Auf Grund dieser Größe ist laut Tierversuchsverordnung in Österreich bei Tieren unter 100 kg eine maximale Tieranzahl von 7 Tieren erlaubt. Deshalb wurde von Gruppe B ein Tier in Stall 4 zu Gruppe C gestellt. Bei den Stallungen 1 und 4, die eine Fläche von 11,5 m² aufwiesen, ist bei Tieren unter 100 kg eine maximale Tieranzahl von 11 Tieren erlaubt. Ab einem Gewicht von 100-150 kg reduzierte sich die erlaubte Tieranzahl in Stall 3 von 7 auf 5 Tiere und in den Stallungen 1 und 4 von 11 auf 7 Tiere (Abbildung 2). Die vorgegebenen Platzangaben sind der Grund für die Aufteilung in einen ersten und zweiten Sektionstermin.

In allen Stallabteilen wurde zur Gewährleistung eines einheitlichen Stallklimas die Temperatur und der Ammoniakgehalt der Luft gemessen.

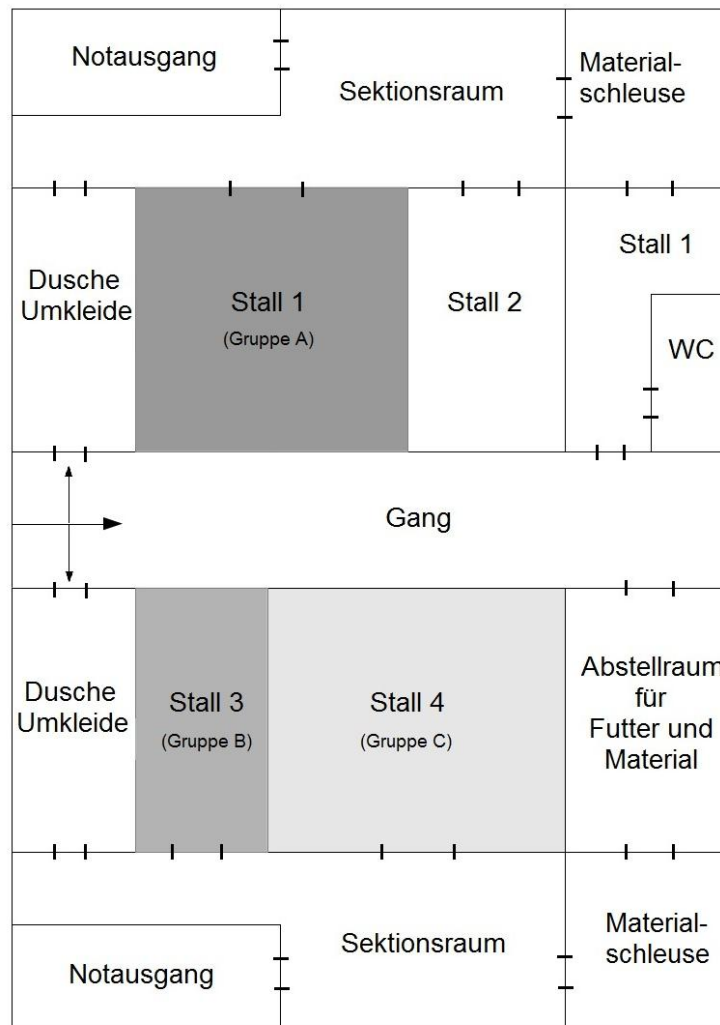


Abbildung 2: Aufbau des Kontumazstalls

3.8. Infektion

Am 137. Lebenstag wurden alle Schweine der Gruppen B und C mit je 10 ml Friisflüssigmedium mit 10^7 KbE M. hyo 232 pro ml intratracheal infiziert. Gruppe A erhielt entsprechend 10 ml eines Friisflüssigmediums (FRIIS, 1975), welches als Placebomedium verwendet wurde. Um die Infektion durchzuführen wurden alle Schweine mit einer Kombination aus 10 mg/kg Ketamin (Narketan 10 %[®], Vétoquinol Paris, Frankreich) und 1,3 mg/kg Azaperon (Stresnil[®], Janssen GmbH, Neuss) sediert. Beide Medikamente wurden in getrennten Spritzen aufgezogen und mit einer 0,60 x 25 mm langen Einmalkanüle (Sterican[®], Braun AG, Melsungen) in die Ohrvene appliziert. Hierzu wurden die Schweine von einer Hilfsperson mit einer Oberkieferschlinge fixiert. Nach Eintritt der Sedation wurden die Tiere in Brustbauchlage gelagert. Oberkiefer und Zunge wurden mit je einer sterilen Gaze fixiert. Mit einem sterilen Laryngoskop wurde durch Druck auf den Zungengrund die

Epiglottis geöffnet, damit ein Absaugkatheter mit 60 cm Länge (Braun AG, Melsungen) soweit wie möglich in die Trachea eingeführt werden konnte. Durch diesen Katheter wurden 10 ml der Inokulumsflüssigkeit in die Trachea appliziert, anschließend 60 ml Luft. Nach der Applikation wurde der Katheter schnellstmöglich entfernt und der Kopf des Tieres hoch gelagert. Bis zum endgültigen Wiedererlangen des Bewusstseins wurden die Tiere durch einen Tierarzt überwacht.

3.9. Direkter Erregernachweis

3.9.1. Erregernachweis mittels bakteriologischer Untersuchung

Zur bakteriologischen Untersuchung wurde bei der Sektion von jedem Tier jeweils der linke kraniale Lungenlappen am Übergang von unverändertem zu verändertem Lungengewebe entnommen und an das Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene der Vetmeduni Vienna versandt. Dort wurde vom Lungenlappen ein Stück Gewebe herausgeschnitten und die Oberfläche abgeflammt. Mit einem sterilen Skalpell wurde aus dieser abgeflamnten Probe ein 1 cm³ großes Fragment entnommen, in ein Gefäß mit 10 ml Friis-Flüssigmedium gegeben, welches zugeschraubt und mit einem Parafilm abgedichtet wurde (FRIIS, 1975). Anschließend wurden die Proben bei 37° C für 14 Tage inkubiert. Nach 4 Tagen Bebrütung wurde 1 ml der Lösung für die PCR Analyse entnommen. Nach 14tägiger Inkubation wurden 100 µl der Flüssigkultur auf Friis-Agarplatten überimpft und diese für weitere 14 Tage bei 37°C und 8%iger CO₂-Atmosphäre bebrütet. Die Agarplatten wurden täglich mittels Stereomikroskopie auf Koloniebildung untersucht. Die Probe wurde als kulturell positiv bewertet, wenn unter dem Stereomikroskop eine für *Mycoplasma hyopneumoniae* typische Koloniemorphologie (KOBISCH und TILLON, 1989) sichtbar war.

3.9.2. Erregernachweis mittels PCR

Neben der kulturellen Untersuchung wurde auch die PCR-Diagnostik zum Nachweis von *Mycoplasma hyopneumoniae* am Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene der Vetmeduni Vienna durchgeführt. Hierfür wurde ein weiteres 1 cm³ großes Gewebestück dem Lungenlappen entnommen und der DNA-Extraktion zugeführt. Des Weiteren wurde die Flüssigkultur nach 4tägiger Anreicherung mittels PCR auf *Mycoplasma hyopneumoniae* untersucht. Hierbei wurde 1 ml der Flüssigkultur entnommen, bei 14000 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die DNA-Extraktion aus gewonnenen Pellets sowie aus den

Gewebeproben erfolgte mit Hilfe des GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits (Sigma–Aldrich, Wien, Österreich) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde eine nested PCR nach KURTH et al. (2002) zum spezifischen und sensitiven Nachweis von *Mycoplasma hyopneumoniae* durchgeführt.

3.10. Indirekter Erregernachweis

3.10.1. Hustenindex

Ab Beginn der Einstellung in den Kontumazstall am 130. Lebenstag wurden alle 24 Tiere täglich beobachtet, einer klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen und die respiratorischen Symptome anhand eines Hustenindex erfasst. Zur Evaluierung des Hustenindex wurden die Tiere der einzelnen Gruppen zu Beginn aufgetrieben und anschließend über einen Zeitraum von zehn Minuten beobachtet, wobei die Anzahl der Hustenstöße jedes einzelnen Tieres individuell dokumentiert wurde. Jeder einzelne Hustenstoß eines Hustenanfalls wurde gezählt.

3.10.2. Gewichtsentwicklung

Um die Gewichtszunahmen zu beurteilen, wurden die Tiere am 26., 75., 118., 130., 137., 144., 150., 158., 165., 172. und 179. Lebenstag gewogen. Aus den erhobenen Daten konnten für jedes in die Studie eingeschlossene Schwein die durchschnittlichen Tageszunahmen berechnet werden. Am 26. Lebenstag wurden die Ferkel mit einer elektrischen Plateuwaage (Söhnle Professional 2755, Backnang) gewogen. An allen anderen Wiegeterminen wurde eine elektrische Viehwaage der Marke F. Star 125 (Meier-Brakenberg, Extertal) verwendet.

3.10.3. Serologie

Das Serum wurde gekühlt an das Labor Synlab® (Leipzig) verschickt und dort mittels ELISA auf Antikörper gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* untersucht. Als Testkit wurde der HerdChek *M. hyo* der Firma IDEXX (Herd Chek® *M. hyo*, IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) gewählt. Bei diesem indirekten ELISA wird der in der Probe enthaltene Antikörper zu dem an die Platte gebundenen Antigen gegeben und ein enzymmarkiertes anti-Speziesglobulinkonjugat hinzugefügt. Die Färbung erfolgt durch ein hinzugegebenes Enzymsubstrat-Chromogenreagenz. Die Stärke der Farbreaktion (Extinktionsmessung/Messung der optischen Dichte) wurde mit einem Sunrise ELISA-Reader Remote (Tecan, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 650 nm gemessen. Neben den OD-Werten wurden auch die S/P-Werte angezeigt.

S/P-Wert = Differenz der Extinktion von Probe und Negativkontrolle / Differenz der Extinktion von Positiv- und Negativkontrolle.

Die S/P-Werte wurden zur Interpretation der Ergebnisse herangezogen. S/P-Werte <30 % wurden als negativ, Werte zwischen 30-40 % als verdächtig und Werte >40 % als positiv bewertet.

3.10.4. Pathologie

Sowohl am 165. (3 Tiere/Gruppe) als auch am 179. (5 Tiere/Gruppe) Lebenstag fanden die pathologischen Untersuchungen im Sektionsraum des Kontumazstalls statt. Alle Schweine wurden mit einer Kombination aus 10 mg/kg Ketamin (Narketan[®] 10 %, Vétocinol, Paris, Frankreich) und 1,3 mg/kg Azaperon (Stresnil[®], Janssen GmbH, Neuss) sediert. Beide Medikamente wurden in getrennten Spritzen aufgezogen und mit einer 0,60 x 25 mm langen aufgesetzten Einmalkanüle (Sterican[®], Braun AG, Melsungen) in die Ohrvene appliziert. Nach dem Eintritt der Sedation wurden alle Tiere mit 1 ml/10 kg T61[®] (Intervet, Boxmeer, Niederlande) intrakardial euthanasiert.

Zur weiteren Untersuchung der Lungen wurden Proben von jedem einzelnen der sieben Lungenlappen nach folgendem Schema entnommen (Abbildung 3).

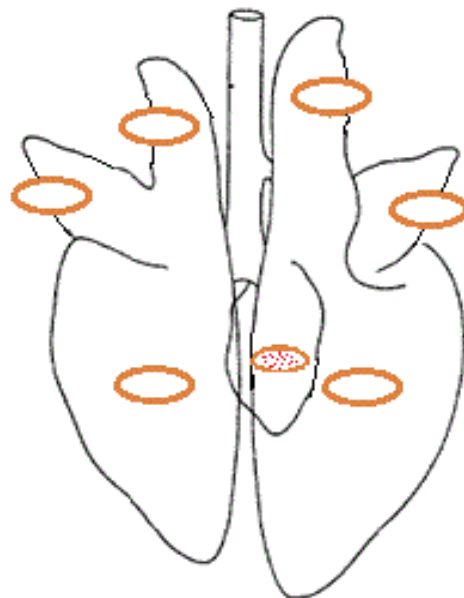


Abbildung 3: Schema der Lungenprobenentnahme

3.10.4.1. Makroskopische Veränderungen der Lunge

Die Lungen wurden von einem Pathologen des Department of Pathology and Forensic Veterinary Medicine der Universität Budapest beurteilt. Die makroskopisch sichtbaren Veränderungen jedes einzelnen Lungenlappens wurden in Prozent angegeben (Abbildung 4). Die Ergebnisse in Prozent wurden für die beiden kranialen, mittleren und den accessorischen Lungenlappen mit 1 multipliziert, die der beiden kaudalen Lungenlappen mit 2,5. Dadurch konnte der Anteil der Lungenlappen an der Gesamtlunge besser erfasst werden (STRAW et al., 1986).

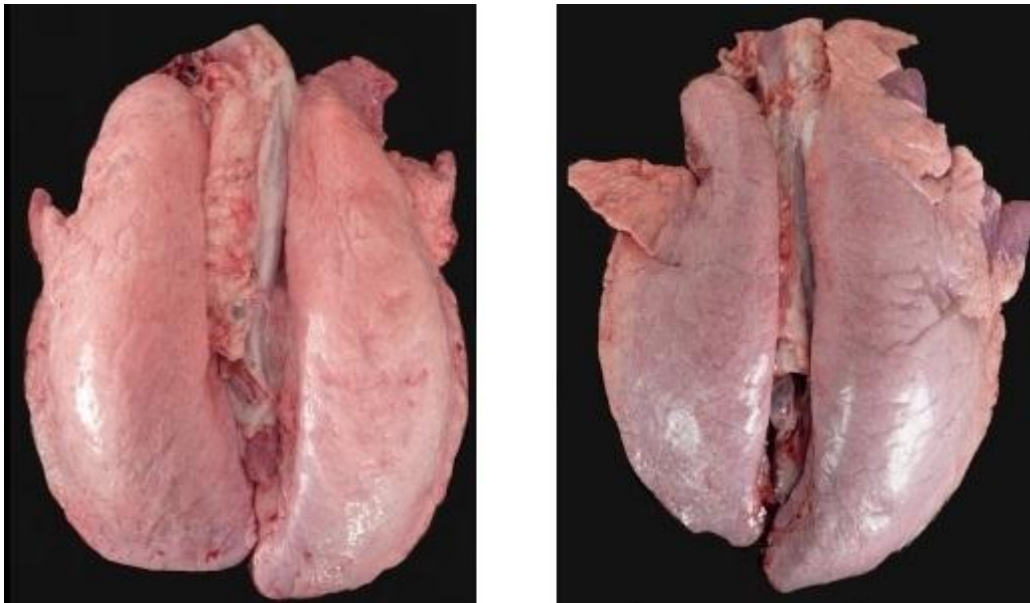


Abbildung 4: Lunge links mit 0 % Veränderungen und Lunge rechts mit 5 % Veränderungen im rechten kranialen Lungenlappen und 60 % Veränderungen im rechten mittleren Lungenlappen

3.10.4.2. Mikroskopische Veränderungen der Lunge

Die Lungenproben wurden im Institut für Pathologie und Gerichtliche Veterinärmedizin der Vetmeduni Vienna aufbereitet. An den jeweiligen Sektionstagen wurden die Lungenproben in 10 % neutral gepuffertem Formalin fixiert, 24 Stunden später entwässert und in Paraffin eingebettet. Daraufhin wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt, welche auf Objektträger aufgezogen und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden.

Die histologische Beurteilung erfolgte am Department of Pathology and Forensic Veterinary Medicine der Universität Budapest mit einem Olympus CX21 Mikroskop (Olympus, Japan). Beurteilt wurden peribronchiale, perivaskuläre „Cuff“- Bildung, Hyperplasie der Typ II Pneumozyten, PMN Infiltration in die Alveoli, intralobuläre Infiltration von mononuklearen Zellen, Atelektase der Alveolen, BALT-Hyperplasie,

Ödeme, zelluläres Exsudat in den Bronchiolen und die Proliferation des Bronchialepithels. Folgender Score, angelehnt an einen histologischen Score von HANNAN et al. (1982), wurde verwendet:

1 = sehr geringgradige Veränderungen

2 = geringgradige Veränderungen

3 = mittelgradige Veränderungen

4 = hochgradige Veränderungen

3.11. Genehmigung des Tierversuchs

This study was approved by the institutional ethics committee and the national authority according to §8ff of Austrian Law for Animal Experiments, Tierversuchsgesetz-TVG. Approval Number: BMWF-68.205/0117-II/3b/2012.

3.12. Statistik

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden alle Daten mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft[®] Excel 2010 Version 14 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) erfasst und zur statistischen Auswertung in SPSS[®] Statistics 21 (IBM SPSS, Chicago, USA) übertragen. Ein Teil der Ergebnisse wurde vom Statistischen Beratungslabor, Institut für Statistik, Ludwig-Maximilians-Universität, München mit dem Programm R Core Team (2012) „A language and environment for statistical computing“, R Foundation for Statistical Computing, Vienna ausgewertet.

Für alle Parameter wurde das arithmetische Mittel, der Median, die Standardabweichung, die Varianz und Maximum und Minimum berechnet. Zur Auswahl des geeigneten statistischen Testverfahrens wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt. Wenn nicht anders beschrieben, galten p-Werte $\leq 0,05$ als signifikant.

Die serologischen Messwerte der einzelnen Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U Test berechnet und der p-Wert nach bonferroni und Holm auf $p \leq 0,016$ korrigiert. Die zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % wird hierbei durch die Anzahl der durchgeführten Vergleiche geteilt. Eine signifikante Abweichung lag somit bei einem p-Wert kleiner als 0,016 vor. Die statistische Auswertung der Mastleistungsdaten wurde mit einem gemischten linearen Modell durchgeführt. Zur statistischen Berechnung des Hustenindex wurde ein generalisiertes lineares Modell (Quasipoisson-Model) angewandt und anschließend ein Chi²-Test durchgeführt. Der

Hustenindex in Wochen wurde mit einem gemischten Poisson-Modell berechnet. Zur statistischen Auswertung des Hustenindex, verglichen mit den PCR Ergebnissen, wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt.

Um statistische Aussagen über die Lungenveränderungen treffen zu können, wurde eine einfache ANOVA berechnet. Außerdem wurde die Korrelation zwischen Hustenindex und makroskopischen Lungenveränderungen überprüft. Bei den BU und PCR Ergebnissen wurde ein exakter Fischer Test angewandt und nach bonferroni und Holm auf $p \leq 0,016$ korrigiert.

4. Ergebnisse

4.1. Direkter Erregernachweis

4.1.1. PCR Ergebnisse der Trachealabstriche und der Nasentupfer

Die am 75. LT mittels Trachealabstrich entnommenen Proben wurden mit Hilfe einer multiplex PCR auf *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRSV, APP und SIV untersucht und lieferten alle negative Ergebnisse. Die bei der Einnistung in den Infektionsstall am 130. LT entnommenen Nasentupfer waren in der PCR Untersuchung negativ auf *Mycoplasma hyopneumoniae*.

4.1.2. Auswertung der bakteriologischen Untersuchung und der nPCR

Die BU und nPCR Ergebnisse der an den beiden Sektionstagen (165. und 179. LT) gewonnenen Lungenproben sind in Tabelle 2 aufgeföhrt. In der nPCR waren 13 der 23 auf *Mycoplasma hyopneumoniae* untersuchten Lungenproben positiv und aus 9 der insgesamt 23 untersuchten Lungenproben konnte bakteriologisch *Mycoplasma hyopneumoniae* isoliert werden. Aus keiner Lungenprobe der Gruppe A war eine Anzucht von *Mycoplasma hyopneumoniae* oder der Nachweis mittels nPCR möglich. Alle Lungenproben der Tiere aus Gruppe C waren in der nPCR positiv. Die statistische Beurteilung ergab, dass sich die BU Ergebnisse der Lungenproben der Gruppen A und C signifikant unterschieden ($p=0,005$). Die Ergebnisse der nPCR der Lungenproben unterschieden sich zwischen den Gruppen A und B ($p=0,019$) und den Gruppen A und C ($p=0,001$) signifikant.

Tabelle 2: Anzahl der auf *Mycoplasma hyopneumoniae* positiven Proben der Gruppen A, B und C in der BU und nPCR (positive Proben /Gesamtzahl der Tiere)

Gruppe	Bezeichnung	nPCR	BU
A	Negativkontrolle	0/7	0/7
B	Impfgruppe	5/8	3/8
C	Positivkontrolle	8/8	6/8

4.2. Indirekter Erregernachweis

4.2.1. Ergebnisse der serologischen Untersuchungen

Die Blutproben der 24 in den Infektionsversuch eingeschlossenen Tiere aus den Gruppen A, B und C wurden mittels ELISA serologisch untersucht. In Abbildung 5 sind die durchschnittlichen S/P-Werte der einzelnen Gruppen über den gesamten Versuchsverlauf dargestellt. Der Cut-off Wert liegt bei 0,4 (Abbildung 5).

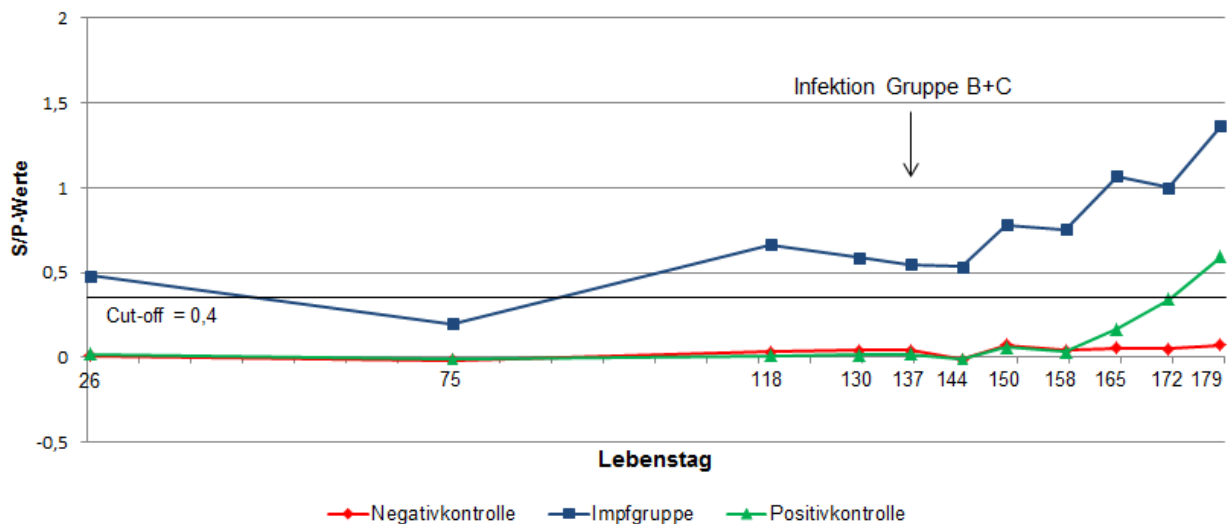


Abbildung 5: Mittelwerte der Antikörper der Gruppen A, B und C im zeitlichen Verlauf der Untersuchung im Vergleich

Die mittleren S/P-Werte der Negativkontrolle (Gruppe A) lagen zu jedem Untersuchungszeitpunkt zwischen -0,01 und 0,07 und damit unter dem Cut-off Wert (Abbildung 5). Der Verlauf der Antikörper der einzelnen Schweine aus Gruppe A ist in Abbildung 6 dargestellt.

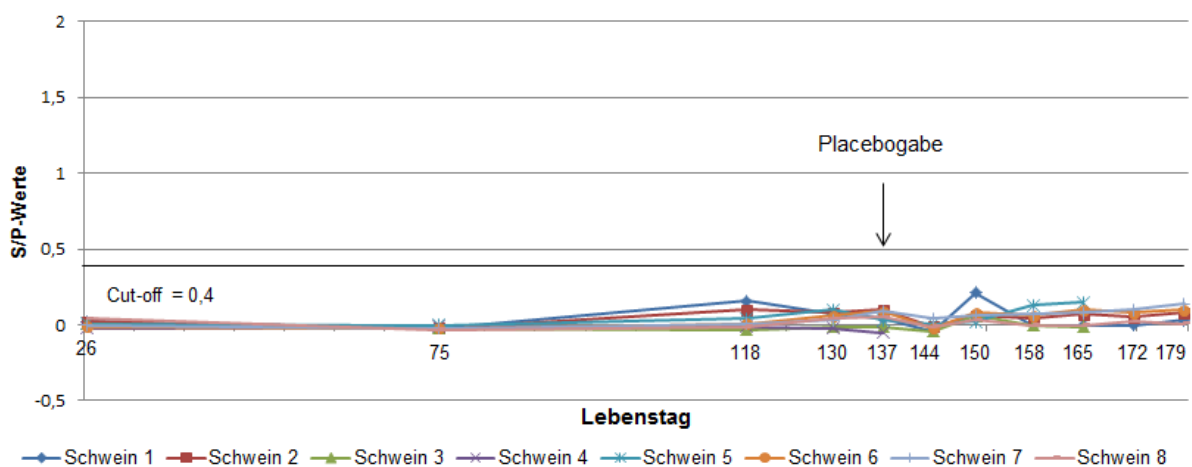


Abbildung 6: Verlauf der S/P-Werte der Tiere der Gruppe A

Die mittleren S/P-Werte der Positivkontrolle (Gruppe C) lagen bis zum 158. Lebenstag zu jedem Untersuchungszeitpunkt zwischen -0,01 und 0,06 und somit unter dem Cut-off Wert. 4 Wochen *post infectionem* stiegen die Antikörper der Positivkontrolle an. In der 6. Woche *post infectionem* lagen die S/P-Werte im Mittel bei 0,59 und waren somit seropositiv (Abbildung 5). Die S/P-Werte der einzelnen Schweine der Gruppe C über den gesamten Studienverlauf sind in Abbildung 7 dargestellt.

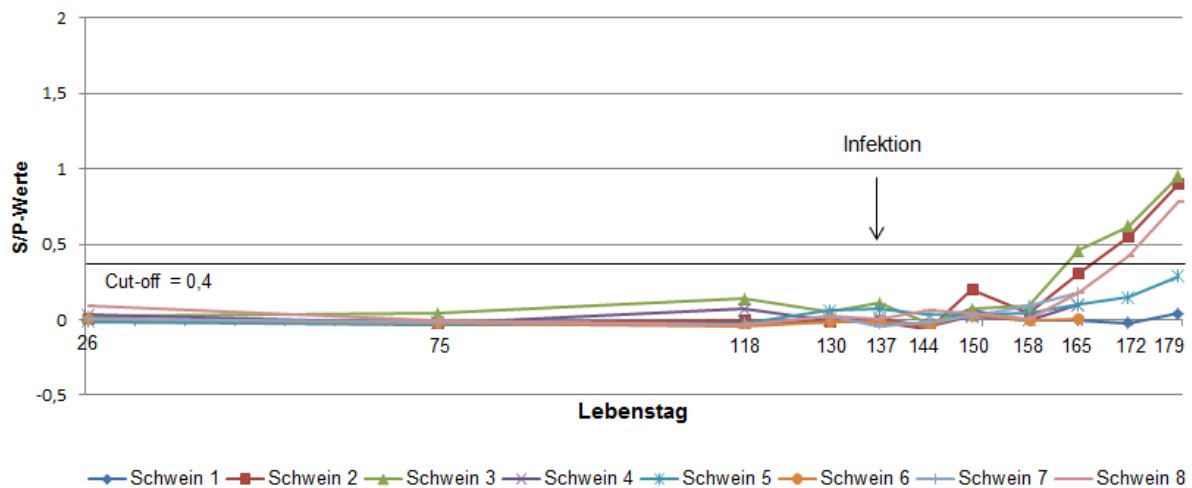


Abbildung 7: Verlauf der S/P-Werte der Tiere der Gruppe C

Zum ersten Blutentnahmeterrn am 26. Lebenstag zeigte die Impfgruppe (Gruppe B) im Mittel S/P-Werte von 0,48 und lag somit über dem Cut-off Wert. Am 75. Lebenstag sanken die Werte unter den Cut-off Wert auf 0,2 ab. Ab dem 118. Lebenstag waren die mittleren S/P-Werte der Tiere der Impfgruppe dauerhaft seropositiv und bewegten sich zwischen 0,54 und 1,36. Sie stiegen ab einer Woche nach experimenteller Infektion kontinuierlich an, so dass am 179. Lebenstag, dem letzten Blutentnahmeterrn, ein mittlerer S/P-Wert von 1,36 erreicht wurde (Abbildung 5). In Abbildung 8 ist der Verlauf der Antikörper der einzelnen Tiere der Gruppe B dargestellt.

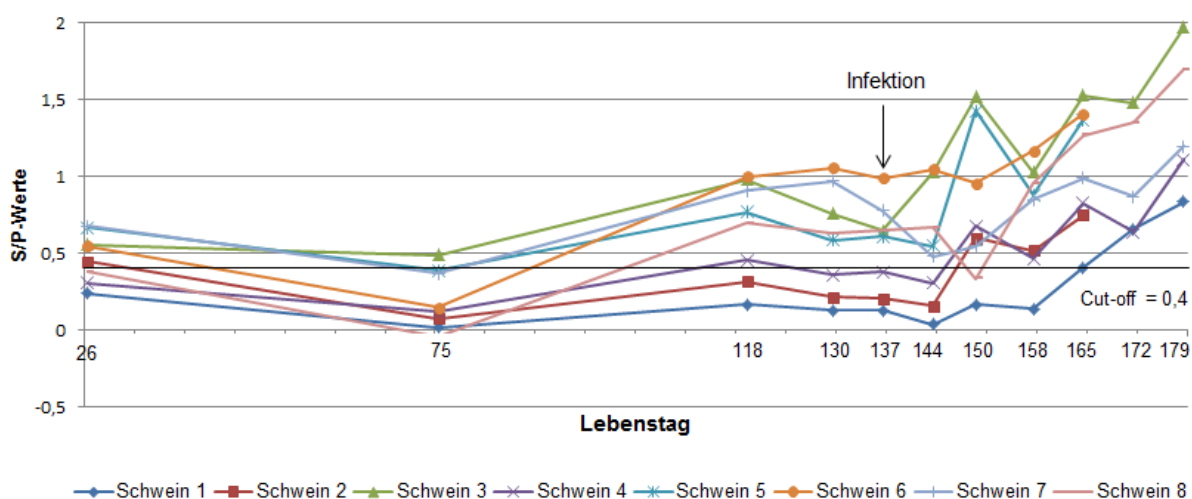


Abbildung 8: Verlauf der S/P-Werte der Tiere der Gruppe B

Die mittleren S/P-Werte der Gruppe B lagen an allen Beprobungszeitpunkten, außer dem 179. Lebenstag, signifikant über denen der Gruppen A und C ($p \leq 0,05$). Am 179. Lebenstag traf dies nur noch zwischen den Gruppen A und B zu ($p = 0,047$), Gruppe B und C unterschieden sich nicht mehr signifikant ($p > 0,05$).

In Tabelle 3 ist die Serokonversionsrate der Tiere der Gruppen A, B und C zu allen Beprobungszeitpunkten dargestellt. In Gruppe A lagen zu keinem Beprobungszeitpunkt seropositive Tiere vor. Am 165. Lebenstag, dem letzten gemeinsamen Beprobungszeitpunkt vor der ersten Sektion der Tiere, waren alle Tiere der Gruppe B und ein Tier der Gruppe C seropositiv.

Tabelle 3: Serokonversionsrate der Tiere der Gruppen A, B und C im Vergleich (positive Tiere/ Gesamtanzahl der Tiere)

Lebenstag	26	75	118	130	137	144	150	158	165	172	179
Negativkontrolle	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/7	0/7	0/7	0/7	0/5	0/5
Impfgruppe	5/8	1/8	6/8	5/8	5/8	5/8	6/8	7/8	8/8	5/5	5/5
Positivkontrolle	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8	3/5	3/5

4.2.2. Auswertung der Mastleistungsdaten

In Abbildung 9 sind die durchschnittlichen täglichen Gewichtszunahmen der Gruppen A, B und C im Aufzuchtstall (26. LT–75. LT) und in der Vor- bis Hauptmast (76. LT–118. LT) dargestellt. Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Tageszunahmen der einzelnen Gruppen vor.

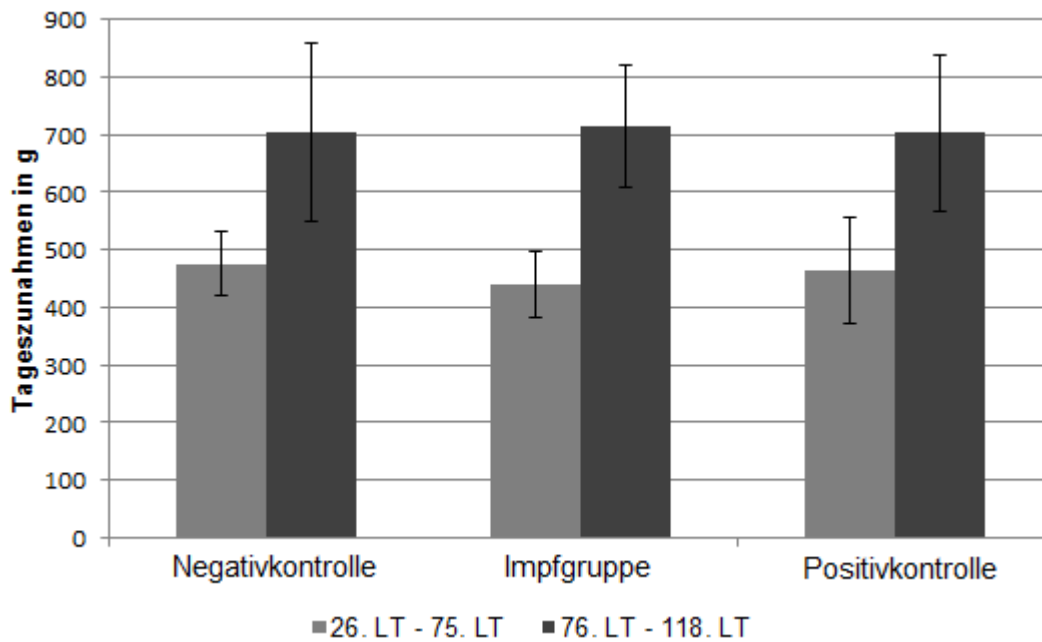


Abbildung 9: Durchschnittliche tägliche Gewichtszunahmen in g der Tiere der Gruppen A, B und C im Aufzuchtstall und in der Anfangsmast im Vergleich; n=20 Tiere pro Gruppe

In Abbildung 10 sind die Körpergewichte am 130. Lebenstag, dem Tag des Einstellens in den Infektionsstall, und die Körpergewichte am 165. Lebenstag, dem Tag des ersten Sektionstermins, dargestellt. Da von den 20 Tieren jeder Gruppe je acht Tiere für den Infektionsversuch ausgewählt wurden und die Tiere der Gruppe A am 130. Lebenstag im Durchschnitt 2 kg mehr wogen, wurde ein lineares Modell angewandt bei dem das Körpergewicht der Tiere der Gruppe A an Lebenstag 130 eingerechnet und bereinigt wurde. Am 165. Lebenstag konnte weder zwischen der Gruppe A und der Gruppe B ($p=0,70$) noch der Gruppe A und der Gruppe C ($p=0,79$) ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

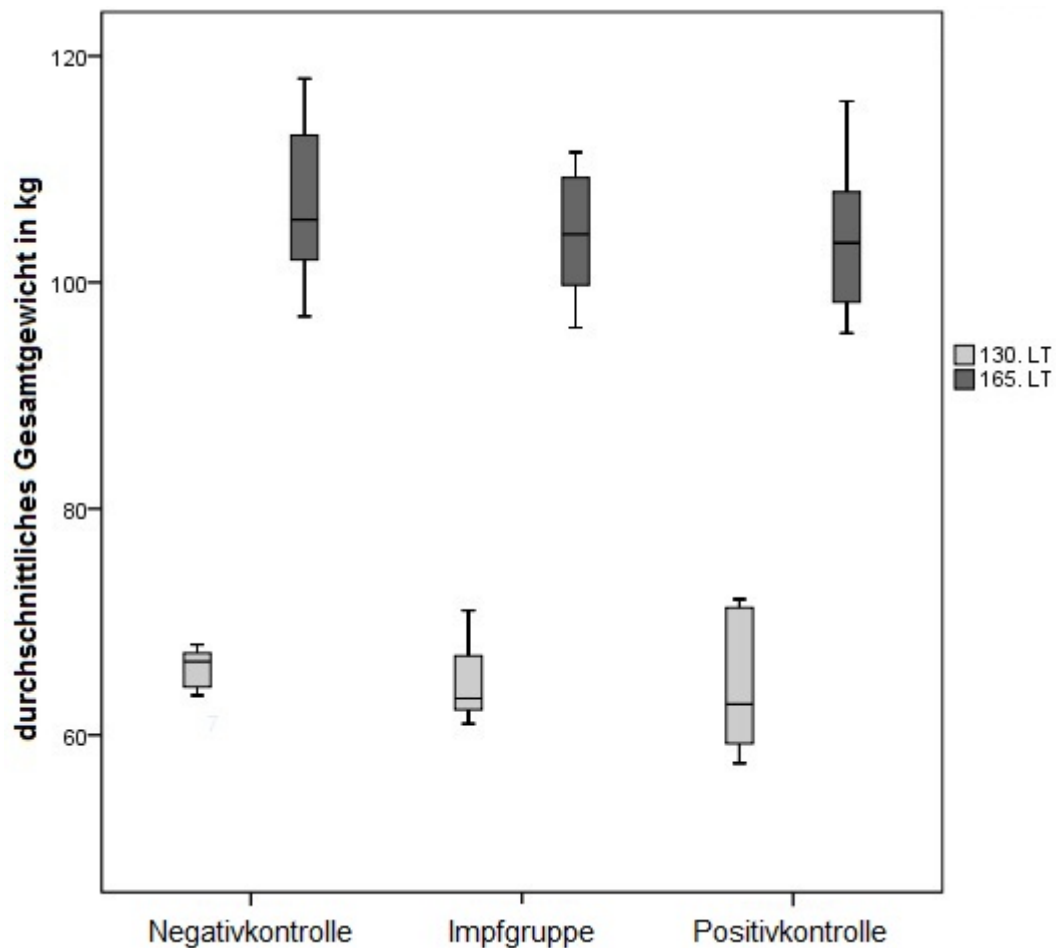


Abbildung 10: Gesamtkörpergewichte der Gruppen A, B und C am 130. und 165. Lebenstag in kg

Die durchschnittlichen täglichen Gewichtszunahmen der Gruppe A lagen zwischen 1000 g und 1157 g. Bei Gruppe B und C war 1 bis 2 Wochen *post infectionem* ein Abfall der täglichen Gewichtszunahmen auf durchschnittlich 715 g sichtbar (Abbildung 11). Dies änderte sich 2 bis 3 Wochen *post infectionem*. Hier lagen die durchschnittlichen täglichen Gewichtszunahmen von Gruppe B und C im Mittel bei 1316 g und somit höher als bei Gruppe A. Über den gesamten Verlauf der Studie lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Tageszunahmen der einzelnen Gruppen vor ($p > 0,05$).

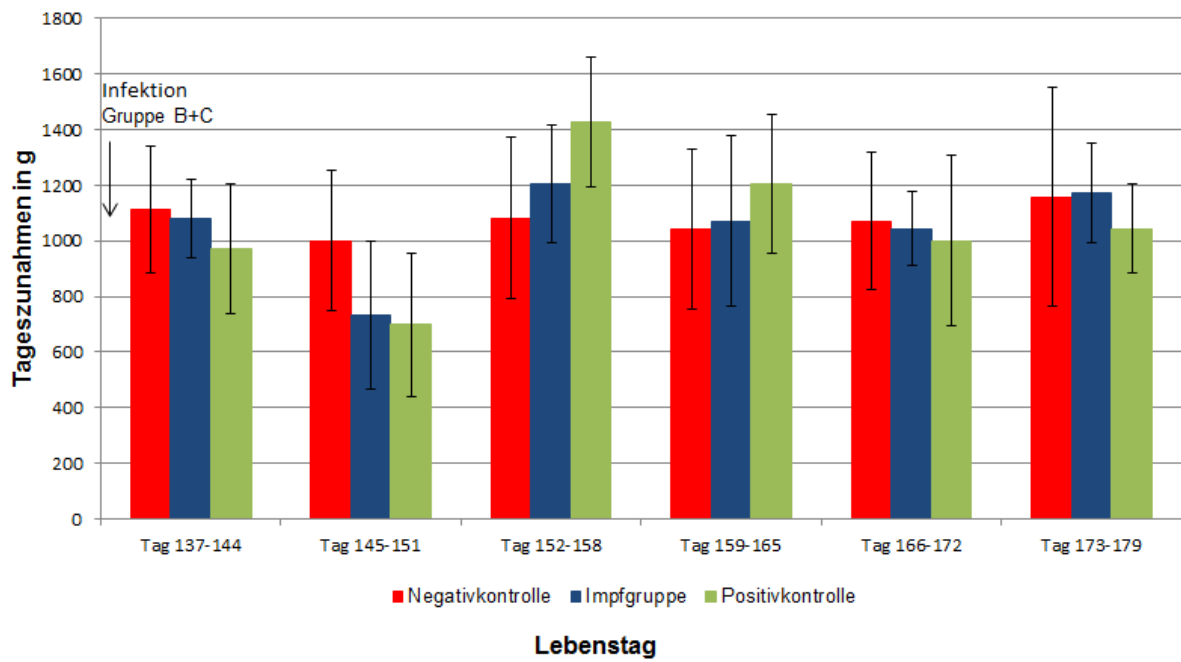


Abbildung 11: Durchschnittliche tägliche Gewichtszunahmen in g der Gruppen A, B und C p.i. pro Woche im Vergleich

4.2.3. Auswertung des Hustenindex

Der durchschnittliche Hustenindex (Hustenstöße pro Individuum/10 Minuten) der Tiere der Gruppe A betrug über den gesamten Zeitraum 1, der der Tiere aus Gruppe B 11 und der der Tiere der Gruppe C 28. Der Median der Gruppe B lag mit 9,5 über dem der Gruppe C (Median=8). Der Hustenindex der Gruppe C war im Vergleich zu Gruppe A signifikant höher ($p=0,003$). Die Streuung des Hustenindex ab dem Zeitpunkt der Einstallung in den Infektionsstall war in Gruppe C am größten und in Gruppe A am kleinsten (Abbildung 12).

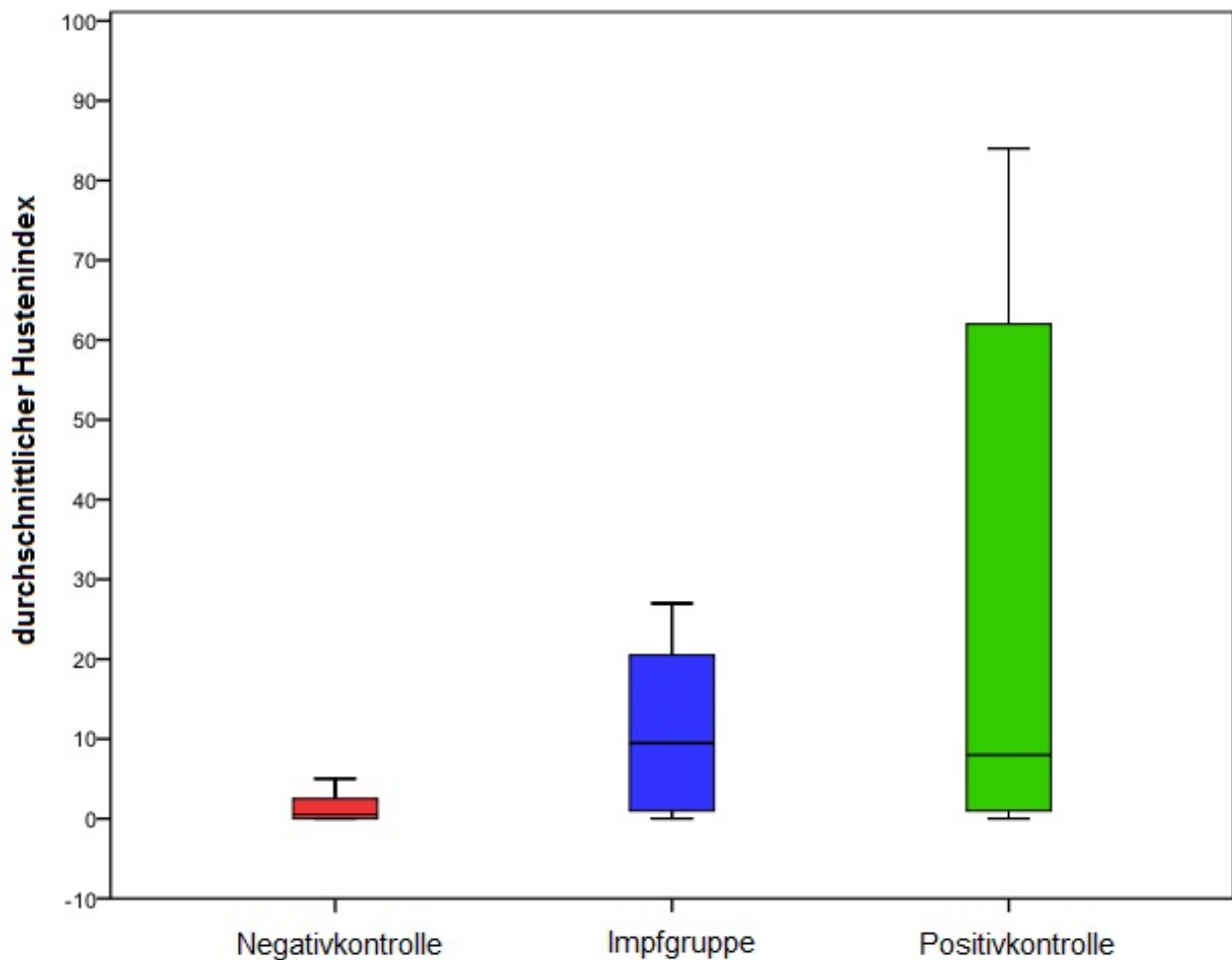


Abbildung 12: Hustenindex (Hustenstöße pro Individuum/10 Minuten) der Tiere der einzelnen Gruppen im Vergleich ab dem Zeitpunkt des Einstallens in den Infektionsstall bis zur Sektion

In Abbildung 13 ist der Hustenindex (Hustenstöße pro Individuum/10 Minuten) der Tiere der Gruppe A, B und C pro Woche angegeben. Bis zu dem Zeitpunkt 3 Wochen nach der Infektion lag der durchschnittliche Hustenindex aller Tiere und aller Gruppen pro Woche zwischen 0 und 0,5. Erst in der vierten Woche (160.-166. Lebenstag) p.i. stieg der durchschnittliche Hustenindex auf 3,3 in den Gruppen B und C an. Der Hustenindex der Gruppe A blieb über den restlichen Verlauf der Studie

zwischen 0 und 0,8. In Gruppe B fiel der durchschnittliche Index in der fünften Woche (167.-173. Lebenstag) auf 0,4 ab und stieg in Gruppe C auf 9,3 an. In der letzten Versuchswoche war bei Gruppe B und C ein Anstieg des Hustenindex (B=6,6; C=14,8) feststellbar. Zu diesem Zeitpunkt war der Hustenindex der Gruppe B im Vergleich zur Gruppe A signifikant höher ($p=0,004$), ebenso der Hustenindex der Gruppen C im Vergleich zur Gruppe A ($p=0,002$). Zwischen Gruppe B und C war kein signifikanter Unterschied festzustellen ($p>0,05$).

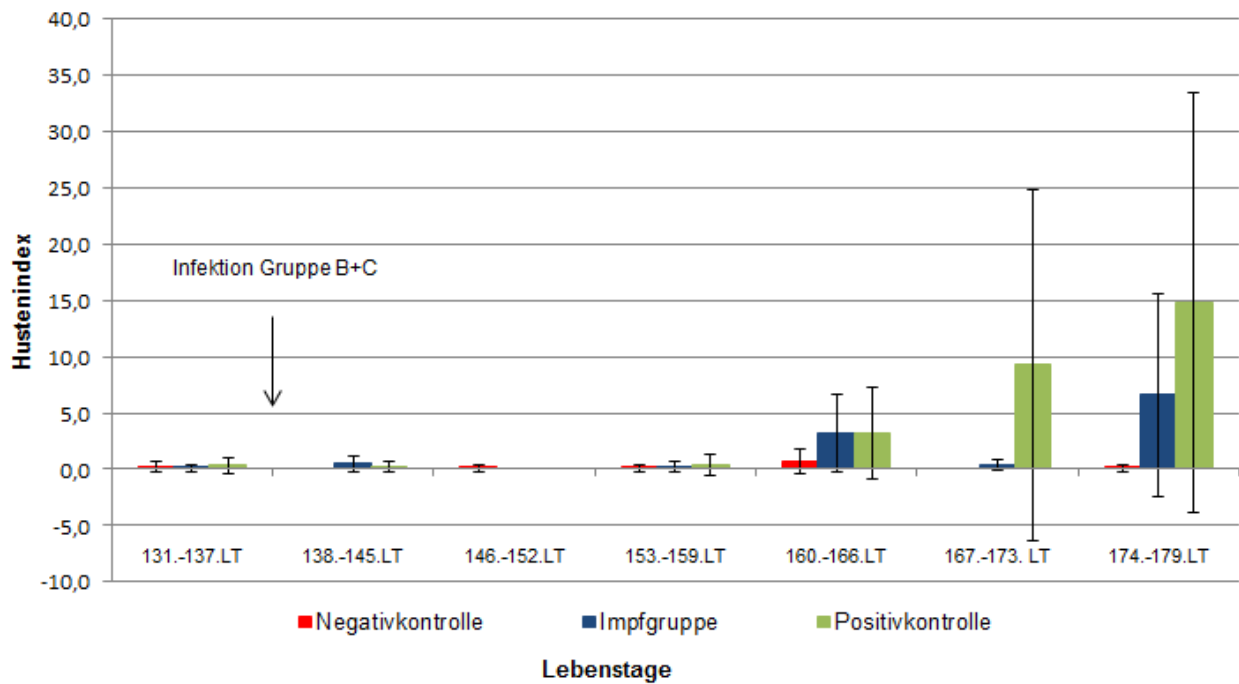


Abbildung 13: Hustenindex (Hustenstöße pro Individuum/10 Minuten) der einzelnen Tiere aus den Gruppen A, B und C pro Woche im Vergleich

4.2.4. Vergleich des Hustenindex mit den PCR Ergebnissen

Im Durchschnitt lag der Hustenindex (Hustenstöße pro Individuum/10 Minuten) der Tiere, die in der PCR positiv getestet wurden (Tabelle 2), mit 22 höher als der Hustenindex der Tiere, die negativ getestet wurden (Abbildung 14). Bei diesen Tieren betrug der Hustenindex 2. Die Streuung war bei den positiv getesteten Tieren größer (Minimum = 0; Maximum = 84). Der Hustenindex, der in der PCR positiv getesteten Tiere, war signifikant höher als der der in der PCR negativ getesteten Tiere ($p \leq 0,05$).

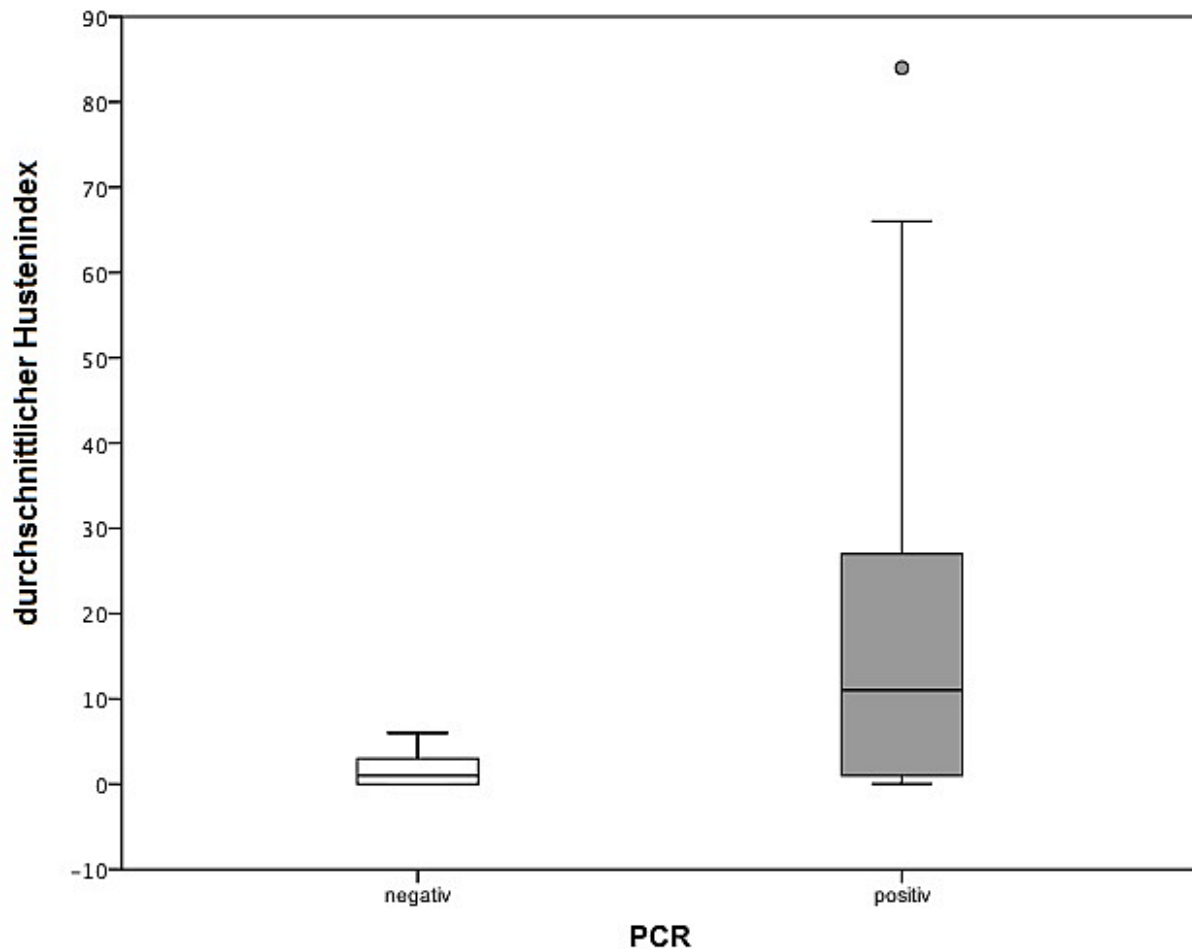


Abbildung 14: Vergleich des Hustenindex (Hustenstöße pro Individuum/10 Minuten) ab dem Zeitpunkt des Einstellens in den Infektionsstall bis zur Sektion mit den PCR Ergebnissen

4.2.5. Auswertung der makroskopischen Lungenveränderungen

Bei allen Gruppen traten die stärksten Veränderungen an den medialen Lungenlappen auf (Abbildung 15). Die Lungen der Tiere der Gruppe A wiesen ausschließlich am linken medialen Lungenlappen (0,1 %) und am rechten medialen Lungenlappen (0,7 %) Veränderungen auf. Alle anderen Lungenlappen der Gruppe A waren makroskopisch unauffällig. Die Lungen der Gruppe B wiesen durchschnittlich 21 % Veränderungen am linken medialen Lungenlappen und durchschnittlich 18 %

Veränderungen am rechten medialen Lungenlappen auf. Der Lobus accessorius war durchschnittlich zu 5 % verändert. Alle anderen Lungenlappen der Gruppe B wiesen makroskopisch im Mittel Veränderungen von unter 0,6 % auf. Bei Gruppe C sah man durchschnittlich 15 % Veränderungen im Lobus accessorius und durchschnittlich 11 % Veränderungen im linken medialen Lungenlappen. Alle übrigen Lungenlappen der Gruppe C wiesen im Mittel Veränderungen von unter 2 % auf. Die Gesamtlungenveränderungen pro Gruppe liegen im Durchschnitt bei Gruppe A bei 0,1 %, bei Gruppe B bei 6,7 % und bei Gruppe C bei 6,4 %. Zwischen allen Gruppen und Lungenlappen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

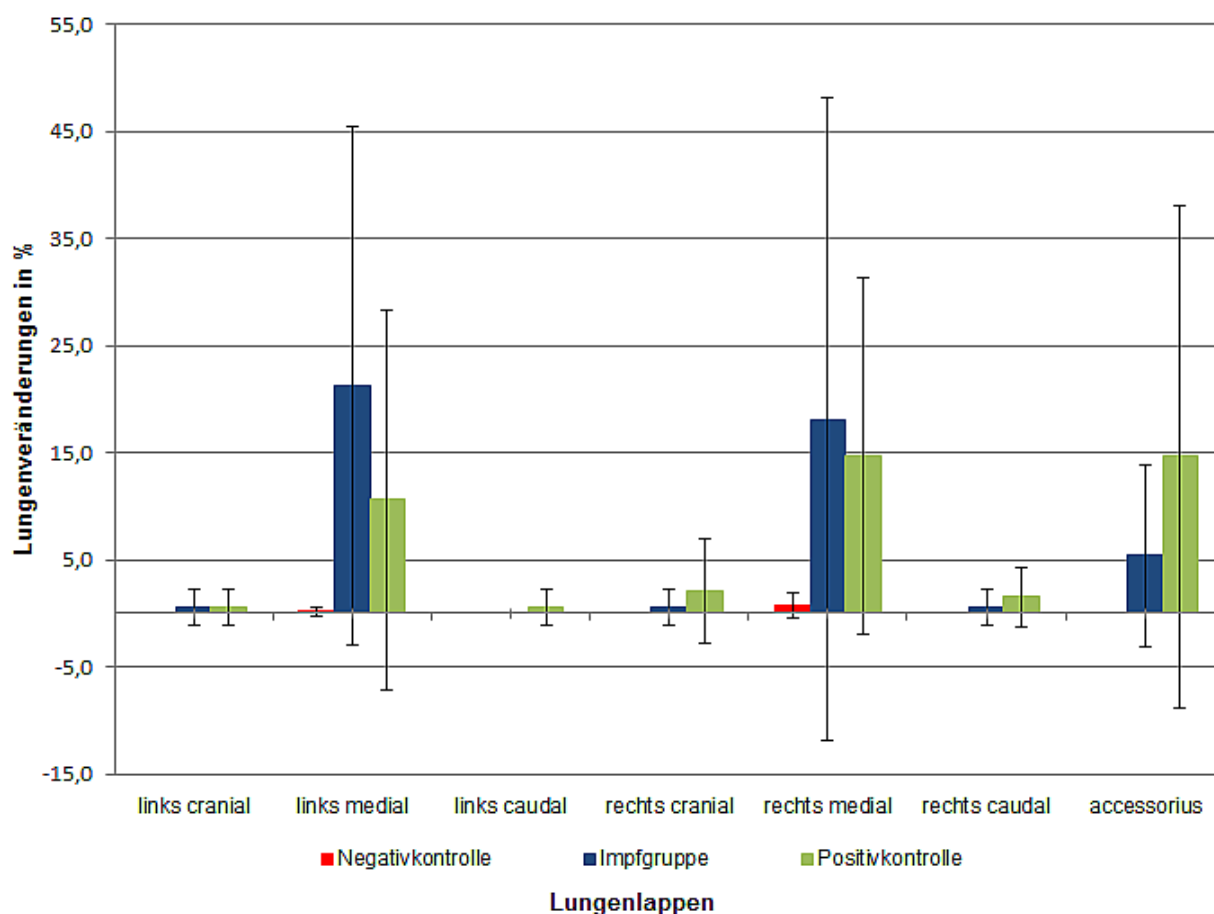


Abbildung 15: Lungenveränderungen der einzelnen Lungenlappen in % der Gruppen A, B und C im Vergleich

4.2.6. Vergleich des Hustenindex mit den makroskopischen Lungenveränderungen

In Abbildung 16 wurde der Hustenindex mit den makroskopischen Lungenveränderungen verglichen. Der Korrelationskoeffizient (r) war bei Gruppe A mit $-0,02$ schwach negativ. In den Gruppen B ($r=0,14$) und C ($r=0,56$) war ein

positiver Korrelationskoeffizient statistisch nachweisbar, wobei der Koeffizient der Gruppe B schwach positiv und der der Gruppe C stark positiv war.

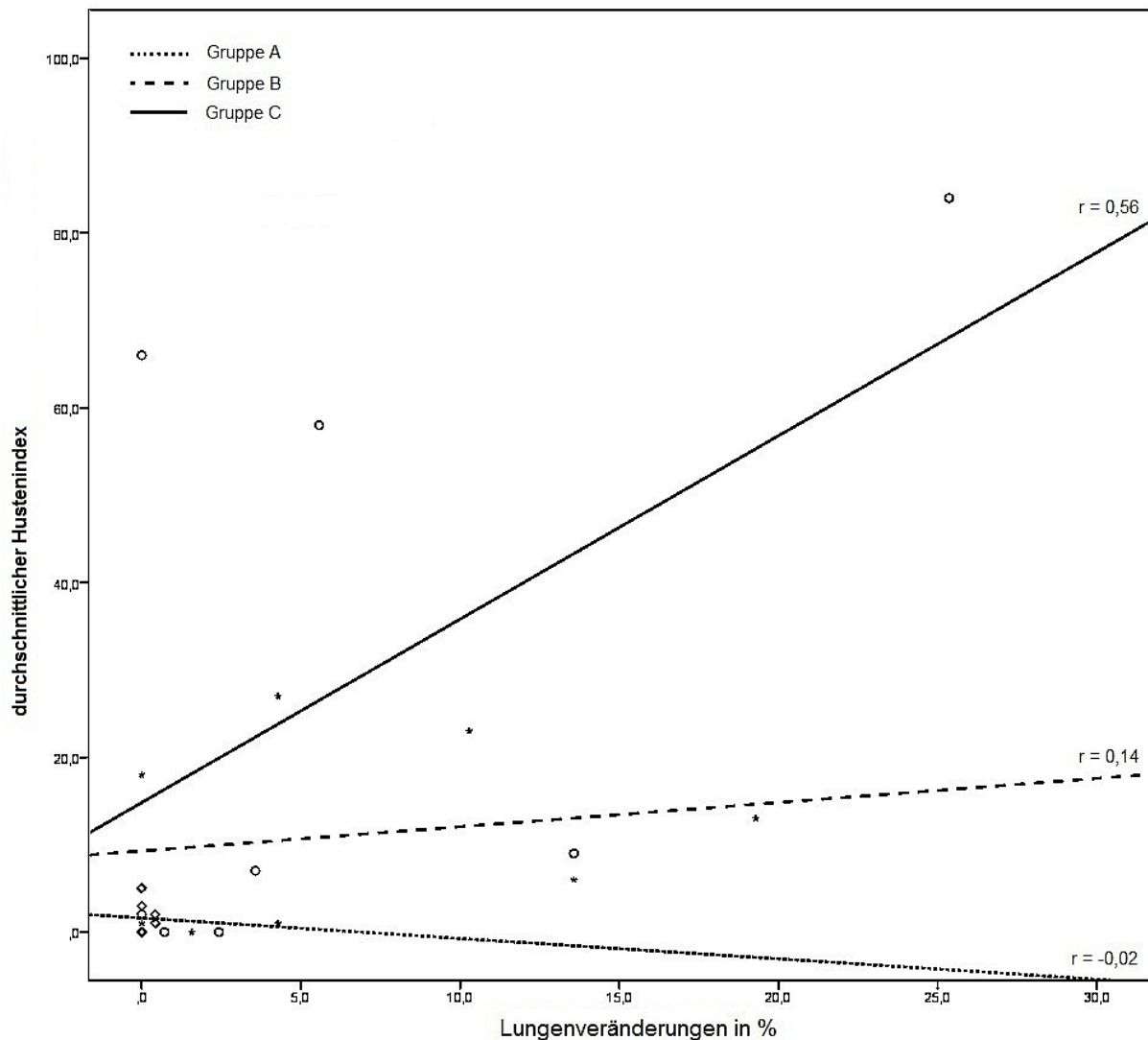


Abbildung 16: Korrelation des Hustenindex (Hustenstöße pro Individuum/10 Minuten) der Gruppen A, B und C mit den jeweiligen makroskopischen Lungenveränderungen; (r=Korrelationskoeffizient)

4.2.7. Auswertung der mikroskopischen Lungenveränderungen

Zur tabellarischen Darstellung wurde die peribronchiale, perivaskuläre „Cuff“-Bildung, die BAL Hyperplasie, die Infiltration von mononuklearen Zellen und die Proliferation des Bronchialepithels herangezogen. Die komplette Tabelle mit allen ausgewerteten Parametern befindet sich im Anhang.

Die peribronchiale, perivaskuläre „Cuff“-Bildung war in Gruppe A sehr gering bis geringgradig ausgebildet. In Gruppe B und C war die „Cuff“-Bildung im Durchschnitt sehr gering- bis mittelgradig (Tabelle 4).

Tabelle 4: „Cuff“ - Bildung (betroffene Tiere / Gesamtzahl der Tiere) der Gruppen A, B und C im Vergleich

Gruppe	sehr geringgradig	geringgradig	mittelgradig	hochgradig
Negativkontrolle	4/7	3/7	-	-
Impfgruppe	1/8	5/8	2/8	-
Positivkontrolle	1/8	3/8	4/8	-

Eine BALT Hyperplasie war bei den Tieren der Gruppe A überwiegend sehr geringgradig ausgeprägt, bei den Tieren der Gruppe B gering- bis mittelgradig und bei den Tieren der Gruppe C ausschließlich geringgradig (Tabelle 5).

Tabelle 5: BALT Hyperplasie (betroffene Tiere / Gesamtzahl der Tiere) der Gruppen A, B und C im Vergleich

Gruppe	sehr geringgradig	geringgradig	mittelgradig	hochgradig
Negativkontrolle	6/7	1/7	-	-
Impfgruppe	1/8	3/8	4/8	-
Positivkontrolle	-	8/8	-	-

Insgesamt 2 von 7 Tieren der Gruppe A zeigten keine Infiltration von mononuklearen Zellen. Die restlichen Tiere der Gruppe A und alle Tiere der Gruppen B und C wiesen vor allem sehr gering- bis geringgradige Veränderungen auf (Tabelle 6).

Tabelle 6: Infiltration von mononuklearen Zellen (betroffene Tiere / Gesamtzahl der Tiere) der Gruppen A, B und C im Vergleich

Gruppe	keine	sehr geringgradig	geringgradig	mittelgradig	hochgradig
Negativkontrolle	2/7	3/7	2/7	-	-
Impfgruppe	-	3/8	5/8	-	-
Positivkontrolle	-	3/8	5/8	-	-

Eine Proliferation des Bronchialepithels war bei keinem der Tiere der Gruppe A festzustellen. Der überwiegende Teil der Gruppen B und C wies eine geringgradige Proliferation des Bronchialepithels auf (Tabelle 7).

Tabelle 7: Proliferation des Bronchialepithels (betroffene Tiere / Gesamtzahl der Tiere) der Gruppen A, B und C im Vergleich

Gruppe	keine	sehr geringgradig	geringgradig	mittelgradig	hochgradig
Negativkontrolle	7/7	-	-	-	-
Impfgruppe	-	2/8	5/8	1/8	-
Positivkontrolle	1/8	-	7/8	-	-

5. Diskussion

Das Ziel dieser Studie ist es im experimentellen Versuch die Wirksamkeit einer in der 1. und 3. Lebenswoche geimpften two-shot Vakzine bei einer späten Infektion an zuvor *Mycoplasma hyopneumoniae* naiven Endmastschweinen zu evaluieren. Zur Durchführung der Studie wurden Schweine mit 70 kg Körpergewicht aus einem *Mycoplasma hyopneumoniae* unverdächtigen Bestand in einen Infektionsstall transportiert und mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infiziert. Zur Evaluation der Wirksamkeit des Impfstoffes Stellamune Mycoplasma[®] wurden Hustenindex, Gewichtsentwicklung und serologische Parameter erhoben. In der Sektion wurden abschließend makroskopische und mikroskopische Lungenveränderungen untersucht.

5.1. Monoinfektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae*

Für den durchgeführten Versuch war von Bedeutung, dass die Tiere seronegativ auf *Mycoplasma hyopneumoniae* und zusätzlich auch auf andere Atemwegserreger wie PRRSV, SIV und APP getestet wurden, da diese Erreger selbst Lungenläsionen herbeiführen und so die Interpretation und Aussagekraft der Ergebnisse beeinträchtigt hätten. YAZAWA et al. (2004) fanden heraus, dass Tiere, die mit *Mycoplasma hyopneumoniae* und SIV Stamm H1N1 infiziert wurden, stärkere Lungenveränderungen zeigten als Tiere, die nur mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infiziert wurden. Ebenso gilt dies für eine Koinfektion mit PRRSV und *Mycoplasma hyopneumoniae* (THACKER et al., 1999). Auch eine einfache *Mycoplasma hyopneumoniae* Infektion kann durch APP verkompliziert werden (MAROIS et al., 2009). Um mögliche Hinweise auf eine Koinfektion mit einem dieser Erreger oder eine zwischenzeitlich erfolgte Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* zu finden, wurden in der Studie am 75. Lebenstag Trachealtupfer von jeweils 6 Tieren jeder Gruppe entnommen. Mittels multiplex PCR wurde auf PRRSV, SIV, APP und *Mycoplasma hyopneumoniae* getestet. Verglichen mit der BAL stellt der Trachealtupfer auf der Betriebsebene eine günstige, schnelle und tierschonende Methode zum Nachweis von Atemwegserregern dar, da bei der BAL eine Narkose nötig und der materielle und zeitliche Aufwand deutlich höher ist (PAUSENBERGER et al., 2012). FABLET et al. (2010) konnten auf Feldebene bei einer Probenentnahme mittels Trachealtupfer eine 60 % Detektionswahrscheinlichkeit für *Mycoplasma hyopneumoniae* feststellen. Verglichen mit der BAL (53 %), dem Nasentupfer (13 %) und dem Maulhöhlen-Pharynxupfer (40

%) weist der Trachealtupfer somit die höchste Detektionswahrscheinlichkeit für *Mycoplasma hyopneumoniae* auf (FABLET et al., 2010). Alle Versuchstiere wurden mittels Trachealtupfern negativ auf PRRSV, SIV und APP getestet und zeigten zu diesem Zeitpunkt keine klinischen Symptome, die auf eine Atemwegserkrankung schließen lassen würden. Somit ergaben sich keine Hinweise auf eine entsprechende Koinfektion. Zusätzlich zeigten am Studienende die Lungenproben makroskopisch keine typischen Veränderungen, die auf PRRSV, APP oder SIV hindeuten würden.

Einen kritischen Abschnitt des Versuchs stellte der Transport der Tiere in den Infektionsstall dar, da sich *Mycoplasma hyopneumoniae* aerogen über 9,1 km verbreiten kann (OTAKE et al., 2010). Deshalb wurde ein Transporter mit Luftfiltersystem verwendet und es wurden nach Ankunft Nasentupfer von den Tieren genommen, welche mittels PCR auf *Mycoplasma hyopneumoniae* untersucht wurden, um Hinweise auf einen möglichen Kontakt mit dem Erreger vor der experimentellen Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* zu bekommen. Auch hier lieferte die PCR negative Ergebnisse. Somit ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine vorzeitige Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae*. Die bei der Sektion gewonnenen Lungenproben wurden neben *Mycoplasma hyopneumoniae* bakteriologisch auch auf das Vorhandensein von Sekundärerregern untersucht. Es konnten keine Sekundärerreger wie *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* und *Bordetella bronchiseptica* nachgewiesen werden.

5.2. Infektionsmethode

Zur Infektion wurden alle Tiere mit Hilfe der Neuroleptanalgesie in einen narkoseähnlichen Zustand versetzt, anschließend wurden ihnen intratracheal 10 ml eines Friisflüssigmediums mit 10^7 KbE des Stamms M. hyo 232 inokuliert. Den Tieren der Negativkontrolle wurden 10 ml eines Placebomediums (Friisflüssigmedium) verabreicht.

MAROIS et al. (2007) verglichen mehrere Inokulationsmethoden zur experimentellen Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae*. Verglichen wurden die intranasale Applikation am nicht sedierten Tier, bei der 1 ml der infektiösen Suspension in jedes Nasenloch verabreicht wurde, mit einer Methode, bei der am sedierten Tier mit einer sterilen Nadel das Inokulum direkt durch die Haut in die Trachea gespritzt wird (transtracheale Infektion), und die tracheale Intubation mit sterilen Absaugkathetern am nicht sedierten Tier (intratracheale/endotracheale Infektion). Sowohl

makroskopische als auch mikroskopische Lungenveränderungen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den verschiedenen angewandten Inokulationsmethoden. Als Schlussfolgerung wurde aus dem Versuch gezogen, dass für zukünftige Infektionen keine Neuroleptanalgesie nötig sei. Der Versuch von MAROIS et al. (2007) wurde mit Ferkeln durchgeführt. Im vorliegenden Versuch wurden hingegen Endmastschweine infiziert und die Infektion in Neuroleptanalgesie durchgeführt. Auch REYNOLDS et al. (2009) führten eine Infektion bei Endmastschweinen durch, bei der die sedierten Tiere intranasal an drei aufeinanderfolgenden Tagen infiziert wurden.

Als häufig verwendete Infektionsmethode wird die intratracheale Inokulation am sedierten (VICCA et al., 2003, VILLARREAL et al., 2011, DEL POZO SACRISTÁN et al., 2012) oder nicht sedierten Tier (FANO et al., 2005, SIBILA et al., 2012) beschrieben, in manchen Studien wird auch eine intranasale (KOBISCH und ROSS, 1996, REYNOLDS et al., 2009) Inokulation durchgeführt. Um den Mechanismus der mucozilären Clearance weitestgehend zu umgehen, wurde im durchgeführten Versuch eine intratracheale Inokulation bevorzugt. Zusätzlich werden durch die intratracheale Infektion die Mykoplasmen näher am Lungengewebe platziert. Als Nachteil der intratrachealen Infektion kann eine versehentlich erfolgte intrabronchiale Infektion gesehen werden. In diesem Fall würde das Inokulum nicht alle Lungenlappen gleichmäßig erreichen und einzelne Lungenlappen würden stärkere Veränderungen aufweisen. Dies kann als eine mögliche Erklärung für das Verteilungsmuster der Lungenveränderungen in dem vorliegenden Versuch angesehen werden (siehe 5.6). Die intranasale Applikation des Inokulums spiegelt zwar eine natürliche Infektion wider, da bei Feldinfektionen der Erreger über die oberen Atemwege aufgenommen wird, aber aufgrund der größeren Entfernung zum Lungengewebe und einer höheren Wahrscheinlichkeit zur Immunabwehr, wurde in diesem Versuch die intratracheale Infektion vorgezogen.

In vielen Infektionsversuchen mit *Mycoplasma hyopneumoniae* wurde der Stamm M. hyo 232, der als sehr virulent gilt, eingesetzt (FANO et al., 2005, REYNOLDS et al., 2009, PIETERS et al., 2010). Da diese Studien positive Ergebnisse lieferten, wurde in der hier vorliegenden Studie ebenfalls der Stamm M. hyo 232 appliziert.

Neben der Menge des applizierten Inokulums, der Anzahl der koloniebildenden Einheiten und dem *Mycoplasma hyopneumoniae* Stamm unterschied sich auch die Anzahl der Inokulationszeitpunkte zwischen den einzelnen zur Diskussion herangezogenen Studien. Neben einer einmaligen Inokulation (VICCA et al., 2003,

FANO et al., 2005, FANO et al., 2007, PIETERS et al., 2010, DEL POZO SACRISTÁN et al., 2012, SIBILA et al., 2012) applizierten DEBLANC et al. (2013) und MAROIS et al. (2007) das Inokulum an zwei aufeinanderfolgenden Tagen, REYNOLDS et al. (2009) sogar an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Da im vorliegenden Versuch eine hohe Infektionsdosis gewählt wurde und bereits eine einmalige Inokulation in Vergleichsstudien zum Infektionserfolg führte, wurde in diesem Versuch auf eine mehrfache Inokulation verzichtet, um das Risiko für narkosebedingte Komplikationen zu minimieren.

Aufgrund der geringen Datenlage zu *Mycoplasma hyopneumoniae* Infektionen von Endmastschweinen wurde mit 10^7 KbE des Stamms M. hyo 232 eine hohe Infektionsdosis gewählt, um sicher eine Infektion auslösen zu können. In Studien mit deutlich jüngeren Tieren wurden geringere Infektionsdosen angewandt (FANO et al., 2005, FANO et al., 2007, PIETERS et al., 2010). Da in der vorliegenden Studie eine vergleichsweise hohe Infektionsdosis gewählt wurde, könnte dies der Grund dafür sein, dass eine Impfung bei einer derart hohen Erregermenge das klinische Auftreten der Erkrankung nicht suffizient verhindern konnte. Außerdem kann durch die hohe eingesetzte Infektionsdosis schwer ein Vergleich zu Feldinfektionen gezogen werden.

5.3. Serologie

Da der für den Versuch ausgewählte Betrieb als *Mycoplasma hyopneumoniae* unverdächtig galt, musste eine Interferenz der Impfung mit maternalen Antikörpern nicht beachtet werden (KOBISCH et al., 1993, STEVENSON, 1998). Die Tiere der Gruppe B, die am 7. und 21. Lebenstag vakziniert wurden, zeigten bereits eine Woche nach der 2. Impfung am 26. Lebenstag im arithmetischen Mittel Werte von 0,48. Dieser Wert lag über dem Cut-off von 0,4. Somit kam es zu einem impfbedingten Antikörperanstieg der Impfgruppe. Dies korreliert mit den Ergebnissen einer Studie von METTLER (2009), bei der nach der Impfung ebenfalls ein Anstieg der Serumantikörper zu beobachten war. Die Werte der beiden ungeimpften Gruppen A und C lagen am ersten Blutentnahmezeitpunkt (26. Lebenstag) unter dem Cut-off Wert.

Bis zum Zeitpunkt der Infektion blieben die Serumantikörper der beiden ungeimpften Gruppen A und C unter dem Cut-off Wert. Bei allen Tieren der Negativkontrolle blieben die Werte auch bis zum Ende des Versuchs konstant unter dem Cut-off Wert. Es kam somit nicht zu einer *Mycoplasma hyopneumoniae* Infektion.

Die Antikörper der Positivkontrolle begannen 4 Wochen *post infectionem* anzusteigen und durchschnittlich 5 Wochen nach der Infektion kam es zur Serokonversion. Ähnlich zum hier durchgeführten Versuch konnten REYNOLDS et al. (2009) in einem Infektionsversuch mit Endmastschweinen ebenfalls einen Antikörperanstieg mit anschließender Serokonversion 4 Wochen p.i. feststellen. Auch experimentelle Studien von MAROIS et al. (2007), MAROIS et al. (2009) und VILLARREAL et al. (2012) an 4-10 Wochen alten Schweinen beschrieben eine Serokonversion zwischen der 2. und 4. Woche *post infectionem*. In diesen drei Studien wurde der DAKO[®] ELISA (DAKO Corporation, Carpinteria, California) verwendet. Erste serologische Reaktionen bei experimentell infizierten Tieren konnten SØRENSEN et al. (1997) mit dem DAKO[®] ELISA bereits 8 Tage p.i. nachweisen. An Tag 46 p.i. waren alle mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infizierten Tiere seropositiv (SØRENSEN et al., 1997). Zur Analyse der Blutergebnisse in der vorliegenden Untersuchung wurde ein indirekter ELISA (Herd Chek[®] M.hyo, IDEXX GmbH, IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) verwendet mit dem im experimentellen Versuch erst 21 Tage p.i. Antikörper gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* detektiert werden können (STRAIT und THACKER, 2006).

Neben dem Antikörperanstieg der Positivkontrolle stiegen auch die Antikörper der Impfgruppe 2 Wochen p.i. an. Zu jedem Messzeitpunkt, außer in der letzten Versuchswoche, sind die Antikörper der Impfgruppe signifikant höher als die der beiden ungeimpften Gruppen. Ähnlich hohe Antikörpertiter durch eine Impfung konnten auch in Studien von VRANCKX et al. (2012) und WILSON et al. (2012) dargestellt werden.

Dass der Serumantikörperspiegel nicht mit der Effektivität der Impfung korreliert, beschrieben THACKER et al. (1998), indem sie die zelluläre und humorale Immunantwort, welche durch vier verschiedene getestete Vakzine induziert wurde, untersuchten. Im aktuellen Versuch zeigten die Ergebnisse der Impfgruppe, ähnlich wie bei THACKER et al. (1998), keine Abhängigkeit zwischen den Lungenveränderungen und dem durch die Impfung induzierten Antikörperanstieg. Alle Versuchstiere der Impfgruppe wiesen zum Zeitpunkt der Sektion einen hohen Serumantikörperspiegel auf. Bei 3 der 8 Tiere der Impfgruppe konnten trotz hohem Antikörpertiter für experimentelle Versuchsergebnisse stärkere Lungenveränderungen nachgewiesen werden (siehe 5.6). Verschiedene Feldstudien, in denen unterschiedliche *Mycoplasma hyopneumoniae* Vakzine und Vakzinationsschemata angewendet wurden (ROOF et al., 2002, SMITH et al., 2002,

LILLIE, 2004), konnten bei vakzinierten Tieren im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen zwar ebenfalls einen Antikörperanstieg, jedoch signifikant weniger Lungenveränderungen feststellen. Dabei muss bedacht werden, dass es bei Feldstudien wahrscheinlich zur Enzootischen Pneumonie und keiner reinen Mykoplasmosen kommt.

5.4. Durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme

In mehreren durchgeführten Feldstudien (LILLIE, 2004, TZIVARA et al., 2007, METTLER, 2009, WILSON et al., 2012) konnte ein positiver Effekt der Vakzination gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* auf die durchschnittlich erzielten Tageszunahmen bei Mastschweinen nachgewiesen werden. DAWSON et al. (2002) verglichen auf Feldebene in einem deutschen und einem englischen Betrieb die Effizienz einer *Mycoplasma hyopneumoniae* Vakzine und konnten bei den geimpften Schweinen des deutschen Bestands signifikant bessere Tageszunahmen feststellen als bei den Kontrolltieren. Im englischen Betrieb konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Schweine, die an einer Pneumonie erkrankten, bauten in der darauffolgenden Zeit weniger Körpermasse auf (RAUTIAINEN et al., 2000). Die Ausprägung der Erkrankung und der Krankheitsbeginn waren maßgeblich von der Virulenz des Stamms und der Infektionsdosis abhängig (STEVENSON, 1998, VICCA et al., 2003).

Allerdings konnten VICCA et al. (2003) nach experimenteller Infektion von Aufzuchtferkeln mit hochpathogenen Stämmen und verschiedenen Feldstämmen keine signifikanten Unterschiede der Gruppen verglichen mit der Kontrollgruppe bezüglich der Tageszunahmen und der Futteraufnahme nachweisen. Auch in anderen Studien konnten, im Gegensatz zur Mastphase, in Säuge- und Aufzuchtphase keine signifikanten Unterschiede der Tageszunahmen festgestellt werden (PABST, 2004, STRAUß, 2007). DE JONG et al. (1996) erzielten nach zweimaliger Impfung von 10 Wochen alten Aufzuchtschweinen nur 1 g mehr Körpermassezuwachs pro Tag, was im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant war. RICE und WIJNBERG (2000) konnten ebenfalls nach einmaliger *M. hyo* Impfung von Schweinen im Alter von 10-13 Wochen keine signifikanten Abweichungen der Tageszunahmen im Vergleich zur ungeimpften Kontrollgruppe nachweisen. Auch im aktuell durchgeführten Versuch konnte kein Unterschied bezüglich der Tageszunahmen zwischen geimpften und ungeimpften *M. hyo* freien Aufzuchtschweinen beobachtet werden.

Einmal wöchentlich wurde im Infektionsstall der Körpermassezuwachs der Tiere ermittelt. Zwischen den einzelnen Gruppen konnten über den sechswöchigen Verlauf des Infektionsversuchs keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Tageszunahmen und des Gesamtkörpergewichts festgestellt werden. Dies könnte vor allem auf die geringe Tierzahl ($n=8$ oder $n=5$) in Verbindung mit der daraus folgenden hohen Standardabweichung zurückzuführen sein. Auch VICCA et al. (2003) konnten mit Gruppen à 10 Aufzuchtschweinen im Infektionsversuch keine signifikanten Unterschiede der Tageszunahmen feststellen. Vergleichbare Infektionsversuche mit Endmastschweinen, bei denen die durchschnittlichen täglichen Gewichtszunahmen beurteilt wurden, sind bisher nicht durchgeführt worden. Lediglich in Feldversuchen, bei denen im Versuchsaufbau eine deutlich höhere Anzahl an Schweinen pro Gruppe berücksichtigt werden konnte, konnten signifikant höhere Tageszunahmen in der Impfgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (LILLIE, 2004, METTLER, 2009, WILSON et al., 2012).

Neben dem Aspekt der geringen Tierzahl musste berücksichtigt werden, dass in vorliegendem Versuch durch einen geringen Keimdruck und ein gutes Stallklima nur eine Mykoplasmosenose erzeugt wurde und keine Enzootische Pneumonie. Im Feldversuch kann durch einen hohen Keimdruck und ein häufig schlechtes Stallklima mit einer Infektion mit Sekundärerregern und somit mit einer Ausbildung einer Enzootischen Pneumonie gerechnet werden (THACKER, 2012).

Zum ersten Wiegetermin betrug das durchschnittliche Gesamtgewicht bei der Negativkontrolle 66 kg und bei der Positivkontrolle 64,5 kg. Diese Differenz von 1,5 kg stieg bis zum letzten gemeinsamen Wiegetermin aller Tiere am 165. Lebenstag auf 2,5 kg an, war aber zu keinem Zeitpunkt signifikant. Ein Abfall der Tageszunahmen eine Woche p.i. wird bei der Impfgruppe und der Positivkontrolle sichtbar. Dieser Abfall könnte infektionsbedingt sein, da die Tiere der Negativkontrolle zu diesem Zeitpunkt keine veränderten Tageszunahmen zeigten. Im Durchschnitt lagen die Tageszunahmen aller Gruppen ab dem Infektionszeitpunkt bei 1062 g. Dieser hohe Durchschnitt könnte vor allem auf die optimalen Haltungsbedingungen und das gute Klima zurückzuführen sein.

DIEKMAN et al. (1993) zeigten in Ihrer Studie, dass ein erhöhter Ammoniakgehalt in der Luft dazu führt, dass sich Erreger leichter im Respirationstrakt ansiedeln können und es so zu verringerten Tageszunahmen kommen kann. Diese Ursache muss in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt werden, da keine signifikante

Abweichung bezüglich der Tageszunahmen nachgewiesen werden konnte und der Ammoniakgehalt über den gesamten Zeitraum des Infektionsversuchs unter 12 ppm lag.

5.5. Husten

Über den gesamten Verlauf des Infektionsversuchs konnte bei Tieren der Negativkontrolle kein Husten beobachtet werden. Auch in der Impfgruppe und der Positivkontrolle konnte bis zum Zeitpunkt 3 Wochen *post infectionem* kaum Husten beobachtet werden. Ein Anstieg des Hustenindex war bei diesen beiden Gruppen erst in der vierten Woche nach der Infektion festzustellen. Eine signifikante Abweichung der Impfgruppe und der Positivkontrolle im Vergleich zur Negativkontrolle bezüglich des Hustenindex konnte erst in der letzten Lebenswoche nachgewiesen werden. In dem vorliegenden Versuch zeigten die Versuchstiere einen trockenen, nicht produktiven Husten. Derartiger Husten lässt auf eine erzeugte Mykoplasmosen schließen (VICCA et al., 2002). Das allgemeine Auftreten von Husten spricht für eine ausreichend applizierte Erregermenge, da niedrige Infektionsdosen nicht zu einer klinischen Erkrankung führen (STEVENSON, 1998).

In Infektionsversuchen mit Ferkeln wurde je nach *Mycoplasma hyopneumoniae* Stamm ein Auftreten des erregertypischen Hustens bereits 7-14 Tage *post infectionem* beobachtet (VICCA et al., 2002, DEL POZO SACRISTÁN et al., 2012, WOOLLEY et al., 2012). WOOLLEY et al. (2012) beschrieben, dass es im Krankheitsfall zu einem stetigen Anstieg der Hustenstärke kam. Auch MAROIS et al. (2007) stellten nach experimenteller Infektion von 6 Wochen alten Ferkeln fest, dass der Husten 8-13 Tage p.i. begann, die Hustenhäufigkeit den Peak nach 10-28 Tagen erreichte und danach wieder abnahm. Vergleichbare Ergebnisse beobachteten auch PIETERS et al. (2010), welche im Infektionsversuch mit 15 Wochen alten Schweinen Husten in einem Zeitraum von 11-68 Tage p.i. beobachteten. In dem hier vorliegenden Versuch konnte bei der Positivkontrolle bis zur Sektion am 28. und 42. Tag p.i. ein Anstieg des Hustenindex beobachtet werden. Bei der Impfgruppe hingegen kam es 5 Wochen p.i. zu einem rückläufigen Hustenindex, da 3 randomisierte Tiere, welche zuvor hohe Hustenindices aufwiesen, seziiert wurden.

Ob die Hustenintensität abhängig vom Erregerstamm ist, untersuchten PIETERS et al. (2010). Sie verglichen zwei *Mycoplasma hyopneumoniae* Isolate und stellten fest, dass bei dem pathogenerem der beiden Stämme der Husten 8 Tage p.i., bei dem weniger pathogenen Isolat erst 19 Tage p.i., begann. Da im vorliegenden Versuch

ein hochpathogener *Mycoplasma hyopneumoniae* Stamm zur Infektion verwendet wurde, ist der verglichen mit der Studie von PIETERS et al. (2010) verzögerte Beginn des Hustens wahrscheinlich auf den guten Immunstatus der Tiere zum Zeitpunkt der Infektion zurückzuführen.

Da bei Feldinfektionen der Zeitpunkt der Infektion nicht immer genau bestimmt werden kann, kann der Beginn des Hustens nicht in einen genauen Zusammenhang mit dem Infektionszeitpunkt gebracht werden (THACKER, 2012). In einem Feldversuch, bei dem die Wirksamkeit zweier *Mycoplasma hyopneumoniae* Vakzine in zwei verschiedenen Haltungssystemen getestet wurde, konnten bezüglich der Hustenhäufigkeit bei Stallhaltung keine signifikanten Unterschiede zwischen Impf- und Kontrollgruppen festgestellt werden. Bei der Haltung der Tiere im Außenklimastall ließ sich eine signifikant geringere Hustenhäufigkeit bei der Impfgruppe nachweisen (METTLER, 2009). In der hier vorliegenden Studie wurden die Tiere der Impfgruppe und der Positivkontrolle jeweils unter vergleichbaren stallklimatischen Bedingungen gehalten. Es kam ebenfalls zu keinen signifikanten Unterschieden bezüglich der Hustenhäufigkeit zwischen diesen beiden Gruppen. Jedoch lässt sich eine konventionelle Stallhaltung im Rahmen des obengenannten Feldversuchs nicht mit den optimalen stallklimatischen Bedingungen eines Infektionsstalls, der in der vorliegenden Studie verwendet wurde, vergleichen.

5.6. Lungenveränderungen

Für eine *Mycoplasma hyopneumoniae* Monoinfektion sind, wie in diesem Versuch bei Impfgruppe und Positivkontrolle nachgewiesen, gut abgrenzbare fokale, konsolidierte Areale typisch, die vor allem an den kranioventralen Lungenlappen auftreten und dunkellila bis grau sind (THACKER, 2004). Sekundärerreger wie *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* und *Bordetella bronchiseptica* konnten im vorliegenden Versuch nicht nachgewiesen werden. Somit ist davon auszugehen, dass die Lungenveränderungen auf eine im Versuch erzeugte Mykoplasmosen zurückzuführen sind.

Die makroskopischen Lungenveränderungen wurden 4 und 6 Wochen p.i. in der Sektion nachgewiesen und zeigten sich vor allem an den kranialen, medialen und accessorischen Lungenlappen und dem kranialen Anteil der kaudalen Lungenlappen. Diese Lokalisationen wurden auch von MAROIS et al. (2007) beim Vorliegen einer Mykoplasmosen beschrieben. Die Veränderungen der medialen Lungenlappen waren bei der Impfgruppe mit durchschnittlich 19,5 % und bei der Positivkontrolle mit

durchschnittlich 11 % am stärksten ausgeprägt. Die zweitstärksten Veränderungen wiesen die accessorischen Lungenlappen mit 5 % Veränderungen bei der Impfgruppe und 15 % bei der Positivkontrolle auf. Alle restlichen Lungenlappen waren mit durchschnittlich 0,6 % bei der Impfgruppe und 2 % bei der Positivkontrolle nur geringgradig verändert. Die ausgeprägten Veränderungen vor allem an den medialen und accessorischen Lungenlappen, die bei den Lungen der Tiere der Impfgruppe und der Positivkontrolle zu finden waren, bestätigen somit eine erfolgreiche Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae*. Die Lungenlappen der Negativkontrolle waren mit durchschnittlich 0,4 % Veränderung der medialen Lungenlappen nahezu unverändert. Dies lässt darauf schließen, dass es bei der Negativkontrolle wie beabsichtigt zu keiner Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* kam.

Nur bei einer stark ausgeprägten *Mycoplasma hyopneumoniae* Infektion sind die kranialen Teile der kaudalen Lungenlappen betroffen (OSBORNE et al., 1981, MORRISON et al., 1985). Bei 10 Wochen alten mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infizierten Schweinen bewiesen WOOLLEY et al. (2012), dass am Tag 21 p.i. vor allem die beiden kranialen und mittleren Lungenlappen betroffen waren. 28 Tage p.i. wiesen dann auch die kranialen Anteile der kaudalen Lungenlappen makroskopische Veränderungen auf. Dies geht einher mit einer Studie von VILLARREAL et al. (2011), welche davon ausgehen, dass die maximale Ausprägung der Lungenläsionen bei hochvirulenten Stämmen 4 Wochen p.i. auftritt. Bei wenig virulenten Stämmen erreicht der Lungenscore 8 Wochen p.i. sein Maximum (VILLARREAL et al., 2011). Die frühesten Läsionen nach einer *Mycoplasma hyopneumoniae* Monoinfektion treten eine Woche p.i. auf und heilen nach 7-9 Wochen wieder ab (KOBISCH et al., 1993). Auch im durchgeführten Versuch, bei dem die Tiere mit einem hochvirulenten Stamm (M.hyo 232) infiziert und 4 und 6 Wochen später seziiert wurden, konnten ausgeprägte Veränderungen, vergleichbar mit dem Versuch von VILLARREAL et al. (2011), nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten am zweiten Sektionstermin 6 Wochen p.i. bei einigen Tieren der Positivkontrolle stärker ausgeprägte makroskopische Lungenveränderungen mit Beteiligung der kranialen Anteile der kaudalen Lungenlappen festgestellt werden.

In der vorliegenden Studie war es nicht möglich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Lungenveränderungen der Impfgruppe und der Positivkontrolle nachzuweisen. Da eine Impfung nicht die Übertragungsrate des Pathogens verringert (MEYNS et al., 2006, VILLARREAL et al., 2011), zeigte eine Studie von

FABLET et al. (2012) ebenfalls, dass trotz Impfung kein positiver Effekt auf pneumoniebedingte Läsionen am Schlachthof gesehen werden konnte. In anderen Feld- und Infektionsversuchen konnte hingegen gezeigt werden, dass eine *Mycoplasma hyopneumoniae* Vakzination Lungenläsionen signifikant reduziert (HAESEBROUCK et al., 2004, LILLIE, 2004, MAES et al., 2008, METTLER, 2009, REYNOLDS et al., 2009). Jedoch wird im Feldversuch die Wirksamkeit eines eingesetzten *Mycoplasma hyopneumoniae* Impfstoffs in Bezug auf die Lungenläsionen erst nach circa 3,5 Monaten, zum Zeitpunkt des Schlachtens, ausgewertet. In dem vorliegenden Versuch wurden die Schweine bereits 4 bis 6 Wochen p.i. sezirt, wie auch bei PIETERS et al. (2010), die alle Versuchsschweine 14 Tage p.i. in der akuten Phase der Entzündung sezirten. PIETERS et al. (2010) stellten in ihrer Arbeit die Hypothese auf, dass eine Vakzination die entzündliche Reaktion nach einer sehr frischen Infektion verstärkt und die Lungenläsionen bei den geimpften Tieren schneller ausheilen als bei nicht vakzinierten. Dies könnte auch die Erklärung für die im vorliegenden Versuch beobachteten Lungenveränderungen liefern. Bei der Impfgruppe konnten durchschnittliche Lungenveränderungen von 6,7 % im Gegensatz zur Positivkontrolle mit 6,4 %, festgestellt werden.

Histologisch waren vor allem die peribronchiale, perivaskuläre „Cuff“-Bildung, die BALT Hyperplasie, die Infiltration von mononuklearen Zellen und die Proliferation des Bronchialepithels nachweisbar. Bei der Negativkontrolle waren die „Cuff“-Bildung, die BALT Hyperplasie und die Infiltration von mononuklearen Zellen sehr geringgradig ausgeprägt. Eine Proliferation des Bronchialepithels war nicht vorhanden. Bei den Tieren der Impf- und Positivkontrolle war vor allem eine geringgradige Infiltration von mononuklearen Zellen, eine geringgradige Proliferation des Bronchialepithels und eine gering- bis mittelgradige Hyperplasie des BALT nachweisbar. Eine „Cuff“-Bildung war bei der Impfgruppe geringgradig und bei der Positivkontrolle mittelgradig ausgebildet. Dies geht einher mit einer Studie von WOOLLEY et al. (2012), welche bei Ferkeln, die mit einem hochpathogenen Hillcrest Stamm infiziert wurden, unter anderem eine peribronchiale, perivaskuläre „Cuff“-Bildung und eine ausgeprägte BALT Hyperplasie feststellen konnten. KWON et al. (2002) konnten bei Ferkeln, die am 13. Lebenstag mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infiziert wurden, 28 Tage p.i. eine signifikant stärker ausgeprägte peribronchiale, peribronchioläre und perivaskuläre "Cuff"-Bildung nachweisen als an Tag 7 p.i.

5.7. Spätinfektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* bei experimenteller Infektion

Die Tiere in diesem Versuch wurden im Alter von 4-5 Monaten und einem Gewicht von 70 kg mit *Mycoplasma hyopneumoniae* infiziert, um zu evaluieren ob Tiere, die früh geimpft wurden, zu diesem Zeitpunkt einen wirksamen Schutz gegen den Erreger aufweisen. Der verwendete Impfstoff verfügt über eine nachgewiesene Immunitätsdauer von 5,5 Monaten (interne Daten, Elanco). Die Sektion der Tiere fand 4 und 6 Wochen p.i. statt, da die Tiere zu diesem Zeitpunkt ein durchschnittliches Schlachtgewicht von 110 kg erreicht hatten. In der Literatur ist zur Zeit nur ein Infektionsversuch mit *Mycoplasma hyopneumoniae* bei Endmastschweinen beschrieben (REYNOLDS et al., 2009), bei welchem der positive Einfluss einer *Mycoplasma hyopneumoniae* one shot Vakzine auf Lungenveränderungen und Antikörperbildung der Tiere belegt werden konnte. In allen anderen Infektionsversuchen wurden Ferkel in den ersten Lebenswochen infiziert (VICCA et al., 2003, MAROIS et al., 2007, VILLARREAL et al., 2011). Durch die geringen Erfahrungswerte zu Infektionen mit Endmastschweinen wurde im vorliegenden Versuch mit 10^7 KbE des Stammes M. hyo 232 ein hochpathogener Stamm hochdosiert verwendet. Es ist möglich, dass dadurch eine hohe Erregermenge appliziert wurde und die Wirksamkeit der Impfung dadurch beeinträchtigt war. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass keine signifikanten positiven Einflüsse der Impfung bezüglich der Tageszunahmen und Lungenveränderungen beobachtet werden konnten.

In dem vorliegenden Versuch konnte bei keinem der Tiere der Negativkontrolle mittels PCR oder BU *Mycoplasma hyopneumoniae* aus dem untersuchten linken kranialen Lungenlappen nachgewiesen werden. Die Lungenproben der Tiere der Positivkontrolle wiesen in der PCR (8 von 8 Tieren) und BU (6 von 8 Tieren) überwiegend positive Ergebnisse auf. Bei den Tieren der Impfgruppe waren in der PCR 5 von 8 Tieren und in der BU 3 von 8 Tieren positiv. In der PCR kann die DNA der lebensfähigen und toten Erreger nachgewiesen, aber nicht unterschieden werden. Wohingegen in der BU nur lebensfähige Erreger nachweisbar sind (KRÜGER und SEIDLER, 2007). Anhand der Ergebnisse aus PCR und BU wurde gezeigt, dass die Impfung die Anzahl lebensfähiger Erreger senkt. Die Ergebnisse sprechen für einen positiven Infektionsversuch, da in der Negativkontrolle mittels BU und PCR keine Erreger nachgewiesen, hingegen bei der Positivkontrolle lebensfähige Erreger in der BU angezüchtet werden konnten.

Da als Probe zur Durchführung der BU und nPCR jeweils der linke kraniale Lungenlappen entnommen wurde, die Lungenveränderungen aber an den medialen Lungenlappen am stärksten ausgeprägt waren, könnte der Erregernachweis aus den Proben beeinträchtigt gewesen sein. Für zukünftige Versuche ist es empfehlenswert die Entnahmestelle für Lungenproben zum *Mycoplasma hyopneumoniae* Nachweis an der Stelle zu wählen, an der die deutlichsten Veränderungen makroskopisch sichtbar sind.

6. Zusammenfassung

Im vorliegenden Versuch wurde die Wirksamkeit der in der 1. und 3. Lebenswoche applizierten two-shot Vakzine Stellamune Mycoplasma[®] (Elanco Animal Health, Bad Homburg) bei einer späten Infektion an zuvor *Mycoplasma hyopneumoniae* naiven Endmastschweinen, evaluiert. Dazu wurden 24 Schweine aus einem *Mycoplasma hyopneumoniae* unverdächtigen Bestand mit 70 kg Körpergewicht in den Infektionsstall der vetmeduni Vienna transportiert und experimentell infiziert. In die Studie wurden 20 Tiere pro Gruppe eingeschlossen, von denen jeweils 8 Tiere für den Infektionsversuch ausgewählt wurden. Beim Einschluss wurden die Tiere nach Gewicht randomisiert und den 3 Versuchsgruppen zugeteilt. Eingeschlossen wurden klinisch gesunde, 7 Tage alte männliche Ferkel, die am Tag des Studieneinschlusses mehr als 2 kg wogen und keine anatomischen und physischen Abnormitäten aufwiesen. Den ungeimpften Tieren der Negativkontrolle (Gruppe A) wurde am 137. Lebenstag unter Narkose intratracheal ein Placebomedium appliziert. Die ungeimpften Tiere der Positivkontrolle (Gruppe C) wurden ebenfalls am 137. Lebenstag narkotisiert und mit 10 ml Inokulum, welches 10^7 KbE des Stamms M.hyo 232 enthielt, intratracheal infiziert. Bei den Tieren der Impfgruppe (Gruppe B) wurde am 7. und 21. Lebenstag eine intramuskuläre Vakzination mit Stellamune Mycoplasma[®] im Betrieb durchgeführt. Diese Tiere wurden am 137. Lebenstag identisch zu den Tieren der Positivkontrolle infiziert. Zur Evaluation der Wirksamkeit der Vakzine wurden klinische Parameter wie Hustenindex und Gewichtsentwicklung und serologische Parameter erhoben. Die Sektionen fanden 4 und 6 Wochen *post infectionem* bei einem durchschnittlichen Gewicht von 110 kg statt. Es wurden makroskopische und mikroskopische Lungenveränderungen beurteilt und Lungenproben mittels BU und PCR auf *Mycoplasma hyopneumoniae* untersucht. Die serologische Untersuchung ergab, dass die Antikörpertiter der Impfgruppe über nahezu den gesamten Versuchsverlauf signifikant höher waren als bei den beiden ungeimpften Kontrollgruppen. Am 179. Lebenstag konnte kein signifikanter Unterschied der Werte zwischen Impfgruppe und Positivkontrolle mehr festgestellt werden. Die Auswertung der Ergebnisse des Hustenindex ergab in der letzten Versuchswoche zwischen der Negativkontrolle und der Impfgruppe und der Negativ- und Positivkontrolle eine signifikante Abweichung. Zwischen Impfgruppe und Positivkontrolle bestand eine Differenz der Hustenindices zu Gunsten der Impfgruppe, welche nicht signifikant war. Beim Vergleich der PCR Ergebnisse mit

dem Hustenindex konnte festgestellt werden, dass Tiere, die in der PCR positiv bewertet wurden, signifikant häufiger Husten zeigten als die in der PCR negativ getesteten Tiere. Bezüglich der Gewichtsentwicklung und der makroskopischen Lungenveränderungen konnte zwischen den einzelnen Gruppen auf Grund der geringen Tierzahl pro Gruppe kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Histologisch konnten bei der Impfgruppe und der Positivkontrolle *Mycoplasma hyopneumoniae* typische Lungenveränderungen nachgewiesen werden. Der Antigennachweis mittels PCR zeigte bei allen Tieren der Positivkontrolle ein positives Ergebnis, bei allen Tieren der Negativkontrolle hingegen waren die Proben negativ. Bei 5 der 8 Tiere der Impfgruppe konnten *Mycoplasma hyopneumoniae* Antigene mittels PCR aus den Lungenproben nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse lieferte auch die bakteriologische Untersuchung, bei der auf Grund der schweren Anzuchtbarkeit von *Mycoplasma hyopneumoniae* nicht aus allen Lungenproben der Impfgruppe (3 von 8 Tieren) und der Positivkontrolle (6 von 8 Tieren) *Mycoplasma hyopneumoniae* angezüchtet werden konnte.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine two-shot Vakzinierung gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* einen positiven Einfluss auf die Antikörperentwicklung und auf die symptomatische Ausprägung der Erkrankung hat.

7. Summary

The aim of this experimental challenge was to evaluate the efficacy of a two-shot-vaccine (Stellamune Mycoplasma[®], Elanco Animal Health, Bad Homburg) regarding late infections of *Mycoplasma hyopneumoniae* naive finishing pigs. After they reached the weight of 70 kg 24 pigs which were used in this experiment were transported from a *Mycoplasma hyopneumoniae* unsuspecting barn to the experimental facility of the vetmeduni Vienna where the infection took place. 60 male piglets were selected and randomly assigned to one of the three groups, the negative control group, the positive control group and the vaccination group. For the experimental challenge 8 of the 20 pigs of each group were selected and allocated to three separated animal rooms. Clinically healthy 7-day-old male piglets with over 2 kilogram of weight on the day of study inclusion and with no anatomical and physical abnormalities were included in the study. The unvaccinated pigs of the negative control group (group A) were inoculated intratracheally with a placebo medium at 137 days of age. The unvaccinated pigs of the positive control group (group C) were, also at 137 days of age, anesthetized and inoculated intratracheally with 10×10^7 CCU of M. hyo 232. Every pig of the vaccination group received, at the age of 7 and 21 days, an intramuscular injection with 2 ml Stellamune Mycoplasma[®] (Elanco Animal Health, Bad Homburg). These pigs were also inoculated intratracheally, at 137 day of age, with 10×10^7 CCU of M. hyo 232.

Clinical parameters such as coughing index and average daily weight gain and serological parameters were collected to evaluate the effectiveness of the vaccine. The sections took place 4 and 6 weeks post infection when the pigs had an average body weight of 110 kilogram. Macroscopic and microscopic lung lesions were evaluated and lung samples were examined by PCR-testing and bacterial culture. The serological investigation revealed that the antibody titer of the vaccinated group was over almost the entire course of the experiment significantly higher than in the two unvaccinated control groups. In the last week of the challenge there was no significant difference of the antibody titer of the vaccinated group compared to the positive control group. The evaluation of the results of the coughing index showed in the last week of the experiment a significant difference between the negative control group and the vaccinated group, and the negative and the positive control group. There was a difference of cough indices between vaccinated and positive control group in favor of the vaccinated group, the difference was not significant. Comparing

the PCR results with the coughing index it was observed that pigs which showed positive results in the PCR, coughed significantly more than the animals whose PCR results were negative. There were no significant differences between the daily weight gain and the macroscopic lung lesions of the groups. Typical histological *Mycoplasma hyopneumoniae* lung changes were detected in the vaccinated and the positive control group. The antigen detection by PCR acquired from the lung samples was positive in all animals of the positive control group and negative in all animals of the negative control group. *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens were detected by PCR from the lung samples of 5 of the 8 animals in the vaccinated group. The results of the bacteriological cultivation showed that *Mycoplasma hyopneumoniae* could not be detected neither in all lung samples of the vaccinated group (3 of 8 animals) nor in all lung samples of the positive control group (6 of 8 animals).

In conclusion, two-shot vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* has a positive influence on the antibody titers and the clinical expression of the disease.

8. Literaturverzeichnis

- Ameri-Mahabadi, M., Zhou, E. M., Hsu, W. H.** Comparison of two swine *Mycoplasma hyopneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies from vaccinated pigs and field serum samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 2005; 17: 61-64.
- Baccaro, M. R., Hirose, F., Umehara, O., Gonçalves, L. C. B., Doto, D. S., Paixão, R., Shinya, L. T., Moreno, A. M.** Comparative efficacy of two single-dose bacterins in the control of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine raised under commercial conditions in Brazil. *The Veterinary Journal* 2006; 172: 526-531.
- Baskerville, A.** Development of the early lesions in experimental enzootic pneumonia of pigs: an ultrastructural and histological study. *Research in Veterinary Science* 1972; 13: 570-578.
- Batista, L., Pijoan, C., Ruiz, A., Utrera, V., Dee, S.** Assessment of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* by personnel. *Journal of Swine Health and Production* 2004; 12: 75-77.
- Calsamiglia, M., Collins, J. E., Pijoan, C.** Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. *Veterinary Microbiology* 2000; 76: 299-303.
- Calsamiglia, M., Pijoan, C., Trigo, A.** Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 1999; 11: 246-251.
- Calsamiglia, M., Pijoan, C.** Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. *Veterinary Record* 2000; 146: 530-532.
- Ciprián, A., Palacios, J. M., Quintanar, D., Batista, L., Colmenares, G., Cruz, T., Romero, A., Schnitzlein, W., Mendoza, S.** Florfenicol feed supplemented decrease the clinical effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* experimental infection in swine in México. *Research in Veterinary Science* 2012; 92: 191-196.
- Clark, L., Armstrong, C., Freeman, M., Scheidt, A., Sands-Freemann, L., Knox, K.** Investigating the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd with enzootic pneumonia. *Veterinary Medicine* 1991; 86: 543-550.
- Dawson, A., Harvey, R. E., Thevasagayam, S. J., Sherington, J., Peters, A. R.** Studies of the field efficacy and safety of a single-dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine for pigs. *Veterinary Record* 2002; 151: 535-538.
- De Jong, M. F., Jedema E. J., Sampimom, O.** *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in 10 week old piglets. Results of a field trial. 14. IPVS Congress, Bologna, Italy, 1996: 220.
- DeBey, M. C., Ross, R. F.** Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infection and Immunity* 1994; 62: 5312-5318.
- Deblanc, C., Robert, F., Pinard, T., Gorin, S., Quéguiner, S., Gautier-Bouchardon, A. V., Ferré, S., Garraud, J. M., Cariolet, R., Brack, M., Simon, G.** Pre-infection of pigs

- with *Mycoplasma hyopneumoniae* induces oxidative stress that influences outcomes of a subsequent infection with a swine influenza virus of H1N1 subtype. *Veterinary Microbiology* 2013; 162: 643-651.
- Dee, S., Otake, S., Deen, J.** Use of a production region model to assess the efficacy of various air filtration systems for preventing airborne transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*: Results from a 2-year study. *Virus Research* 2010; 154: 177-184.
- Del Pozo Sacristán, R., Thiry, J., Vranckx, K., López Rodríguez, A., Chiers, K., Haesebrouck, F., Thomas, E., Maes, D.** Efficacy of florfenicol injection in the treatment of *Mycoplasma hyopneumoniae* induced respiratory disease in pigs. *The Veterinary Journal* 2012; 194: 420-422.
- Diekman, M. A., Scheidt, A. B., Sutton, A. L., Green, M. L., Clapper, J. A., Kelly, D. T., Van Alstine, W. G.** Growth and reproductive performance, during exposure to ammonia, of gilts afflicted with pneumonia and atrophic rhinitis. *American Journal of Veterinary Research* 1993; 54: 2128-2131.
- Dorr, P. M., Baker, R. B., Almond, G. W., Wayne, S. R., Gebreyes, W. A.** Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2007; 230: 244-250.
- Erlandson, K. R.** Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production* 2005; 13: 198-203.
- Fablet, C., Marois-Crehan, C., Simon, G., Grasland, B., Jestin, A., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N.** Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: a cross-sectional study. *Veterinary Microbiology* 2012; 157: 152-163.
- Fablet, C., Marois, C., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N.** Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. *Veterinary Microbiology* 2010; 143: 238-245.
- Fablet, C., Marois, C., Kuntz-Simon, G., Rose, N., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Jolly, J. P., Le Devendec, L., Tocqueville, V., Quéguiner, S., Gorin, S., Kobisch, M., Madec, F.** Longitudinal study of respiratory infection patterns of breeding sows in five farrow-to-finish herds. *Veterinary Microbiology* 2011; 147: 329-339.
- Fano, E., Pijoan, C., Dee, S., Deen, J.** Longitudinal assessment of two *Mycoplasma hyopneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assays in challenged and contact-exposed pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2012; 24: 383-387.
- Fano, E., Pijoan, C., Dee, S.** Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2005; 69: 223-228.
- Fano, E., Pijoan, C., Dee, S.** Infection dynamics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a continuous-flow population of pigs also infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *The Veterinary Record* 2007; 161: 515-520.
- Feenstra, A. A., Sorensen, V., Friis, N. F., Jensen, N. E., Bille-Hansen, V.** Experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs.13. IPVS Congress, Bangkok, Thailand, 1994: 187.

- Friis, N. F.** Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nordisk Veterinærmedicin* 1975; 27: 337-339.
- Goodwin, R. F. W.** Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds: search for possible causes. *Veterinary Record* 1985; 116: 690-694
- grosse Beilage, E., Rohde, N., Krieter, J.** Seroprevalence and risk factors associated with seropositivity in sows from 67 herds in north-west Germany infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Preventive Veterinary Medicine* 2009; 88: 255-263.
- grosse Beilage, E., Schreiber, A., Pabst, T.** Diagnostik der Enzootischen Pneumonie in Schweineherden nach Impfung gegen *Mycoplasma hyopneumoniae*. Teil 1: Seroreaktionen von Schweinen auf verschiedene Impfschemata. *Tierärztliche Praxis* 2005; 33(G): 239-245.
- Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., Decostere, A.** Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Veterinary Microbiology* 2004; 100: 255-268.
- Hannan, P. C., B.S. Bhogal, J.P. Fish** Tylosin tartrate und tiamutilin effects on experimental piglet pneumonia induced with pneumonic lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. *Research in Veterinary Science* 1982; 33: 76-88.
- Harris, H., Alexander, T.** Methods of disease control. In: *Diseases of swine*. B. E. Straw, S. D'Allaire, W. Mengeling, D. Taylor (Hrsg.) 1999; Iowa State University Press: 1077-1110.
- Hege, R., Zimmermann, W., Scheidegger, R., Stark, 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 Veterinaria Scandinavica* 2002; 43: 145-156.
- Heinonen, M., Laurila, T., Vidgren, G., Levonen, K.** Eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine finishing herd without total depopulation. *The Veterinary Journal* 2011; 188: 110-114.
- Heinritzi, K.** Pneumonie. In: *Schweinekrankheiten*. K. Heinritzi, H.R. Gindele, G. Reiner, U. Schnurrbusch, (Hrsg.) 2006; Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer: 137-146.
- Hennig-Pauka, I., Bremerich, S., Nienhoff, H., Schröder, C., Ganter, M., Blecha, F., Waldmann, K.-H., Gerlach, G. F.** Comparison of three common methods of lung lavage in healthy pigs. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 2007; 54: 428-433.
- Hiltermann-Linden, E.** Vergleich von Methoden zum Nachweis von *Mycoplasma hyopneumoniae*-Infektionen beim Schwein sowie epidemiologische Untersuchungen über die Verbreitung der Enzootischen Pneumonie im Weser-Ems Gebiet im Jahre 1996. *Dissertation* 2004; Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Horst, I., Lindner, A., Krüger, M., Gindele, H. R., Sting, R.** Verbreitung der *Mycoplasma hyopneumoniae*-Infektion in Deutschland - Schlussfolgerungen für die Bekämpfung der Enzootischen Pneumonie der Schweine. *Tierärztliche Umschau* 1997; 52: 393-394.
- Kobisch, M.** Les Mycoplasmoses respiratoires du porc. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 1987; 163: 419-430.

- Kobisch, M.** Mycoplasmal diseases in pigs – old diseases still causing trouble. 16. IPVS Congress, Melbourne, Australia, 2000: 434-438.
- Kobisch, M., Blanchard, B., Le Potier, M. F.** Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. *Veterinary research* 1993; 24: 67-77.
- Kobisch, M., Ross, R.F.** Experimental infections of swine. Tully, J.G., Razin, S. (Eds.) 1996, *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, vol. II. Academic Press, San Diego, CA, 371-376.
- Kobisch, M., Tillon, J.P.** Erkrankungen des Atmungsapparates. In: *Das Schwein und seine Krankheiten*. P. Mornet, J. Tournut, B. Toma (Hrsg.) 1989; Schoeber Verlags-GmbH, Hengersberg: 171-191.
- Krüger, M., Seidler, T.** Allgemeine Bakteriologie. In: *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. A. Mayr (Hrsg.) 2007; Stuttgart: Enke Verlag: 344-391.
- Kurth, K. T., Hsu, T., Snook, E. R., Thacker, E. L., Thacker, B. J., Minion, F. C.** Use of a Mycoplasma hyopneumoniae nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians* 2002; 14: 463-469.
- Kwon, D., Chae, C.** Detection and localization of Mycoplasma hyopneumoniae DNA in lungs from naturally infected pigs by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *Veterinary Pathology* 1999; 36: 308-313.
- Kwon, D., Choi, C., Chae, C.** Chronologic localization of mycoplasma hyopneumoniae in experimentally infected pigs. *Veterinary Pathology* 2002; 39: 584-587.
- Le Carrou, J., Laurentie, M., Kobisch, M., Gautier-Bouchardon, A. V.,** 2006: Persistence of Mycoplasma hyopneumoniae in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the parC gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50: 1959-1966.
- Li, Y., Li, P., Wang, X., Yu, Q., Yang, Q.** Co-administration of attenuated Mycoplasma hyopneumoniae 168 strain with bacterial DNA enhances the local and systemic immune response after intranasal vaccination in pigs. *Vaccine* 2012; 30: 2153-2158.
- Lillie, K.** Untersuchung zur Wirkung und Verträglichkeit eines inaktivierten Mycoplasma hyopneumoniae - One-shot-Impfstoffes (Stellamune One) bei unterschiedlichen Vakzinationszeitpunkten. Dissertation 2004; Tierärztliche Fakultät LMU München.
- Lorenzo, H., Quesada, O., Assuncao, P., Castro, A. und Rodriguez, F.** Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with Mycoplasma hyopneumoniae. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006; 109: 199-207.
- Maes, D.,** 2010: Mycoplasma hyopneumoniae infections in pigs: update on epidemiology and control. 21. IPVS Congress, Vancouver, Canada, 2010: 30-33.
- Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Lein, A., Vrijens, B., de Kruif, A.** The effect of vaccination against Mycoplasma hyopneumoniae in pig herds with a continuous production system. *Journal of Veterinary Medicine. Series B* 1998; 45: 495-505.

- Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Vrijens, B., Verbeke, W., Viaene, J., de Kruif, A.** Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. *Vaccine* 1999; 17: 1024-1034.
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F.** Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary Microbiology* 2008;126: 297-309.
- Maes, D., Verdonck, M., Deluyker, H., de Kruif, A.** Enzootic pneumonia in pigs. *The Veterinary Quarterly* 1996; 18: 104-109.
- Marois, C., Gottschalk, M., Morvan, H., Fablet, C., Madec, F., Kobisch, M.** Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 2009; 135: 283-291.
- Marois, C., Le Carrou, J., Kobisch, M., Gautier-Bouchardon, A. V.** Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Veterinary Microbiology* 2007; 120: 96-104.
- Martelli, P., Terreni, M., Guazzetti, S., Cavirani, S.** Antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in vaccinated pigs with or without maternal antibodies induced by sow vaccination. *Journal of Veterinary Medicine* 2006; 53: 229-233.
- McKelvie, J., Morgan, J. H., Nanjiani, I. A., Sherington, J., Rowan, T. G., Sunderland, S. J.** Evaluation of tulathromycin for the treatment of pneumonia following experimental infection of swine with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Therapeutics: Research in applied Veterinary Medicine* 2005; 6: 197-202.
- Mettler, S.** Untersuchungen zur Wirksamkeit zweier *Mycoplasma hyopneumoniae* Impfstoffe bei verschiedenen Haltungssystemen innerhalb eines Betriebs. Dissertation 2009; Tierärztliche Fakultät LMU München.
- Meyns, T., Dewulf, J., de Kruif, A., Calus, D., Haesebrouck, F., Maes, D.** Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine* 2006; 24: 7081-7086.
- Meyns, T., Van Steelant, J., Rolly, E., Dewulf, J., Haesebrouck, F., Maes, D.** A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. *The Veterinary Journal* 2011; 187: 388-392.
- Minion, F. C.** Molecular pathogenesis of mycoplasma animal respiratory pathogens. *Frontiers in Bioscience* 2002; 7: 1410-1422.
- Moorkamp, L., Grosse Beilage, E., Hewicker-Trautwein, M.** Immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in piglets. *Tierärztliche Praxis* 2010(G); 6: 357-362.
- Morrison, R. B., Pijoan, C., Hilley, H.D., Rapp, V.** Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 1985; 49: 129-137.
- Nanjiani, I., McKelvie, J., Benchaoui, H., Godinho, K., Sherington, J., Sunderland, S., Weatherley, A., Rowan, T.** Evaluation of the therapeutic activity of tulathromycin against swine respiratory disease on farms in Europe. *Veterinary Therapeutics: research in applied Veterinary Medicine* 2005; 6: 203-213.

- Nathues, H., Doehring, S., Woeste, H., Fahrion, A. S., Doherr, M. G., grosse Beilage, E.** Individual risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2013; 55: 44.
- Nathues, H., Chang, Y. M., Wieland, B., Rechter, G., Spergser, J., Rosengarten, R., Kreienbrock, L., Grosse Beilage, E.** Herd-Level Risk Factors for the Seropositivity to *Mycoplasma hyopneumoniae* and the Occurrence of Enzootic Pneumonia Among Fattening Pigs in Areas of Endemic Infection and High Pig Density. *Transbound Emerg Dis.* 2012a; doi: 10.1111/tbed.12033.
- Nathues, H., Spergser, J., Rosengarten, R., Kreienbrock, L., Grosse Beilage, E.** Value of the clinical examination in diagnosing enzootic pneumonia in fattening pigs. *The Veterinary Journal* 2012b; 193: 443-447.
- Nutsch, R. G., Hart, F. J., Rooney, K. A., Weigel, D. J., Kilgore, W. R., Skogerboe, T. L.** Efficacy of tulathromycin injectable solution for the treatment of naturally occurring Swine respiratory disease. *Veterinary therapeutics: research in applied Veterinary Medicine* 2005; 6: 214-224.
- Okada, M., Asai, T., Ono, M., Sakano, T., Sato, S.** Cytological and immunological changes in bronchoalveolar lavage fluid and histological observation of lung lesions in pigs immunized with *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccine prepared from broth culture supernate. *Vaccine* 2000; 18: 2825-2831.
- Opriessnig, T., Thacker, E. L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X. J., Halbur, P. G.** Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology* 2004; 41: 624-640.
- Osborne, A. D., Saunders, J.R., Sebunya, T.K.** An abattoir survey of the incidence of pneumonia in Saskatchewan swine and an investigation of the microbiology of affected lungs. *The Canadian Veterinary Journal* 1981; 22: 82-85.
- Otake, S., Dee, S., Corzo, C., Oliveira, S., Deen, J.** Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Veterinary Microbiology* 2010; 145:198-208.
- Pabst, T.** Ausbreitung von *M. hyopneumoniae* in endemisch infizierten Schweineherden und Bekämpfung der Enzootischen Pneumonie mittels one-shot Impfung (Ingelvac M.hyo). Dissertation 2004; Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Park, S. C., Yibchok-Anun, S., Cheng, H., Young, T. F., Thacker, E. L., Minion, F. C., Ross, R. F., Hsu, W. H.** *Mycoplasma hyopneumoniae* increases intracellular calcium release in porcine ciliated tracheal cells. *Infection and Immunity* 2002; 70: 2502-2506.
- Pausenberger, A., Mues, G., Nienhoff, H., Strutzberg-Minder, K.** Vergleich der Untersuchungsergebnisse von bronchoalveolären Lavageproben mit Bronchialtupferproben (Tracheobronchialabstrichproben) mittels PCR in einem Ferkelerzeugerbetrieb. *Praktischer Tierarzt* 2012; 93: 440-447.
- Pieters, M., Fano, E., Pijoan, C., Dee, S.** An experimental model to evaluate *Mycoplasma hyopneumoniae* transmission from asymptomatic carriers to unvaccinated and vaccinated sentinel pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2010; 74: 157-160.

- Pieters, M., Pijoan, C., Fano, E., Dee, S.** An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. *Veterinary Microbiology* 2009; 134: 261-266.
- Piffer, I. A., Ross, R. F.** Effect of age on susceptibility of pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia. *American Journal of Veterinary Research* 1984; 45: 478-481.
- Pointon, A. M., Heap, P., McCloud, P.** Enzootic pneumonia of pigs in South Australia-factors relating to incidence of disease. *Australian Veterinary Journal*; 62: 98-101.
- Prikazsky, M.** Endemic pneumonia in pigs and mycoplasma. *Point Véter Maim* 1988 1985; 20: 137-148.
- Rammohan, L., Xue, L., Wang, C., Chittick, W., Ganesan, S., Ramamoorthy, S.** Increased prevalence of torque teno viruses in porcine respiratory disease complex affected pigs. *Veterinary Microbiology* 2012; 157: 61-68.
- Rautiainen, E., Virtala, A. M., Wallgren, P., Saloniemi, H.** Varying effects of infections with *Mycoplasma hyopneumoniae* on the weight gain recorded in three different multisource fattening pig herds. *Journal of Veterinary Medicine* 2000; 47: 461-469.
- Razin, S.** Peculiar properties of mycoplasmas: The smallest self-replicating prokaryotes. *FEMS microbiology letters* 1992; 100: 423-431.
- Razin, S., Yogev, D., Naot, Y.** Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; 62: 1094-1156.
- Redondo, E., Masot, A. J., Fernández, A., Gázquez, A.** Histopathological and Immunohistochemical Findings in the Lungs of Pigs Infected Experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology* 2009; 140: 260-270.
- Reynolds, S. C., St Aubin, L. B., Sabbadini, L. G., Kula, J., Vogelaar, J., Runnels, P., Peters, A. R.** Reduced lung lesions in pigs challenged 25 weeks after the administration of a single dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine at approximately 1 week of age. *Veterinary Journal* 2009; 181: 312-320.
- Rice, B. F. J., M. Wijnberg,** 2000: Field evaluation of the effect on lung scores at slaughter and performance of fattening pigs sourced from outdoor breeding units after single vaccination with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine at 10-13 weeks of age when compared to unvaccinated controls. 16. IPVS Congress, Melbourne, Australia: 455.
- Roof, M., Burkhart, K., Zuckermann, F.** Pig efficacy study comparing *Mycoplasma* vaccines used at one and 2 doses. 17. IPVS Congress, Ames, Iowa, 2002: 570.
- Ross, R.** *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in swine: history, pathogenesis and epidemiology. *Selezione Veterinaria* 1987; 28: 43-54.
- Ruiz, A. R., Utrera, V., Pijoan, C.** Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* sow vaccination on piglet colonization at weaning. *Journal of Swine Health and Production* 2003; 11:131-135.
- Sarradell, J., Andrada, M., Ramirez, A. S., Fernandez, A., Gomez-Villamandos, J. C., Jover, A., Lorenzo, H., Herraes, P., Rodriguez, F.** A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs

- naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Pathology* 2003; 40: 395-404.
- Schmidt, J. A., Browning, G. F., Markham, P. F.** *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein is a lipolytic enzyme with a preference for shorter-chain fatty acids. *Journal of Bacteriology* 2004; 186: 5790-5798.
- Segales, J., Valero, O., Espinal, A., Lopez-Soria, S., Nofrarias, M., Calsamiglia, M., Sibila, M.**, 2012: Exploratory study on the influence of climatological parameters on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection dynamics. *International Journal of Biometeorology* 2012; 56: 1167-1171.
- Selbitz, H. J.** Zellwandlose Bakterien der Klasse Mollicutes. In: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. H. J. Selbitz, U. Truyen, P. V. Weigand (Hrsg.) 2010; Stuttgart: Enke Verlag: 319-329.
- Sibila, M., Bernal, R., Torrents, D., Riera, P., Llopart, D., Calsamiglia, M., Segalés, J.** Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. *Veterinary Microbiology* 2008; 127: 165-170.
- Sibila, M., Fort, M., Nofrarias, M., Pérez de Rozas, A., Galindo-Cardiel, I., Mateu, E., Segalés, J.** Simultaneous Porcine Circovirus Type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* Co-inoculation does not Potentiate Disease in Conventional Pigs. *Journal of Comparative Pathology* 2012; 147: 285-295.
- Sibila, M., Nofrarias, M., Lopez-Soria, S., Segales, J., Valero, O., Espinal, A., Calsamiglia, M.** Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Veterinary Microbiology* 2007; 122: 97-107.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segalés, J.** Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *The Veterinary Journal* 2009; 181: 221-231.
- Smith, S. C., S. J. Thevasagayam, P. Pommier, A. Keita, E. Pagot, A. R. Peters** Field efficacy of a new single dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine Stellamune One administered to pigs at 3 to 5 weeks of age. 17. IPVS Congress, Ames, Iowa, 2002: 515.
- Sørensen, V., Ahrens, P., Barfod, K., Feenstra, A. A., Feld, N. C., Friis, N. F., Bille-Hansen, V., Jensen, N. E., Pedersen, M. W.** *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Veterinary Microbiology* 1997; 54: 23-34.
- Staerk, K. D., Nicolet, J., Frey, J.** Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; 64: 543-548.
- Staerk, K. D., Miserez, R., Siegmann, S., Ochs, H., Infanger, P., Schmidt, J.** A successful national control programme for enzootic respiratory diseases in pigs in Switzerland. *Revue Scientifique et Technique* 2007; 26: 595-606.
- Steenhard, N. R., Jungersen, G., Kokotovic, B., Beshah, E., Dawson, H. D., Urban, J. F., Jr., Roepstorff, A. und Thamsborg, S. M.**, 2009: *Ascaris suum* infection negatively affects the response to a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination and subsequent challenge infection in pigs. *Vaccine* 2009; 27: 5161-5169.

- Stevenson, G. W.**, 1998: Bacterial pneumonia in swine. 15. IPVS Congress, Birmingham, UK, 1998: 11-20.
- Strait, E. L., Thacker, E. L.**, 2006: Challenge study to compare *Mycoplasma hyopneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assays. 19. IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006: 97.
- Strasser, M., Abiven, P., Kobisch, M. und Nicolet, J.** Immunological and pathological reactions in piglets experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or *Mycoplasma flocculare*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1992; 31: 141-153.
- Strauß, C.** Einfluss der Mutterschutzimpfung gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* auf den Impfschutz der Ferkel. Dissertation 2007; Tierärztliche Fakultät LMU München.
- Straw, B. E., Backstrom, L., Lehman, A. D.** Examination of swine at slaughter. Part II. Findings at slaughter and their significance. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1986; 8: 106-112.
- Straw, B. E., Burgi, E. J., Hilley, H. D., Leman, A. D.** Pneumonia and atrophic rhinitis in pigs from a test station. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1983; 182: 607-611.
- Tajima, M., Yagihashi, T.** Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infection and Immunity* 1982; 37: 1162-1169.
- Tassis, P. D., Papatsiros, V. G., Nell, T., Maes, D., Alexopoulos, C., Kyriakis, S. C., Tzika, E. D.**, 2012: Clinical evaluation of intradermal vaccination against porcine enzootic pneumonia (*Mycoplasma hyopneumoniae*). *The Veterinary Record* 2012; 170: 261.
- Taylor, J. D.** The Lungs. in: *Pathology of the Pig - A Diagnostic Guide*. L.D. Sims, J. R. W. Glastonbury (Hrsg.) 1996; Melbourne: Verlag D.G. Walker Pty. Ltd: 219-238.
- Thacker, E. L.** Immunology of the porcine respiratory disease complex. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 2001; 17: 551-565.
- Thacker, E. L.** Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production* 2004; 12: 252-254.
- Thacker, E. L.** Mycoplasmosis. in: *Diseases of swine*. J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson (Hrsg.) 2012; Iowa: Blackwell Publishing: 779-788.
- Thacker, E. L., Halbur, P. G., Ross, R. F., Thanawongnuwech, R., Thacker, B. J.** *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 620-627.
- Thacker, E. L., Thacker, B. J., Kuhn, M., Hawkins, P. A., Waters, W. R.**, Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *American Journal of Veterinary Research* 2000; 61: 1384-1389.

- Thacker, E. L., Thacker, B. J., Boettcher, T. B.** Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *Journal of Swine Health and Production* 1998; 6: 107-112.
- Tzivara, A., Kritas, S. K., Bourriel, A. R., Alexopoulos, C., Kyriakis, S. C.** Efficacy of an inactivated aqueous vaccine for the control of enzootic pneumonia in pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *The Veterinary Record* 2007; 160: 225-229.
- Vicca, J., Maes, D., Jonker, L., de Kruif, A. und Haesebrouck, F.** Efficacy of in-feed medication with tylosin for the treatment and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. *The Veterinary Record* 2005; 156: 606-610.
- Vicca, J., Maes, D., Stakenborg, T., Butaye, P., Minion, F., Peeters, J., de Kruif, A., Decostere, A., Haesebrouck, F.** Resistance mechanism against fluoroquinolones in *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Microbial Drug Resistance* 2007; 13: 166-170.
- Vicca, J., Maes, D., Thermote, L., Peeters, J., Haesebrouck, F., de Kruif, A.** Patterns of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in Belgian farrow-to-finish pig herds with diverging disease-course. *Journal of Veterinary Medicine* 2002; 49: 349-353.
- Vicca, J., Stakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J., de Kruif, A., Haesebrouck, F.** Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Veterinary Microbiology* 2003; 97: 177-190.
- Vicca, J., Stakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J., de Kruif, A., Haesebrouck, F.** In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48: 4470-4472.
- Villarreal, I., Maes, D., Vranckx, K., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F.** Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vaccine* 2011; 29: 1731-1735.
- Villarreal, I., Vranckx, K., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Maes, D.** Effect of challenge of pigs previously immunised with inactivated vaccines containing homologous and heterologous *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *BMC Veterinary Research* 2012; 8: 2.
- Vranckx, K., Maes, D., Marchioro, S. B., Villarreal, I., Chiers, K., Pasmans, F., Haesebrouck, F.** Vaccination reduces macrophage infiltration in bronchus-associated lymphoid tissue in pigs infected with a highly virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain. *BMC Veterinary Research* 2012; 8: 24.
- Whittlestone, P.** Immunity to mycoplasmas causing respiratory diseases in man and animals. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* 1976; 20: 277-302.
- Wilson, S., Van Brussel, L., Saunders, G., Taylor, L., Zimmermann, L., Heinritzi, K., Ritzmann, M., Banholzer, E., Eddicks, M.** Vaccination of piglets at 1 week of age with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine reduces lung lesions and improves average daily gain in body weight. *Vaccine* 2012; 30: 7625-7629.
- Woolley, L. K., Fell, S., Gonsalves, J. R., Walker, M. J., Djordjevic, S. P., Jenkins, C., Eamens, G. J.** Evaluation of clinical, histological and immunological changes and qPCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tissues during the early stages of mycoplasmal pneumonia in pigs after experimental challenge with two field isolates. *Veterinary Microbiology* 2012; 161: 186-195.

- Yagihashi, T., Kazama, S., Tajima, M.** Seroepidemiology of mycoplasmal pneumonia of swine in Japan as surveyed by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Microbiology* 1993; 34: 155-166.
- Yang, W. J., Lai, J. F., Peng, K. C., Chiang, H. J., Weng, C. N., Shiuan, D.** Epitope mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using phage displayed peptide libraries and the immune responses of the selected phagotopes. *Journal of Immunological Methods* 2005; 304: 15-29.
- Yazawa, S., Okada, M., Ono, M., Fujii, S., Okuda, Y., Shibata, I., Kida, H.** Experimental dual infection of pigs with an H1N1 swine influenza virus (A/Sw/Hok/2/81) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 2004; 98: 221-228.
- Young, T. F., Thacker, E. L., Erickson, B. Z., Ross, R. F.** A tissue culture system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. *Veterinary Microbiology* 2000; 71: 269-279.
- Zhang, Q., Young T. F., Ross R. F.** Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infection and Immunity* 1994; 62: 1616-1622.
- Zhang, Q., Young, T. F., Ross, R. F.** Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infection and Immunity* 1995; 63: 1013-1019.
- Zielinski, G. C., Ross, R. F.** Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. *American Journal of Veterinary Research* 1993; 54: 1262-1269.
- Zimmermann, W., Odermatt, W., Tschudi, P.** Enzootische Pneumonie (EP): die Teilsanierung EP-reinfizierter Schweinezuchtbetriebe als Alternative zur Totalsanierung. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 1989; 131: 179-191.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Studienverlauf.....	23
Abbildung 2: Aufbau des Kontumazstalls.....	26
Abbildung 3: Schema der Lungenprobenentnahme.....	29
Abbildung 4: Lunge links mit 0 % Veränderungen und Lunge rechts mit 5 % Veränderungen im rechten kranialen Lungenlappen und 60 % Veränderungen im rechten mittleren Lungenlappen	30
Abbildung 5: Mittelwerte der Antikörper der Gruppen A, B und C im zeitlichen Verlauf der Untersuchung im Vergleich	34
Abbildung 6: Verlauf der S/P-Werte der Tiere der Gruppe A.....	34
Abbildung 7: Verlauf der S/P-Werte der Tiere der Gruppe C	35
Abbildung 8: Verlauf der S/P-Werte der Tiere der Gruppe B.....	36
Abbildung 9: Durchschnittliche tägliche Gewichtszunahmen in g der Tiere der Gruppen A, B und C im Aufzuchtstall und in der Anfangsmast im Vergleich; n=20 Tiere pro Gruppe	37
Abbildung 10: Gesamtkörpergewichte der Gruppen A, B und C am 130. und 165. Lebenstag in kg	38
Abbildung 11: Durchschnittliche tägliche Gewichtszunahmen in g der Gruppen A, B und C p.i. pro Woche im Vergleich.....	39
Abbildung 12: Hustenindex (Hustenstöße pro Individuum/10 Minuten) der Tiere der einzelnen Gruppen im Vergleich ab dem Zeitpunkt des Einstallens in den Infektionsstall bis zur Sektion	40
Abbildung 13: Hustenindex (Hustenstöße pro Individuum/10 Minuten) der einzelnen Tiere aus den Gruppen A, B und C pro Woche im Vergleich	41
Abbildung 14: Vergleich des Hustenindex (Hustenstöße pro Individuum/10 Minuten) ab dem Zeitpunkt des Einstallens in den Infektionsstall bis zur Sektion mit den PCR Ergebnissen ...	42
Abbildung 15: Lungenveränderungen der einzelnen Lungenlappen in % der Gruppen A, B und C im Vergleich	43
Abbildung 16: Korrelation des Hustenindex (Hustenstöße pro Individuum/10 Minuten) der Gruppen A, B und C mit den jeweiligen makroskopischen Lungenveränderungen; (r=Korrelationskoeffizient).....	44

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung.....	22
Tabelle 2: Anzahl der auf Mycoplasma hyopneumoniae positiven Proben der Gruppen A, B und C in der BU und nPCR (positive Proben /Gesamtzahl der Tiere)	33
Tabelle 3: Serokonversionsrate der Tiere der Gruppen A, B und C im Vergleich (positive Tiere/ Gesamtanzahl der Tiere)	36
Tabelle 4: „Cuff“ - Bildung (betroffene Tiere / Gesamtzahl der Tiere) der Gruppen A, B und C im Vergleich	45
Tabelle 5: BALT Hyperplasie (betroffene Tiere / Gesamtzahl der Tiere) der Gruppen A, B und C im Vergleich.....	45
Tabelle 6: Infiltration von mononuklearen Zellen (betroffene Tiere / Gesamtzahl der Tiere) der Gruppen A, B und C im Vergleich.....	45
Tabelle 7: Proliferation des Bronchialepithels (betroffene Tiere / Gesamtzahl der Tiere) der Gruppen A, B und C im Vergleich.....	45
Tabelle 8: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Gruppe A	76
Tabelle 9: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Gruppe B	78
Tabelle 10: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Gruppe C	80

11. Anhang

Tabelle 8: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Gruppe A

ID	Lungenlappen	peribronchiale, perivaskuläre "Cuff-Bildung"	Proliferation der Typ 2 Pneumozyten	PMN Infiltration in die Alveoli	BALT hyperplasia	Atelektase der Alveolen	intralobuläre Infiltration von mononuklearen Zellen	zelluläres Exsudat in den Bronchiolen	Proliferation des Bronchialepithels	Ödeme
1	links kranial	0	0	0	0	2	0	0	0	0
	links medial	1	0	1	1	1	0	1	0	1
	links kaudal	1	0	0	1	1	0	0	0	0
	rechts kranial	1	1	0	1	1	0	0	1	0
	rechts medial	1	0	0	1	2	0	0	0	0
	rechts kaudal	1	0	0	1	1	0	0	0	0
	L. accessorius	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	links kranial	2	0	0	2	1	1	0	0	0
	links medial	2	0	0	2	0	1	0	1	0
	links kaudal	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	rechts kranial	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	rechts medial	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	rechts kaudal	1	0	0	2	0	0	0	0	1
	L. accessorius	1	0	0	2	0	0	0	0	0
3	links kranial	1	0	0	2	2	0	0	0	0
	links medial	1	0	0	0	1	1	0	0	0
	links kaudal	2	1	0	3	2	2	0	0	0
	rechts kranial	0	0	0	0	2	0	0	0	0
	rechts medial	1	0	0	1	2	3	0	0	1
	rechts kaudal	2	0	0	0	1	1	0	1	3
	L. accessorius	1	0	0	1	2	1	0	0	0
4	links kranial	2	0	0	0	1	2	0	0	0
	links medial	1	0	0	0	2	1	0	0	0
	links kaudal	1	0	0	1	2	1	0	0	0

<u>ID</u>	<u>Lungenlappen</u>	<u>peribronchiale, perivaskuläre "Cuff-Bildung"</u>	<u>Proliferation der Typ 2 Pneumozyten</u>	<u>PMN Infiltration in die Alveoli</u>	<u>BALT hyperplasia</u>	<u>Atelektase der Alveolen</u>	<u>intralobuläre Infiltration von mononuklearen Zellen</u>	<u>zelluläres Exsudat in den Bronchiolen</u>	<u>Proliferation des Bronchialepithels</u>	<u>Ödeme</u>
	rechts kranial	2	0	0	2	1	2	0	0	0
	rechts medial	1	1	0	0	3	2	0	0	0
	rechts kaudal	2	0	0	1	1	2	0	0	0
	L. accessorius	2	0	0	1	1	2	0	1	0
5	links kranial	1	0	0	0	1	1	0	0	0
	links medial	2	0	0	0	1	2	0	0	0
	links kaudal	1	0	0	0	1	1	0	0	0
	rechts kranial	2	0	0	0	1	2	0	0	0
	rechts medial	2	0	0	0	1	1	0	0	0
	rechts kaudal	1	0	0	0	0	1	0	0	0
	L. accessorius	2	0	0	0	1	1	0	0	0
6	links kranial	1	0	0	1	1	2	0	0	0
	links medial	2	0	0	0	1	1	0	0	0
	links kaudal	1	0	0	1	1	1	0	0	0
	rechts kranial	1	0	0	1	1	1	0	0	0
	rechts medial	2	0	0	0	1	1	0	0	0
	rechts kaudal	1	0	0	1	1	1	0	0	0
	L. accessorius	2	0	0	0	1	1	0	0	0
7	links kranial	2	0	0	1	0	1	0	0	0
	links medial	2	0	0	0	0	1	0	0	0
	links kaudal	1	0	0	1	0	2	0	0	0
	rechts kranial	2	0	0	1	1	3	0	0	0
	rechts medial	2	0	0	2	1	2	0	0	0
	rechts kaudal	2	0	0	2	1	2	0	1	0
	L. accessorius	1	0	0	2	0	1	0	0	0

Tabelle 9: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Gruppe B

ID	Lungenlappen	peribronchiale, perivaskuläre "Cuff-Bildung"	Proliferation der Typ 2 Pneumozyten	PMN Infiltration in die Alveoli	BALT hyperplasia	Atelektase der Alveolen	intralobuläre Infiltration von mononuklearen Zellen	zelluläres Exsudat in den Bronchiolen	Proliferation des Bronchialepithels	Ödeme
1	links kranial	2	0	0	1	0	1	0	3	0
	links medial	4	2	2	4	3	3	3	4	4
	links kaudal	2	0	0	1	0	0	0	2	0
	rechts kranial	1	0	0	1	0	1	0	1	0
	rechts medial	2	0	0	3	0	0	0	1	1
	rechts kaudal	2	0	0	2	0	1	0	1	1
	L. accessorius	3	0	0	4	0	0	0	3	0
2	links kranial	2	0	0	3	0	3	0	2	0
	links medial	2	0	0	2	0	2	0	1	0
	links kaudal	2	0	0	2	0	2	0	2	0
	rechts kranial	2	0	0	2	0	2	0	2	2
	rechts medial	3	2	3	2	3	3	3	3	1
	rechts kaudal	2	0	0	2	0	2	0	2	0
	L. accessorius	2	0	0	2	0	3	0	2	2
3	links kranial	1	0	0	1	0	1	0	1	0
	links medial	3	2	3	3	3	2	2	3	2
	links kaudal	1	0	0	1	0	1	0	1	0
	rechts kranial	1	0	0	2	0	2	0	1	0
	rechts medial	4	2	3	4	3	2	2	3	2
	rechts kaudal	1	0	0	2	0	1	0	1	0
	L. accessorius	3	0	0	3	0	0	0	2	0
4	links kranial	2	0	0	2	0	1	0	2	0
	links medial	2	0	0	2	0	2	0	2	0
	links kaudal	2	0	0	1	0	1	0	1	0
	rechts kranial	2	0	0	1	0	1	0	1	0
	rechts medial	3	0	0	4	1	2	0	2	0
	rechts kaudal	2	0	0	1	0	1	0	1	0
	L. accessorius	2	0	0	2	0	2	0	2	0

ID	Lungenlappen	peribronchiale, perivaskuläre "Cuff-Bildung"	Proliferation der Typ 2 Pneumozyten	PMN Infiltration in die Alveoli	BALT hyperplasia	Atelektase der Alveolen	intralobuläre Infiltration von mononuklearen Zellen	zelluläres Exsudat in den Bronchiolen	Proliferation des Bronchialepithels	Ödeme
5	links kranial	3	0	2	3	3	3	3	3	0
	links medial	2	0	0	1	0	1	2	2	0
	links kaudal	2	0	0	2	0	3	0	3	0
	rechts kranial	2	0	0	1	1	1	0	1	0
	rechts medial	4	2	2	4	2	1	2	3	3
	rechts kaudal	3	0	0	2	0	2	0	2	0
	L. accessorius	3	2	2	4	2	1	2	3	3
6	links kranial	2	0	0	3	0	2	0	1	0
	links medial	2	0	0	2	0	3	0	1	0
	links kaudal	2	0	0	2	0	2	0	1	0
	rechts kranial	2	0	0	1	0	2	0	1	0
	rechts medial	4	2	3	4	3	2	4	4	3
	rechts kaudal	2	0	0	1	0	2	0	1	0
	L. accessorius	4	2	3	4	3	2	4	3	3
7	links kranial	1	0	0	1	1	2	0	0	0
	links medial	2	0	0	1	1	3	0	0	0
	links kaudal	1	0	0	3	1	2	0	0	0
	rechts kranial	2	0	0	3	1	3	0	1	0
	rechts medial	1	0	0	1	1	2	0	0	0
	rechts kaudal	2	0	0	2	0	1	0	1	0
	L. accessorius	1	0	0	1	1	2	0	0	0
8	links kranial	3	0	0	3	0	0	2	2	0
	links medial	4	2	3	4	3	2	4	4	3
	links kaudal	2	0	0	2	0	1	1	2	0
	rechts kranial	1	0	0	1	1	2	0	0	0
	rechts medial	2	0	0	3	0	2	0	3	0
	rechts kaudal	1	0	0	1	1	2	0	0	0
	L. accessorius	2	0	0	3	0	2	0	1	0

Tabelle 10: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Gruppe C

ID	Lungenlappen	peribronchiale, perivaskuläre "Cuff-Bildung"	Proliferation der Typ 2 Pneumozyten	PMN Infiltration in die Alveoli	BALT hyperplasia	Atelektase der Alveolen	intralobuläre Infiltration von mononuklearen Zellen	zelluläres Exsudat in den Bronchiolen	Proliferation des Bronchialepithels	Ödeme
1	links kranial	3	1	2	3	1	2	3	3	0
	links medial	3	2	3	3	3	2	3	3	1
	links kaudal	2	0	0	2	1	2	0	2	0
	rechts kranial	3	2	4	3	3	2	4	4	0
	rechts medial	4	2	4	3	3	2	4	3	0
	rechts kaudal	2	0	0	3	2	3	0	2	0
	L. accessorius	1	0	0	1	1	1	0	0	0
2	links kranial	1	0	0	3	0	0	0	2	0
	links medial	4	2	4	2	3	2	4	3	2
	links kaudal	1	0	0	2	0	0	0	1	0
	rechts kranial	1	0	0	0	0	1	0	0	0
	rechts medial	1	0	0	2	0	2	0	0	0
	rechts kaudal	1	0	0	1	0	0	0	1	0
	L. accessorius	1	0	0	1	0	1	1	1	0
3	links kranial	2	0	0	3	0	1	0	2	0
	links medial	3	0	0	4	0	2	0	3	0
	links kaudal	1	0	0	1	0	1	0	0	0
	rechts kranial	2	0	0	1	0	1	0	1	0
	rechts medial	3	0	0	4	0	2	1	3	0
	rechts kaudal	1	0	0	1	0	1	0	1	0
	L. accessorius	3	0	0	4	0	1	0	3	0
4	links kranial	3	0	0	3	1	1	0	1	0
	links medial	3	0	0	3	1	2	0	0	0
	links kaudal	2	0	0	2	0	2	0	0	0
	rechts kranial	2	0	0	3	1	2	0	1	0

ID	Lungenlappen	peribronchiale, perivaskuläre "Cuff-Bildung"	Proliferation der Typ 2 Pneumozyten	PMN Infiltration in die Alveoli	BALT hyperplasia	Atelektase der Alveolen	intralobuläre Infiltration von mononuklearen Zellen	zelluläres Exsudat in den Bronchiolen	Proliferation des Bronchialepithels	Ödeme
	rechts medial	4	3	4	3	3	2	4	3	2
	rechts kaudal	3	0	0	3	0	2	1	1	0
	L. accessorius	3	0	0	3	0	2	2	3	0
5	links kranial	3	0	0	2	0	0	0	2	0
	links medial	2	0	0	2	2	0	0	1	0
	links kaudal	2	0	0	1	0	2	0	0	0
	rechts kranial	2	0	0	2	0	3	0	2	0
	rechts medial	4	3	4	3	3	3	4	4	3
	rechts kaudal	2	0	0	2	3	1	0	1	0
	L. accessorius	4	3	4	3	3	3	4	4	3
6	links kranial	2	0	0	2	1	3	0	1	0
	links medial	2	0	0	3	0	3	0	2	0
	links kaudal	2	0	0	2	1	2	0	1	0
	rechts kranial	2	0	0	2	2	2	0	1	0
	rechts medial	2	0	0	2	0	2	0	1	0
	rechts kaudal	2	0	0	2	0	2	0	1	0
	L. accessorius	3	0	0	2	0	3	0	1	0
7	links kranial	2	0	0	2	1	2	0	2	0
	links medial	2	0	0	1	1	2	0	2	0
	links kaudal	2	0	0	1	1	2	0	2	0
	rechts kranial	2	0	0	2	1	2	0	2	0
	rechts medial	2	0	0	2	1	3	0	2	0
	rechts kaudal	2	0	0	1	1	2	0	2	0
	L. accessorius	2	0	0	1	1	2	0	2	0
8	links kranial	4	2	2	4	3	3	3	4	4
	links medial	4	3	2	4	3	3	3	4	3
	links kaudal	2	0	0	1	1	2	0	2	0
	rechts kranial	4	2	4	4	2	2	3	4	3
	rechts medial	4	3	2	4	2	2	3	4	3

<u>ID</u>	<u>Lungenlappen</u>	<u>peribronchiale, perivaskuläre "Cuff-Bildung"</u>	<u>Proliferation der Typ 2 Pneumozyten</u>	<u>PMN Infiltration in die Alveoli</u>	<u>BALT hyperplasia</u>	<u>Atelektase der Alveolen</u>	<u>intralobuläre Infiltration von mononuklearen Zellen</u>	<u>zelluläres Exsudat in den Bronchiolen</u>	<u>Proliferation des Bronchialepithels</u>	<u>Ödeme</u>
	rechts kaudal	2	0	0	1	1	2	0	2	0
	L. accessorius	4	2	2	4	3	3	3	4	4

Danksagung

An allererster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Mathias Ritzmann für die Überlassung dieses interessanten Themas und die großartige Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Korrektur dieser Arbeit bedanken. Die Arbeit im Team der Klinik für Schweine hat mir sehr viel Freude bereitet.

Bei Frau Dr. Astrid Pausenberger möchte ich mich für die tolle Unterstützung bei der Planung und der praktischen Versuchsdurchführung bedanken. Danke, dass du immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme hattest.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Schweine Oberschleißheim möchte ich sehr herzlich für die hilfsbereite und freundliche Unterstützung danken. Ganz besonders danke ich meinen Betreuern Frau Dr. Nicole Übel und Herrn Dr. Mathias Eddicks für die wertvollen Ratschläge, die Hilfe bei statistischen Problemen und die Korrektur dieser Arbeit.

Bei allen Mitarbeitern der Klinik für Schweine der vetmeduni Vienna bedanke ich mich für ihre jederzeit wie selbstverständlich gewährte Hilfe bei der Durchführung meines Versuchs. Ein besonderer Dank gilt Herrn Robert Graage und Frau Hanna Koinig für ihren unermüdlichen Einsatz und die Lösung aller technischen Probleme, die ein hochkomplexer Kontumazstall mit sich bringt. Danke für eure uneingeschränkte Unterstützung und die aufmunternden Worte.

Für die bakteriologische und histologische Auswertung meiner Proben möchte ich mich bei Herrn Dr. Joachim Spergser und Herrn Dr. Gyula Balka bedanken.

Außerdem gilt mein Dank der Tierarztpraxis Latell für die Suche nach einem geeigneten Versuchsbetrieb und den Mitarbeitern dieses Betriebes.

Der Firma Elanco danke ich für die Bereitstellung des Impfstoffes und den Versuchsaufbau.

Für die statistische Beratung bedanke ich mich bei Frau Heidi Seibold.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Freia und Roland Frey, die mir durch ihre großartige Unterstützung diesen Weg überhaupt erst ermöglicht haben.

Außerdem danke ich meinem Freund Dr. Evgeni Evtouchenko, der mich uneingeschränkt bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt hat.