

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

Klinischer Krankheitsverlauf der infektiösen Anämie der
Schweine und Ausscheidungswege von *Mycoplasma suis* nach
experimenteller Infektion splenektomierter Schweine
mit dem Feldstamm K323/13

Johanna Sofia Glonegger-Reichert

aus

Altötting

München 2015

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. M. Ritzmann

Mitbetreuung durch: Dr. J. Stadler

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

Meiner Familie

Meinem Ehemann

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Historie und Taxonomie von <i>Mycoplasma suis</i>.....	3
2	Morphologische Eigenschaften von <i>Mycoplasma suis</i>.....	4
3	Pathomechanismen von <i>Mycoplasma suis</i>	5
4	Klinisches Erscheinungsbild	9
4.1	Akute Erkrankungsform	9
4.2	Chronische Erkrankungsform	10
4.3	Anämie	11
4.4	Morbus maculosus.....	11
5	Pathologisches Erscheinungsbild von <i>Mycoplasma suis</i>	12
6	Differentialdiagnosen	13
6.1	Anämie	13
6.2	Ikterus.....	14
6.3	Hautveränderungen	14
7	Übertragungswege und Verbreitung von <i>Mycoplasma suis</i>	14
8	Diagnose von <i>Mycoplasma suis</i>.....	15
8.1	Klinische Diagnostik	15
8.2	Hämatologische und klinisch-chemische Parameter.....	16
8.3	Mikroskopischer Nachweis	17
8.4	Serologische Nachweisverfahren	17
8.5	Molekularbiologischer Nachweis.....	19
9	Therapie und Prophylaxe von <i>Mycoplasma suis</i>.....	20
III	MATERIAL UND METHODEN	21
1	Ziel des Versuchsvorhabens	21
2	Durchführung des Tierversuchs	21
2.1	Versuchstiere	21
2.1.1	Vorversuch	22
2.1.2	Hauptversuch.....	22

2.2	Versuchsablauf und Probengewinnung	23
2.2.1	Splenektomie	23
2.2.2	Infektion.....	24
2.2.3	Klinische Untersuchung.....	24
2.2.4	Probenentnahme	26
2.2.4.1	Speichel-, Nasen- und Vaginalsekretupferproben.....	26
2.2.4.2	Urinproben.....	26
2.2.4.3	Blutproben	26
2.2.4.4	Gewebestanzproben.....	27
2.2.5	Pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Untersuchung.....	28
2.3	Probenverarbeitung.....	28
2.3.1	Hämatologische Blutuntersuchung.....	28
2.3.2	Klinisch-chemische Blutuntersuchung.....	28
2.3.3	Blutgasmessungen	29
2.3.4	Blutausstriche	29
2.3.5	Gewebestanzproben.....	29
2.3.6	Urinuntersuchung	30
2.3.7	Extraktion der DNA von <i>Mycoplasma suis</i>	30
2.3.8	Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis von <i>Mycoplasma suis</i>	31
2.3.9	Nachweis der <i>Mycoplasma suis</i> spezifischen Immunantwort	31
2.3.10	Statistische Auswertung.....	32
IV	ERGEBNISSE.....	35
1	Ergebnisse des Vorversuchs	35
2	Ergebnisse des Hauptversuchs	36
2.1	Klinische Untersuchung.....	36
2.2	Hämatologische Parameter	40
2.2.1	Vergleich zwischen splenektomierten, nicht infizierten (Kontrollgruppe) und splenektomierten, infizierten (Feldstammgruppe) Tieren	45
2.2.2	Vergleich zwischen splenektomierten, nicht infizierten Tieren (Kontrollgruppe) und ID 13 (splenektomiert, infiziert) über 90 Tage	47
2.3	Klinisch-chemische Blutparameter.....	48

2.3.1	Vergleich zwischen splenektomierten, nicht infizierten Tieren (Kontrollgruppe) und ID 13 (splenektomiert, infiziert) über 90 Tage.....	52
2.4	Blutgasmessung ID 13	53
2.5	Verlauf der <i>M. suis</i> -Bakteriämie	55
2.6	Korrelation zwischen der Erregermenge und den klinischen Parametern.....	57
2.7	Korrelation zwischen der Erregermenge und den hämatologischen Parametern.....	58
2.8	Korrelation zwischen der Erregermenge und den klinisch-chemischen Blutparametern	60
2.9	Mikroskopischer Erregernachweis	61
2.10	Nachweis von <i>M. suis</i> in Urin- und Tupferproben.....	62
2.10.1	Urin.....	62
2.10.2	Nasen-, Speichel- und Vaginalsekretupfer.....	63
2.11	Humorale Immunantwort	63
2.12	Untersuchung der Gewebestanzproben.....	64
2.13	Pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Untersuchungen.....	66
2.13.1	Molekularbiologische Untersuchung der Gewebeprobe.....	68
2.14	Bakteriologische und virologische Untersuchung.....	69
V	DISKUSSION	71
1	Klinischer Verlauf.....	71
2	Auswirkungen von <i>Mycoplasma suis</i> auf die hämatologischen Parameter.....	76
3	Auswirkungen von <i>Mycoplasma suis</i> auf die klinisch-chemischen Blutparameter	77
4	Auswirkungen von <i>Mycoplasma suis</i> auf die Blutgaswerte	78
5	Mikroskopischer Erregernachweis.....	78
6	<i>Mycoplasma suis</i>-Konzentration	79
6.1	<i>M. suis</i> -Konzentration im Urin.....	79
6.2	<i>M. suis</i> -Konzentration im Nasen-, Speichel- und Vaginalsekretupfer	79

6.3	<i>M. suis</i> -Verteilung in den Organen.....	80
7	Humorale Immunantwort.....	81
8	Auswirkungen von <i>Mycoplasma suis</i> auf die Endothelzellen.....	81
9	Pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Untersuchungsergebnisse.....	82
VI	ZUSAMMENFASSUNG.....	85
VII	SUMMARY.....	87
VIII	LITERATURVERZEICHNIS.....	89
IX	ANHANG.....	101
1	Abbildungsverzeichnis.....	101
2	Tabellenverzeichnis.....	102
X	DANKSAGUNG.....	105

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aqua dest.	Aqua destillata
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	desoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-homologes Protein
HCO ₃	Hydrogencarbonat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horseradish peroxidase
HspA1	Heat shock Protein A1
IAP	infectious anemia of pigs
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KGW	Körpergewicht
KSP	Klassische Schweinepest
MCH	mean corpuscular hemoglobin
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	mean corpuscular volume
MSG1	<i>M. suis</i> GAPDH like Protein
<i>M. suis</i>	<i>Mycoplasma suis</i>
O ₂	Sauerstoff
p. i.	<i>post infectionem</i>
PBS	phosphate buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
PCV-2	Porcines Circovirus Typ 2
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
ZNS	Zentrales Nervensystem

I EINLEITUNG

Bei der durch *Mycoplasma suis* (*M. suis*) verursachten infektiösen Anämie des Schweins (IAP) handelt es sich um eine weltweit auftretende Faktorenkrankheit, die zu wirtschaftlichen Verlusten in der Schweineindustrie führt (RITZMANN et al., 2009). Neben der akuten Erkrankung mit schwerer Bakteriämie, einer hämolytischen Anämie und dem perakuten Verenden der Tiere, spielt bei einer Infektion mit *M. suis* vor allem der chronische Verlauf eine wichtige Rolle im Bestand (HEINRITZI, 1990a; MESSICK, 2004). Die stetige Immunsuppression führt, neben sinkenden Reproduktions- und Mastleistungen, zu Coinfektionen mit anderen bakteriellen oder viralen Erregern des Respirations- und Digestionstrakts (ZACHARY und SMITH, 1985; HEINRITZI, 1989). Bislang konnte *M. suis in vitro* nicht kultiviert werden, was die Erforschung der genauen Pathomechanismen erschwert (HOELZLE et al., 2014). In den letzten Jahren konnten durch experimentelle Infektion von splenektomierten Schweinen und den Einsatz moderner molekularer Methoden wichtige Erkenntnisse zur Pathogenese gewonnen werden. Neue potentielle Ausscheidungswege des hochpathogenen, invasiven KI3806-*M. suis*-Stamms wurden z. B. von DIETZ et al. (2014) untersucht. Dabei konnte *M. suis*-DNA in Nasen-, Speichel-, Vaginalsekretupfern und Urin mittels quantitativer PCR nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen eines aktuellen *M. suis*-Feldstamms auf die klinischen und hämatologischen Parameter nach experimenteller Infektion splenektomierter Schweine zu evaluieren. Zusätzlich wurde anhand einer *M. suis*-negativen Kontrollgruppe der Einfluss der Splenektomie auf die klinischen und labordiagnostischen Parameter untersucht. Die Studie erfolgte auf Grundlage der Arbeitshypothese, dass sich im Gegensatz zu der bei den hochpathogenen *M. suis*-Stämmen beschriebenen akuten IAP ein chronischer Krankheitsverlauf darstellt. Darüber hinaus sollten Ausscheidungswege von *M. suis* über Sekrete und Urin nach experimenteller Infektion mit einem Feldstamm untersucht werden.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Historie und Taxonomie von *Mycoplasma suis*

Im Jahre 1928 konnte SCHILLING (1928) im Rahmen seiner Untersuchungen an splenektomierten Mäusen in Giemsa gefärbten Blutaussstrichen ringförmige Gebilde auf der Oberfläche von Erythrozyten detektieren (SCHILLING, 1928). Die neu entdeckten Gebilde wurden aufgrund ihrer ringförmigen Erscheinung und der damals vermuteten Zugehörigkeit zu den Protozoen als *Eperythrozoon coccoides* bezeichnet (SCHILLING, 1928).

In den USA wurde das Krankheitsbild der Eperythrozoonose beim Schwein erstmals im Jahre 1932 sowohl von DOYLE (1932) als auch von KINSLEY (1932) beschrieben. Mikroskopisch entdeckte KINSLEY (1932) im Blut von erkrankten Schweinen unterschiedlich große Strukturen, welche aufgrund ihrer Lokalisation auf den Erythrozyten den Anaplasmen oder Rickettsien zugeordnet wurden. Die betroffenen Tiere zeigten ein bis dato unbekanntes klinisches Erscheinungsbild mit Dyspnoe, Apathie, Iktereanämie und hoher innerer Körpertemperatur (DOYLE, 1932). Demzufolge wurde die Erkrankung zunächst als „anaplasmosis-like disease“, „yellow-belly of swine“ bzw. „swine ictereanemia“ bezeichnet (DOYLE, 1932; SPLITTER, 1950).

Aufgrund der Ähnlichkeit zu den bei Schaf und Rind bereits bekannten Krankheitserregern *Eperythrozoon ovis* bzw. *Eperythrozoon wenyoni* erfolgte durch SPLITTER (1950) im Jahr 1950 schließlich die Zuordnung des Erregers zum Genus *Eperythrozoon* als Spezies *Eperythrozoon suis*. Das Krankheitsbild wurde dementsprechend als porcine Eperythrozoonose bezeichnet.

In Deutschland wurde, im Zuge eines Schweinepestverdacht, im Jahre 1968 von KORN und MUSSGAY (1968) erstmals die porcine Eperythrozoonose nachgewiesen. Das Sektionsbild war geprägt von hyperplastischen Lymphknoten und hämorrhagischen Diathesen in Haut und Organen (KORN und MUSSGAY, 1968).

Lange Zeit waren die Vertreter des Genus *Eperythrozoon* taxonomisch der Familie *Anaplasmataceae* innerhalb der Ordnung der *Rickettsiales* zugeordnet (NEIMARK et al., 2001). Im Jahr 2001 erfolgte aufgrund von phylogenetischen

Untersuchungen der 16S rDNA eine Reklassifizierung als hämotrophe Mykoplasmen innerhalb des Genus *Mycoplasma*, Familie *Mycoplasmataceae*, Ordnung *Mycoplasmatales*. Dabei bildet das ehemalige Genus *Eperythrozoon* zusammen mit den Vertretern des ehemaligen Genus *Haemobartonella* ein eigenes Cluster (Hämoplasmen, hämotrophe Mykoplasmen) (RIKIHISA et al., 1997; NEIMARK et al., 2001; MESSICK et al., 2002; HOELZLE et al., 2014). Aktuell wird diese taxonomische Eingruppierung wieder aufgrund der relativ geringen Sequenzhomologien der 16S rRNA von ca. 80 % zwischen den hämotrophen Mykoplasmen und anderen Vertretern des Genus *Mycoplasma* und den Unterschieden in wichtigen Merkmalen wie v.a im Zelltropismus und der Unkultivierbarkeit in Frage gestellt (GUIMARAES et al., 2014a; HICKS et al., 2014). Daher werden hämotrophe Mykoplasmen momentan innerhalb der Familie *Mycoplasmatales* "insertae sedis" klassifiziert und die letztendliche Einklassifizierung wird unklar bleiben, bis für die hämotrophen Mykoplasmen ein *in vitro*-Kultursystem etabliert sein wird (GUIMARAES et al., 2014a; HICKS et al., 2014).

HOELZLE (2008) bezeichnet die durch *Mycoplasma suis* (*M. suis*) hervorgerufene Erkrankung im Jahre 2008 schließlich als infektiöse Anämie des Schweins (IAP).

2 Morphologische Eigenschaften von *Mycoplasma suis*

M. suis ist ein pleomorphes, zellwandloses Bakterium mit einem Durchmesser von 0,3 bis 3 µm (MESSICK, 2004; HOELZLE, 2007; HOELZLE, 2008). Eine besondere Eigenschaft von *M. suis* und anderen hämotrophen Mykoplasmen ist ihr Zelltropismus (HOELZLE, 2008; SOKOLI et al., 2013). Man findet diese Bakterien in der Regel auf der Oberfläche von Erythrozyten oder auch frei im Plasma (ZACHARY und BASGALL, 1985; MESSICK, 2004). Für *M. suis* wurden zudem intrazelluläre Formen in Erythrozyten nachgewiesen (GROEBEL et al., 2009).

Je nach Infektionsstadium können elektronenmikroskopisch verschiedene morphologische Formen (kokkoid, ringförmig oder diskusförmig) von *M. suis* im Blut von infizierten Schweinen gefunden werden. Man geht davon aus, dass es

sich dabei um unterschiedliche Replikationsformen handelt (LIEBICH und HEINRITZI, 1992; MESSICK, 2004). Neben kleinen, unreifen Stadien können während einer akuten IAP reife, ringförmige Bakterien an den Erythrozyten heftend oder frei im Zytoplasma beobachtet werden (ZACHARY und BASGALL, 1985; LIEBICH und HEINRITZI, 1992; GROEBEL et al., 2009). Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien konnten elektronenmikroskopisch keine typischen flaschenförmigen Adhäsionsstrukturen (sog. Tip-Organellen) nachgewiesen werden (MESSICK, 2004).

Das aus einer doppelsträngigen, zirkulären DNA bestehende Genom von *M. suis* ist sehr klein (GUIMARAES et al., 2011b; OEHLERKING et al., 2011). Bisher wurden zwei *M. suis*-Stämme sequenziert, wobei der invasive Stamm KI3806 eine Genomgröße von 709,2 kb und das Genom des nicht invasiven Stamms Illinois eine Größe von 742,4 kb aufweist (GUIMARAES et al., 2011b; OEHLERKING et al., 2011). Damit gehört das Genom von *M. suis* zu den kleinsten, bei Bakterien vorkommenden Genomen und befindet sich im Bereich der theoretischen Minimalgrenze für Bakterien mit eigenständiger Replikation (HOELZLE et al., 2011).

3 Pathomechanismen von *Mycoplasma suis*

Da hämotrophe Mykoplasmen bislang *in vitro* nicht kultiviert werden konnten, ist die Erforschung ihrer Pathogenese schwierig (HOELZLE et al., 2014). Dennoch konnten in den letzten Jahren insbesondere für *M. suis* durch den Einsatz moderner molekularer Methoden wichtige Erkenntnisse zur Pathogenese gewonnen werden. Diese können aber aufgrund der Unkultivierbarkeit von *M. suis* nach wie vor nur in Kombination mit experimentellen Infektionen von splenektomierten Schweinen eingesetzt werden (HOELZLE, 2008; HOELZLE et al., 2014).

Wichtigste Veränderung einer *M. suis*-Infektion ist die Anämie, die sowohl zum Zeitpunkt der hochgradigen Bakteriämie zu finden ist, aber auch zum Zeitpunkt geringgradiger Bakteriämie auftritt (ZACHARY und BASGALL, 1985). Diese Beobachtung spricht dafür, dass mehrere Pathomechanismen für die Anämie bzw. die Schädigung, Lyse und Eliminierung von Erythrozyten verantwortlich sind

(HOELZLE et al., 2014). Prinzipiell können die beteiligten Mechanismen in zwei Kategorien unterteilt werden, in 1. eine direkte Interaktionen zwischen *M. suis* und der Wirtszelle Erythrozyt (Adhäsion, Invasion) und 2. eine indirekte Schädigung und Lyse von Erythrozyten, die durch *M. suis*-induzierte Autoantikörper verursacht wird (ZACHARY und SMITH, 1985; HOELZLE et al., 2006; FELDER et al., 2010; HOELZLE et al., 2014).

Adhäsion

M. suis ist im infizierten Schwein zum größten Teil adhäriert an seiner Wirtszelle Erythrozyt zu finden. Diese Adhäsion spielt offensichtlich eine sehr wichtige Rolle in der Pathogenese von *M. suis*-Infektionen (HOELZLE, 2008). Die Erythrozytenmembran der Schweine wird durch *M. suis* modifiziert und direkt mechanisch geschädigt (MESSICK, 2004; SCHREINER et al., 2012a; HOELZLE et al., 2014). Durch die enge Verbindung zwischen *M. suis* und den Erythrozyten entstehen auf der Membran der Erythrozyten irreversible Schäden bis hin zu tiefen Eindellungen und Invaginationen (ZACHARY und BASGALL, 1985).

Darüber hinaus wird die osmotische Permeabilität der Membran verändert (HEINRITZI und PLANK, 1992; HOELZLE et al., 2014). Die enge Verbindung zwischen *M. suis* und der Erythrozytenmembran wird durch fibrilläre Strukturen vermittelt (LIEBICH und HEINRITZI, 1992; MESSICK, 2004; HOELZLE et al., 2014). Der dabei zugrunde liegende Mechanismus sowie die an der Adhäsion beteiligten bakteriellen und zellulären Strukturen sind nicht aufgeklärt. Bislang konnten lediglich zwei Adhäsionsproteine identifiziert werden, das MSG1 (ein Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-homologes Protein; GAPDH) und die α -Enolase (HOELZLE et al., 2007b; SCHREINER et al., 2012b). Beide sind als intrazelluläre Proteine primäre Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels. MSG1 katalysiert die Umwandlung von Glyceraldehyd-3-Phosphat zu D-Glycerat-1,3-Bisphosphat (HOELZLE et al., 2007c). Die α -Enolase katalysiert die Reaktion von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat (SCHREINER et al., 2012b). In ihrer Membran-lokalisierten Form erfüllen diese Enzyme als sogenannte „Moonlighting“ Proteine zusätzliche Funktionen wie z. B. in der Adhäsion (HOELZLE et al., 2014). Die Analysen der *M. suis*-Genome haben lediglich Hinweise auf drei weitere Adhäsions-assoziierten Proteine ergeben, das Hitzeschockprotein HspA1, das P97-like Protein und zwei MgpA-orthologe Proteine (HOELZLE et al., 2007b; GUIMARAES et al., 2011b; HOELZLE et al., 2014).

Invasion

Aktuelle Studien beschreiben invasive *M. suis*-Isolate (KI3806 und 08/07), die durch Endozytose-ähnliche Vorgänge in die Erythrozyten eindringen können und so die Virulenz steigern (GROEBEL et al., 2009; SOKOLI et al., 2013). Die intrazelluläre Lage in den Erythrozyten erschwert sowohl die Bekämpfung einer *M. suis*-Infektion durch Antibiotika als auch die körpereigene Immunantwort des Wirtstieres (HOELZLE et al., 2014).

Immunpathogenese

Autoimmunreaktionen sind weitere bedeutende Pathomechanismen bei der Entstehung der Anämie während einer IAP (HOELZLE et al., 2014), wobei sowohl IgM- als auch IgG-Autoantikörper gebildet werden. Verschiedene Ursachen für die Entstehung beider Antikörperklassen werden diskutiert (FELDER et al., 2010). Einerseits könnte es durch eine *M. suis*-Infektion zu einer unspezifischen Proliferation von B-Zell-Klonen kommen (ZACHARY und SMITH, 1985; FELDER et al., 2010). Es ist aber auch möglich, dass durch eine direkte Schädigung der Erythrozyten „hidden“ Antigene auf der Zellmembran freigelegt werden, die vom Immunsystem als Fremdartigene beantwortet werden, oder aber auch dass *M. suis* im Zuge einer Immunevasion porcine Strukturen imitiert (sog. molekulares Mimikry) und somit eine immunvermittelte, hämolytische Anämie auslöst (HOFFMANN et al., 1981; ZACHARY und SMITH, 1985; HEINRITZI et al., 1990b; FELDER et al., 2010). Man findet diese beiden Autoantikörper-Klassen in unterschiedlichen Phasen der *M. suis*-Infektion.

Die Kälteagglutinine vom Typ IgM sind gegen Karbohydratstrukturen auf der Erythrozytenmembran gerichtet und werden vorwiegend während der chronischen IAP in der Phase der niedrigsten Erregermenge im Blut gebildet (FELDER et al., 2010). Im peripheren Blutkreislauf verursachen sie eine Agglutination der Erythrozyten (PLANK und HEINRITZI, 1990). Die daraus resultierende Minderdurchblutung der Endstrombahnen kann z. B. im Bereich der Ohren und der Gliedmaßen zu Zyanosen und Nekrosen führen (PLANK und HEINRITZI, 1990; HOELZLE et al., 2014).

Während der akuten Krankheitsphase der IAP werden hauptsächlich warm-reaktive Autoantikörper vom IgG-Typ im Blut von *M. suis*-infizierten Schweinen nachgewiesen (HOELZLE et al., 2006). Diese IgG-Autoantikörper sind gegen

Aktin gerichtet, das in der Erythrozytenmembran Teil des Zytoskeletts ist (FELDER et al., 2010). Durch die „Markierung“ von Erythrozyten durch IgG-Autoantikörper können diese von den retikuloendothelialen Organen als verändert erkannt und eliminiert werden, was zu einer autoimmunen hämolytischen Anämie, extravasaler Hämolyse und indirekter Bilirubinämie führt (FELDER et al., 2010; HOELZLE et al., 2014).

Eingriff in den Zellstoffwechsel

Die enge Verbindung zwischen den hämotrophen Mykoplasmen und den Erythrozyten scheint für den Lebenszyklus von *M. suis* essentiell zu sein (HOELZLE et al., 2014). Während einer akuten IAP greift das Bakterium in den Energie-, Kohlenhydrat- und Zellstoffwechsel ein und entzieht der Wirtszelle Stoffwechselprodukte wie Glukose, Aminosäuren, NADH, NADHP, Inosin und Hypoxanthine (FELDER et al., 2010; GUIMARAES et al., 2011b). *M. suis* induziert insbesondere im infizierten Schwein eine z.T. hochgradige Hypoglykämie die durch die Glukoneogenese des Wirtstieres selbst nicht ausgeglichen werden kann (ZACHARY und BASGALL, 1985; HEINRITZI et al., 1990c; STADLER et al., 2014). Des Weiteren fanden GUIMARAES et al. (2011b) in ihren Genomsequenzanalysen Hinweise, dass durch die reduzierte Energieproduktion und den oxidativen Stress die Lebensdauer der Erythrozyten herabgesetzt wird.

Eryptose

Von FELDER et al. (2011) wurde die Eryptose als ein weiterer Pathomechanismus von *M. suis* beschrieben. Durch die Adhäsion und Invasion von *M. suis* wird die Erythrozytenmembran geschädigt und der Zelltod induziert (ZACHARY und BASGALL, 1985; FELDER et al., 2011; HOELZLE et al., 2014). Der oxidative Stress führt zur Eryptose durch Erythrozytenschrumpfung, Bläschenbildung, Aktivierung von Proteasen und Präsentation von Phosphatidylserin auf der Oberfläche der Erythrozyten (FELDER et al., 2011; LANG et al., 2014). Es folgt die Aktivierung von Makrophagen und die Phagozytose der Erythrozyten (FELDER et al., 2011; LANG et al., 2014).

Schädigung des Endothels

Neben der Fähigkeit zur Invasion ist das KI3806-Isolat in der Lage, mit dem Zytoskelett des Endothels zu interagieren, dieses zu aktivieren sowie zu schädigen (SOKOLI et al., 2013). SOKOLI et al. (2013) konnten *M. suis* elektronenmikroskopisch vereinzelt auf Gefäßendothelien detektieren, ebenso wie auch biofilmartige Zusammenschlüsse des Erregers. Die massiven Schädigungen des Endothels sind möglicherweise Ursache einer während einer *M. suis*-Infektion beobachteten intravasalen Gerinnungsaktivierung mit konsekutiver Verbrauchskoagulopathie, die sich in den infizierten Schweinen als Hämostasestörung mit erhöhter Blutungsneigung (hämorrhagische Diathese) sowie Mikrothromben-Bildung und Funktionsstörungen von Organen darstellt (PLANK und HEINRITZI, 1990; HOELZLE et al., 2011).

4 Klinisches Erscheinungsbild

Die IAP ist eine Faktorenkrankheit und kann bei Schweinen jeder Alters- und Nutzungsgruppe auftreten (HEINRITZI, 1990a). Der Zusammenhang zwischen dem Krankheitsausbruch und immunsuppressiven Stressoren wie Koinfektionen, Absetzen, Transport oder Umstallen der Tiere wurde u. a. von HEINRITZI (1990a) und HOELZLE (2008) beschrieben. Der klinische Krankheitsverlauf und die Inkubationszeit der IAP sind abhängig von der Virulenz des Stamms, der Empfänglichkeit des Wirtstieres und der Infektionsdosis (HOELZLE, 2008; STADLER et al., 2014). Die Inkubationszeit der IAP beträgt in der Regel zwischen sechs und vierzehn Tagen (SPLITTER, 1951; STADLER et al., 2014).

Grundsätzlich wird zwischen einem akuten und einem chronischen Krankheitsverlauf der IAP unterschieden (HENRY, 1979; MESSICK, 2004).

4.1. Akute Erkrankungsform

Bei Muttersauen zeigt sich meist peripartal und zum Zeitpunkt des Absetzens der Ferkel ein akuter Krankheitsausbruch der IAP mit Anorexie, hohem Fieber, Apathie und Dysgalaktie (HEINRITZI, 1990a; MESSICK, 2004; STRAIT et al., 2012).

Erkrankte Saugferkel fallen kurz nach der Geburt mit klinischen Anzeichen einer Anämie in Form von Blässe der Haut und Schleimhaut, mildem Ikterus und Saugunlust auf (HEINRITZI, 1990a).

Bei der akuten IAP, die vor allem Absetzferkel, Läufer und Mastschweine betrifft, ist eine hochgradige Ikteroanämie zu erkennen (SPLITTER, 1951). Darüber hinaus entwickeln die Tiere eine hohe innere Körpertemperatur bis zu 42° C, zyanotische Farbveränderungen der Ohrränder und Dyspnoe (HEINRITZI, 1990a; HEINRITZI et al., 1990b). Außerdem zeigen akut erkrankte Schweine Inappetenz und Apathie (HEINRITZI, 1990a).

4.2. Chronische Erkrankungsform

Der chronische Verlauf der IAP ist vor allem durch die Immunsuppression und eine daraus resultierende Empfänglichkeit für Koinfektionen mit Erregern des Digestions- bzw. Respirationstraktes gekennzeichnet (HOELZLE, 2007).

Bei Sauen äußert sich der chronische Krankheitsverlauf der IAP in Form von Reproduktionsstörungen wie erhöhten Umrauschquoten, Anöstrie, embryonalem Fruchttod, Abort oder der Geburt lebensschwacher Ferkel (MESSICK, 2004). Anämie, Ikterus und Apathie sind weitere klinische Symptome des chronischen Verlaufs bei Sauen (HEINRITZI, 1990a).

Die Blutarmut, eine erhöhte Anfälligkeit für weitere Infektionen und das niedrige Geburtsgewicht führen bei den Ferkeln zu einer erhöhten Letalität und einem Auseinanderwachsen des Wurfes (ZINN et al., 1983).

Beim chronischen Verlauf der IAP bei Absetzferkeln, Läufern und Mastschweinen wird Kümern, geringere Gewichtszunahmen, Ohrrandnekrosen, struppiges Haarkleid, Blässe und Ikterus beobachtet (HEINRITZI, 1990a). Außerdem sind bei der chronischen IAP allergische Hautveränderungen (Morbus maculosus), in Form von hämorrhagische Diathesen, Petechien, Ekchymosen und Urtikaria, die meist am ventralen Abdomen beginnen, zu erkennen (HEINRITZI, 1984b; STADLER et al., 2014).

Im Folgenden werden die Symptome Anämie und Morbus maculosus genauer beschrieben.

4.3. Anämie

Eine Anämie ist eine Reduktion der Erythrozytenzahl, des Hämatokrits und des Hämoglobingehalts im Blut bei normalem Blutvolumen (SILBERNAGL, 2013a; MORITZ et al., 2014). Klinisch ist die Anämie durch Blässe der Haut und Schleimhäute, sowohl während eines akuten als auch eines chronischen Krankheitsverlaufes der IAP, zu diagnostizieren (HEINRITZI, 1990a). *M. suis* führt u. a. durch die Bildung von IgM-Antikörpern (Kälteagglutinine) zu einer immunmedierten, hämolytischen Anämie (GWALTNEY und OBERST, 1994; MESSICK, 2004). Es handelt sich um eine normochrome, normozytäre Anämie, d. h. es kommt zu einer Abnahme der Erythrozytenzahl bei jeweils unveränderten MCH-, MCV- sowie MCHC-Indices (HEINRITZI et al., 1984; HAFERLACH et al., 2012). Eine Anämie hat durch die Abnahme der Erythrozytenzahl gleichzeitig eine starke Reduktion der Erregermenge zur Folge (HOELZLE, 2007).

4.4. Morbus maculosus

Morbus maculosus (vgl. Abbildung 1) ist durch petechiale Blutungen und Ekchymosen gekennzeichnet (HEINRITZI, 1990a). Vor allem beim chronischen Verlauf der IAP kommt es zur hämorrhagischen Diathese (HEINRITZI, 1990a). Grund für die Blutungsneigung und den Austritt von Blutbestandteilen in das extravasale System sind defekte Gefäße (SILBERNAGL, 2013a). Ein Defekt der Hämostase während der akuten IAP wird wegen der erhöhten Blutungsneigung an den Injektionsstellen bzw. Einstichstellen der Haut bei der Blutabnahme diskutiert (PLANK und HEINRITZI, 1990). Während der akuten Bakteriämie können verminderte Thrombozytenzahlen und verlängerte Thromboplastinzeiten im Quick-Test festgestellt werden (PLANK und HEINRITZI, 1990). 1968 wurden bereits oben genannte Hautveränderungen beim Schwein von KORN und MUSSGAY (1968) beschrieben und zunächst als Schweinepestverdachtsfall behandelt. Eine aktuelle Studie von SOKOLI et al. (2013) konnte eine hochgradige Veränderung der Gefäßendothelien bei Schweinen nach Infektion mit dem invasiven *M. suis*-Stamm KI3806 zeigen. Die hämotrophen Mykoplasmen interagieren mit dem endothelialen Zytoskelett und erhöhen die Permeabilität der Gefäßwand (SOKOLI et al., 2013). Durch die Zerstörung der Schutzbarriere des Endothels kommt es zur hämorrhagischen Diathese (SOKOLI et al., 2013).



Abbildung 1: Morbus maculosus

5 Pathologisches Erscheinungsbild von *Mycoplasma suis*

Die Ikterooanämie wird als auffälligster pathologischer Befund bei *M. suis*-infizierten Schweinen beschrieben (DOYLE, 1932; KINSLEY, 1932). Pathologisch-anatomisch lässt sich nach Infektion mit *M. suis* eine Gelbverfärbung des Fettgewebes und der inneren Organen feststellen, die sich besonders deutlich in der Leber, den Nierenpapillen und der Gefäßintima manifestiert (SPLITTER, 1951). Außerdem wird eine hochgradige Schwellung der Milz beobachtet (CAMPBELL, 1945; SPLITTER, 1951; QUIN, 1960). Die Leber ist ebenfalls vergrößert, von weicher Konsistenz und weist hell-gelbe Farbveränderungen auf (HEINRITZI, 1984b). Die generalisiert vergrößerten Lymphknoten erscheinen marmoriert (KORN und MUSSGAY, 1968). Die Gallenblasenflüssigkeit ist von visköser, gelartiger Konsistenz (SPLITTER, 1951). Von DOYLE (1932) wurden Ansammlungen gelber, ikterischer Flüssigkeit in der Bauchhöhle (Aszites), im Perikard (Hydroperikard), im Peritoneum (Hydroperitoneum) und im Thorax (Hydrothorax) diagnostiziert. KINSLEY (1932) beschrieb Hämorrhagien im Herz, der Niere und der Lunge. Außerdem wurden Blutungen in das subkutane und muskuläre Gewebe sowie in den Magen-Darm-Trakt beobachtet (ADAMS et al., 1959). Das Blut war von wässriger Konsistenz und hell gefärbt (KORN und MUSSGAY, 1968; HEINRITZI, 1990b). Histologisch wurden eine deutliche Einlagerung von Hämosiderin und eine gesteigerte Erythrophagozytose in den Retikulumzellen der Lymphknoten, der

Milz und den Kupfferschen Sternzellen der Leber beschrieben (HOFFMANN et al., 1981; THIEL, 1983). Außerdem konnte eine Atrophie bzw. Nekrose der zentrolobulären Leberläppchen diagnostiziert werden (HOFFMANN und SAALFELD, 1977; HEINRITZI, 1990a). HOFFMANN und SAALFELD (1977) beschrieben eine deutlich aktivierte Erythropoese im Knochenmark der *M. suis*-infizierten Schweine.

6 Differentialdiagnosen

Aufgrund der vielfältigen klinischen Symptomatik der IAP und der Unterschiede bei den Alters- und Nutzungsgruppen sind folgende Krankheiten differentialdiagnostisch abzuklären: Eisenmangelanämie der Saugferkel, Thrombozytopenische Purpura, Leukose, akute und chronische Blutungen, Leptospirose, Intoxikationen sowie Schweinepest. Die Differentialdiagnosen sind nach den verschiedenen klinischen Symptomen bzw. den labordiagnostischen Veränderungen gegliedert.

6.1. Anämie

Eine häufige Ursache für Anämie beim Saugferkel ist der Eisenmangel: Die Ferkel entwickeln eine hypochrome, mikrozytäre Anämie mit einem niedrigen Hämatokrit ($< 0,33$ l/l) und Eisengehalt (< 21 $\mu\text{mol/l}$) im Blut (HEINRITZI, 2006a). Neben der Eisenmangelanämie führen auch ein Eiweiß-, Kupfer- und Kobaltmangel zu hypoplastischen Anämien beim Schwein (HEINRITZI, 2006a).

Beim Saugferkel ist außerdem die Thrombozytopenische Purpura eine wichtige Differentialdiagnose zur IAP. Die Ferkel entwickeln kurz nach der Geburt eine Anämie und es sind petechiale Blutungen in der Unterhaut erkennbar (SCHMIDT et al., 1977). Die Tiere verenden binnen einiger Tage oder bleiben im Wachstum zurück (HEINRITZI, 2006a).

Eine seltenere Erkrankung, die vor allem beim Mastschwein in einer Anämie resultiert, ist die Leukose: Neben einer generalisierten Lymphknotenschwellung treten Tumore im Knochenmark, der Milz, der Leber und der Niere auf (HEINRITZI, 2006a). Die Tiere zeigen Apathie, Anorexie, Dyspnoe, Diarrhoe

und Fieber (HEINRITZI, 2006a).

Akute oder chronische Blutungen im Allgemeinen führen zu hämorrhagischen Anämien (MORITZ et al., 2014). Vorwiegend bei Masttieren ist ein Ulcus ventriculi Ursache für akute hämorrhagische Anämien (WENDT et al., 2013). Vergiftungen mit z. B. Kumarinderivaten oder häufiges Blutnehmen sind bei allen Altersklassen Ursachen für eine hämorrhagische Anämie (HEINRITZI, 1990a).

6.2. Ikterus

Die Ferkel von Sauen, die an Leptospirose erkrankt sind, zeigen eine deutliche Ikterooanämie mit akuten Temperaturanstiegen und Inappetenz (HEINRITZI, 1990a). Bei der pathologisch-histologischen Untersuchung fallen Nekrosen in der Leber auf und morphologisch ist eine Aufhellung der Niere zu erkennen (HEINRITZI, 2006a).

Weitere Ursachen für Ikterus bei Schweinen jeder Altersgruppe sind Intoxikation z. B. durch Kupfer, Aflatoxine oder Cyanamid (HEINRITZI, 1986).

6.3. Hautveränderungen

Differentialdiagnostisch ist neben der bereits beschriebenen Thrombozytopenischen Purpura aufgrund der zahlreichen Petechien und Ekchymosen auch der Verdacht der Schweinepest abzuklären (KORN und MUSSGAY, 1968). Bei der Schweinepest ist im Gegensatz zu einer *M. suis*-Infektion eine Leukopenie mit relativer Lymphozytose festzustellen (HEINRITZI, 1990a). Flächenhafte Blutungen werden außerdem bei einer Vergiftung mit Dicumarol sichtbar (HEINRITZI, 1990a).

7 Übertragungswege und Verbreitung von *Mycoplasma suis*

Die Übertragung von *M. suis* von Schwein zu Schwein erfolgt entweder durch direkten Kontakt (durch kleine Verletzungen oder Rankkämpfe) oder indirekt über Vektoren (HEINRITZI, 1990a). Die iatrogene Übertragung durch zootechnische Maßnahmen (Impfen, Tätowieren, Kastrieren und Schwanzkupieren) gilt seit

langer Zeit als wichtiger Faktor bei der Verbreitung von *M. suis* in Beständen (HEINRITZI, 1992). Dabei wird davon ausgegangen, dass insbesondere durch kontaminierte Kanülen oder Skalpelle, aber auch durch die Oberkieferschlinge *M. suis* innerhalb eines Bestandes verbreitet werden kann (HEINRITZI, 1992). Diese Übertragung ist zumindest experimentell nachgewiesen, da Schweine durch die subkutane, intramuskuläre oder intravenöse Injektion von erregerehaltigem Blut infizierbar sind (HOELZLE, 2008).

Darüber hinaus wird blutsaugenden Arthropoden wie z. B. der Schweinelaus (*Hämato pinus suis*) oder der Räude milbe (*Sarcoptes suis*) eine Vektorfunktion zugesprochen (SPLITTER, 1951; HEINRITZI, 1992). Zudem wird eine intrauterine Übertragung von *M. suis* als weiterer möglicher Übertragungsweg diskutiert (HENDERSON et al., 1997), eine Übertragung von *M. suis* über Sperma oder den Deckakt konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (HEINRITZI, 1992).

Außerdem ist eine orale Übertragung von *M. suis* möglich (HEINRITZI, 1992). Frühere Studien konnten eine orale Übertragung durch Blut und Blut-haltigem Urin nachweisen (HEINRITZI, 1992). Da in aktuellen Untersuchungen von experimentell infizierten splenektomierten Schweinen *M. suis*-DNA in Blut-freien Urinproben, Nasen- und Vaginalsekret sowie Speichel nachgewiesen werden konnte, werden weitere Übertragungswege diskutiert, die aber in anderen Studien verifiziert werden müssen (DIETZ et al., 2014).

In einer Studie von RITZMANN et al. (2009) wurde die Prävalenz von *M. suis* in Deutschland mittels real-time PCR erhoben. Die Prävalenz von 40,3 % der Bestände und die Einzeltierprävalenz von 13,9 % bei 1176 untersuchten Schweinen in 196 Betrieben, zeigt dass *M. suis* ein relevantes Bestandsproblem in Deutschland darstellt (RITZMANN et al., 2009).

8 Diagnose von *Mycoplasma suis*

8.1. Klinische Diagnostik

Eine klinische Diagnose einer *M. suis*-Infektion hat sich nur während einer akuten IAP bewährt (HEINRITZI, 1984b). Plötzliche Temperaturanstiege, Blässe, Ikterus und Akrenzyanosen sind laut HEINRITZI (1990a) deutliche klinische Anzeichen

einer akuten IAP. Hingegen verläuft die chronische IAP asymptomatisch bzw. unspezifisch, wodurch eine alleinige klinische Diagnostik erschwert wird (HEINRITZI, 1990a).

8.2. Hämatologische und klinisch-chemische Parameter

Die während einer akuten *M. suis*-Infektion auftretenden hämatologischen und klinisch-chemischen Veränderungen können diagnostisch verwendet werden, um die klinische Diagnose zu stützen, sind aber nicht pathognomonisch (HEINRITZI, 1984b). So kann man z. B. während einer akuten IAP eine Mikroagglutination der Erythrozyten am Rand des EDTA-Blutröhrchens sehen (HEINRITZI, 1984b). Zudem ist eine sehr wässrige Konsistenz des Bluts sowie eine ikterische Farbveränderung des Plasmas festzustellen (HEINRITZI, 1984b).

Das Blutbild ist typisch für eine normochrome, normozytäre Anämie mit einem parallelen Abfall der Erythrozytenzahl, des Hämoglobins und des Hämatokrits. Außerdem sieht man ein bis zwei Tage vor und ein bis zwei Tage nach dem Temperaturanstieg bei einer akuten IAP eine neutrophile Leukozytose (HEINRITZI et al., 1984).

Von PLANK und HEINRITZI (1990) wurden in der akuten Krankheitsphase der IAP veränderte Gerinnungsparameter beschrieben. Die Thrombozytenzahl ist reduziert, die partielle Thromboplastinzeit und die Thromboplastinzeit nach Quick hingegen verlängert (PLANK und HEINRITZI, 1990). Kurze Zeit vor dem Krankheitsausbruch der akuten IAP kommt es zu einem Anstieg der Bilirubinkonzentration (HEINRITZI, 1984b). Dabei entstehen in der Phase der stärksten Hämolyse beim enzymatischen Hämabbau große Mengen Bilirubin, die in diesem Maße von der Leber nicht vollständig an Glukuronsäure gekoppelt werden können (HEINRITZI, 1984b). Die Bilirubinkonzentration aber sinkt nach der Therapie der akuten IAP sofort wieder auf Normalwerte ab (HEINRITZI et al., 1984).

Zudem tritt während der akuten IAP ein hochgradiger Abfall der Blutglukosekonzentration in proportionaler Abhängigkeit zum Anstieg der Erregermenge im Blut auf. Die Blutglukosewerte können dabei während eines akuten Anfalls unter 10 mg/dl abfallen (PETERANDERL, 1988; SMITH et al., 1990).

8.3. Mikroskopischer Nachweis

M. suis kann im Blut infizierter Schweine mikroskopisch in nach Giemsa, Wright, Pappenheim, Romanowsky und Mac Neal gefärbten Blutaussstrichen nachgewiesen werden (HEINRITZI, 1990a). Weiterhin besteht die Möglichkeit des Nachweises im Fluoreszenzmikroskop nach einer Färbung mit Akridinorange (HEINRITZI, 1990b; LIEBICH und HEINRITZI, 1992; HOELZLE et al., 2007a). Bei Blutaussstrichen ist aber zu beachten, dass das Blut, bevor es auf dem Objektträger ausgestrichen wird, auf 38° C angewärmt wird, um eine Agglomeration der Erythrozyten durch Kälteagglutinine zu vermeiden (HEINRITZI, 1990b).

In der Akridinfärbung stellen sich die Mykoplasmen gelb bis orange dar und liegen auf den hell- bis dunkelgrünen Erythrozyten oder frei im Plasma (HEINRITZI, 1990b; LIEBICH und HEINRITZI, 1992; GROEBEL et al., 2009). Insgesamt ist die Spezifität und Sensitivität des mikroskopischen Erregernachweises in Relation zu den molekularen PCR-Methoden relativ gering (RITZMANN et al., 2009). Ein sicherer Nachweis gelingt erst ab einer Erregermenge von $>10^5$ *M. suis*/ml Blut (RITZMANN et al., 2009). Fehlinterpretationen von Blutaussstrichen können zudem zu falsch-positiven Ergebnissen und somit geringer Spezifität der Methode führen, da im Blut Färbeartefakte, Pappenheim- und Howell-Jolly-Körperchen auftreten können (HOELZLE et al., 2003). Insgesamt ist der mikroskopische Nachweis von *M. suis* nur während einer sehr kurzen Bakteriämiephase möglich, und hat dabei den Vorteil, kostengünstig und schnell zu sein (BOLLWAHN, 1982; RITZMANN et al., 2009).

8.4. Serologische Nachweisverfahren

Serologische Nachweisverfahren eignen sich insbesondere für die Untersuchungen von Beständen sowie einer größeren Anzahl von Tieren. Lange Zeit waren die Etablierung und der Einsatz von serologischen Methoden aufgrund der Unkultivierbarkeit von *M. suis* schwierig, da das diagnostische Antigen aus dem Blut infizierter Schweine gewonnen werden musste und dadurch neben bakteriellen Komponenten auch porcine Anteile enthalten waren und so die Spezifität beeinträchtigt war (HOELZLE et al., 2006). Dennoch wurden im Laufe

der Jahre verschiedene serologische Nachweismethoden entwickelt. So wurde von SMITH und RAHN (1975) bereits 1975 die indirekte Hämagglutination zum serologischen Nachweis von *M. suis*-Antikörpern verwendet. IgM-Kälteagglutinine sind zum einen nicht Erreger-spezifisch und treten zum anderen nicht kontinuierlich im Blut infizierter Tiere auf. Daher ist die Sensitivität der indirekten Hämagglutination relativ gering (BALJER et al., 1989; HEINRITZI, 1990a).

Die Komplementbindungsreaktion und der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sind weitere serologische Diagnostikmethoden, um Antikörper gegen eine bestehende *M. suis*-Infektion nachzuweisen (SCHULLER et al., 1990; HSU et al., 1992). HOELZLE et al. (2006) konnten nachweisen, dass insbesondere beim ELISA die in den Antigenen aus Blutpräparationen enthaltenen Immunglobuline zu nicht-interpretierbaren Ergebnissen führen. Durch eine Depletierung von Immunglobulinen und Albuminen konnte eine deutliche Verbesserung der Sensitivität und Spezifität auf 94% bzw. 96% erreicht werden (HOELZLE et al., 2007a).

Erst mit einer genaueren Untersuchung der *M. suis*-Antigenstruktur in Verbindung mit der Immunantwort experimentell infizierter Schweine wurden Hauptimmunogene von *M. suis* als geeignete diagnostische Antigene identifiziert (HOELZLE et al., 2006). Zwei dieser Hauptimmunogene (MSG1 und HspA1) wurden als diagnostische Antigene rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt. Durch diese Herstellung von *M. suis*-Antigenen im Labor und ihre Verwendung in einem indirekten ELISA konnte die Spezifität, Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit signifikant verbessert werden (HOELZLE et al., 2007b; HOELZLE et al., 2007c). Basierend auf dem MSG1 wurde ein weiterer diagnostischer Test von ZHANG et al. (2012) in Form eines Blocking-ELISA mit monoklonalen Antikörpern gegen das rekombinante MSG1-Protein etabliert. Auch dieser Test zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und Sensitivität aus, ebenso wie der von GUIMARAES et al. (2014b) entwickelte Multiplex Microbead Immunoassay, der auf den *M. suis* GAPN (eine NADP-abhängige Glyceraldehyddehydrogenase), dem Hitzeschockprotein GrpE und einem hypothetischen Protein aus einer PGF paralogen Genfamilie (MSU_0184; pf184) basiert.

8.5. Molekularbiologischer Nachweis

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) bietet als molekularbiologische Nachweismethode eine hohe Spezifität und Sensitivität bei der Diagnose von *M. suis*-DNA aus Blut oder Organgewebe von Schweinen (MESSICK, 2004; HOELZLE et al., 2007a; RITZMANN et al., 2009). Dadurch können bereits geringe Mengen des Erregers detektiert werden und eine Diagnose ist in jedem Krankheitsstadium möglich (GWALTNEY und OBERST, 1994; HOELZLE et al., 2007d).

Verschiedene Protokolle für konventionelle PCRs wurden beschrieben, basierend auf der Amplifizierung von Gensequenzen, wie z. B. der 16S rDNA eines 1,8 kb Genomfragment oder der β -Untereinheit der RNA-Polymerase (rpoB) (GWALTNEY und OBERST, 1994; MESSICK et al., 1999; HOELZLE et al., 2003).

Zudem wurden verschiedene quantitative real-time PCR-Methoden beschrieben, die neben einer schnellen und genauen Diagnose auch die Bestimmung der Erregermenge im Blut ermöglichen (HOELZLE et al., 2007d). Von HOELZLE et al. (2007d) wurde die erste quantitative LightCycler[®] PCR entwickelt. Die Sensitivität dieser, auf dem MSG1-Gen basierenden PCR Methode, lag bei 100 %, die Spezifität bei 96,7 % (HOELZLE et al., 2007d). Mittels der quantitativen LightCycler[®] PCR konnten bei den akut infizierten Schweinen mittlere Erregermengen von $1,5 \times 10^6$ *M. suis*/ml Blut und bei den chronisch infizierten Tieren Erregermengen von $1,1 \times 10^3$ *M. suis*/ml Blut detektiert werden (HOELZLE et al., 2007d). Eine weitere Möglichkeit der quantitativen PCR basiert auf der Nutzung des 16S rRNA Gens (GUIMARAES et al., 2011a; WATANABE et al., 2012). Mit dieser neu entwickelten quantitativen PCR ist es möglich, Erregermengen von $8,1 \times 10^2$ *M. suis*/ml Blut nachzuweisen (GUIMARAES et al., 2011a). Durch die Reproduzierbarkeit, Standardisierung und Automatisierung des Testverfahrens sowie das geringe Kontaminationsrisiko stellt die real-time PCR ein geeignetes Verfahren für die Routinediagnostik im Labor dar (HOELZLE et al., 2007d).

9 Therapie und Prophylaxe von *Mycoplasma suis*

Aufgrund der vielfältigen Übertragungswege von *M. suis* ist eine umfassende Prophylaxe unerlässlich um einer Infektion vorzubeugen.

Hygienische Maßnahmen bei zootechnischen Eingriffen sind wichtige Schritte, um eine Verbreitung von *M. suis* innerhalb des Bestandes zu verhindern (HOFFMANN und SAALFELD, 1977; HEINRITZI, 1984b). Daher ist eine Zwischendesinfektion der im Rahmen von zootechnischen Maßnahmen verwendeten chirurgischen Instrumente und der Gebrauch von Einmalkanülen anzuraten (HEINRITZI, 1984b).

Außerdem ist die Bekämpfung von Ektoparasiten ein wichtiger Punkt bei der Prophylaxe von *M. suis* (HOFFMANN und SAALFELD, 1977; PRULLAGE et al., 1993). Im Vordergrund steht hierbei vor allem die Bekämpfung der Schweinelaus (*Hämato pinus suis*) und der Räude milbe (*Sarcoptes suis*) (HOFFMANN und SAALFELD, 1977; HEINRITZI, 1992, 2006a).

Da sich die IAP als Faktorenkrankheit v.a. bei immunsupprimierten, gestressten Tieren manifestiert, ist es wichtig Koinfektionen und Stressfaktoren im Stall auf ein geringes Maß zu reduzieren (HEINRITZI, 1990a). Von einer Behandlung *M. suis*-positiver Tiere mit Dexamethason wird aufgrund der immunsuppressiven Wirkung abgeraten (YUAN et al., 2007).

Die Therapie eines Tieres während der akuten IAP erfolgt parenteral mit einem Tetrazyklinpräparat (20 - 30 mg/kg KGW) über sieben bis zehn Tage (HEINRITZI, 2006a). Darüber hinaus wird die Gabe von Eisen und Glukose empfohlen (HOELZLE, 2008). Die klinischen Symptome werden mit Tetrazyklin erfolgreich therapiert und es ist innerhalb weniger Tage eine Besserung sichtbar (HENDERSON et al., 1997). Eine vollständige Elimination des Erregers ist dennoch nicht möglich (HOELZLE, 2008).

Die Vakzination wäre die einzige Möglichkeit, Infektionen mit *M. suis* zu kontrollieren. Allerdings erschwert die Unkultivierbarkeit von *M. suis in vitro* die Entwicklung eines geeigneten Impfstoffes (HOELZLE et al., 2009). In der Studie mit rMSG1 und *E. coli*_MSG1 Vakzine Kandidaten konnte eine starke Immunantwort beobachtet, aber kein ausreichender Schutz vor einer *M. suis*-Infektion erzielt werden (HOELZLE et al., 2009).

III MATERIAL UND METHODEN

Der Versuch wurde an der Klinik für Schweine der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Untersuchungen fanden im Zeitraum von November 2013 bis Mai 2014 statt. Das Tierversuchsvorhaben und die Anzeige einer Erweiterung des Tierversuchsvorhabens wurden von der Regierung von Oberbayern nach §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt und sind dort mit dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-87-12 hinterlegt.

1 Ziel des Versuchsvorhabens

Ziel der Arbeit war es, den klinischen Verlauf und die Ausscheidungswege nach experimenteller Infektion mit einem aktuellen *M. suis*-Feldstamm K323/13 zu untersuchen. Hierzu wurden splenektomierte Tiere mit *M. suis*-positivem Blut infiziert. Um den Einfluss der Splenektomie auf die erhobenen Parameter zu evaluieren, wurde eine splenektomierte, nicht infizierte Kontrollgruppe verwendet. Während der Versuchsdauer von 90 Tagen wurden alle Tiere täglich klinisch untersucht. Außerdem wurden Blutproben entnommen und die hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter erhoben. Darüber hinaus wurden Tupfer- und Urinproben gesammelt und zusammen mit den Blutproben mittels quantitativer PCR auf *M. suis* untersucht. Im Anschluss wurde die Korrelation zwischen den klinischen Parametern, den Blutparametern und der *M. suis*-Konzentration im Blut evaluiert. Ergänzend wurden Gewebestanzproben vom Ohrtrand der Tiere gewonnen, um eine durch *M. suis*-induzierte Schädigung der Endothelzellen mikroskopisch nachweisen zu können. Am Ende des Versuchszeitraums wurden die Tiere getötet und pathologisch-anatomisch sowie pathologisch-histologisch untersucht.

2 Durchführung des Tierversuchs

2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Masthybriden (Deutsche Landrasse x Piétrain), die von

der Lehr- und Versuchsstation der Technischen Universität München in Thalhausen bezogen wurden. Die Tiere wurden im Alter von 28 Tagen abgesetzt und unmittelbar nach dem Absetzen in die Klinik für Schweine eingestallt. Zum Zeitpunkt der Einstallung wiesen die Tiere ein Gewicht von circa 9 kg auf. Die Haltung der Tiere erfolgte zunächst in Gruppenbuchten, zu je sieben Tieren, mit planbefestigtem Boden und Stroheinstreu. Am Tag der Splenektomie wurden die Tiere in Einzelboxen verbracht. Die Fütterung erfolgte mit einem pelletierten Ferkelfutter (Ferkelstarter UNI, Zimmerer Werk GmbH, Hohenthann, Deutschland) zweimal am Tag. Ab einem Gewicht von circa 30 kg wurde ein pelletiertes Alleinfuttermittel für Zuchtschweine verwendet (ZILA Zuchtschwein Getreidemischung UNI, Zimmerer Werk GmbH, Hohenthann, Deutschland). Die Wasseraufnahme erfolgte ad libitum über eine Nippeltränke. Die Temperatur im Stall betrug 16 - 18 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 60 - 70 %.

2.1.1. Vorversuch

Zur Gewinnung von erregerhaltigem Blut für die experimentelle Infektion der Tiere im Hauptversuch wurde zunächst ein Vorversuch durchgeführt. Hierzu wurden drei splenektomierte Absetzferkel mit *M. suis*-haltigem Blut aus einem *M. suis*-positiven Basiszuchtbetrieb der Rasse Deutsche Landrasse infiziert. Der *M. suis*-Infektionsstatus des Betriebs wurde vorher durch mikroskopische und molekularbiologische Untersuchungen bestätigt. Zum Zeitpunkt des akuten Anfalls wurde EDTA-Blut aus der *V. cava caudalis* gewonnen und mittels LightCycler[®] MSG1-PCR auf *M. suis* untersucht und quantifiziert. Das erregerhaltige Blut wurde bis zur Infektion der Tiere des Hauptversuchs bei -80 °C gelagert, um eine Schädigung der *M. suis*-DNA zu verhindern.

2.1.2. Hauptversuch

Der Hauptversuch wurde in zwei Versuchsgruppen mit jeweils sieben Tieren durchgeführt. Sieben Tiere wurden splenektomiert und mit *M. suis*-haltigem Blut aus dem Vorversuch infiziert (Feldstammgruppe). Die sieben Tiere der zweiten Versuchsgruppe wurden splenektomiert und nicht infiziert (Kontrollgruppe). Die Untersuchungen erstreckten sich bei beiden Versuchsgruppen über einen Zeitraum von 90 Tagen.

2.2. Versuchsablauf und Probengewinnung

Am Tag der Einstellung wurden von allen Versuchstieren EDTA-Blutproben entnommen und mittels quantitativer LightCycler® MSG1-PCR auf *M. suis* untersucht. Es wurden nur *M. suis*-negative Tiere in dem Versuch verwendet. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 2 dargestellt.

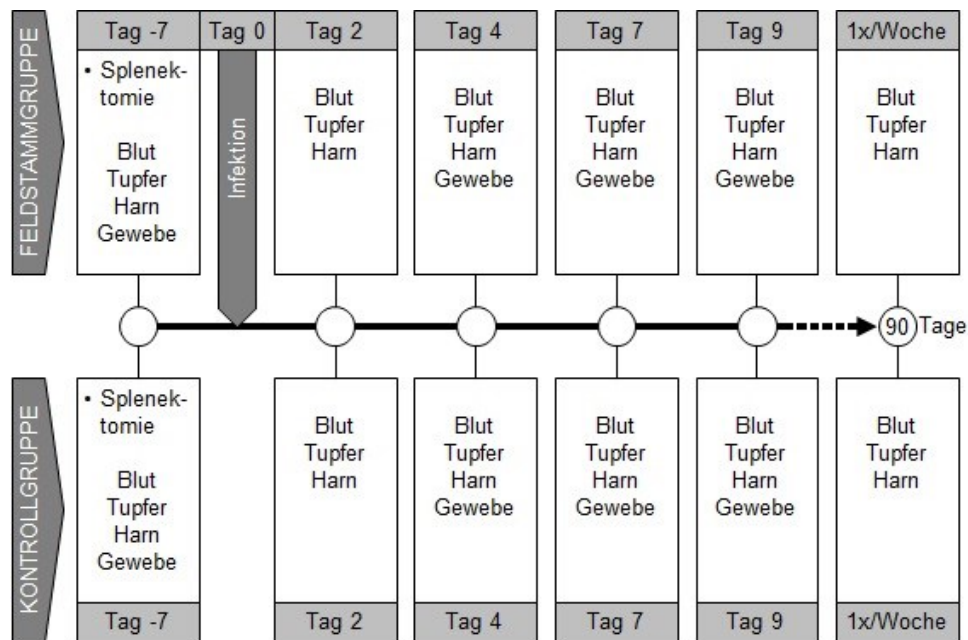


Abbildung 2: Zeitlicher Versuchsablauf und Probenentnahmeschema

2.2.1. Splenektomie

Eine Woche nach Einstellung wurden alle 17 Tiere (drei Vorversuchstiere, sieben Tiere der Feldstammgruppe und sieben Tiere der Kontrollgruppe) nach der Methode von HEINRITZI (1984a) splenektomiert. Unter Vollnarkose mit Azaperon (Stresnil® 40 mg/ml, 2 mg/kg KGW, JANSSEN-CILAG GmbH, Neuss, Deutschland), Ketamin (Ursotamin® 100 mg/ml, 10-25 mg/kg KGW Serumwerk Bernburg, Bernburg, Deutschland) und Isofluran (Isofluran CP® 1 ml/ml, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland) erfolgte die Splenektomie von der linken Bauchwand ausgehend. Zunächst wurde ein circa zehn Zentimeter langer Schnitt parallel und mit 2 cm Abstand zum Rippenbogen gesetzt, der die Haut, die Muskelschichten und Faszien und schließlich das Peritoneum durchtrennte. Nachdem die Milz aus der Operationswunde vorgelagert wurde, wurden die *A.* und *V. gastroepiploica* mit zwei Massenligaturen abgebunden und dazwischen

durchtrennt. Danach konnte die Milz weiter vorverlagert werden. Mithilfe des Schlingenführers nach HEINRITZI (1984a) wurde ein Faden über den dorsalen Milzpol geführt und die *Aa.* und *Vv. lienalis* und *gastricae breves* abgebunden. Die Ligatur wurde beim Absetzen der Milz fixiert. Im Anschluss wurden die Gefäßstümpfe auf Blutungen kontrolliert und das Peritoneum durch eine fortlaufende Naht verschlossen. Die Muskelschichten und die Haut wurden mit einer Kammnaht verschlossen. Die Fäden der Hautnaht wurden nach zehn Tagen entfernt. Die Tiere wurden analgetisch peri- und postoperativ mit Metamizol (Vetalgin[®] 1 ml/kg KGW MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim, Deutschland) und Meloxicam (Metacam[®] 2 ml/kg KGW Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland) behandelt. Bis zum dritten Tagen nach der Splenektomie wurde den Tieren Penicillin (Vetriproc[®] 30 % 0,5-1 ml/15 kg KGW CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland) intramuskulär injiziert, um einer Wundinfektion vorzubeugen.

2.2.2. Infektion

Eine Woche nach der Splenektomie wurden die Tiere der Feldstammgruppe durch subkutane Applikation von 1,5 ml *M. suis*-haltigem Blut ($1,8 \times 10^7$ *M. suis*/ml) mit *M. suis* infiziert. Der Tag der Infektion wurde als Tag 0 des Versuchs festgelegt.

2.2.3. Klinische Untersuchung

Bei allen Versuchstieren wurde über den gesamten Versuchszeitraum von 90 Tagen eine tägliche klinische Untersuchung durchgeführt. Dazu wurde am Morgen nach der Fütterung die innere Körpertemperatur rektal gemessen, das Verhalten der Tiere beurteilt und die Futterraufnahme dokumentiert. Darüber hinaus wurden die Haut und die Ohränder auf Veränderungen begutachtet und die Atmung kontrolliert. Die Quantifizierung der Veränderungen wurde durch Vergabe von Punkten („Score“) nach einem definierten Bewertungssystem vorgenommen, das in Tabelle 1 dargestellt ist. Der Gesamtscore pro Tier ergab sich aus der Summe aller Parameter, die zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt ermittelt wurden.

Tabelle 1: Bewertungssystem („Score-System“) nach STADLER et al. (2014) für die tägliche klinische Untersuchung

Score	0	1	2	3
Ohrränder	o.b.B.	ggr. Zyanosen	mgr.-hgr. Zyanosen bzw. Nekrosen	
Haut	o.b.B.	mgr. Blässe	Morbus maculosus	Ikterus
Innere Körpertemperatur	< 40°C	40-42°C	> 42°C	
Verhalten	o.b.B.	reduziert	Apathie	
Futteraufnahme	o.b.B.	reduziert	Anorexie	
Atmung	o.b.B.	mgr. Dyspnoe	hgr. Dyspnoe	
Gesamtscore	= Summe aller Werte			

o.b.B. = ohne besonderen Befund

Ab einem Gesamtscore von drei (akute IAP (STADLER et al., 2014)) wurden folgende Therapiemaßnahmen eingeleitet. Parenteral wurde Oxytetracyclin (Terramycin[®]/LA 20 mg/kg KGW, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) injiziert. Bei einer erhöhten inneren Körpertemperatur wurde zusätzlich parenteral Metamizol (Vetalgin[®] 1 ml/10 kg KGW, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) appliziert. Bei erniedrigtem Glukosespiegel wurde oral Glukose in Form von Ursolyt[®] G oral (35 g in 1 l Wasser, Serumwerk Bernburg, Bernburg, Deutschland) verabreicht. Bei nicht vorhandener Futteraufnahme wurde Glukose per Infusion über die Ohrvene appliziert. Wenn drei Tage lang, trotz Behandlung, der Gesamtscore über drei Punkten lag, wurde das Tier getötet. Die Tötung erfolgte mit Pentobarbital (Release[®] 500 mg/ml, WDT, Garbsen, Deutschland) i.v. (bis 30 kg: 450 mg/5 kg KGW, ab 30 kg: 450 mg/10 kg). Durch Auskultation wurden die Vitalfunktionen bis zum Eintritt des Todes überprüft.

2.2.4. Probenentnahme

Von Versuchstag 0 bis 10 erfolgte die Probenentnahme alle zwei Tage, danach bis Versuchstag 90 einmal wöchentlich (Abbildung 2). Es wurden Blut-, Urin-, Speichel-, Nasensekret- und Vaginalsekretproben gewonnen. Zusätzlich wurde an Versuchstag 0, 4, 7 und 9 eine Gewebestanzprobe entnommen. Die Entnahme der Gewebestanze an Versuchstag 0 erfolgte unter Vollnarkose im Anschluss an die Splenektomie. An Versuchstag 4, 7 und 9 wurde die Gewebestanze unter Neuroleptanalgesie mit Azaperon (Stresnil® 2 mg/kg KGW Fa. Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und Ketamin (Ursotamin® 10-25 mg/kg KGW Fa. Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) gewonnen.

2.2.4.1. Speichel-, Nasen- und Vaginalsekrettupferproben

Bei der Entnahme der Speichel-, Nasen- und Vaginalsekrettupferproben wurden Tupfer ohne Medium (Heinz Herenz®, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die Tupferprobenentnahme erfolgte jeweils vor der Blutabnahme, um eine Kontamination der Tupfer mit Blut zu vermeiden. Außerdem wurden die Rüsselscheibe und die Vulva vor der Tupferprobenentnahme mit einem Tuch gereinigt, um eine Verunreinigung mit Kot, Urin oder Futter zu verhindern.

2.2.4.2. Urinproben

Um die Urinprobe ohne Kontamination durch Stroh, Kot oder Futter gewinnen zu können, wurden die Tiere in einen Kälberwagen verbracht. Der Boden des Kälberwagens bestand aus einem Spaltenboden aus Kunststoff. Unter dem Kälberwagen wurde eine Folie befestigt, mit der der Urin aufgesammelt werden konnte. Der spontan abgesetzte Urin der Tiere wurde sofort nach dem Absetzen mit einer Spritze aufgezogen und weiter verarbeitet.

2.2.4.3. Blutproben

Die Blutabnahme erfolgte bei den Tieren unter 15 kg an der *V. cava cranialis*. Dazu wurden die Ferkel von einer Hilfsperson in Rückenlage fixiert. Es wurde eine Serummonovette (Primavette®S 7,5 ml KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland), ein EDTA Röhrchen (Primavette® K3E

2,6 ml KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) sowie ein Blutgasröhrchen (Blut-Monovetten[®] 2 ml SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) mit aufgesetzten Einmalkanülen 1.10 x 50 mm und 19 G (Sterican[®] B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verwendet. Später wurden die Tiere, die ein Gewicht von über 30 kg aufwiesen, mittels Oberkieferschlinge fixiert. Die Blutabnahme erfolgte an der *V. jugularis externa*.

2.2.4.4. Gewebestanzproben

Die Entnahme der Gewebestanze erfolgte am Ohr der Tiere (Abbildung 3). Zunächst wurde das Ohr mit Wasser gereinigt und getrocknet. Im Anschluss fand eine Desinfektion am Ohr mit Alkohol statt. Nachdem der Alkohol vollständig getrocknet war, wurde die Hautstanze (Biopsy Punch[®], Kruuse, Langeskov, Dänemark) mit einem circa 2 mm großem Abstand zum Margo tragicus bzw. antitragicus angesetzt. Mit einer drehenden Bewegung wurde ein 3 mm großes Gewebebiopat entnommen.



Abbildung 3: Entnahme der Gewebestanzprobe

2.2.5. Pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Untersuchung

Alle Tiere wurden mit Pentobarbital (Release[®] 500 mg/ml, WDT, Garbsen, Deutschland) i.v. (bis 30 kg: 450 mg/5 kg KGW, ab 30 kg: 450 mg/10 kg) getötet und anschließend pathologisch-anatomisch und pathologisch-histologisch untersucht. Die Sektion erfolgte am Institut für Tierpathologie der LMU München und in der Pathologie des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit. Im Anschluss wurde eine bakteriologische Untersuchung von veränderten Organen sowie ein molekularbiologischer Nachweis zur differentialdiagnostischen Abklärung von PCV-2, PRRSV (EU- und US-Typ), KSP, Influenza A und Hepatitis E durchgeführt.

2.3. Probenverarbeitung

2.3.1. Hämatologische Blutuntersuchung

Die hämatologische Blutuntersuchung erfolgte im Labor der Klinik für Schweine der LMU München. Mittels des vollautomatischen Blutkörperchenzählgeräts Animal Blood Counter (Scil Vet abc, scil animal care company GmbH, Viernheim, Deutschland) wurden aus dem EDTA-Blut die Erythrozyten- und Leukozytenzahl, der Hämoglobingehalt, der Hämatokrit, MCH, MCV und MCHC bestimmt bzw. errechnet.

2.3.2. Klinisch-chemische Blutuntersuchung

Die klinisch-chemischen Blutuntersuchungen der genommenen Proben erfolgten im Labor der Klinik für Wiederkäuer der LMU München. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden die Serummonovetten (Primavette[®]S 7,5 ml KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) 10 Minuten bei 3000 U/min im Labor der Klinik für Schweine der LMU München zentrifugiert (Rotanta 460 R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Die Bestimmung der Serumparameter Blutzucker, Bilirubin, Harnstoff, Kreatinin und Eisen erfolgte photometrisch mit einem Autoanalyzer für die klinische Chemie (Hitachi cobas[®] c 311, Roche, Mannheim, Deutschland). Anschließend wurden die Serumproben bei -80° C gelagert.

2.3.3. Blutgasmessungen

Die Blutgasmessung erfolgte im Labor der Klinik für Wiederkäuer der LMU München unmittelbar nach der Blutprobengewinnung (RAPIDPoint® 400/405 System, Siemens AG, Erlangen, Deutschland). Die Parameter pH-Wert, CO₂-, O₂- und HCO₃⁻-Partialdruck wurden erhoben und der aktuellen inneren Körpertemperatur der Tiere angepasst.

2.3.4. Blutausstriche

Von allen EDTA-Blutproben wurden Blutausstriche angefertigt. Die Ausstriche wurden nach dem Trocknen für 40 Sekunden in 96 %igem Ethanol fixiert. 24 Stunden nach der Fixation wurden die vollständig getrockneten Ausstriche in Akridinorange-Gebrauchslösung für 60 Minuten gefärbt und im Anschluss in Aqua dest. geschwenkt und abgespült. Nachdem der fertig gefärbte Ausstrich getrocknet war, wurde dieser unter Ölimmersion bei 600-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop begutachtet und fotografiert.

2.3.5. Gewebestanzproben

Das vom Ohrtrand entnommene 3 mm große Gewebebiopat wurde mit einer Rasierklinge in 1 mm dünne Scheiben zerteilt und in 4 %igem Formalin (SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland) fixiert. Danach wurde die Gewebestanze geteilt und in Kassetten für Paraffin- und Kunststoffeinbettung verbracht.

Bei der Paraffineinbettung wurden die Proben zunächst für 30 Minuten mit Aqua dest. gespült und anschließend für je zweimal 90 Minuten mit 70 %igem, 96 %igem und 100 %igem Ethanol entwässert. Im Anschluss wurden die Proben in Xylol überführt und schließlich in Paraffin eingebettet (TBS 88 Paraffin Embedding System, MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland). Die ca. 5 µm dicken Schnitte wurden mit einem Rotationsmikrotom (HM 315, Mikrom GmbH, Berlin, Deutschland) angefertigt und auf einen Objektträger aufgezogen. Nach Trocknung wurden die Schnitte mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und nach Giemsa gefärbt und eingedeckt.

Bei der Kunststoffeinbettung wurden die Proben zunächst mit einer Spüllösung gewaschen und in einem Einbettungsautomaten (Citadel 100, Shandon GmbH, Frankfurt, Deutschland) für je zweimal 1 Stunde mit 30 %igem und 50 %igem Ethanol, je zweimal 2 Stunden mit 70 %igem und 96 %igem Ethanol und zum Schluss nochmal zweimal für 3 Stunden mit 96 %igem Ethanol entwässert. Nach der Inkubation für 24 Stunden bei 4°C in einem Gemisch aus Methacrylsäure-2-hydroxyester und Methacrylsäuremethylester auf einem Taumler (Modell 4010, Köttermann GmbH, Uetze/Hänigsen, Deutschland) wurde die Probe für 4 Stunden bei Raumtemperatur in das Einbettungsmedium verbracht. Für die Polymerisation wurde 60 µl N,N-Dimethylanilin (803060, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) pro 40 ml Medium zugegeben. Nach dem Schneiden an einem Rotationsmikrotom (HM360, Mikrom GmbH, Berlin, Deutschland) wurden die Schnitte getrocknet. Die Schnitte wurden ebenfalls mit HE und nach Giemsa gefärbt und eingedeckt. Die präparierten und gefärbten Gewebeschnitte wurden mithilfe eines Lichtmikroskops (Leica DM 1000, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) untersucht.

2.3.6. Urinuntersuchung

Mittels Teststreifen (Medi-Test Combi 9[®] Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) wurde ein Schnellnachweis von Glukose, Ascorbinsäure, Keton, Nitrit, Urobilinogen, Bilirubin, Protein, Blut sowie des pH-Werts aus dem Urin der Tiere durchgeführt. Dabei wurde der Teststreifen für circa 1 Sekunde in den Urin der Schweine getaucht. Die Reaktionsfarbe konnte nach circa 30 Sekunden mit der Farbskala verglichen und das Ergebnis analysiert werden. Der restliche Urin wurde bei -80 °C gelagert.

2.3.7. Extraktion der DNA von *Mycoplasma suis*

Die DNA-Extraktion von *M. suis* erfolgte aus den gewonnenen Blut-, Urin-, Tupfer- sowie Gewebeproben (Leber und Gehirn).

Die Tupferproben wurden in ein Eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäß (1,5 ml, Eppendorf Biopur[®], Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt und der Stiel abgeschnitten. Nach der Zugabe von 1 ml PBS, wurden die Proben für 24

Stunden bei 1600 rpm mit einem Thermomixer (Eppendorf ThermoMixer[®] Compact, Eppendorf AG) bei Raumtemperatur gemischt.

Ein jeweils circa haselnussgroßes Stück der Gewebeprobe von Leber, Kleinhirn und Großhirn wurde jeweils in einem sterilen Mörser, zusammen mit einer Spatelspitze Sand und 2 ml PBS, zerkleinert.

Von der EDTA-Blutprobe wurden 200 µl in ein 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäß pipettiert und mit dem Lysis-Puffer nach HOELZLE et al. (2003) gewaschen.

200 µl Urin wurden in einem Eppendorf Reaktionsgefäß bei 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert (Rotanta 460 R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen, sodass das Sediment im Eppendorf Reaktionsgefäß zurückblieb.

Im Anschluss wurde das Urinsediment und je 200 µl der Tupfer-, Gewebe-, Blut- und Urinproben entnommen und das Protokoll zur DNA-Extraktion des GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) durchgeführt.

2.3.8. Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis von *Mycoplasma suis*

Die Durchführung der *M. suis*-spezifischen quantitativen Polymerase-Kettenreaktion fand im Labor des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim statt. Nach dem Protokoll von HOELZLE et al. (2007d) wurde die DNA von *M. suis* mit dem LightCycler[®] 2.0 Instrument (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland) detektiert und quantifiziert.

2.3.9. Nachweis der *Mycoplasma suis* spezifischen Immunantwort

Für die Durchführung des HspA1-ELISA nach dem Protokoll von HOELZLE et al. (2007a) wurden folgende Puffer bzw. Lösungen hergestellt:

Coating-Puffer: 15,0 mM Na₂CO₃, 34,8 mM NaHCO₃, 3,0 mM NaN₃, pH 9.6

Waschpuffer: PBS (phosphate buffered saline) (Biochrom, Berlin, Deutschland), 0,05 % Tween 20

Blocking-Lösung: PBS, 1 % FKS (Fetales Kälberserum)

Substrat-Lösung: 0,73 mM ABTS (2,2-Azino-di [3-ethyl-Benzthiazolinsulfat]; Roche), 100 mM Zitrat-Phosphat-Puffer, pH 4.2, 2 mM H₂O₂

Zunächst wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) mit rekombinantem, in *E. coli* hergestelltem und aufgereinigtem HspA1 (Hitzeschockprotein A1 von *M. suis*; (HOELZLE et al., 2007d)) in einer Konzentration von 1000 ng/ml Coating-Puffer (100 ng/Loch) beschichtet und 60 min bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde mit Blockinglösung (300 µl/Loch) und Inkubation (1 h, Raumtemperatur) auf einem Schüttler (See-saw rockers SSL4, Stuart[®], Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK) unspezifische Bindungsstellen blockiert. Die Seren wurden vor Durchführung des ELISAs mit *E. coli*-Zellen präadsorbiert, um unspezifische anti-*E. coli*-Antikörper zu entfernen. Im ELISA wurden die präadsorbierten Seren 1:100 in Blocking Puffer verdünnt und jeweils 100 µl/Loch aufgetragen. Nach dreimaligem Waschen mit dem Waschpuffer wurden 100 µl des HRP-konjugierten anti-Schwein-IgG Sekundärantikörper (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden als letztes 100 µl der Substrat-Lösung aufgetragen. Nach 30 Minuten Inkubation im Dunkeln erfolgte die Auswertung mithilfe des TECAN Plate Readers (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 405 nm.

2.3.10. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Microsoft Office Excel Programm (Microsoft Corp., Redmond, USA) und dem IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corp., Armonk, USA). Die hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter wurden mittels deskriptiver Statistik ausgewertet. Mittels des Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Tests auf Normalverteilung wurde gezeigt, dass es sich bei den hämatologischen und klinisch-chemischen Parametern meist um nicht normalverteilte Parameter handelt. Zur Bestimmung des linearen Zusammenhangs zwischen Blut und der logarithmierten Erregermenge wurde der Korrelationstest nach Spearman-Rho verwendet. Werte galten als signifikant wenn der Signifikanzwert $P < 0,05$ war. Die Korrelation zwischen der logarithmierten

Erregermenge an Tag 4 p.i. und der Lebensdauer der Tiere wurde mit dem Korrelationstest nach Pearson bestimmt.

IV ERGEBNISSE

1 Ergebnisse des Vorversuchs

Im Vorversuch wurde das *M. suis*-haltige Blut für die experimentelle Infektion der Tiere im Hauptversuch gewonnen. Dazu wurden drei Tiere splenektomiert und eine Woche nach der Splenektomie experimentell mit 1,5 ml *M. suis*-haltigem Blut ($1,8 \times 10^7$ *M. suis*/ml) subkutan infiziert.

Alle drei Tiere entwickelten zwischen dem sechsten und achten Tag *post infectionem* (p.i.) das typische Bild einer akuten IAP. Die innere Körpertemperatur der Vorversuchstiere stieg auf 40,0 bis 41,0 °C an. Klinisch zeigten alle drei Tiere ab Tag 6 p.i. Blässe der Haut und Schleimhäute. Ab dem Tag 7 p.i. konnten Zyanosen an den Ohrändern festgestellt werden. Das Allgemeinbefinden war hochgradig reduziert und die Tiere nahmen ab Tag 6 p.i. kein Futter mehr auf. Die klinische Bewertung der Tiere erfolgte täglich mittels eines definierten Bewertungssystems („Score-System“). Die Tiere erreichten an Tag 8 p.i. zwischen vier und sieben Punkte von maximal 13 Punkten im Score-System. In den Akridinorange-gefärbten Blutaussstrichen konnte an Tag 7 p.i. bei zwei Tieren *M. suis* detektiert werden. In der quantitativen PCR konnte bei allen drei Tieren *M. suis*-DNA ab dem Tag 4 p.i. nachgewiesen werden. Die höchste Erregermenge wurde an Tag 7 p.i. nachgewiesen. Die Erregermenge lag an Tag 7 p.i. zwischen $4,0 \times 10^7$ und $4,4 \times 10^{12}$ *M. suis*/ml Blut. Eine hochgradige Hypoglykämie mit Glukosewerten zwischen 0,1 mmol/l und 0,5 mmol/l wurde bei allen drei Tieren an Tag 8 p.i. festgestellt. Darüber hinaus ergaben die klinisch-chemischen Blutuntersuchungen an Tag 8 p.i. erhöhte Bilirubin- (8,44 µmol/l – 195,07 µmol/l), Harnstoff- (5,7 mmol/l - 22,5 mmol/l) sowie Kreatininkonzentrationen (163,48 - 305,99 µmol/l). Die klinischen Anzeichen der Anämie wurden labordiagnostisch durch den Abfall der hämatologischen Blutparameter Erythrozytenzahl ($4,20 - 5,25 \times 10^6/\mu\text{L}$), Hämoglobin (7,6 – 11,0 g/dl) und Hämatokrit (25 – 29 %) bestätigt. Zum Zeitpunkt der höchsten Bakteriämie an Tag 7 p.i. wurde Blut für den Hauptversuch entnommen. Die drei Tiere des Vorversuchs wurden an Tag 8 p.i. getötet.

2 Ergebnisse des Hauptversuchs

Im Hauptversuch wurden insgesamt 14 Tiere verwendet. Dabei wurden die Tiere der Feldstammgruppe (N = 7 Tiere) splenektomiert und anschließend mit 1,5 ml *M. suis*-haltigem Blut ($1,8 \times 10^7$ *M. suis*/ml) aus dem Vorversuch infiziert. Die Tiere der Kontrollgruppe (N = 7 Tiere) wurden splenektomiert und nicht infiziert, um den Effekt der Splenektomie auf den klinischen Verlauf sowie die hämatologischen und klinisch-chemischen Blutparameter zu untersuchen.

2.1. Klinische Untersuchung

Alle Tiere der beiden Versuchsgruppen wurden täglich klinisch untersucht und nach dem Score-System bewertet. Um die beiden Versuchsgruppen vergleichend analysieren zu können, wurde der Beginn des Versuchszeitraum für die Kontrollgruppe (= Versuchstag 0) auf den siebten Tag nach der Splenektomie, entsprechend dem Tag der Infektion der Feldstammgruppe, festgelegt.

Splenektomierte, nicht infizierte Tiere (Kontrollgruppe)

Bei allen sieben Tieren der Kontrollgruppe konnten während der gesamten Versuchsdauer von 90 Tagen keine klinisch erkennbaren Krankheitssymptome festgestellt werden, die auf eine IAP hindeuten. Von Versuchstag 8 bis Versuchstag 12 zeigten drei der sieben Kontrolltiere respiratorische Symptome in Form von Husten und geringgradiger Dyspnoe. Zwei Tiere erreichten an den Versuchstagen 8 und 9 den bei der Kontrollgruppe maximal gemessenen Wert von zwei Punkten im klinischen Score-System. Auch bei anderen sich nicht im Versuch befindenden Schweinen der Klinik für Schweine wurden in diesem Zeitraum respiratorische Symptome festgestellt. Über den restlichen Versuchszeitraum lag der Gesamtscore der klinischen Untersuchung bei allen sieben Tieren der Kontrollgruppe bei null Punkten.

Splenektomierte, infizierte Tiere (Feldstammgruppe)

Bei drei Tieren (ID 9, ID 12 und ID 14) der Feldstammgruppe konnte am Tag der Infektion geringgradige Blässe festgestellt werden. An Tag 2 p.i. entwickelten zwei weitere Tiere (ID 8 und ID 10) blasse Haut und Schleimhäute. An Tag 6 p.i. zeigten alle sieben Tiere klinische Symptome einer akuten IAP mit einer gering- bis mittelgradigen Blässe, einer reduzierten Futteraufnahme und Apathie. Bei

zwei Tieren (ID 10 und ID 12) wurden an Tag 6 p.i. zyanotische Farbveränderungen an den Ohrrändern festgestellt (Abbildung 4). Drei Tiere (ID 10, ID 13 und ID 14) entwickelten eine erhöhte innere Körpertemperatur von über 40,5° C. Bei zwei Tieren (ID 8 und ID 12) wurden außerdem Vomitus und zentralnervöse Störungen festgestellt. Neben Seitenlage mit Ruderbewegungen zeigte ein Tier (ID 8) tonisch-klonische Krämpfe, Opisthotonus und Nystagmus. Bei dem zweiten Tier (ID 12) wurde darüber hinaus Tremor der Vorder- und Hinterextremitäten festgestellt. Alle Tiere erreichten an Tag 6 p.i. einen Wert von ≥ 3 im Score-System und wurden mit Oxytetracyclin (Terramycin[®]/ LA 20 mg/kg KGW, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) und Metamizol (Vetalgin[®] 1 ml/10 kg KGW, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) behandelt. Zusätzlich wurde Glukose oral verabreicht. Aufgrund der ausgeprägten ZNS-Symptomatik und des Verdachts einer *Streptococcus suis*-Koinfektion wurden die Tiere ID 8 und ID 12 zusätzlich mit Amoxicillin (Amoxicillin 200 mg/ml, 0,5 ml/10kg KGW, Alfavet Tierarzneimittel GmbH, Neumünster, Deutschland) behandelt. Beide Tiere (ID 8 und ID 12) zeigten keine Verbesserung des klinischen Allgemeinbefindens und verendeten an Tag 6 p.i. (ID 8) bzw. in der Nacht von Tag 6 auf Tag 7 p.i. (ID 12). Zwei weitere Tiere (ID 10 und ID 14) wiesen an Tag 7 p.i. Festliegen in Seitenlage mit Ruderbewegungen, tonisch-klonischen Krämpfen, Opisthotonus sowie Nystagmus auf. Diese Tiere wurden an Tag 7 p.i. mit einem klinischen Gesamtscore von 8 und 9 Punkten getötet. Ein Tier (ID 9) verendete an Tag 8 p.i., ein weiteres Tier (ID 11) wurde an Tag 8 p.i. aufgrund eines hochgradigen gestörten Allgemeinbefindens mit Seitenlage und Ruderbewegungen getötet. Ein Tier (ID 13) zeigte an Tag 9 p.i. eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptomatik und überlebte bis zum Versuchsende an Tag 90 (Tabelle 2).



Abbildung 4: Zyanotische Ohrränder

Tabelle 2: Verlauf Gesamtscore der täglichen klinischen Untersuchung der splenektomierten, infizierten Tiere der ersten zehn Tage p.i.

Versuchstage	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10
Tier											
ID 8	0	0	1	1	1	2	5				
ID 9	1	0	0	0	1	0	3	7			
ID 10	0	0	1	1	1	1	9	9			
ID 11	0	0	0	1	0	0	4	5	9		
ID 12	1	0	0	0	0	0	6				
ID 13	0	0	0	0	0	0	6	6	4	2	0
ID 14	1	0	0	0	1	0	7	8			

Gesamtscore > 3 Punkte $\hat{=}$ akute IAP (rot markiert)

Wie in Abbildung 5 dargestellt, konnten bei Tier 13 über die gesamte Versuchsdauer von 90 Tagen vier weitere akute Phasen der IAP (Tag 20 p.i., 31/32 p.i., 42/43 p.i. und 56/57 p.i.) festgestellt werden. Dabei erreichte das Tier an den Tagen 31/32 p.i. (dritter Anfall) sowie den Tagen 42/43 p.i. (vierter Anfall) einen Gesamtscore von maximal sieben Punkten über circa 36 Stunden. Beim zweiten Anfall (Tag 20 p.i.) trat ein Gesamtscore von drei Punkten über 24 Stunden auf. Ab Tag 40 p.i. konnten bei ID 13 Hautveränderungen in Form von lokalen, teilweise konfluierenden Petechien an den Hinterextremitäten festgestellt werden. Die punktförmigen Einblutungen in der Haut sind in Abbildung 6 dargestellt.

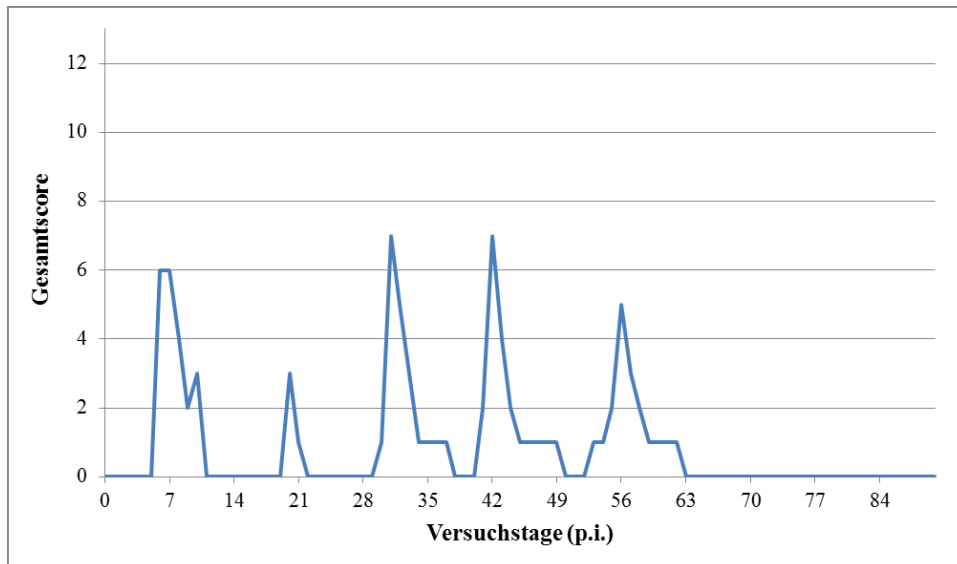


Abbildung 5: Verlauf des klinischen Gesamtscores über 90 Tage von ID 13



Abbildung 6: Petechien an den Hinterextremitäten von ID 13

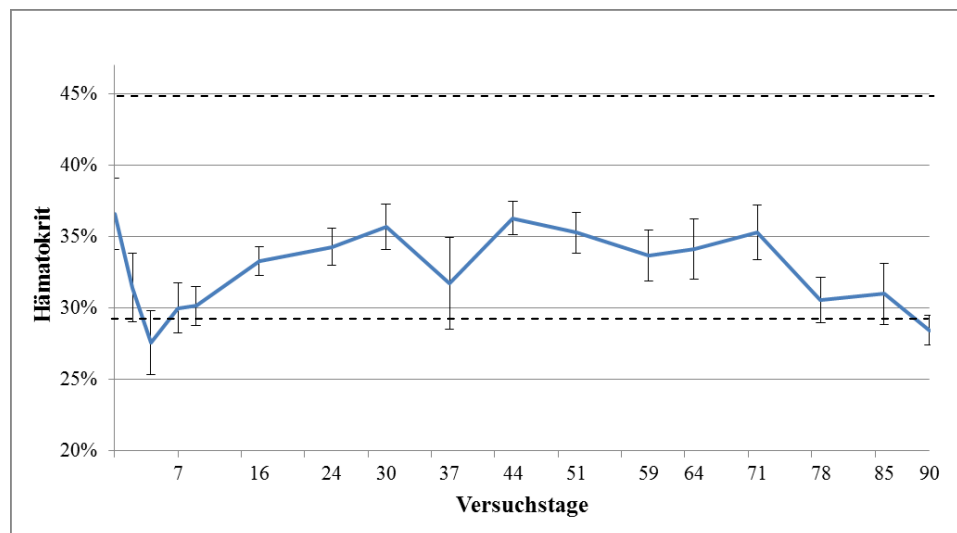
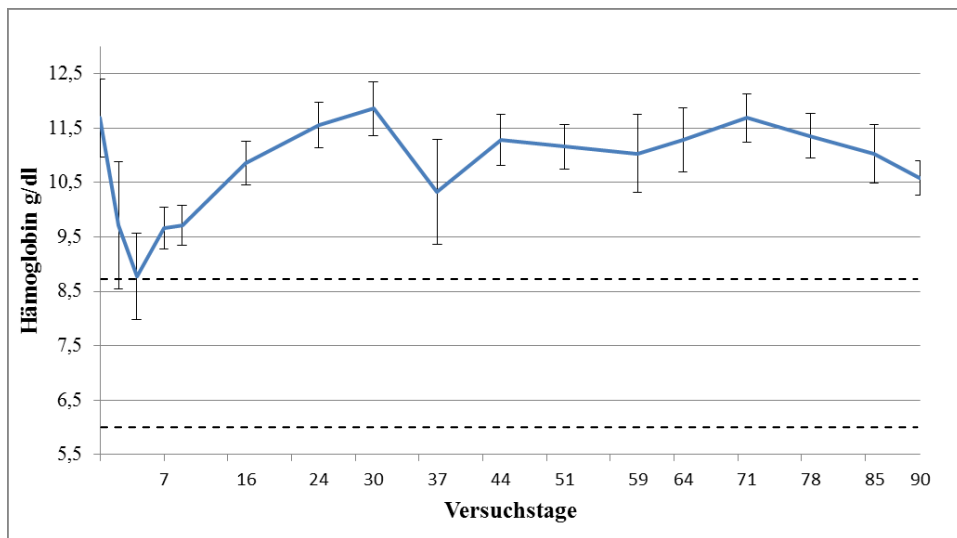
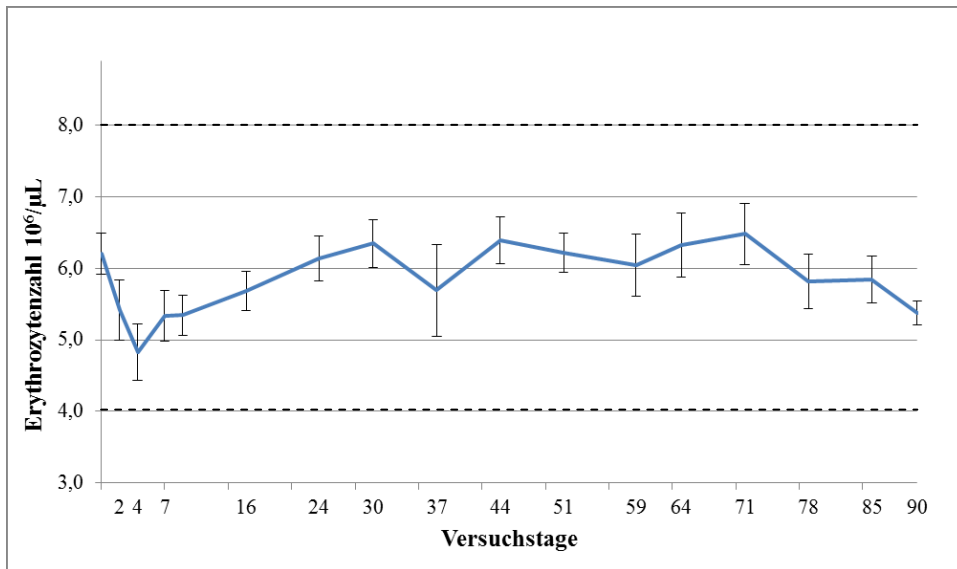
2.2. Hämatologische Parameter

Um den Einfluss der Splenektomie auf die hämatologischen Parameter zu untersuchen sowie den Verlauf der hämatologischen Parameter nach experimenteller Infektion mit *M. suis* darzustellen, wurde in beiden Versuchsgruppen die Erythrozytenzahl und die Leukozytenzahl sowie die Hämoglobinkonzentration und der Hämatokrit gemessen.

Splenektomierte, nicht infizierte Tiere (Kontrollgruppe)

In Abbildung 7 sind die Verlaufskurven der hämatologischen Blutparameter Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit und Leukozytenzahl der splenektomierten, nicht infizierten Tiere der Kontrollgruppe als Mittelwert und die Standardabweichungen über den gesamten Versuchszeitraum von 90 Tagen dargestellt.

Die mittlere Erythrozytenzahl der splenektomierten, nicht infizierten Schweine (Kontrollgruppe) lag über den Versuchszeitraum von 90 Tagen zwischen $4,82 \times 10^6/\mu\text{L}$ (SD $\pm 0,40$, SEM $\pm 0,18$) und $6,4 \times 10^6/\mu\text{L}$ (SD $\pm 0,43$, SEM $\pm 0,17$). An Versuchstag 4 nach der Splenektomie wurde im Mittel die niedrigste Erythrozytenzahl von $4,82 \times 10^6/\mu\text{L}$ (SD $\pm 0,40$, SEM $\pm 0,18$) gemessen. Als Referenzbereich für die Erythrozytenzahl bei Masthybriden im Läuferalter werden Werte zwischen $4,0 \times 10^6/\mu\text{L}$ und $8,0 \times 10^6/\mu\text{L}$ angegeben (KIXMÖLLER, 2004). Die Hämoglobinkonzentration betrug im Mittel zwischen $8,77 \text{ g/dl}$ (SD $\pm 0,79$, SEM $\pm 0,27$) an Versuchstag 4 und $11,85 \text{ g/dl}$ (SD $\pm 0,49$, SEM $\pm 0,14$) an Versuchstag 30. Der Mittelwert des Hämatokrits erreichte Werte zwischen $27,6 \%$ (SD $\pm 0,02$, SEM $\pm 0,04$) an Versuchstag 4 und $36,6 \%$ (SD $\pm 0,02$, SEM $\pm 0,04$) an Versuchstag 0. Nach KIXMÖLLER (2004) liegt der Referenzbereich für die Hämoglobinkonzentration zwischen $6,0 \text{ mmol/l}$ und $8,8 \text{ mmol/l}$, während der Referenzbereich für Hämatokrit zwischen 29% und 45% angegeben wird. Die Leukozytenzahl schwankte im Mittel zwischen $18,03 \times 10^3/\mu\text{L}$ (SD $\pm 2,53$, SEM $\pm 0,60$) an Versuchstag 30 und $23,87 \times 10^3/\mu\text{L}$ (SD $\pm 4,22$, SEM $\pm 0,86$) an Versuchstag 2. Der Referenzbereich der Leukozytenzahl wird zwischen $12,1 \times 10^3/\mu\text{L}$ - $26,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ angegeben (KIXMÖLLER, 2004). Die hämatologischen Parameter der Kontrollgruppe verlaufen demnach über den gesamten Versuchszeitraum von 90 Tagen im Referenzbereich.



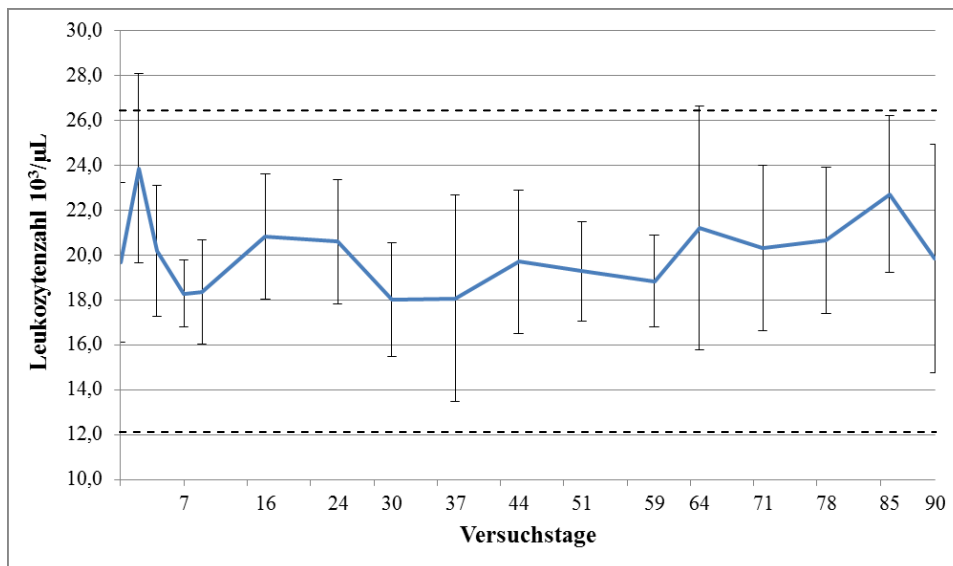


Abbildung 7: Mittelwerte, Standardabweichungen und Referenzbereiche der hämatologischen Parameter Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit und Leukozytenzahl der splenektomierten, nicht infizierten Tiere über den Versuchszeitraum von 90 Tagen

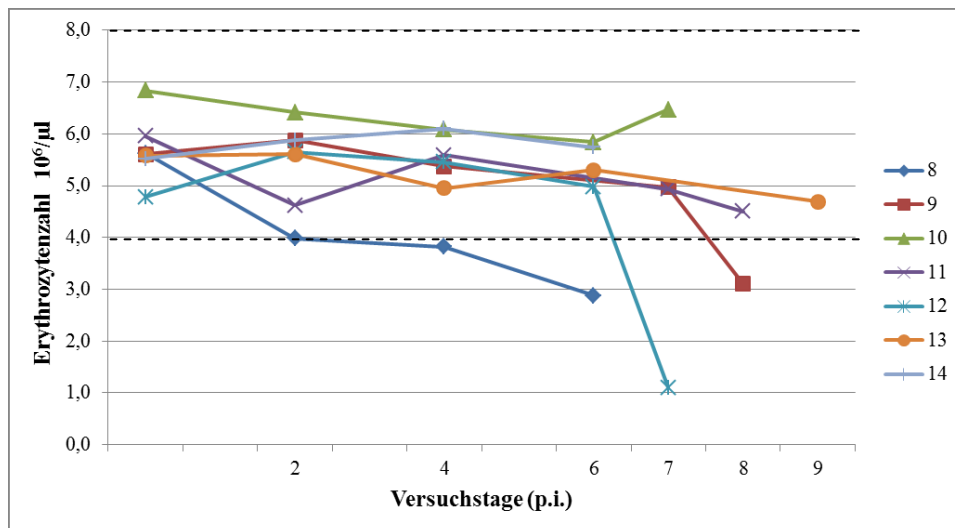
Splenektomierte, infizierte Tiere (Feldstammgruppe)

Zum Zeitpunkt einer akuten IAP an Tag 6 p.i. konnte, wie in Abbildung 8 dargestellt, am Rand des Reagenzgefäßes eine Mikroagglutination des ungerinnbar gemachten Blutes festgestellt werden.

Am Tag der Splenektomie konnte bei den sieben Tieren der Feldstammgruppe eine mittlere Erythrozytenzahl von $5,7 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($\text{SD} \pm 0,60$, $\text{SEM} \pm 0,23$), eine mittlere Hämoglobinkonzentration von $10,7 \text{ g/dl}$ ($\text{SD} \pm 1,01$, $\text{SEM} \pm 0,38$) und ein mittlerer Hämatokrit von $25,5 \%$ ($\text{SD} \pm 3,12$, $\text{SEM} \pm 1,18$) nachgewiesen werden. Ab Tag 6 p.i. entwickelten alle sieben Tiere der splenektomierten, infizierten Gruppe eine normochrome, normozytäre Anämie. Die niedrigste Erythrozytenzahl ($1,1 \times 10^6/\mu\text{L}$), die niedrigste Hämoglobinkonzentration ($2,1 \text{ g/dl}$) sowie der niedrigste Hämatokrit ($6,8 \%$) konnte bei ID 12 an Tag 7 p.i. festgestellt werden. Die Leukozytenzahl stieg bis Tag 2 p.i. auf Werte von $27,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($\text{SD} \pm 7,25$, $\text{SEM} \pm 2,74$) im Mittel an. Nach einem Abfall der Leukozytenzahl an Tag 4 p.i. war ein erneuter Anstieg an Tag 7 p.i. auf einen Mittelwert von $26 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($\text{SD} \pm 5,47$, $\text{SEM} \pm 2,07$) zu verzeichnen. In Abbildung 9 sind die hämatologischen Parameter der splenektomierten und infizierten Tiere in den ersten neun Versuchstagen dargestellt.



Abbildung 8: Mikroagglutination an der Wand des Reagenzgefäßes zum Zeitpunkt der akuten IAP an Tag 6 p.i.



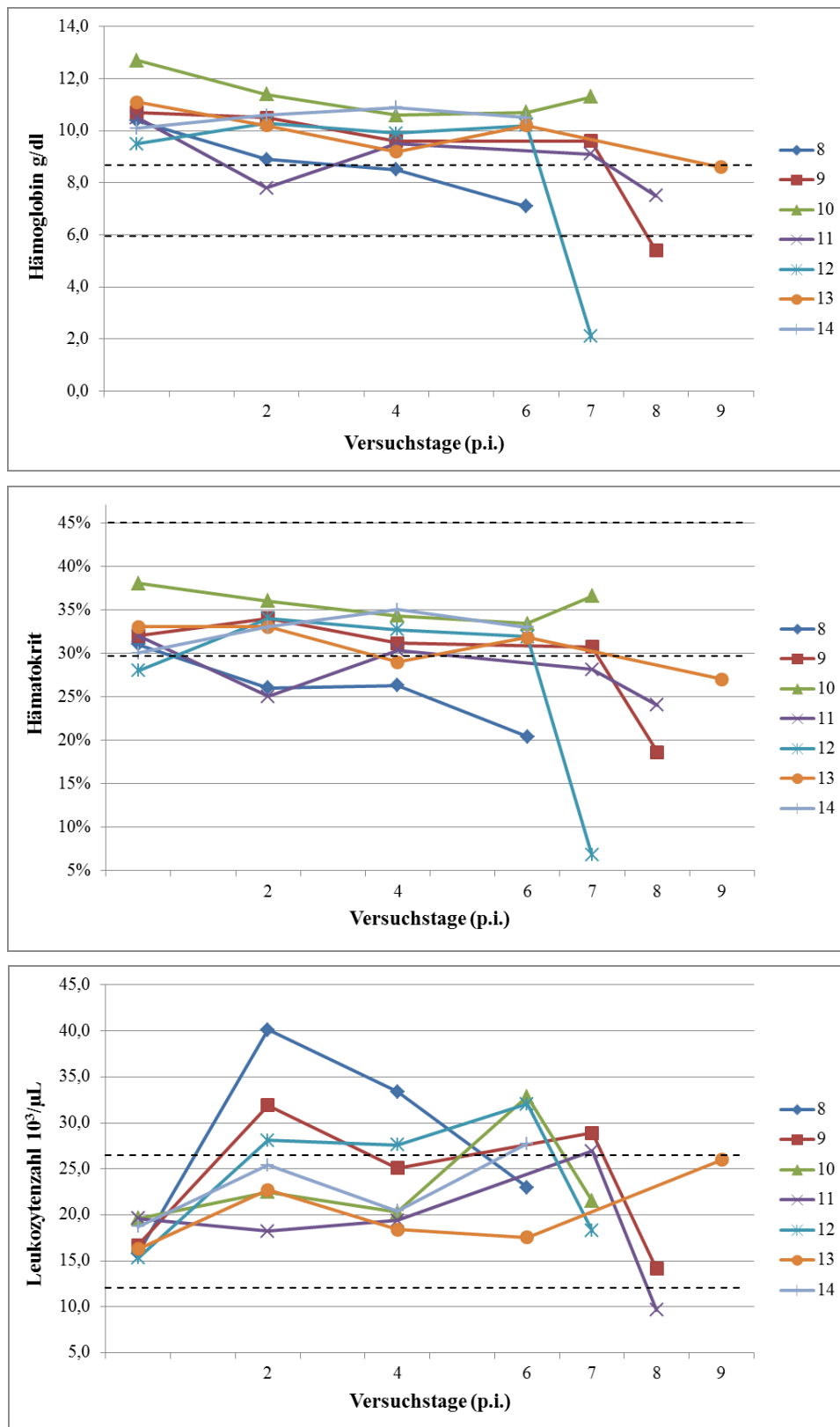
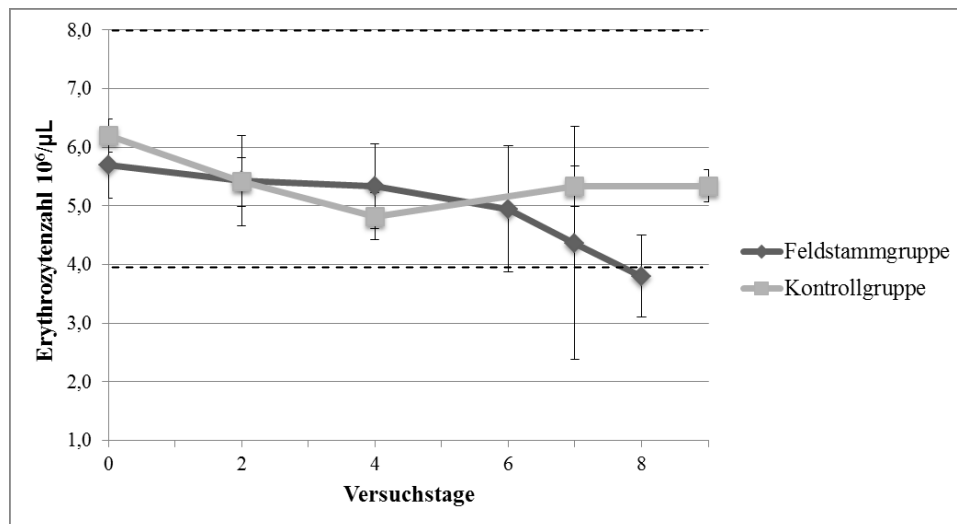


Abbildung 9: Verlaufskurven und Referenzbereiche der hämatologischen Parameter Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit und Leukozytenzahl der splenektomierten, infizierten Tiere der Feldstammgruppe in den ersten 9 Tagen p.i.

2.2.1. Vergleich zwischen splenektomierten, nicht infizierten (Kontrollgruppe) und splenektomierten, infizierten (Feldstammgruppe) Tieren

In Abbildung 10 sind die hämatologischen Parameter der Tiere der Kontrollgruppe und Feldstammgruppe während der ersten neun Versuchstage im Vergleich dargestellt. Bei den Tieren beider Versuchsgruppen war bis zum Versuchstag 4 ein Abfall der mittleren Erythrozytenzahl, der mittleren Hämoglobinkonzentration und des mittleren Hämatokrits festzustellen. Nach Versuchstag 4 war bei der Kontrollgruppe ein Anstieg der Erythrozytenzahl, der Hämoglobinkonzentration und des Hämatokrits zu verzeichnen. Die hämatologischen Parameter der Tiere der Feldstammgruppe sanken hingegen weiter ab. Nach einem Anstieg der mittleren Leukozytenzahl aller Versuchstiere (Kontroll- und Feldstammgruppe) bis Versuchstag 2, verlief die Leukozytenzahl der Tiere der Kontrollgruppe für die restliche Versuchsdauer innerhalb des Referenzbereichs. Bei den Tieren der Feldstammgruppe konnte nach einem Abfall der Leukozytenzahl bis zum Versuchstag 4 ein erneuter Anstieg gemessen werden. Ab Tag 6 p.i. entwickelten die Tiere der Feldstammgruppe wiederum eine Leukopenie.



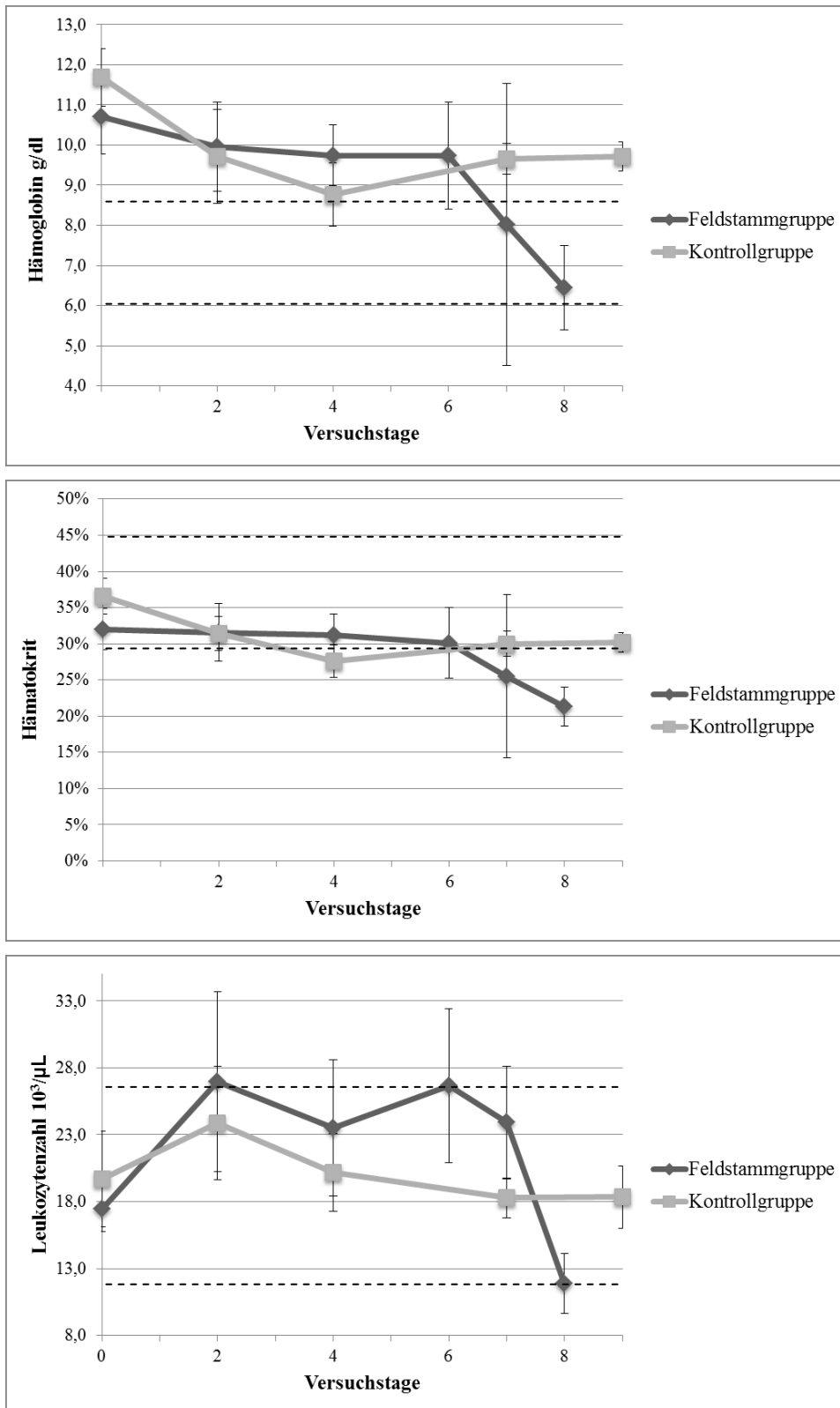
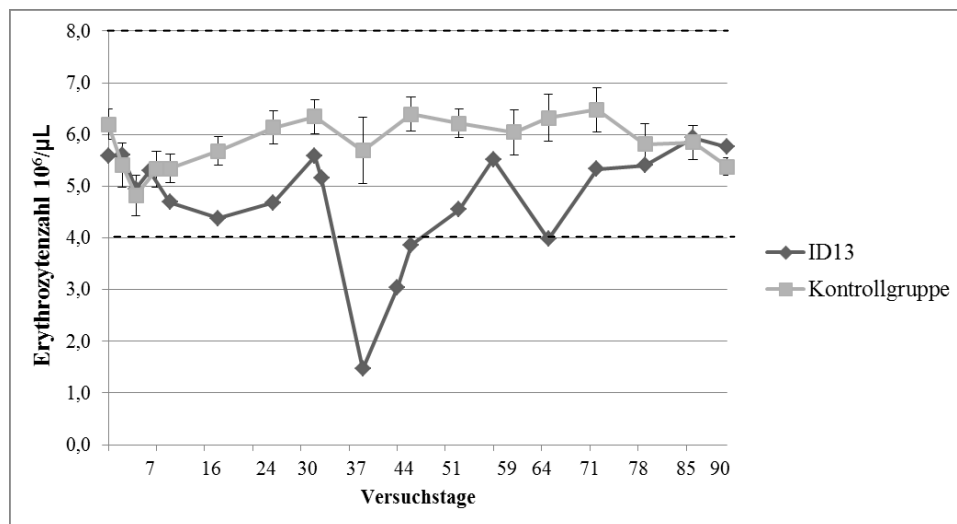


Abbildung 10: Verlaufskurven, Standardabweichung und Referenzbereiche der Mittelwerte der hämatologischen Parameter Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit und Leukozytenzahl der Feldstamm- und Kontrollgruppe im Vergleich in den ersten 9 Tagen p.i.

2.2.2. Vergleich zwischen splenektomierten, nicht infizierten Tieren (Kontrollgruppe) und ID 13 (splenektomiert, infiziert) über 90 Tage

Im Folgenden ist der Verlauf der hämatologischen Parameter der Tiere der splenektomierten, nicht infizierten Gruppe sowie des splenektomierten, infizierten ID 13 (Feldstammgruppe) vergleichend über 90 Versuchstage dargestellt (Abbildung 11).

Die Erythrozytenzahl von ID 13 lag während des Versuchszeitraums von 90 Tagen zwischen $5,94 \times 10^6/\mu\text{L}$ und $1,47 \times 10^6/\mu\text{L}$. An den Tagen 37 bis 44 p.i. sowie an Tag 64 p.i. befand sich die Erythrozytenzahl unterhalb des Referenzbereichs. Die mittlere Erythrozytenzahl der Tiere der Kontrollgruppe verlief ab Versuchstag 4 innerhalb des Referenzbereichs mit Werten zwischen $4,82 \times 10^6/\mu\text{L}$ und $6,4 \times 10^6/\mu\text{L}$. Die Leukozytenzahl von ID 13 lag zwischen Werten von $16,3 \times 10^3/\mu\text{L}$ und $57,63 \times 10^3/\mu\text{L}$. An Tag 37 p.i. kam es bei ID 13 zu einer Leukozytose mit Werten von $57,63 \times 10^3/\mu\text{L}$. Die Leukozytenzahl der Kontrollgruppe blieb hingegen zwischen $18,03 \times 10^3/\mu\text{L}$ und $23,87 \times 10^3/\mu\text{L}$.



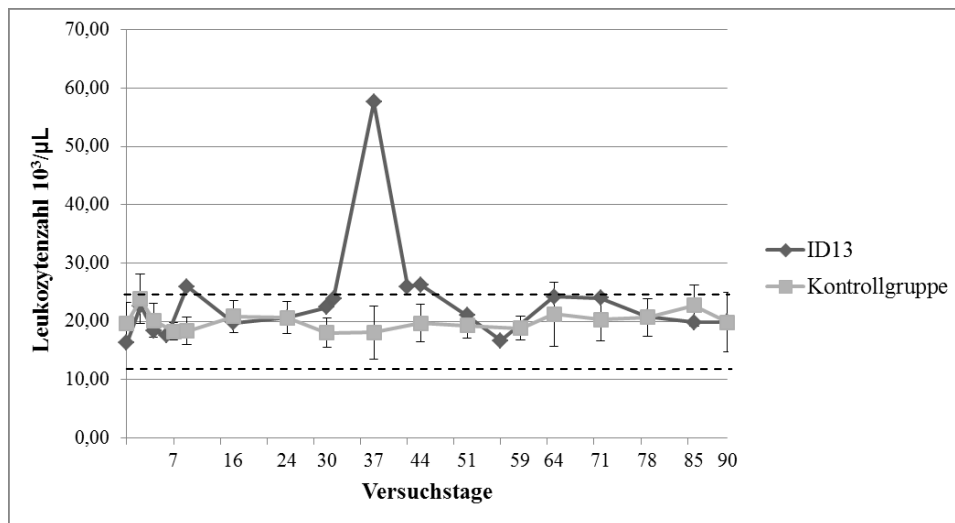


Abbildung 11: Verlaufskurven und Referenzbereiche der Erythrozyten- und Leukozytenzahl der splenektomierten, nicht infizierten Tiere und des splenektomierten, infizierten Tieres (ID 13) über den Versuchszeitraum von 90 Tagen

2.3. Klinisch-chemische Blutparameter

Zusätzlich zu den hämatologischen Parametern wurden in beiden Versuchsgruppen die klinisch-chemischen Blutparameter Glukose, Bilirubin, Harnstoff, Kreatinin und Eisen erhoben.

Splenektomierte, nicht infizierte Tiere (Kontrollgruppe)

Die Bilirubinkonzentration betrug bei der splenektomierten, nicht infizierten Gruppe über den gesamten Versuchszeitraum im Mittel zwischen 0,50 µmol/l und 0,87 µmol/l. Der Referenzbereich für Bilirubin wird zwischen 0 - 2,36 µmol/l angegeben (KIXMÖLLER, 2004). Der Mittelwert der Glukosekonzentration im Blut verlief zwischen 5,46 mmol/l und 7,47 mmol/l. Laut KIXMÖLLER (2004) beträgt der Referenzbereich für Glukose bei Masthybriden zwischen 3,6 mmol/l - 6,8 mmol/l. Der Mittelwert der Harnstoffkonzentration der Kontrollgruppe liegt zwischen 2,73 mmol/l und 4,93 mmol/l. Der Referenzbereich für Harnstoff bei Masthybriden beläuft sich zwischen 2,32 mmol/l - 6,12 mmol/l (KIXMÖLLER, 2004). Die klinisch-chemischen Parameter Bilirubin, Glukose, Harnstoff sowie Kreatinin (< 220 µmol/l) und Eisen (> 17,9 µmol/l) der splenektomierten, nicht infizierten Tiere verliefen über den gesamten Versuchsablauf im Referenzbereich (Abbildung 12).

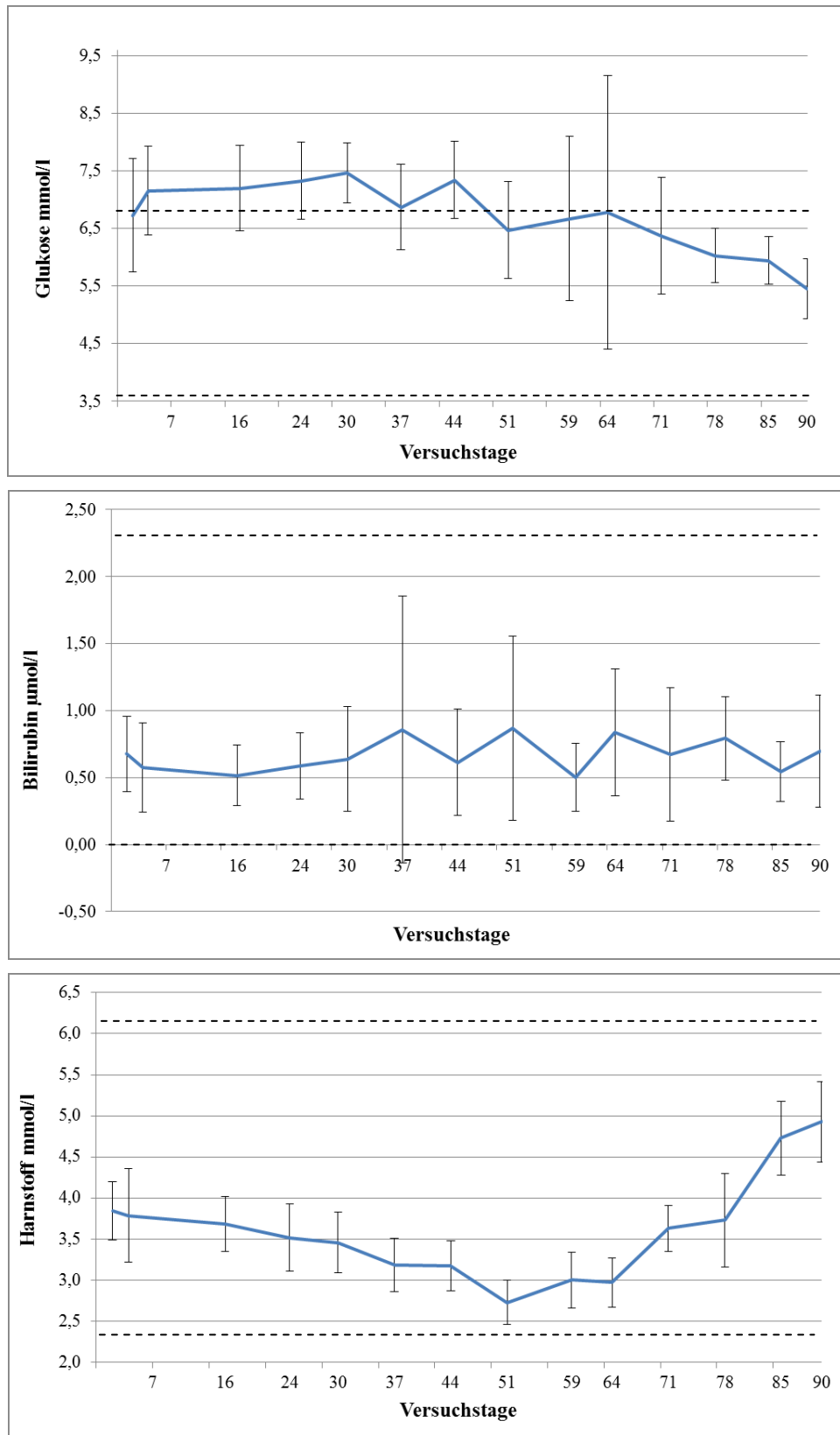


Abbildung 12: Mittelwerte, Standardabweichungen und Referenzbereiche der klinisch-chemischen Blutparameter Glukose, Bilirubin und Harnstoff der splenektomierten, nicht infizierten Tiere über den Versuchszeitraum von 90 Tagen

Splenektomierte, infizierte Tiere (Feldstammgruppe)

Makroskopisch konnte ab dem Tag 4 p.i. bzw. Tag 6 p.i. eine ikterische Farbveränderung des Blutserums beobachtet werden (Abbildung 13). Analog dazu konnte ab dem Tag 4 p.i. bei zwei Tieren (ID 8 und ID 11) bzw. ab dem Tag 6 p.i. bei einem weiteren Tier (ID 10) ein Anstieg der Bilirubinkonzentration im Blut gemessen werden (Abbildung 14). Es kam zu einer Bilirubinämie mit Maximalwerten von $140,9 \mu\text{mol/l}$ (ID 11). Die Blutglukosekonzentration lag bei den sieben Tieren der Feldstammgruppe bis zum Tag 4 p.i. innerhalb des Referenzbereichs mit Werten zwischen $5,1 \text{ mmol/l}$ und $8,9 \text{ mmol/l}$. Danach war eine Hypoglykämie mit einem hochgradigen Abfall der Glukosekonzentration im Blut bis Tag 7 p.i. erkennbar (Abbildung 14). Ein Tier (ID 12) erreichte Blutglukosewerte, die unterhalb des messbaren Bereichs lagen. Die Harnstoffkonzentration im Blut verlief bis Tag 4 p.i. im Normalbereich mit Werten zwischen $1,9 \text{ mmol/l}$ und $5,5 \text{ mmol/l}$. Bei der Harnstoffkonzentration war ab Tag 4 bis Tag 7 p.i. bei drei Tieren (ID 8, ID 10 und ID 12) ein Anstieg zu verzeichnen. Diese erreichten Werte von $20,9 \text{ mmol/l}$ (ID 8) (Abbildung 14). Die Kreatininkonzentration der splenektomierten, infizierten Tiere stieg ab Tag 4 p.i. auf Werte bis $335,24 \mu\text{mol/l}$ (ID 8) an. Die Eisenkonzentration fiel bis Tag 6 p.i. auf $4,58 \text{ mmol/l}$ (ID 10) ab.

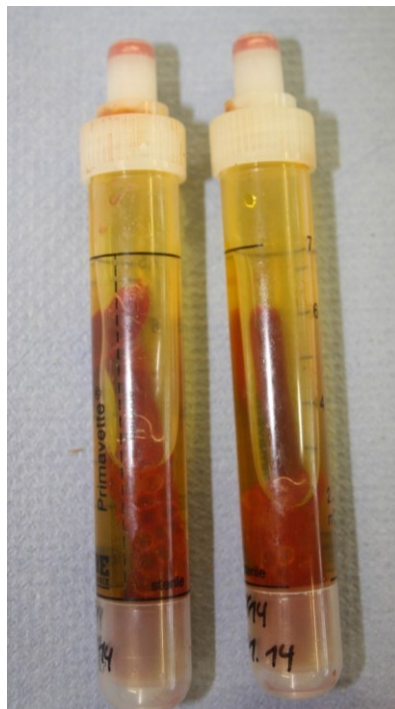


Abbildung 13: Ikterisches Blutserum von ID 14 an Tag 6 p.i.

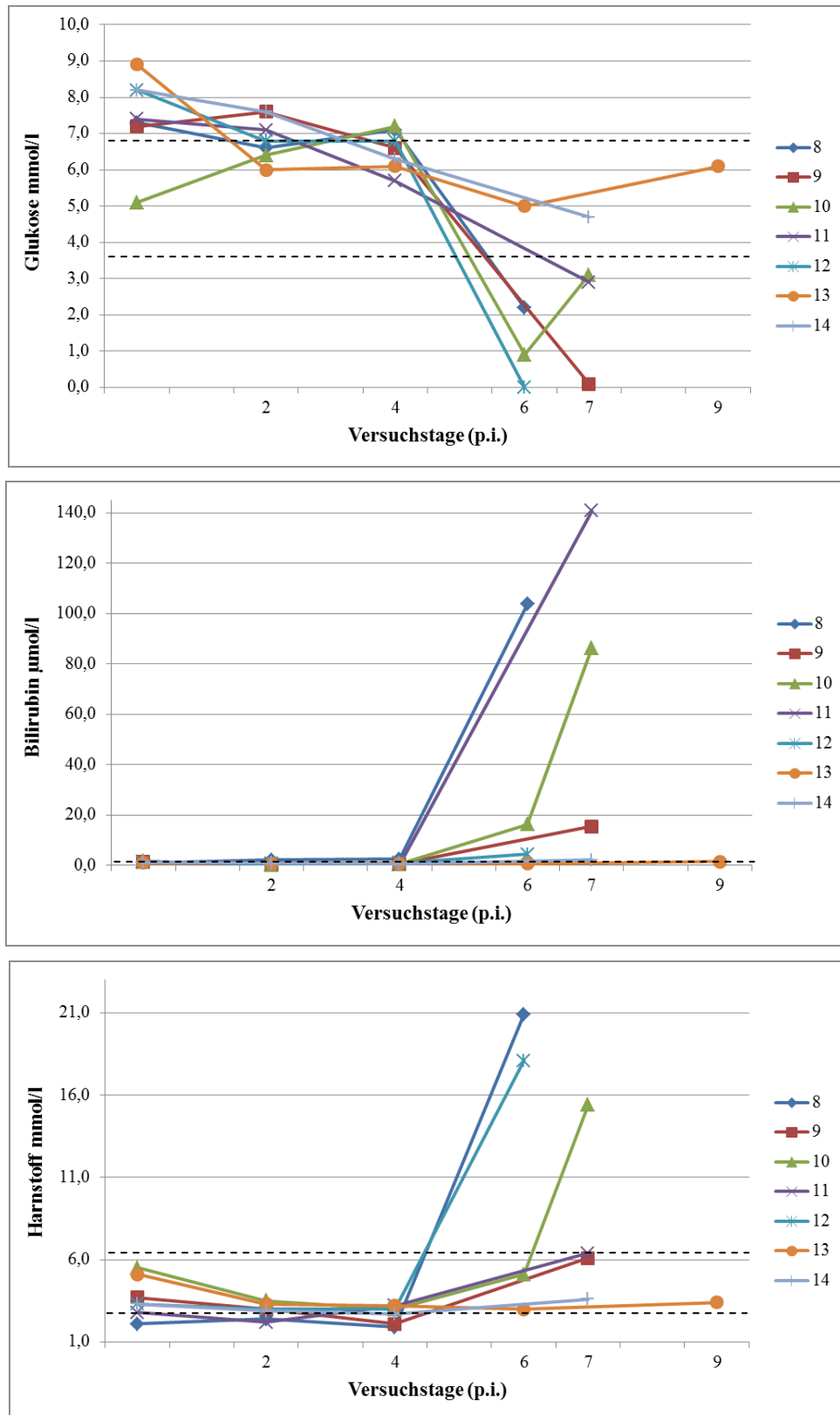
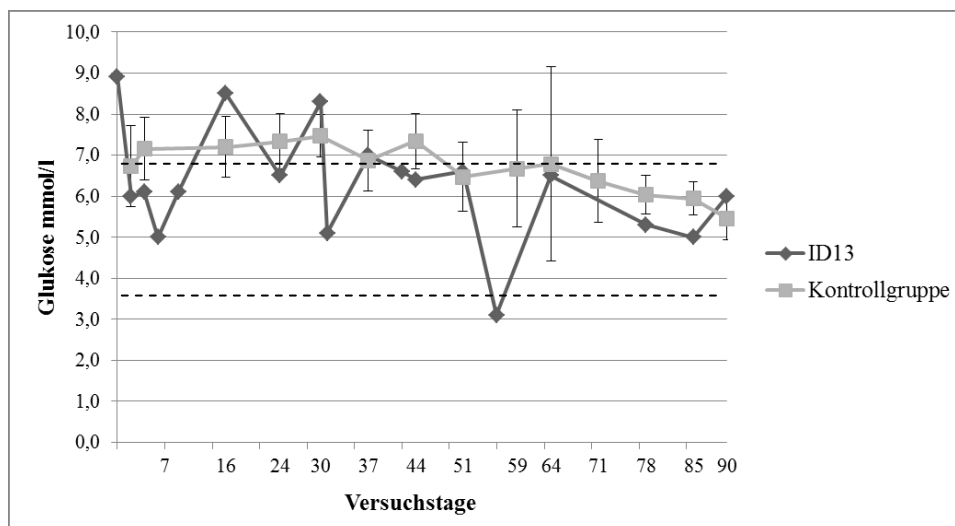


Abbildung 14: Verlaufskurven und Referenzbereiche der klinisch-chemischen Blutparameter Glukose, Bilirubin und Harnstoff der splenektomierten, infizierten Tieren in den ersten 9 Tagen p.i.

2.3.1. Vergleich zwischen splenektomierten, nicht infizierten Tieren (Kontrollgruppe) und ID 13 (splenektomiert, infiziert) über 90 Tage

Über die Dauer des Versuchs von 90 Tagen war insgesamt ein geringgradiger Abfall der mittleren Blutglukosekonzentration der splenektomierten, nicht infizierten Tiere (Kontrollgruppe) zu erkennen. Die Werte der Blutglukosekonzentration lagen jedoch durchgehend innerhalb des Referenzbereichs (Abbildung 15). Bei ID 13 befand sich die Blutglukosekonzentration an den Tagen 6, 31 und 85 p.i. im unteren Referenzbereich. An Tag 56 p.i. konnte eine Hypoglykämie festgestellt werden mit einer Glukosekonzentration von 3,1 mmol/l. Die mittlere Bilirubinkonzentration der Tiere der Kontrollgruppe verlief über den gesamten Versuchszeitraum konstant im Referenzbereich ($< 1,0 \mu\text{mol/l}$) (Abbildung 15). Bei ID 13 war an Tag 9 und Tag 42 p.i. ein Anstieg der Bilirubinkonzentration in den oberen Referenzbereich zu erkennen. An Tag 56 p.i. trat eine Bilirubinämie mit einem Wert von $6,44 \mu\text{mol/l}$ auf. Zudem war bei ID 13 an Tag 56 p.i. ein Anstieg der Harnstoffkonzentration auf $5,6 \text{ mmol/l}$ im Blut nachweisbar. Die Eisenkonzentration von ID 13 fiel an den Tagen 42 und 56 p.i. unterhalb des Referenzbereichs ($> 17,9 \mu\text{mol/l}$) und erreichte Werte von $8,15$ und $5,12 \mu\text{mol/l}$.



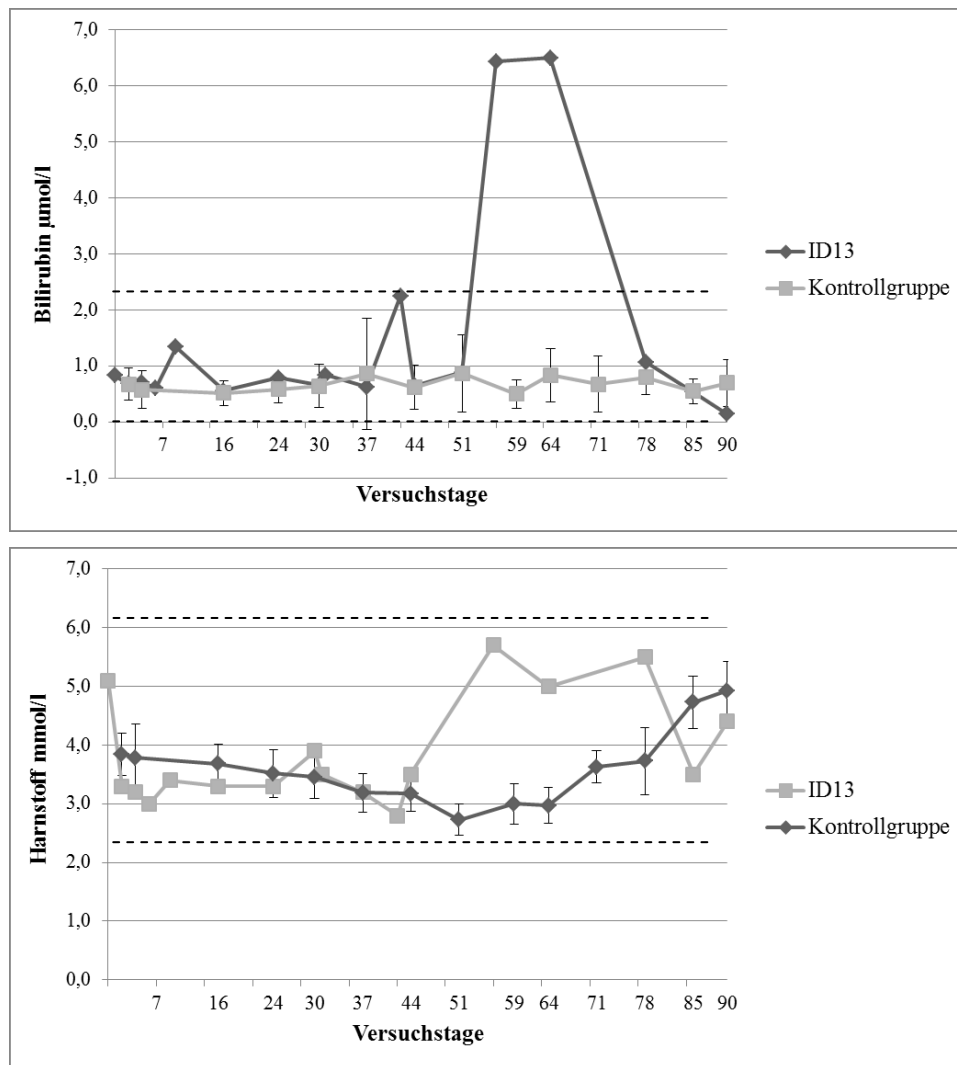


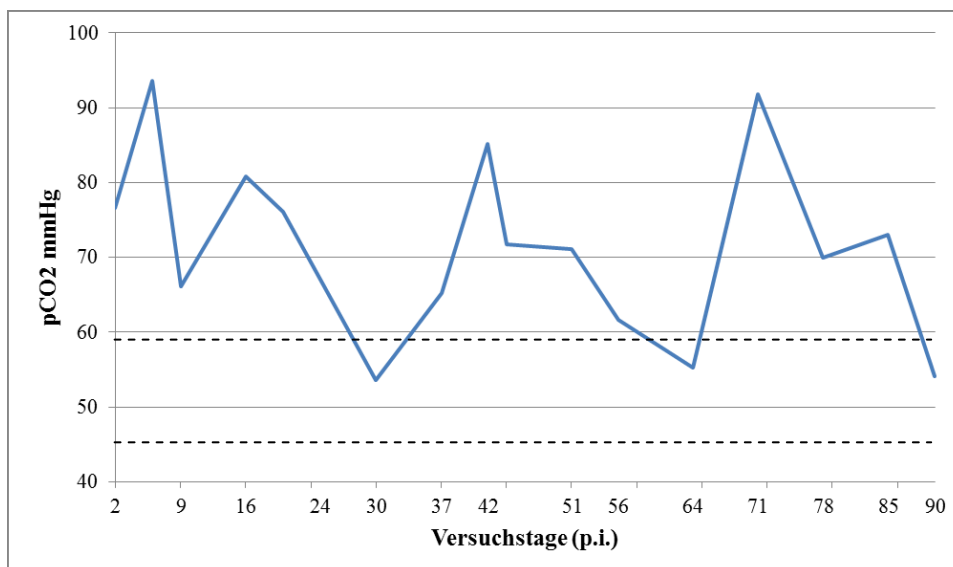
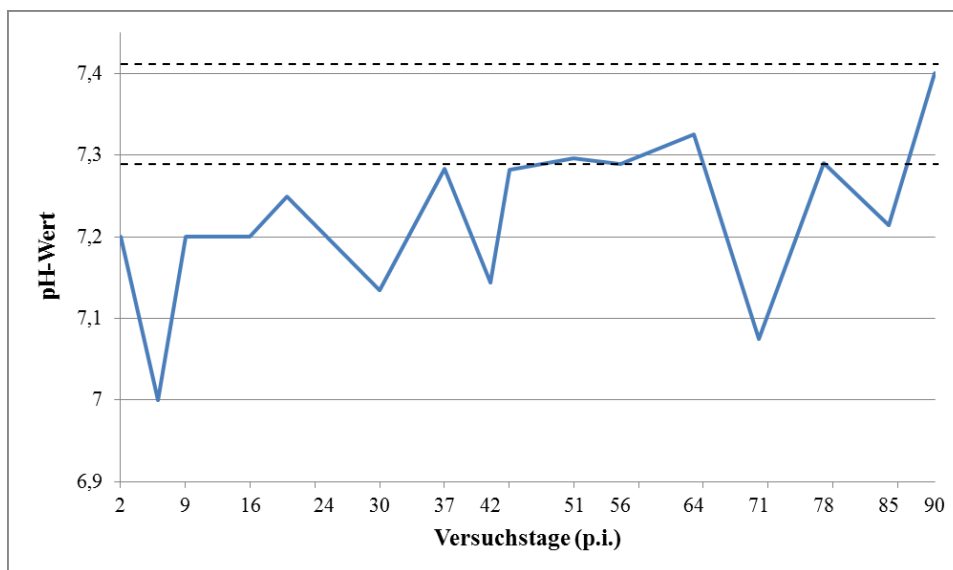
Abbildung 15: Verlaufskurven, Standardabweichung und Referenzbereiche der klinisch-chemischen Blutparameter Glukose, Bilirubin und Harnstoff der splenektomierten, nicht infizierten Gruppe und des splenektomierten, infizierten Tieres (ID 13) im Vergleich über 90 Versuchstage

2.4. Blutgasmessung ID 13

Um die Veränderungen der Blutgasparameter im chronischen Infektionsverlauf der IAP darzustellen, wurde von dem splenektomierten, infizierten Tier ID 13 der pH-Wert, der Kohlenstoffdioxidpartialdruck ($p\text{CO}_2$), der Sauerstoffpartialdruck ($p\text{O}_2$) sowie die Bicarbonatkonzentration (HCO_3) im Blut über den gesamten Versuchszeitraum von 90 Tagen erhoben.

In Abbildung 16 sind die Verlaufskurven der Parameter der Blutgasmessungen von ID 13 dargestellt. Der pH-Wert schwankte zwischen 7,20 und 7,40. Der Referenzbereich des Blut-pH-Wertes liegt nach PETERANDERL (1988) im venösen Blut zwischen 7,29 und 7,41. Der Kohlendioxidpartialdruck $p\text{CO}_2$ verlief

zwischen 53,6 mmHg und 93,6 mmHg, der Sauerstoffpartialdruck pO_2 zwischen 26,2 und 108,1 mmHg und die Bicarbonatkonzentration zwischen 17,1 mmol/l und 33,0 mmol/l. Als Referenzbereich werden Werte für den Kohlendioxidpartialdruck zwischen 45,35 mmHg und 59,23 mmHg, für den Sauerstoffpartialdruck 32,45 mmHg und 47,49 mmHg und für die Bicarbonatkonzentration 23,83 mmol/l und 34,47 mmol/l im venösen Blut von Läufer Schweinen angegeben (PETERANDERL, 1988).



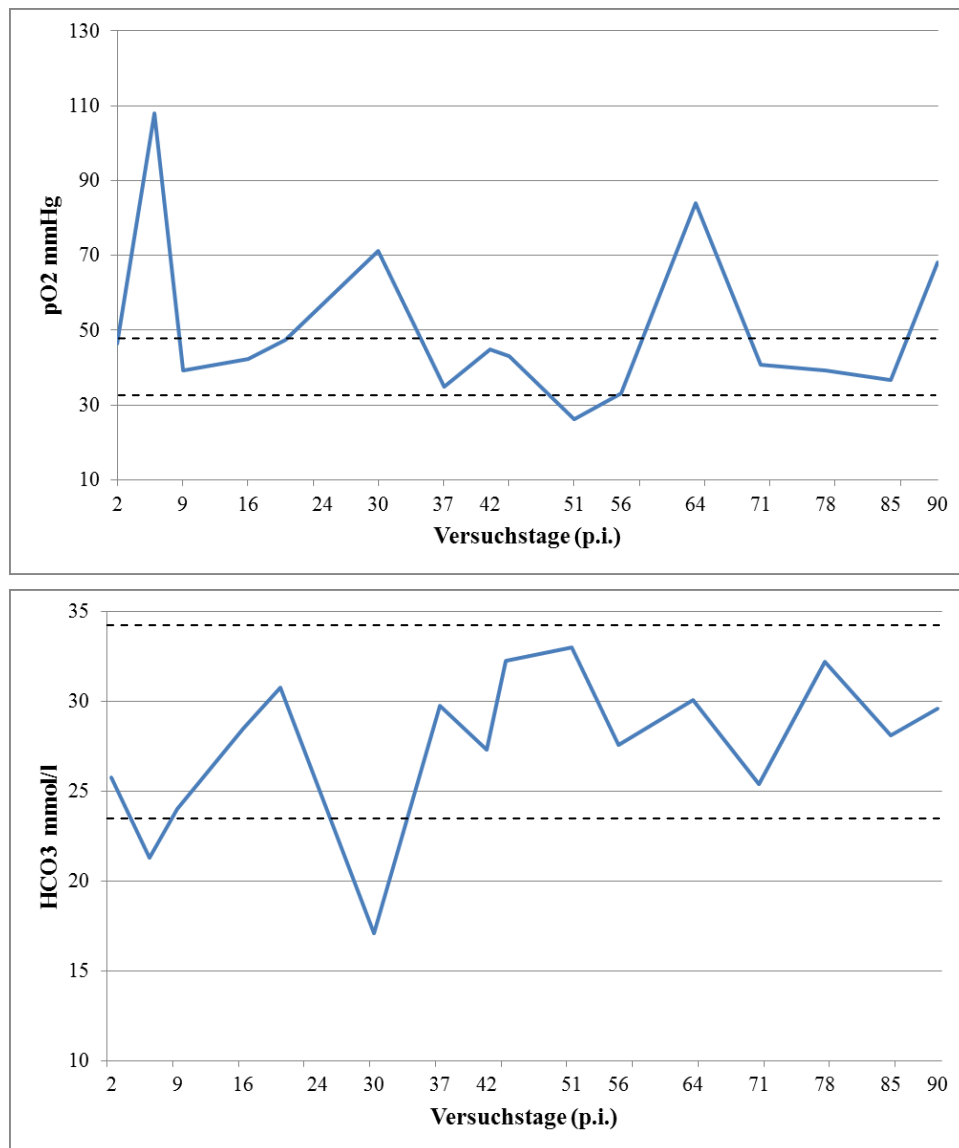


Abbildung 16: Verlaufskurven und Referenzbereiche der einzelnen Parameter der Blutgasmessung pH, pCO₂, pO₂ und HCO₃ von ID 13

2.5. Verlauf der *M. suis*-Bakteriämie

Mittels des LightCycler® 2.0 Systems erfolgte die Detektion und Quantifizierung der *M. suis*-DNA im Blut.

Splenektomierte, nicht infizierte Tiere (Kontrollgruppe)

Alle Blutproben der sieben Tiere der Kontrollgruppe waren über den gesamten Versuchsablauf in der quantitativen real-time PCR *M. suis*-negativ.

Splenektomierte, infizierte Tiere (Feldstammgruppe)

Vor der Infektion konnte bei keinem der sieben Tiere der Feldstammgruppe in der quantitativen PCR *M. suis*-DNA detektiert werden. Zwei Tage p.i. waren zwei

Tiere (ID 8 und ID 12) in der PCR *M. suis*-positiv. An Tag 4 p.i. konnte bei allen Tieren *M. suis*-DNA im Blut nachgewiesen werden, wobei die Tiere ID 8 und ID 12 mit einem Wert von $1,8 \times 10^7$ *M. suis*/ml Blut die höchste *M. suis*-Konzentration aufwiesen (Tabelle 3, Tabelle 4). Die Erregermenge stieg bis Tag 7 p.i. weiter an und erreichte Werte zwischen $4,1 \times 10^7$ *M. suis*/ml Blut und $1,1 \times 10^9$ *M. suis*/ml Blut.

Tabelle 3: Erregermenge im Blut der splenektomierten, infizierten Tiere der Feldstammgruppe in den ersten 9 Tagen p.i.

Tage p.i.	d0	d2	d4	d6	d7	d8	d9
ID 8	neg	1,1E+04	1,8E+07	1,10E+08	†	†	†
ID 9	neg	neg	2,0E+04	-	1,1E+09	3,2E+07	†
ID 10	neg	neg	1,2E+06	-	4,1E+07	†	†
ID 11	neg	neg	4,5E+04	-	8,3E+08	2,3E+07	†
ID 12	neg	7,6E+03	1,8E+07	2,5E+06	†	†	†
ID 13	neg	neg	6,5E+04	-	5,1E+08	-	5,5E+05
ID 14	neg	neg	1,0E+05	-	3,2E+08	†	†

Tabelle 4: Mittlere Erregermenge der splenektomierten, infizierten Tiere der Feldstammgruppe in den ersten 8 Tagen p.i.

Tage p.i.	n*	Minimum	Maximum	<i>M. suis</i> /ml Blut	SEM**	SD***
d2	7	0,0E+00	1,1E+04	2,6E+03	1,7E+03	4,6E+03
d4	7	2,0E+04	1,8E+07	5,3E+06	3,2E+06	8,6E+06
d6	2	2,5E+06	1,1E+08	5,6E+07	5,3E+07	7,6E+07
d7	5	4,1E+07	1,1E+09	5,6E+08	1,8E+08	4,1E+08
d8	2	2,3E+07	3,2E+07	2,7E+07	4,5E+06	6,3E+06

*Anzahl der Tiere **Standardfehler ***Standardabweichung

Während des Versuchszeitraums von 90 Tagen lag die *M. suis*-Konzentration im Blut bei ID 13 zwischen $2,7 \times 10^4$ *M. suis*/ml (Tag 24 p.i.) und $2,0 \times 10^9$ *M. suis*/ml (Tag 42 p.i.) (Abbildung 17). An den Tagen 0, 2, 16, 64, 71, 78, 85 und 90 p.i. konnte keine *M. suis*-DNA im Blut von ID 13 nachgewiesen werden.

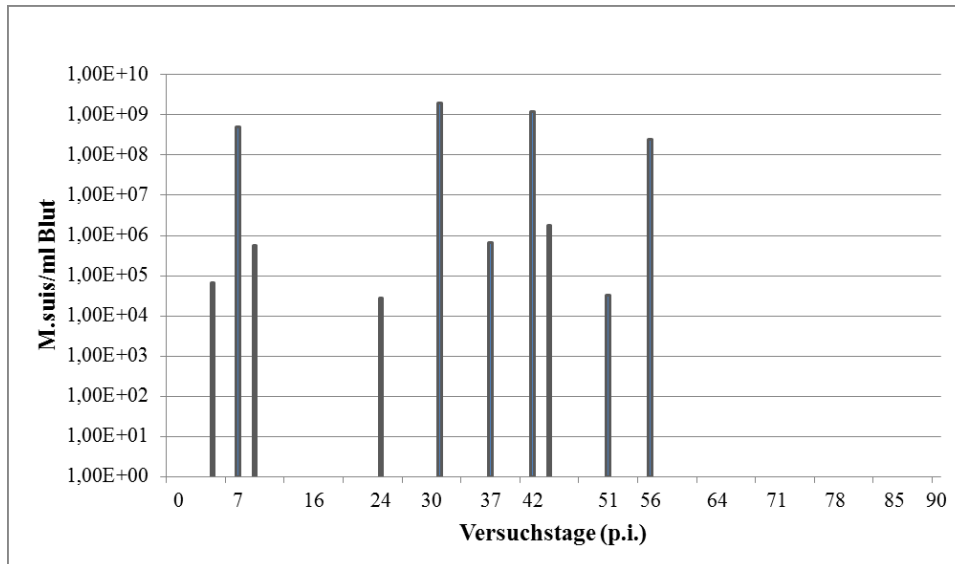


Abbildung 17: *M. suis*-Konzentration von ID 13 über den Versuchszeitraum von 90 Tagen

2.6. Korrelation zwischen der Erregermenge und den klinischen Parametern

Eine negative Korrelation zwischen der Erregermenge an Tag 4 p.i. und der Lebensdauer der Tiere (ID 8, 9, 10, 11, 12 und 14) konnte nachgewiesen werden. Abbildung 18 zeigt diesen Sachverhalt in Form eines Streudiagramms. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson lag bei -0,865 mit einer Signifikanz von $P = 0,026$.

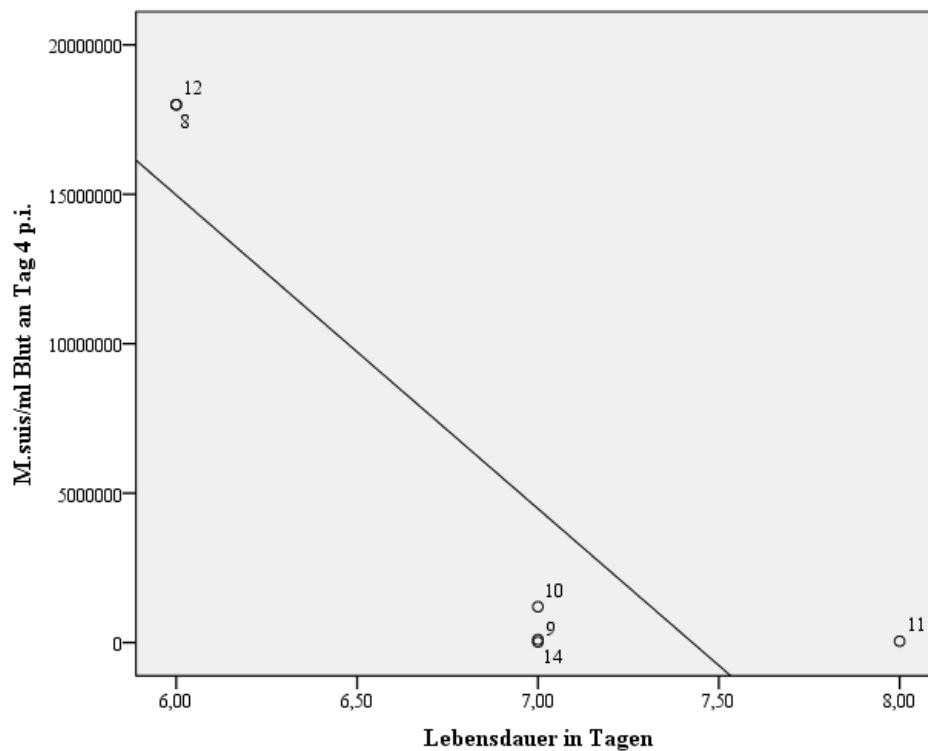


Abbildung 18: Korrelation zwischen der Erregermenge (*M. suis*/ml Blut) an Tag 4 p.i. und der Lebensdauer der splenektomierten, infizierten Tiere (Feldstammgruppe)

2.7. Korrelation zwischen der Erregermenge und den hämatologischen Parametern

Um den Einfluss von *M. suis* auf die hämatologischen Parameter darzustellen, wurde die Korrelation zwischen der Erregermenge und der Erythrozytenzahl sowie der Hämoglobinkonzentration und dem Hämatokrit berechnet.

Zwischen dem Anstieg der *M. suis*-Konzentration im Blut der splenektomierten, infizierten Tiere und der Erythrozytenzahl ab Tag 4 p.i. konnte eine Korrelation ($P < 0,05$) festgestellt werden (Abbildung 19, Tabelle 5). Keine Korrelation bestand hingegen zwischen der *M. suis*-Konzentration im Blut und den hämatologischen Parametern Hämoglobin und Hämatokrit (Tabelle 5).

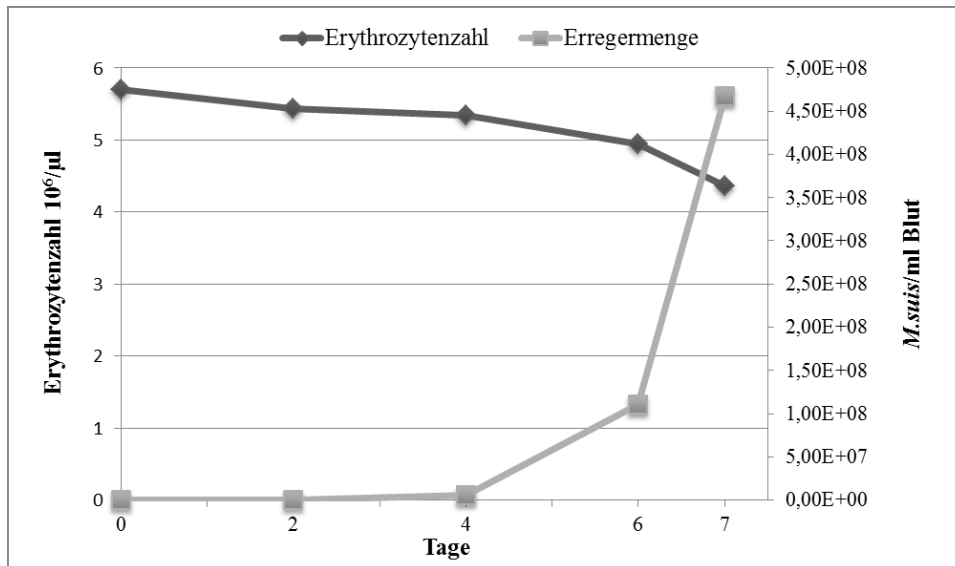


Abbildung 19: Korrelation zwischen der Erregermenge und dem Mittelwert der Erythrozytenzahl in den ersten 7 Tagen p.i.

Tabelle 5: Korrelation zwischen der Erregermenge und den hämatologischen Parametern Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit

Blutparameter	Statistische Analyse	Feldstammgruppe
Erythrozytenzahl	Korrelationskoeffizient	-,401
	Signifikanz	,072
	n	21
Hämoglobin	Korrelationskoeffizient	-,065
	Signifikanz	,780
	n	21
Hämatokrit	Korrelationskoeffizient	-,343
	Signifikanz	,128
	n	21

Korrelationskoeffizient nach *Spearman-Rho*

2.8. Korrelation zwischen der Erregermenge und den klinisch-chemischen Blutparametern

Ab Tag 6 p.i. war eine negative Korrelation ($P < 0,01$) zwischen der Erregermenge im Blut und der Blutglukosekonzentration bei den splenektomierten und infizierten Tieren der Feldstammgruppe nachweisbar. Ebenfalls konnte eine Korrelation ($P < 0,01$) zwischen der *M. suis*-Konzentration im Blut und der Bilirubinkonzentration bzw. dem Eisengehalt im Blut, respektive den Harnstoffwerten ($P < 0,05$) festgestellt werden (Tabelle 6, Abbildung 20).

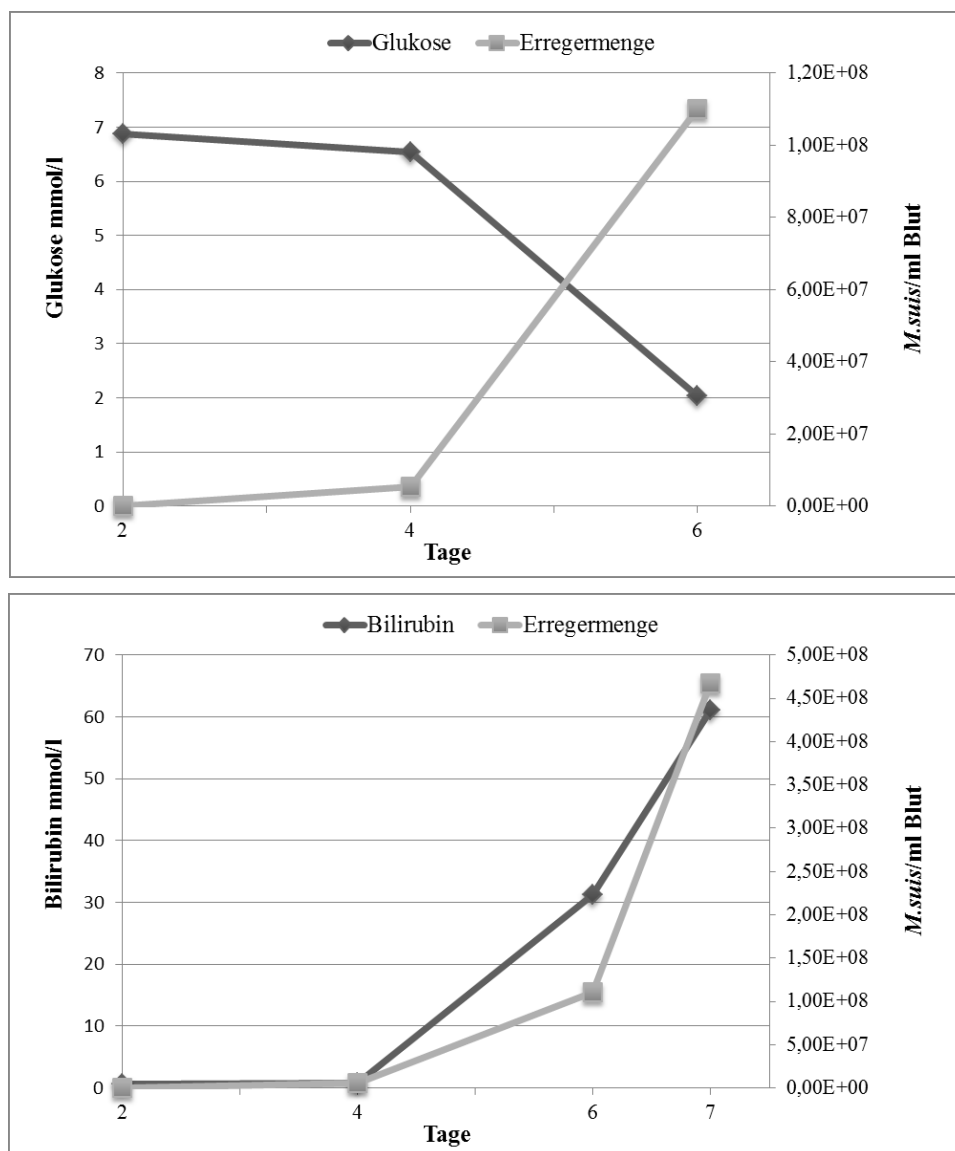


Abbildung 20: Korrelation zwischen der Erregermenge und den klinisch-chemischen Blutparametern Glukose und Bilirubin der splenektomierten, infizierten Tiere der Feldstammgruppe in den ersten 7 Tagen p.i.

Tabelle 6: Korrelation zwischen der Erregermenge im Blut und den klinisch-chemischen Blutparametern Glukose und Bilirubin

Blutparameter	Statistische Analyse	Feldstammgruppe
Glukose	Korrelationskoeffizient	-,623**
	Signifikanz	,003
	n	20
Bilirubin	Korrelationskoeffizient	,775**
	Signifikanz	,000
	n	20
Harnstoff	Korrelationskoeffizient	,494*
	Signifikanz	,027
	n	20
Kreatinin	Korrelationskoeffizient	,389
	Signifikanz	,090
	n	20
Eisen	Korrelationskoeffizient	-,586**
	Signifikanz	,007
	n	20

Spearman-Rho, *Signifikanzwert $P < 0,05$ **Signifikanzwert $P < 0,01$

2.9. Mikroskopischer Erregernachweis

Zusätzlich zur molekularbiologischen Untersuchung wurde ein mikroskopischer Erregernachweis in Akridinorange-gefärbten Blutaussstrichen zur Detektion von *M. suis* durchgeführt.

Splenektomierte, nicht infizierte Tiere (Kontrollgruppe)

Bei den Tieren der Kontrollgruppe konnte *M. suis* in Akridinorange-gefärbten Blutaussstrichen über den gesamten Versuchszeitraum von 90 Tage nicht

nachgewiesen werden.

Splenektomierte, infizierte Tiere (Feldstammgruppe)

An Tag 0 konnte *M. suis* in keinem der Blutausstriche der Feldstammgruppe nachgewiesen werden. Bei einem Tier (ID 8) wurde an Tag 2 p.i. *M. suis* bei der mikroskopischen Untersuchung detektiert. Am vierten Tag p.i. waren sechs von sieben Tieren (ID 8, 9, 10, 12, 13, 14) im mikroskopischen Erregernachweis *M. suis* positiv. Darüber hinaus konnte bei allen sieben Tieren an den Tagen 6, 7 und 8 p.i. *M. suis* in Akridinorange-gefärbten Blutausstrichen detektiert werden. Bei einem Tier (ID 13) erfolgte zudem an Tag 9 p.i. ein positiver Erregernachweis. Der mikroskopische Nachweis von *M. suis* im Akridinorange-gefärbten Blutausstrich gelang bei den sieben Tieren der Feldstammgruppe ab einer Erregermenge von $1,1 \times 10^4$ *M. suis*/ml Blut.

2.10. Nachweis von *M. suis* in Urin- und Tupferproben

Um potentielle Übertragungswege von *M. suis* zu identifizieren, wurden Urin, Nasen-, Speichel- und Vaginalsekrettupfer auf das Vorhandensein von *M. suis*-DNA mittels quantitativer PCR überprüft.

2.10.1. Urin

Splenektomierte, nicht infizierte Tiere (Kontrollgruppe)

In der quantitativen real-time PCR konnte im Urin der sieben Tiere der Kontrollgruppe über den gesamten Versuchszeitraum von 90 Tagen keine *M. suis*-DNA nachgewiesen werden.

Splenektomierte, infizierte Tiere (Feldstammgruppe)

In den ersten neun Tagen p.i. wurden von den Tieren der Feldstammgruppe insgesamt 13 Urinproben gesammelt und mittels Urinteststreifen und quantitativer PCR ausgewertet. Bei einem Tier (ID 14) konnte an Tag 7 p.i. eine Erregermenge von $5,5 \times 10^4$ *M. suis*/ml Urin bzw. $5,6 \times 10^4$ *M. suis*/ml Urinsediment in der quantitativen PCR detektiert werden. In der Urinprobe von diesem Tier wurden an Tag 7 p.i. Erythrozytenbestandteile nachgewiesen.

Von einem Tier (ID 13) wurden im weiteren Versuchsablauf bis zum Versuchsende an Tag 90 insgesamt weitere sechs Urinproben gesammelt und untersucht. Hierbei konnte an Tag 30 p.i. eine Erregermenge von $3,6 \times 10^4$ *M. suis*/ml Urin bzw. $2,6 \times 10^4$ *M. suis*/ml Urinsediment nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde an Tag 42 p.i. eine Erregermenge von $2,6 \times 10^4$ *M. suis*/ml Urin festgestellt. Im Urinsediment konnte an diesem Tag keine *M. suis*-DNA detektiert werden. An Tag 30 und 42 p.i. waren Erythrozytenbestandteile im Urin vorhanden.

2.10.2. Nasen-, Speichel- und Vaginalsekretupfer

Splenektomierte, nicht infizierte Tiere (Kontrollgruppe)

Über die gesamte Versuchsdauer von 90 Tagen konnte in keiner der Nasen-, Speichel- und Vaginalsekretupferproben der Tiere der Kontrollgruppe *M. suis*-DNA nachgewiesen werden.

Splenektomierte, infizierte Tiere (Feldstammgruppe)

Bei den Tieren der Feldstammgruppe konnte bei einem Tier (ID 13) an Tag 16 p.i. im Nasensekretupfer *M. suis*-DNA detektiert werden. Die Erregermenge lag hier bei $1,1 \times 10^4$ *M. suis*/Tupfer. Die Speichelsekret- und Vaginalsekretupferproben desselben Tages waren in der quantitativen PCR negativ. Die anderen Nasen-, Speichel- und Vaginalsekretupferproben der Tiere der Feldstammgruppe blieben über den gesamten Versuchszeitraum *M. suis*-negativ.

2.11. Humorale Immunantwort

In den ersten acht Tagen p.i. konnten bei den sieben Tieren der Feldstammgruppe keine *M. suis*-spezifischen Antikörper im HspA1-ELISA nachgewiesen werden.

Bei einem Tier (ID 13) konnten an den Tagen 42, 51, 64, 85 und 90 p.i. keine rHspA1-reaktive Antikörper im HspA1-ELISA detektiert werden (Abbildung 21).

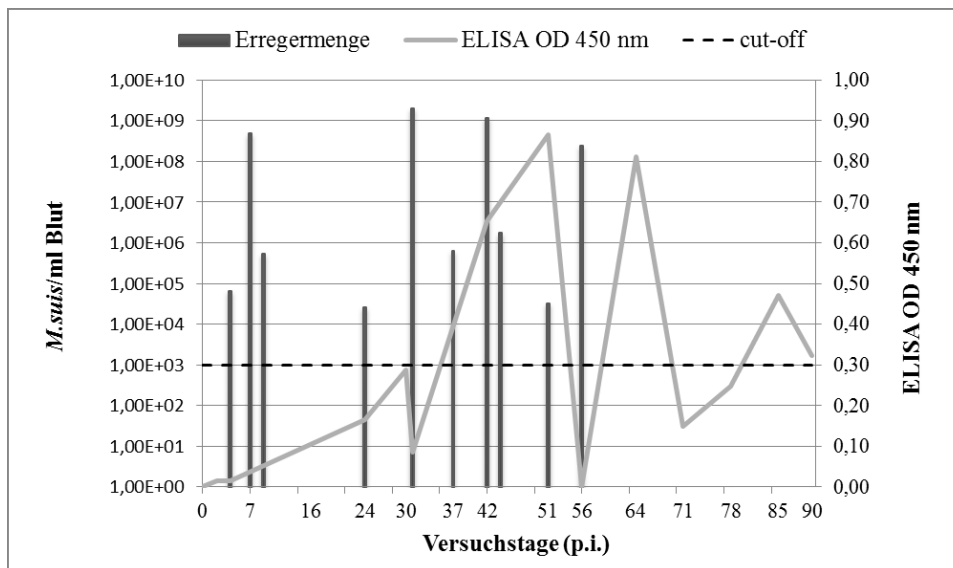


Abbildung 21: Darstellung der *M. suis*-Konzentration im Blut und der ELISA OD-Werte von ID 13 innerhalb des Versuchszeitraums von 90 Tagen

2.12. Untersuchung der Gewebestanzproben

Zur Erhebung von *M. suis*-induzierten Schädigungen an den Gefäßen der Endstrombahnen wurden Gewebestanzproben vom Ohrtrand entnommen und mikroskopisch untersucht.

Splenektomierte, nicht infizierte Tiere (Kontrollgruppe)

Die mikroskopische Untersuchung der Gewebestanzproben der splenektomierten, nicht infizierten Tiere zeigten an den Versuchstagen 0, 4, 7 und 9 keine Veränderungen oder Schädigungen des Gefäßendothels der kleinen Gefäße des Ohrandes.

Splenektomierte, infizierte Tiere (Feldstammgruppe)

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Gewebestanzproben der Feldstammgruppe konnten an Tag 7 p.i. Veränderungen in Form von Fibrinthromben an den kleinen Ohrtrandgefäßen bei einem Tier (ID 14) festgestellt werden (Abbildung 22, Abbildung 23).

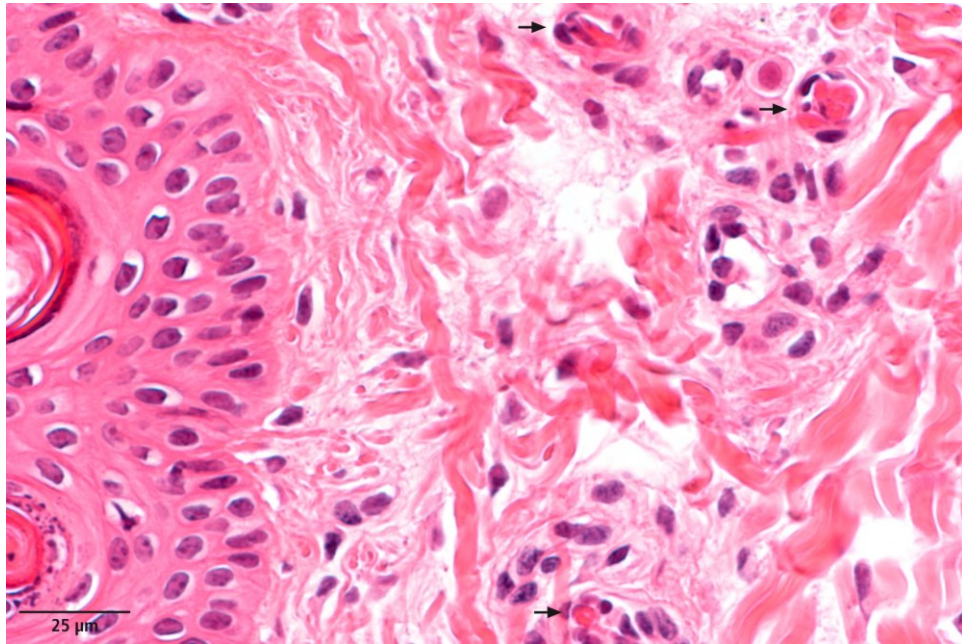


Bild: Prof. Dr. W. Hermanns, Institut der Tierpathologie der LMU München

Abbildung 22: Kleine Ohrrandgefäße mit Fibrinthromben von ID 14 an Tag 7 p.i. (markiert durch Pfeile), HE-Färbung

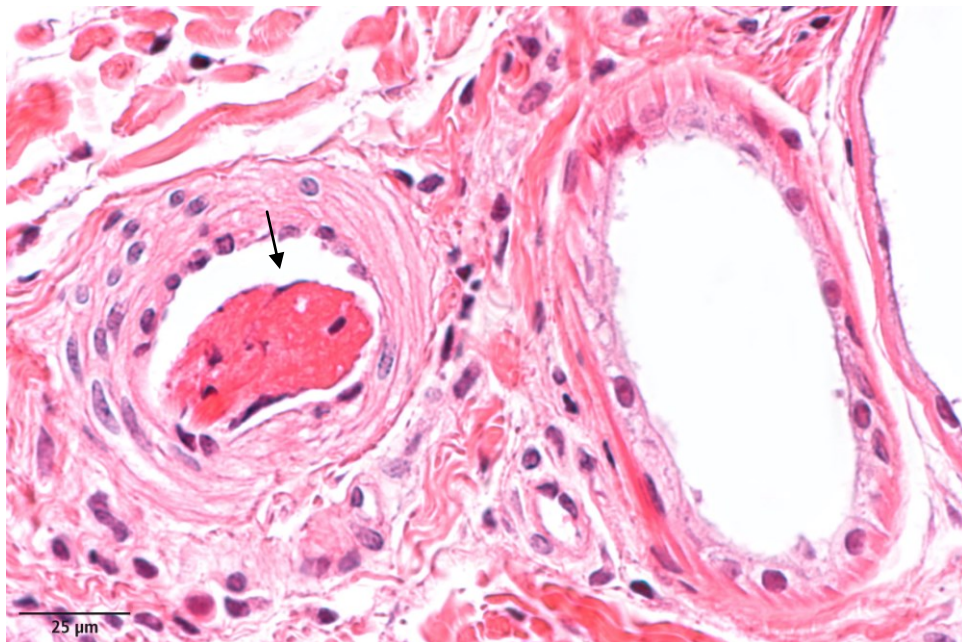


Bild: Prof. Dr. W. Hermanns, Institut der Tierpathologie der LMU München

Abbildung 23: Ohrrandgefäß mit Fibrinthrombus links im Bild von ID 14 an Tag 7 p.i. (markiert durch Pfeil)

2.13. Pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Untersuchungen

Splenektomierte, nicht infizierte Tiere (Kontrollgruppe)

An Versuchstag 90 wurden alle sieben Tiere der Kontrollgruppe getötet und pathologisch-anatomisch und pathologisch-histologisch untersucht. Bei einem Tier wurde ein Abszess im Unterkiefer diagnostiziert. Bei der Sektion der restlichen Tiere der Kontrollgruppe konnten keine pathologisch-anatomischen und pathologisch-histologischen Veränderungen erhoben werden.

Splenektomierte, infizierte Tiere (Feldstammgruppe)

Bei den sieben Tieren der Feldstammgruppe wurde nach dem Verenden bzw. nach der Tötung ebenfalls eine pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Untersuchung durchgeführt. Pathologisch-anatomisch zeigte sich bei sechs Tieren (ID 8, 9, 10, 11, 12 und 14) eine hochgradige Iktereanämie und eine mittel- bis hochgradige Aszites (Abbildung 24 und Abbildung 25). Darüber hinaus waren die peripheren Lymphknoten hyperplastisch. Bei drei Tieren (ID 11, 12 und 14) wurde ein hochgradiges Gallenblasenbettödem festgestellt (Abbildung 26). Morphologisch war außerdem bei allen sechs Tieren eine hochgradig vergrößerte Leber mit hellrot-gefleckten Farbaufhellungen zu erkennen (Abbildung 27). Die Lunge, die Niere, der Magen-/ Darmtrakt und das Herz der Tiere der Feldstammgruppe zeigten keine pathologisch-anatomischen Auffälligkeiten. Bei Tier 13 konnten bei der Sektion keine veränderten Organbefunde erhoben werden.



Abbildung 24: Gelbfärbung der Blutgefäße von ID 11

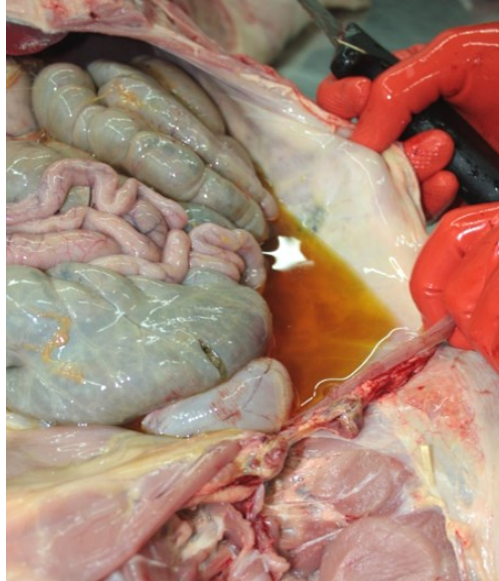


Abbildung 25: Aszites bei ID 11

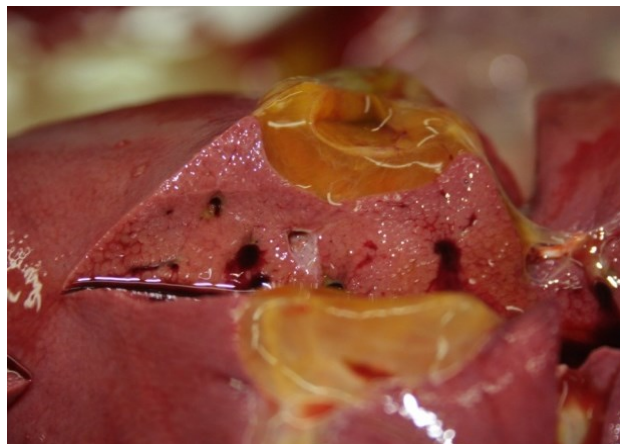


Abbildung 26: Gallenblasenbettödem ID 12



Abbildung 27: Herdförmige Aufhellungen der Leber von ID 11

Pathologisch-histologisch konnte bei den sechs Tieren (ID 8, 9, 10, 11, 12 und 14) der Feldstammgruppe Autolyse der Leber, mit verbreiteten band- bis mottenfraßartigen, peripherlobulären Parenchymnekrosen, festgestellt werden. Es wurde bei allen sechs Tieren eine mittel- bis hochgradige interstitielle Hepatitis diagnostiziert. Darüber hinaus war eine lymphozytäre, interstitielle Infiltration mit Beteiligung von eosinophilen Granulozyten vorhanden (Abbildung 28). Ein Tier (ID 8) wies eine geringgradige, eitrige Meningitis auf. Bei einem weiteren Tier (ID 9) wurden eine Meningitis und eine superfizielle Enzephalomyelitis diagnostiziert.

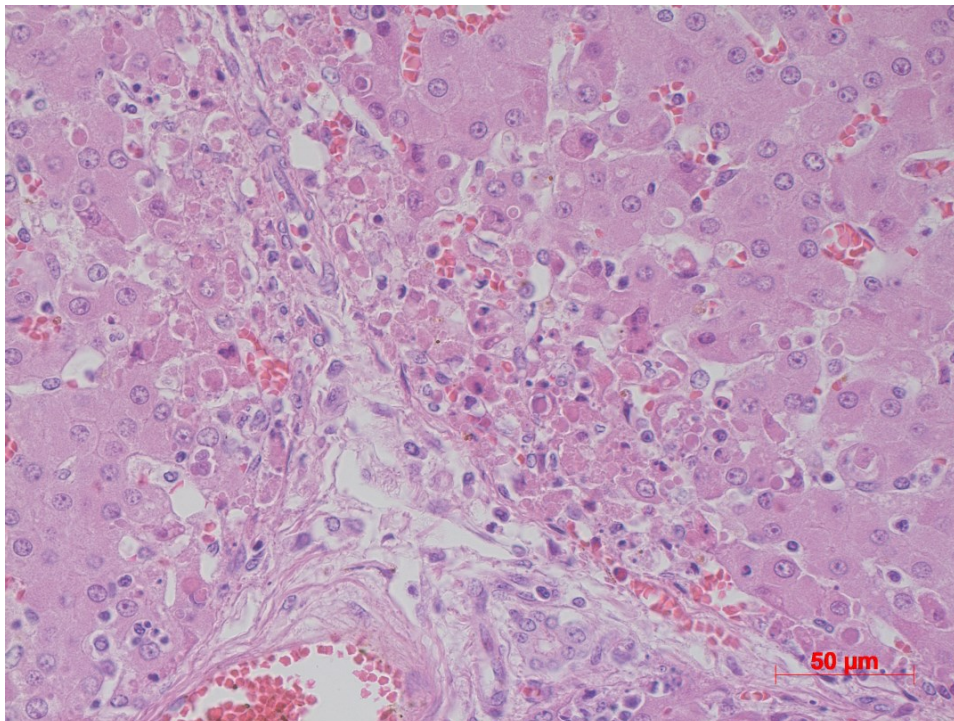


Bild: Dr. med. vet. habil. W. Breuer, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Abbildung 28: Peripherlobuläre Parenchymnekrosen der Leber von ID 14

2.13.1. Molekularbiologische Untersuchung der Gewebeproben

Zum Nachweis von *M. suis* in verschiedenen Organen (Leber, Klein- und Großhirn), wurden Gewebeproben entnommen und mittels quantitativer PCR untersucht.

In Leber, Klein- und Großhirn konnte bei sechs der sieben Tiere der Feldstammgruppe *M. suis*-DNA detektiert werden (Tabelle 7). Die höchsten

Erregermengen wurden mit einem Mittelwert von $1,85 \times 10^7$ *M. suis*/Probenansatz in der Leber nachgewiesen.

Bei ID 13 konnte keine *M. suis*-DNA in Leber, Klein- und Großhirn detektiert werden.

Tabelle 7: *M. suis* in Groß-, Kleinhirn und Leber der splenektomierten, infizierten Tiere

	Großhirn	Kleinhirn	Leber
Tier 8	$1,9 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6$	$1,8 \times 10^5$
Tier 9	$4,1 \times 10^5$	$4,4 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$
Tier 10	$1,7 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7$
Tier 11	$1,2 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^6$
Tier 12	$1,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$	$4,2 \times 10^6$
Tier 13	negativ	negativ	negativ
Tier 14	$3,4 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$

2.14. Bakteriologische und virologische Untersuchung

Zur Abklärung von Differentialdiagnosen bzw. zum Ausschluss möglicher Koinfektionen wurde bei allen Tieren eine molekularbiologische Untersuchung auf PCV-2, PRRSV (EU- und US-Typ), KSP, Influenza A, Hepatitis E und *Haemophilus parasuis* eingeleitet. Von Leber und Lunge wurde jeweils eine bakteriologische Untersuchung durchgeführt. Zudem erfolgte eine molekularbiologische Charakterisierung der *Escherichia coli*-Isolate mittels PCR. Darüber hinaus wurde das Blutserum auf Antikörper gegen elf verschiedene Leptospiren-Serovare mittels Mikroagglutinationstest untersucht.

Bei keinem der Tiere konnten Influenza-, Hepatitis E-, PRRSV-, PCV-2- und KSP- Virusnukleinsäuren nachgewiesen werden. Die bakteriologische Untersuchung verschiedener Organe auf Salmonellen verlief negativ. Bakteriologisch konnten bei ID 14 nicht hämolysierende *Escherichia coli* im Darm nachgewiesen werden. Die molekularbiologische Untersuchung der

isolierten *Escherichia coli* auf Virulenzfaktoren (Shigatoxine 2e, F18-Fimbrien) verlief negativ. Der Nachweis spezifischer DNA-Fragmente von *Haemophilus parasuis* inklusive potentiellm Virulenzmarker mittels PCR war negativ. Im Gehirn- und Serosatupfer von einem Tier der Feldstammgruppe (ID 9) wurde *Streptococcus suis* in geringgradiger Menge nachgewiesen, bei allen anderen Tieren war die bakteriologische Untersuchung auf *Streptococcus suis* negativ. Im Mikroagglutinationstest wurden keine Leptospiren-spezifischen Antikörper nachgewiesen.

V DISKUSSION

Experimentelle Infektionen spielen bei der Erforschung der Pathogenese von *M. suis*-Infektionen eine besondere Rolle, da das Bakterium *in vitro* bislang nicht kultiviert werden kann (HOELZLE et al., 2014). Dabei kommt in der Regel ein splenektomiertes Schweinmodell zum Einsatz, da dadurch ein akuter Krankheitsverlauf induziert werden kann (HOELZLE, 2008). Die Kombination von experimentellen Infektionen im splenektomierten Schweinmodell mit modernen molekularbiologischen Methoden lieferte in den letzten Jahren wichtige Erkenntnisse zu Pathomechanismen sowie zu möglichen Ausscheidungswegen von *M. suis* (FELDER et al., 2011; FELDER et al., 2012; SOKOLI et al., 2013; DIETZ et al., 2014; HOELZLE et al., 2014). Zudem wurde inzwischen nachgewiesen, dass es offensichtlich große Unterschiede zwischen *M. suis*-Isolaten hinsichtlich der Virulenz gibt (FELDER et al., 2011). Die in den letzten Jahren durchgeführten Studien im splenektomierten Schweinmodell beruhen hauptsächlich auf dem hochvirulenten und invasiven *M. suis*-Stamm KI3806 (DIETZ et al., 2014; HOELZLE et al., 2014; STADLER et al., 2014). In der vorliegenden Studie wurden daher die klinischen und labordiagnostischen Auswirkungen eines neuen *M. suis*-Feldstamms bei splenektomierten Schweinen untersucht. Mögliche Auswirkungen der Splenektomie auf klinische und labordiagnostische Parameter wurden anhand einer *M. suis*-negativen, splenektomierten Kontrollgruppe evaluiert. Außerdem wurden mögliche Ausscheidungswege über Urin, Nasen-, Speichel- und Vaginalsekret untersucht.

1 Klinischer Verlauf

Ein wichtiger Teilaspekt bei der Beurteilung der experimentellen Infektion mit einem neuen *M. suis*-Feldstamm ist im klinischen Verlauf zu sehen. Der neue Feldstamm erwies sich als hochvirulent, der klinische Verlauf der splenektomierten, infizierten Tiere war geprägt durch hochgradige klinische Veränderungen einer akuten IAP mit Ikterooanämie, Apathie, hoher innerer Körpertemperatur und Anorexie. Insgesamt war die Ausprägung der klinischen Anämie-Symptome vergleichbar mit denen einer Infektion mit dem hochpathogenen, invasiven *M. suis*-Stamm KI3806 (STADLER et al., 2014). Im

Gegensatz dazu konnten aber in der vorgestellten Studie bei fünf der sieben mit dem neuen Feldstamm infizierten Tiere zentralnervöse Störungen festgestellt werden. Bei zwei Tieren (ID 8 und ID 12) traten sogar hochgradige ZNS-Symptome, wie tonisch-klonische Krämpfe, Opisthotonus, Nystagmus und Seitenlage mit Ruderbewegungen auf. Außerdem zeigten beide Tiere Vomitus. Eine mögliche Ursache für die beobachtete ZNS-Symptomatik könnte die ab Tag 4 p.i. aufgetretene hochgradige Hypoglykämie sein.

Die Tiere ID 8 und ID 12, die an Tag 6 p.i. hochgradige ZNS-Symptome und Erbrechen zeigten, wiesen hochgradig reduzierte Blutglukosewerte von $< 2,2$ mmol/l auf. Eine Hypoglykämie führt zu einer Aktivierung des Sympathikus und infolge dessen zu Tachykardie und Zittern (LANG, 2013). Darüber hinaus ist die Versorgung des zentralen Nervensystems durch die fehlende Blutglukose gestört (LANG, 2013). Gegen die Hypoglykämie als mögliche Ursache für die starke Ausprägung der ZNS-Symptomatik spricht, dass bei STADLER et al. (2014) ebenfalls hochgradig reduzierte Blutglukosekonzentrationen bei splenektomierten, infizierten Tieren vorhanden waren, jedoch keine zentralnervösen Störungen beobachtet wurden. Zudem spielt möglicherweise der Blutglukosegehalt für die Ausprägung der klinischen Symptomatik und die Überlebensdauer der Tiere eine entscheidende Rolle. Bei ID 13, dem Tier das den ersten Anfall überlebt hat, sank der Glukosegehalt im Blut während der ersten 9 Tage p.i. nicht unter 5 mmol/l und die klinischen Symptome waren weniger stark ausgeprägt als bei den anderen Tieren der Feldstammgruppe.

Eine weitere mögliche Ursache für die ZNS-Symptomatik könnte zudem der schnelle Anstieg der inneren Körpertemperatur ab Tag 6 p.i. sein. Die Körpertemperatur der Tiere der Feldstammgruppe stieg innerhalb weniger Stunden um 3° C an. Die ZNS-Symptome wurden in der vorliegenden Studie vor allem zum Zeitpunkt der höchsten inneren Körpertemperatur beschrieben. In der Humanmedizin wird von tonisch-klonischen Fieberkrämpfen bei plötzlich hoch ansteigender innerer Körpertemperatur berichtet (SCHMIDT und ELGER, 2002; SILBERNAGL, 2013b). Darüber hinaus kann es bei einer Hyperthermie zur Schädigung der Blut-Hirn-Schranke kommen, da die beteiligten Zytokine IL-1, TNF- α und insbesondere IL-6 durch Aktivierung von Endothelzellen zu einer erhöhten Permeabilität führen (PETER, 2006; GÖBEL und KASPERS, 2010).

Die infrage kommenden differentialdiagnostischen infektiösen Ursachen der

ZNS-Symptome bei Tieren dieser Altersgruppe wie *Haemophilus parasuis* und v.a. *Streptococcus suis* wurden abgeklärt. In der vorliegenden Studie wurde lediglich in Gehirn und Serosa von ID 9 *Streptococcus suis* bakteriologisch nachgewiesen, jedoch nur in geringer Menge. Alle anderen Tiere waren dagegen negativ. Zusätzlich wurde das verwendete Inokulum nach Voranreicherung bakteriologisch untersucht. Auch hier konnte *Streptococcus suis* nicht nachgewiesen werden.

Ein sehr interessanter Befund der vorliegenden Studie war die bei allen Tieren mit hochgradiger zentralnervöser Symptomatik diagnostizierte Hepatitis. Die dabei festgestellten massiven morphologischen und histologischen Veränderungen der Leber mit Autolyse und den band- bis mottenfraßartigen, peripherlobulären Parenchymnekrosen wurden bislang bei *M. suis*-Infektionen noch nicht beschrieben. Aus der Humanmedizin dagegen gibt es Berichte über Mykoplasmen-induzierte Hepatitiden (ROMERO-GOMEZ et al., 2006; SHIN et al., 2012). SHIN et al. (2012) und ROMERO-GOMEZ et al. (2006) beschrieben Leberfunktionsstörungen mit morphologischen Veränderungen der Zellstruktur der Hepatozyten. ROMERO-GOMEZ et al. (2006) diskutierten eine immunmedierte Ätiologie, die auch eine mögliche Erklärung für die peripherlobuläre Leberschädigungen durch *M. suis* in der vorliegenden Studie darstellen könnten. Andererseits könnte auch eine toxische Komponente als Ursache für die massiven Leberveränderungen in Frage kommen (ROMERO-GOMEZ et al., 2006). Zwei Tiere zeigten in eigenen Untersuchungen neben den hochgradigen ZNS-Symptomen Vomitus, was auf einen toxischen Vorgang hindeuten könnte.

ID 13 war das einzige Tier der splenektomierten, infizierten Feldstammgruppe, das den ersten Anfall überlebt hat. Es zeigte in regelmäßigen Abständen über den gesamten Versuchszeitraum von 90 Tagen klinische Anzeichen einer IAP. Bei dem dritten und vierten akuten Anfall der IAP war eine hochgradige klinische Symptomatik zu beobachten. In der vorliegenden Untersuchung konnte somit die in der Literatur beschriebene Abnahme der Intensität der klinischen Symptome von Anfall zu Anfall nicht bestätigt werden (HEINRITZI, 1990a). Die in der Literatur beschriebene, mit zunehmender Infektionsdauer einhergehende Verlängerung der Intervalle zwischen den Anfällen, konnte in der vorliegenden Studie erst nach dem fünften Anfall (Tag 55 p.i.) festgestellt werden (HEINRITZI, 1990a).

Bei ID 13 wurden ab Tag 40 p.i. Hautveränderungen in Form eines Morbus maculosus an den Hinterextremitäten diagnostiziert. Bei den anderen infizierten Tieren traten bis zum Verenden an Tag 8 p.i. keine Hautveränderungen auf. Ähnliche Veränderungen der Haut wie hämorrhagische Diathesen und Urtikaria wurden auch in der Infektionsstudie mit dem hochpathogenen, invasiven KI3806-Stamm bei nicht-splenektomierten Schweinen von STADLER et al. (2014) bereits ab Tag 17 p.i. beschrieben. Andere Studien beschrieben derartige Hautveränderungen bei experimentellen *M. suis*-Infektionen von splenektomierten Schweinen hingegen erst ab der zehnten Woche p.i. (HEINRITZI, 1990a). HEINRITZI (1990a) führte aufgrund der reduzierten Thrombozytenzahlen und einer verlängerten Thromboplastinzeit die Einblutungen in die Haut auf eine Verbrauchskoagulopathie zurück. Neueren Untersuchungen von SOKOLI et al. (2013) zufolge konnte *M. suis* elektronenmikroskopisch vereinzelt auf Gefäßendothelien nachgewiesen werden. Als mögliche Ursache der intravasalen Gerinnungsaktivierung mit konsekutiver Verbrauchskoagulopathie, die sich in den infizierten Schweinen als Hämostasestörung mit erhöhter Blutungsneigung (hämorrhagische Diathese) darstellt, wird diese massive Endothelzellschädigung diskutiert (PLANK und HEINRITZI, 1990; HOELZLE et al., 2011).

In der Humanmedizin wird als Morbus maculosus Werlhof eine Autoimmunkrankheit bezeichnet, die durch den Abbau der Thrombozyten petechiale Blutungen in Haut und Schleimhaut hervorruft (IMBACH et al., 2006). Eine erhöhte Permeabilität der Endothelwand als Folge immunmediierter Entzündungen der Blutgefäße mit dem klinischen Bild des Morbus maculosus equorum wird darüber hinaus in der Pferdemedizin beschrieben (FEY, 2006). Bei der Pathogenese von *M. suis* wird den Autoimmunreaktionen eine wichtige Rolle zugesprochen. Ob sie auch als Ursache für die beschriebenen Hautveränderungen angesehen werden können, bedarf weiterer Untersuchungen (HOELZLE, 2008; STADLER et al., 2014). Das frühe Auftreten der Hautveränderungen bei den splenektomierten Feldstammtieren in der vorliegenden Studie könnte für einen *M. suis*-Stamm sprechen, der die Endothelzellen der Gefäße bereits zu einem früheren Zeitpunkt soweit geschädigt hat, dass Blut austreten kann.

Die in vorliegender Studie festgestellte Inkubationszeit von sechs Tagen bewegt sich im Bereich der bereits in früheren Untersuchungen bei experimentell infizierten, splenektomierten Schweinen beschriebenen Inkubationszeiten von

durchschnittlich sieben Tagen (HEINRITZI, 1990a) bzw. fünf Tagen (GROEBEL et al., 2009; SOKOLI et al., 2013). Die Inkubationszeit kann abhängig sein von der Infektionsdosis, der Virulenz des *M. suis*-Stamms und der Empfänglichkeit des Wirtstieres (HOELZLE, 2008). In vorliegender Studie wurden die Tiere mit 1,5 ml *M. suis*-haltigem Blut mit einer *M. suis*-Konzentration von $1,8 \times 10^7$ *M. suis*/ml Blut subkutan infiziert. Bei dem Infektionsversuch von STADLER et al. (2014) wurde hingegen eine höhere Infektionsdosis (1 ml Blut, 10^8 *M. suis*/ml Blut) verwendet. Die kürzere Inkubationsdauer bei STADLER et al. (2014) könnte somit neben der höheren Virulenz des invasiven Isolats KI3806 auch durch die höhere Infektionsdosis bedingt sein.

Der bei JANNASCH (2014) beschriebene Zusammenhang zwischen der Erregermenge und den klinischen Symptomen der splenektomierten, mit dem *M. suis*-Stamm KI3806 infizierten Versuchstiere konnte auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Die beiden Tiere (ID 8 und ID 12), die an Tag 4 p.i. bereits mit $1,8 \times 10^7$ *M. suis*/ml Blut hochgradig bakteriämisch waren, verendeten bereits sechs Tage nach der experimentellen Infektion. Auch bei den restlichen Tieren war ein Zusammenhang zwischen der Erregermenge im Blut an Tag 4 p.i. und der Überlebensdauer der Tiere feststellbar. Der Zusammenhang zwischen der *M. suis*-Konzentration im Blut und dem klinischen Bild der IAP wird darüber hinaus bei dem chronischen Krankheitsverlauf von ID 13 deutlich. An den Tagen 31 p.i. und 42 p.i. lag der Gesamtscore der klinischen Untersuchung bei sieben Punkten. Die *M. suis*-Konzentration im Blut erreichte Werte von $2,0 \times 10^9$ *M. suis*/ml Blut (Tag 31 p.i.) sowie $1,2 \times 10^9$ *M. suis*/ml Blut (Tag 42 p.i.). Von Tag 64 p.i. bis Tag 90 p.i. konnte keine *M. suis*-DNA im Blut von ID 13 nachgewiesen werden. Auch der klinische Gesamtscore lag in diesem Zeitraum bei null Punkten.

Bei den Untersuchungen von STADLER et al. (2014) mit dem invasiven und hochvirulenten *M. suis*-Stamm KI3806 konnte an Tag 2 p.i. bereits bei allen splenektomierten Tieren *M. suis*-DNA nachgewiesen werden. Zudem wiesen die Tiere in dieser Studie an Tag 4 p.i. mit einem Mittelwert der Erregermenge von $1,1 \times 10^9$ *M. suis*/ml Blut (STADLER et al., 2014) eine deutlich höhere *M. suis*-Konzentration im Blut auf. In der vorliegenden Studie lag die Erregermenge an Tag 4 p.i. ($5,3 \times 10^6$ *M. suis*/ml Blut) deutlich niedriger als bei der Studie von STADLER et al. (2014) ($1,1 \times 10^9$ *M. suis*/ml Blut).

2 Auswirkungen von *Mycoplasma suis* auf die hämatologischen Parameter

In der vorliegenden Studie konnte bei den Tieren der Kontrollgruppe während der ersten vier Versuchstage eine Abnahme der Blutparameter Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit innerhalb des Referenzbereichs festgestellt werden. Der Abfall der hämatologischen Parameter könnte durch den Blutverlust während der Splenektomie und dem sich daraus ergebenden Fehlen der Milz als Speicherorgan begründet sein.

Bei allen infizierten Tieren konnte ab Tag 6 p.i. das typische Bild einer normochromen, normozytären Anämie mit einem hochgradigen Abfall der Erythrozytenzahl, des Hämoglobins und des Hämokrits festgestellt werden. Dabei zeigte sich, wie auch in den Studien von STADLER et al. (2014) und HOELZLE et al. (2009), eine signifikante Korrelation zwischen dem Abfall der hämatologischen Blutparameter und der Erregermenge; die Erregermenge im Blut stieg mit dem Schweregrad der Anämie an.

Erwartungsgemäß entwickelten die Tiere im Laufe der experimentellen Infektion zwischen Tag 2 und 7 p.i. eine Leukozytose mit einem Mittelwert der Leukozyten zwischen $18,03 \times 10^3/\mu\text{L}$ und $23,87 \times 10^3/\mu\text{L}$. Zum Zeitpunkt des Beginns der akuten IAP an Tag 6 p.i. entwickelten die Tiere eine Leukopenie. Während einer experimentellen *M. suis*-Infektion wurde auch von HEINRITZI et al. (1984) die Leukozytose beschrieben, dagegen finden sich in der Literatur keine Berichte über eine Leukopenie während einer *M. suis*-Infektion. Lediglich ZACHARY und BASGALL (1985) konnten *in vitro* eine Reduktion der T-Zell-vermittelten Immunantwort kurz nach dem Höhepunkte der *M. suis*-Bakteriämie nachweisen. Zudem geht man davon aus, dass *M. suis* immunsupprimierend wirkt und somit die Empfänglichkeit für andere bakterielle und virale Infektionen v.a. im Respirations- und Verdauungstrakt erhöht (HOELZLE, 2008; HOELZLE et al., 2011). Über die Art der Interaktion zwischen *M. suis* und den Leukozyten ist bisher nichts bekannt. Für andere Mykoplasmen wie *M. bovis* konnte aber nachgewiesen werden, dass die Bakterien die Lymphozyten-Proliferation inhibieren und in verschiedene Subpopulationen invadieren können (VAN DER MERWE et al., 2010).

3 Auswirkungen von *Mycoplasma suis* auf die klinisch-chemischen Blutparameter

Die Blutglukose-, Bilirubin- und Harnstoffkonzentrationen im Blut der splenektomierten, nicht infizierten Tiere (Kontrollgruppe) verliefen während des gesamten Beobachtungszeitraumes im Referenzbereich.

Alle infizierten Tiere entwickelten eine hochgradige Hypoglykämie. Dieser massive Abfall der Blutglukosekonzentration ist typisch für eine akute IAP und wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (HEINRITZI et al., 1990a; NONAKA et al., 1996; STADLER et al., 2014). Die Erregermenge stieg parallel zum Abfall der Blutglukosewerte der Feldstammgruppe an. Auch in anderen Studien wurde der Zusammenhang zwischen der Erregermenge und der Blutglukosekonzentration beschrieben (PETERANDERL, 1988; HEINRITZI et al., 1990a; STADLER et al., 2014). Genomsequenzanalysen konnten inzwischen belegen, dass *M. suis* Glukose als Hauptenergiequelle nutzt und alle notwendigen Enzyme für die Glukose-Aufnahme und die Verstoffwechslung besitzt (OEHLERKING et al., 2011). Durch den raschen Anstieg der Erregermenge im Blut bei akuter IAP steigt parallel dazu der Glukoseverbrauch durch *M. suis* an und das Wirtstier kann offensichtlich der daraus resultierenden, hochgradigen Hypoglykämie durch Glukoneogenese nicht in ausreichender Form entgegenwirken.

Bei drei splenektomierten, infizierten Tieren (ID 8, ID 10 und ID 12) war bis Tag 7 p.i. ein hochgradiger Anstieg der Harnstoffkonzentration zu erkennen. Die infolge einer *M. suis*-Infektion induzierten Mikrothromben in den Gefäßen könnten für den Anstieg der Harnstoffkonzentration verantwortlich sein. Die Arterien der Niere sind Endarterien und haben keine Verbindungen untereinander, daher ist die Gefahr von Infarkten der Endarterien bei der Niere hoch (GILLE, 2008). Außerdem könnte, da die Tiere während der akuten IAP kein Futter und kein Wasser mehr aufnehmen, eine Dehydratation die Ursache für die hohen Harnstoffwerte darstellen.

Bei zwei Tieren (ID 8 und ID 12) war bereits an Tag 4 p.i. ein massiver Anstieg der Bilirubinkonzentration zu verzeichnen. Laut HEINRITZI (1990a) ist zum Zeitpunkt der stärksten Hämolyse (kurz vor dem Krankheitshöhepunkt) ein Anstieg der Bilirubinkonzentration im Blut nachweisbar. Die hochgradige

Ikterooanämie, die klinisch bei allen sieben Tieren der Feldstammgruppe zu erkennen war, war zum einen durch die massive Hämolyse begründet. Zum anderen könnte der Ikterus bzw. der Anstieg der Bilirubinkonzentration Folge der hochgradigen Leberschädigung sein, die sich in Form von mottenfraßartigen, peripherlobulären Parenchymnekrosen äußert.

Die Eisenkonzentration im Blut der splenektomierten, infizierten Tiere sank bis Tag 6 p.i. stark ab. Beim chronischen Krankheitsverlauf von Tier ID 13 war zudem beim vierten und fünften Anfall (Tag 42 und 56 p.i.) ein Abfall der Eisenkonzentration im Blut unterhalb des Referenzbereichs zu beobachten. Nach der Therapie konnte wieder ein Anstieg der Eisenkonzentration auf Werte im Referenzbereich gemessen werden. Auch HEINRITZI (1984b) beschrieb einen Abfall der Serumeisenkonzentration bis zum Zeitpunkt des Krankheitshöhepunktes. Aufgrund des Eisenmangels wird gespeichertes Eisen aus den Speicherorganen abgerufen, was dann nach der Therapie wieder zu einem schnellen Anstieg der Eisenkonzentration im Blut führt (HEINRITZI, 1984b).

4 Auswirkungen von *Mycoplasma suis* auf die Blutgaswerte

Beim ersten (Tag 6 p.i.) und vierten akuten Anfall (Tag 42 p.i.) von Tier ID 13 konnte eine respiratorische Azidose im Blut festgestellt werden. Wie auch in der Literatur beschrieben, kam es zu einem Abfall des pH-Werts und der Bikarbonatkonzentration, sowie zu einem Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks (HEINRITZI et al., 1990d). An den Tagen 20 p.i., 31 p.i. und 56 p.i. konnten diese Untersuchungen hingegen nicht bestätigt werden. Bei der Blutentnahme bei ID 13 wurde meist Mischblut gewonnen, was dazu führen könnte, dass die Ergebnisse nicht mit den Untersuchungen anderer Studien verglichen werden können, bei denen venöses Blut verwendet wurde (HEINRITZI, 1990a).

5 Mikroskopischer Erregernachweis

Im Akridinorange-gefärbten Blutausschlag gelang der mikroskopische Nachweis von *M. suis* bei den sieben Tieren der Feldstammgruppe bereits ab einer Erregermenge von $1,1 \times 10^4$ M. suis/ml Blut. In der Studie von (RITZMANN et

al., 2009) konnte *M. suis* erst ab einer Konzentration von $1,0 \times 10^5$ *M. suis*/ml Blut in Akridinorange-gefärbten Blutausstrichen nachgewiesen werden. In der vorliegenden Studie wurden splenektomierte, experimentell infizierte Tiere verwendet, während die Untersuchungen von RITZMANN et al. (2009) an nicht splenektomierten, infizierten Tieren stattfand.

6 *Mycoplasma suis*-Konzentration

6.1. *M. suis*-Konzentration im Urin

In dieser Studie wurden von den Tieren der Feldstammgruppe insgesamt 13 Urinproben gesammelt und ausgewertet. Weitere sechs Urinproben wurden von ID 13 während des weiteren Versuchszeitraums von 90 Tagen untersucht. Bei insgesamt drei Urinproben von zwei Tieren (ID 13 und ID 14) konnte *M. suis*-DNA im Urin detektiert werden. Die Erregermenge lag zwischen $2,6 \times 10^4$ und $5,6 \times 10^4$ *M. suis*/ml Urin. In den Urinproben beider Tiere wurden Erythrozytenbestandteile nachgewiesen.

In der vorliegenden Studie konnte demnach wie bei den Untersuchungen von HEINRITZI (1992) *M. suis* nur in Urinproben nachgewiesen werden, die Blutbestandteile enthielten.

Im Gegensatz dazu beschrieben DIETZ et al. (2014) den Nachweis von *M. suis*-DNA in Urinproben, die keine Blutbestandteile beinhalteten. In der letztgenannten Studie wurde in 100 % der Urinproben der Tiere an Tag 6 p.i. *M. suis*-DNA nachgewiesen. Die Erregermenge lag zwischen $4,7 \times 10^2$ und $6,3 \times 10^5$ *M. suis*/ml Urin. Somit könnte die Infektion von *M. suis* nicht nur iatrogenen bzw. durch kleine Verletzungen erfolgen, sondern möglicherweise auch durch die orale Aufnahme von Urin.

6.2. *M. suis*-Konzentration im Nasen-, Speichel- und Vaginalsekretupfer

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Studie die mögliche Ausscheidung von *M. suis* über Nasen- und Vaginalsekret sowie Speichel untersucht. Es konnte dabei keine kontinuierliche Ausscheidung von *M. suis* über das Nasen-, Speichel-

oder Vaginalsekret nachgewiesen werden. *M. suis*-DNA konnte lediglich in einem Nasensekretupfer von ID 13 an Tag 16 p.i. detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt war jedoch keine *M. suis*-DNA im Blut nachweisbar. Diese Befunde weisen darauf hin, dass eine Ausscheidung über das Nasensekret nicht nur zum Zeitpunkt der Bakteriämie erfolgt. In der Studie von DIETZ et al. (2014) konnte bei allen splenektomierten, infizierten Tieren *M. suis*-DNA zeitgleich in den Tupfern und im Blut nachgewiesen werden. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der *M. suis*-Konzentration im Blut und dem Nachweis in den Tupferproben festgestellt werden. Kein Zusammenhang zwischen der *M. suis*-Konzentration im Blut und dem Nachweis in den Tupferproben war hingegen bei den nicht-splenektomierten und infizierten Tieren zu erkennen. Mögliche Ursache für die geringe Nachweisrate von *M. suis* DNA in Tupferproben in der vorliegenden Untersuchung könnte die Erregermenge im Blut, die niedriger war als bei den Infektionsversuchen von DIETZ et al. (2014), sein. Außerdem waren alle sieben Tiere der Feldstammgruppe an Tag 6 p.i. *M. suis*-positiv, bei DIETZ et al. (2014) bereits an Tag 2 p.i., was eine schnellere Erregervermehrung vermuten lässt.

6.3. *M. suis*-Verteilung in den Organen

In Leber, Groß- und Kleinhirn konnte *M. suis*-DNA bei sechs der sieben splenektomierten, infizierten Tiere detektiert werden. Die sechs Tiere (ID 8, 9, 10, 11, 12 und 14) wiesen am Tag des Verendens bzw. der Tötung eine *M. suis*-Konzentration im Blut von $2,5 \times 10^6$ und $1,1 \times 10^9$ *M. suis*/ml Blut auf. Bei Tier ID 13 war hingegen weder in Leber noch in Groß- und Kleinhirn *M. suis*-DNA in der real-time PCR detektierbar. Zu diesem Zeitpunkt konnte auch keine *M. suis*-DNA im Blut nachgewiesen werden. Die Blutbeimengung bei der Organentnahme bzw. die Blutversorgung der Organe könnte möglicherweise Grund für den Nachweis von *M. suis* in den Organproben sein. In der Studie von TASKER et al. (2009) konnte zum Zeitpunkt einer hohen *Mycoplasma haemofelis*-Konzentration im Blut *Mycoplasma haemofelis*-DNA in allen Organen nachgewiesen werden. Hingegen konnte in der letztgenannten Studie während der niedrigen Bakteriämiephase *M. haemofelis*-DNA nur in wenigen Organen detektiert werden. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen der Erregermenge im Blut und dem Nachweis von *M. suis* in den Organen besteht.

Darüber hinaus sind bislang nur die Erythrozyten und Endothelzellen als Wirtszellen von *M. suis* bekannt. Durch weitere Nachweismethoden wie z. B. die Immunhistochemie könnten möglicherweise weitere Zellen als Wirtszellen von *M. suis* identifiziert werden.

7 Humorale Immunantwort

Im HspA1-ELISA konnten bei den sieben Tieren der Feldstammgruppe in den ersten acht Tagen p.i. keine *M. suis*-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Die Tiere starben bzw. wurden getötet, bevor eine humorale Immunantwort messbar war. Bei ID 13 wurden im weiteren Versuchsverlauf an den Tagen 42, 51, 64, 85 und 90 p.i. rHspA1-reaktive Antikörper nachgewiesen. Bei den Untersuchungen von HOELZLE et al. (2009) und JANNASCH (2014) wurde bereits ab dem siebten Tag p.i. eine humorale Immunantwort festgestellt, was mit der höheren *M. suis*-Konzentration im Blut und der Virulenz des Stammes bei JANNASCH (2014) begründet werden könnte.

8 Auswirkungen von *Mycoplasma suis* auf die Endothelzellen

Um die Auswirkungen von *M. suis* auf die Endothelzellen in den Endstrombahnen der Peripherie während des Infektionsverlaufs mit dem *M. suis*-Feldstamm zu untersuchen, wurden Gewebestanzproben am Ohrrand der Tiere entnommen.

Tier ID 13 zeigte ab Tag 40 p.i. hämorrhagische Diathesen in Form von Ekchymosen, was auf eine Schädigung der Endothelzellen durch *M. suis* und einen daraus resultierenden Blutaustritt aus den Gefäßen hinweisen könnte. Erste Anhaltspunkte, dass *M. suis* mit Endothelzellen interagiert, dort zu massiven Schädigungen führt und somit möglicherweise das klinische Bild einer hämorrhagischen Diathese, des Morbus maculosus, induziert, wurden erst kürzlich in der Studie von SOKOLI et al. (2013) publiziert. In dieser Studie (SOKOLI et al., 2013) wurden am Versuchsende nach Tötung Blutgefäße, abdominale Arterien und Venen der infizierten Schweine entnommen und mikroskopisch mit den Blutgefäßen von gesunden Tieren verglichen. Diese Tiere

wurden mit dem hochpathogenen, invasiven *M. suis*-Stamm KI3806 infiziert (SOKOLI et al., 2013). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Endothelien bei Infektionen mit dem invasiven *M. suis*-Stamm KI3806 hochgradig verändert waren (SOKOLI et al., 2013). Die Untersuchungen zeigten die Interaktion zwischen den hämotrophen Mykoplasmen und dem endothelialen Zytoskelett (SOKOLI et al., 2013). Diese Interaktion zwischen *M. suis* und den Wirtsendothelien könnte Ursache für das klinische Bild des Morbus maculosus sein.

Bis dato liegen keine publizierten Daten und Untersuchungen zur Endothelzellschädigung vor der Tötung der Tiere vor. Deshalb wurden in dieser Studie Gewebestanzproben während des Infektionsverlaufs entnommen und mikroskopisch auf Endothelzellschädigungen untersucht.

Bei ID Tier 14 konnten an Tag 7 p.i. Veränderungen an den kleinen peripheren Gefäßen des Ohrrandes in Form von Fibrinthromben festgestellt werden. In den Studien von RICHARDSON et al. (1984) und WEISSENBACHER-LANG et al. (2012) konnten ähnliche mikroskopische Befunde an den Läsionen der Ohren von an Porcine ear necrosis syndrome (PENS) erkrankten Schweinen diagnostiziert werden. Die mikroskopischen Befunde der vorliegenden Studie könnten daher auf eine Schädigung der Ohrrandgefäße durch *M. suis* hinweisen.

9 Pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Untersuchungsergebnisse

Morphologisch sowie histologisch wurden bei den Tieren der Feldstammgruppe neben Aszites und Iktereanämie, ebenso hochgradige Leberveränderungen diagnostiziert.

Bei ID 13 war, im Gegensatz zu den anderen sechs Tieren der splenektomierten, infizierten Gruppe, die pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Untersuchung der Leber unauffällig. Der Grund hierfür könnte sein, dass die sechs Tiere (ID 8, 9, 10, 11, 12 und 14) während der akuten IAP getötet wurden bzw. verendet sind und ID 13 nach Ablauf des Versuchszeitraums von 90 Tagen ohne klinische Symptome einer IAP getötet wurde. Die Nekrose der zentralen Leberläppchen ist bei der IAP durch Hypoxie, als Folge der Anämie, bedingt

(THIEL, 1983). Hingegen weisen peripherlobuläre Nekrosen der Leber auf eine direkt wirkende, toxische Komponente hin. Beispielsweise zeigten die Tiere bei einer Intoxikation mit Aflatoxinen pathomorphologische Veränderungen wie Ikterus, Aszites, Gallenblasenwandödem und gelb-braune Leberveränderungen (HEINRITZI, 2006b). Futtermittelbedingte Intoxikationen sowie andere Intoxikationen z.B. durch Fliegengift, Blei, Kupfer und Desinfektionsmittel gelten in der vorliegenden Studie aufgrund der fehlenden Exposition als unwahrscheinlich.

Ein immunpathologischer Zusammenhang zwischen der Hepatitis und *M. suis* ist wahrscheinlicher. Der Autoimmunhepatitis können verschiedene Pathomechanismen zugrunde liegen; es wird die Beteiligung von Bakterien, Medikamenten oder Toxinen diskutiert (MANN, 2011). *M. suis* führt zu einer autoimmunen hämolytischen Anämie durch Bildung von Kälte- und Wärmeagglutininen.

Histologisch ist in den Gewebeschnitten der Leber eine Mottenfraßnekrose (sog. Piecemeal Necrosis) in der Peripherie der Leber zu erkennen. In der Humanmedizin wird diese Form von Leberschädigung als Folge einer viralen Hepatitis oder medikamentell induzierten chronischen Hepatitis gesehen (STALKER und HAYES, 2007). Durch Aufnahme von Antigen-Antikörper-Komplexe werden die Hepatozyten entweder direkt geschädigt oder es werden Makrophagen durch T-Lymphozyten aktiviert (STALKER und HAYES, 2007). Durch immunpathologische Prozesse wird die Apoptose induziert.

Als mögliche Folge der Leberveränderungen können Ödeme im Abdomen und Aszites auftreten. Ein niedriger onkotischer und hoher hydrostatischer Druck führen zum Flüssigkeitsaustritt in das extravasale System.

Das Gallenblasenbettödem und die zentralnervösen Ausfallserscheinungen sind typische klinische bzw. pathologische Befunde einer Enterotoxämie beim Schwein und müssen daher differentialdiagnostisch abgeklärt werden (HEINRITZI, 2006c). Das *E. coli* Shigella-like Toxin (SLT x2e) schädigt die Gefäßwände und engt die Gefäße ein (HEINRITZI, 2006c). Durch die Veränderung der Gefäßwand wird diese durchlässig, Flüssigkeit tritt in das umliegende Gewebe aus und Ödeme entstehen (HEINRITZI, 2006c). Die Anoxie infolge der Gefäßeinengung bzw. Ödeme im Gehirn führen zu zentralnervösen

Störungen in Form von Zittern, Festliegen und Ruderbewegungen (HEINRITZI, 2006c). Der Nachweis von Shigatoxin-Gen stx1 und stx2 mittels real-time PCR verlief bei allen Tieren negativ. Das Gallenblasenwandödem könnte durch die *M. suis*-Infektion und die Aktivierung bzw. Schädigung des Gefäßendothels begründet werden. *M. suis* könnte durch die Gefäßwandschädigung außerdem einen Flüssigkeitsaustritt in das umliegende Gewebe hervorrufen und ein ähnliches Krankheitsbild wie die Enterotoxämie hervorrufen.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Mycoplasma suis gehört zu der Gruppe der hämotrophen Mykoplasmen und ist Erreger der infektiösen Anämie des Schweins (IAP). Der klinische Krankheitsverlauf und die Inkubationszeit der IAP sind abhängig von der Virulenz des Stammes, der Empfänglichkeit des Wirtstieres und der Infektionsdosis des Erregers (HOELZLE, 2008; STADLER et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurden der klinische Verlauf und die labordiagnostischen Parameter von splenektomierten Schweinen nach experimenteller Infektion mit einem aktuellen *M. suis*-Feldstamm K323/13 untersucht. Mittels quantitativer LightCycler® MSG1-PCR erfolgte die Detektion und Quantifizierung der *M. suis*-DNA im Blut der splenektomierten, infizierten Tiere. Zusätzlich wurden Urinproben, Nasen-, Speichel- und Vaginalsekretupfer- und Gewebestanzproben sowie Gewebeproben von Leber, Klein- und Großhirn auf *M. suis*-DNA untersucht. Die humorale Immunantwort nach *M. suis*-Infektion wurde mittels rHspA1-ELISA evaluiert. Bei allen Tieren wurde eine pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Untersuchung durchgeführt. Um den Einfluss der Splenektomie auf die klinischen und labordiagnostischen Parameter zu ermitteln, wurden zudem splenektomierte, nicht infizierte Tiere als Kontrollgruppe verwendet.

Sechs Tage p.i. zeigten alle splenektomierten, infizierten Tiere hochgradige Symptome einer akuten IAP in Form von Iktereanämie, hohem Fieber und Apathie. Darüber hinaus wurden erstmals nach experimenteller Infektion mit *M. suis* zentralnervöse Symptome beobachtet. Bis zum achten Tag p.i. verendeten sechs der sieben infizierten Tiere bzw. wurden aufgrund einer hochgradigen, lebensbedrohlichen Hypoglykämie getötet. Labordiagnostisch wurde zudem ein massiver Anstieg der Bilirubin- und der Harnstoffkonzentration im Blut festgestellt. Ein infiziertes Tier zeigte einen chronischen Krankheitsverlauf mit wiederholten Phasen einer akuten IAP und hämorrhagischer Diathese. Eine humorale Immunantwort ließ sich mittels eines rHspA1-ELISAs ab dem 42. Tag p.i. detektieren. Bei einzelnen splenektomierten, infizierten Tieren konnte *M. suis*-DNA sowohl in Nasensekretupfern als auch in Urinproben nachgewiesen werden.

In der pathologisch-anatomischen und pathologisch-histologischen Untersuchung konnten bei den splenektomierten, infizierten Tieren hochgradige Veränderungen einer IAP erhoben werden. Zusätzlich wurde eine für *M. suis* bisher noch nicht beschriebene peripherlobuläre Leberzelldegenerationen festgestellt.

Die splenektomierten, nicht infizierten Tiere zeigten weder klinische Anzeichen noch pathologisch-anatomische oder pathologisch-histologische Veränderungen einer IAP. Die labordiagnostischen Blutparameter verliefen über den gesamten Versuchszeitraum von 90 Tagen innerhalb des Referenzbereichs.

VII SUMMARY

Mycoplasma suis, the causative agent of infectious anemia in pigs (IAP) belongs to the group of haemotrophic mycoplasmas. Clinical course and incubation period depend on the virulence of the strain, the susceptibility of the host and the infection dose (HOELZLE, 2008; STADLER et al., 2014).

The present study investigates the clinical course and the hematological parameters of splenectomized pigs after experimental infection with a current *M. suis* field strain K323/13. Detection and quantification of *M. suis* DNA in the blood of splenectomized, infected pigs was carried out by LightCycler[®] MSG1-PCR. Furthermore, urin samples, nasal, saliva and vaginal swabs as well as biopsy punches of the margo tragicus area and tissue samples of the liver, the cerebellum and the cerebrum were tested for *M. suis* DNA. The humoral immune response was evaluated by rHspA1-ELISA. At necropsy pathological-anatomical and pathological-histological examination of all study animals was performed. In order to determine the influence of splenectomy on clinical and laboratory parameters, a control group of splenectomized, not infected animals was established.

Six days p.i. all splenectomized and infected animals developed severe symptoms of acute IAP in the form of icteroaemia, high fever and apathy. This is the first report to describe central nervous system signs after experimental infection with *M. suis*. Until day 8 p.i., six of the seven infected animals died or had to be euthanized due to live-threatening hypoglycemia. In addition, a severe increase of bilirubin and urea concentration in the blood could be discovered. One animal showed a chronic infection course with repeated phases of acute IAP and hemorrhagic diathesis. A humoral immune response could be detected by rHspA1-ELISA from day 42 p.i. onwards. *M. suis* DNA was detected in nasal swabs and urine samples of individual splenectomized, infected animals.

In the pathological-anatomical and pathological-histological examination the splenectomized, infected pigs displayed severe organ lesions suggestive of IAP. Untypical of IAP severe peripheral lobular hepatic cell degeneration could be identified.

In contrast, the splenectomized, not infected animals did not show any clinical signs or pathological-anatomical and pathological-histological disorders indicating IAP. The laboratory parameters remained within their reference range throughout the whole study period of 90 days.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

Adams EW, Lyles DI, Cockrell KO. Eperythrozoonosis in a herd of purebred landrace pigs. J Am Vet Med Assoc 1959; 135: 226-228.

Baljer G, Heinritzi K, Wieler L. Untersuchungen mit der indirekten Hämagglutination zum *Eperythrozoon suis*-Nachweis in experimentell und spontan infizierten Schweinen. Zentralbl Veterinarmed B 1989; 36: 417-423.

Bollwahn W. Die Eperythrozoonose (Ikteroanämie) der Schweine. Prakt Tierarzt 1982; 63: 1043-1044.

Campbell RL. Icteric condition found in hogs in northern Missouri. North Am Vet 1945; 26: 347-358.

Dietz S, Mack SL, Hoelzle K, Becker K, Jannasch C, Stadler J, Ritzmann M, Hoelzle LE. Quantitative PCR analysis of *Mycoplasma suis* shedding patterns during experimental infection. Vet Microbiol 2014; 172: 581-585.

Doyle LP. A rickettsia-like or anaplasmosis-like disease in swine. J Am Vet Med Assoc 1932; 81: 668-671.

Felder KM, Hoelzle K, Heinritzi K, Ritzmann M, Hoelzle LE. Antibodies to actin in autoimmune haemolytic anaemia. BMC Vet Res 2010; 6: 18.

Felder KM, Hoelzle K, Ritzmann M, Kilchling T, Schiele D, Heinritzi K, Groebel K, Hoelzle LE. Hemotrophic mycoplasmas induce programmed cell death in red blood cells. Cell Physiol Biochem 2011; 27: 557-564.

Felder KM, Carranza PM, Gehrig PM, Roschitzki B, Barkow-Oesterreichert S, Hoelzle K, Riedel K, Kube M, Hoelzle LE. Insights into the Gene Expression Profile of Uncultivable Hemotrophic *Mycoplasma suis* during Acute Infektion, Obtained Using Proteome Analysis. J Bacteriol 2012: 1505-1514.

Fey K. Hämatopoetisches System. In: Handbuch Pferdepraxis. Dietz O, Huskamp B, eds. Stuttgart, Deutschland: Enke Verlag 2006: 273-295.

Gille U. Harn- und Geschlechtsapparat, Apparatus urogenitalis In: Anatomie für die Tiermedizin. Salomon FV, Geyer H, Gille U, eds. Stuttgart, Deutschland: Enke Verlag 2008: 368-397.

Göbel T, Kaspers B. Blut. In: Physiologie der Haustiere. Engelhardt Wv, Breves G, eds. Stuttgart, Deutschland: Enke Verlag 2010: 197-240.

Groebel K, Hoelzle K, Wittenbrink MM, Ziegler U, Hoelzle LE. *Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes. Infect Immun 2009; 77: 576-584.

Guimaraes AM, Vieira RF, Poletto R, Vemulapalli R, Santos AP, de Moraes W, Cubas ZS, Santos LC, Marchant-Forde JN, Timenetsky J, Biondo AW, Messick JB. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis*. J Appl Microbiol 2011a; 111: 417-425.

Guimaraes AM, Santos AP, SanMiguel P, Walter T, Timenetsky J, Messick JB. Complete genome sequence of *Mycoplasma suis* and insights into its biology and adaptation to an erythrocyte niche. PLoS One 2011b; 6

Guimaraes AM, Santos AP, do Nascimento NC, Timenetsky J, Messick JB. Comparative genomics and phylogenomics of hemotrophic mycoplasmas. PLoS One 2014a; 9: e91445.

Guimaraes AM, Santos AP, Timenetsky J, Bower LP, Strait E, Messick JB. Identification of *Mycoplasma suis* antigens and development of a multiplex microbead immunoassay. J Vet Diagn Invest 2014b; 26: 203-212.

Gwaltney SM, Oberst RD. Comparison of an improved polymerase chain reaction protocol and the indirect hemagglutination assay in the detection of *Eperythrozoon suis* infection. J Vet Diagn Invest 1994; 6: 321-325.

Haferlach T, Bacher U, Thöml H, Diem H. Störungen der Erythrozyten und Thrombozyten. In: Taschenatlas Hämatologie Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag 2012: 162-212.

Heinritzi K. Ein Beitrag zur Splenektomie beim Schwein. Tierarztl Prax 1984a; 12: 451-454.

Heinritzi K. Klinik, Hämatologie und Metabolismus des Eperythrozoonotischen Anfalls. Prakt Tierarzt 1984b; 65: 40-44.

Heinritzi K, Wentz I, Bollwahn W. Hämatologische Befunde bei der akuten Eperythrozoonose der Schweine. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1984; 97: 404-408.

Heinritzi K. Vergiftungen beim Schwein. Tierarztl Prax 1986; 14: 219-230.

Heinritzi K. *Eperythrozoon*-Infektion beim Schwein als Faktorenkrankheit. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1989; 102: 337-342.

Heinritzi K, Peteranderl W, Plank G. *Eperythrozoon*-Infektion beim Schwein: Einfluß auf Säure-Basen-Haushalt sowie Glucose-, Lactat- und Pyruvatgehalt des venösen Blutes. Dtsch Tierarztl Wochenschr 1990a; 97: 31-34.

Heinritzi K (1990a) Untersuchung zur Pathogenese und Diagnostik der Infektion mit *Eperythrozoon suis*. Habilitationsschrift. Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Heinritzi K, Jüngling A, Kühlmann R, Löscher U (1990b) *Eperythrozoon suis*-infection: occurrence and importance of cold agglutinin. Proc IPVS. Lausanne, Schweiz. 329.

Heinritzi K, Plank G, Peteranderl W, Sandner N. Untersuchungen zum Säure-Basen-Haushalt und Kohlenhydratstoffwechsel bei der Infektion mit *Eperythrozoon suis*. Zentralbl Veterinarmed B 1990c; 37: 412-417.

Heinritzi K. Zur Diagnostik der Eperythrozoon-Infektion. Tierärztl Prax 1990b; 18: 477-481.

Heinritzi K, Plank G, Peteranderl W, Sandner N. Untersuchungen zum Säure-Basen-Haushalt und Kohlenhydratstoffwechsel bei der Infektion mit *Eperythrozoon suis*. Zentralbl Veterinarmed B 1990d; 37: 412-417.

Heinritzi K. Untersuchungen zur Übertragbarkeit von *Eperythrozoon suis*. Tierärztl Umsch 1992; 47: 588-599.

Heinritzi K, Plank G. Einfluss der *Eperythrozoon-suis*-Infektion auf die osmotische Resistenz der Erythrozyten. Berl Munch Tierärztl Wochenschr 1992; 105: 380-383.

Heinritzi K. Blutkrankheiten. In: Schweinekrankheiten. Heinritzi K, Gindele H, Reiner G, Schnurrbusch U, eds. Stuttgart, Deutschland: Eugen Ulmer KG 2006a: 51-62.

Heinritzi K. Vergiftungen. In: Schweinekrankheiten. Heinritzi K, Gindele H, Reiner G, Schnurrbusch U, eds. Stuttgart, Deutschland: Eugen Ulmer KG 2006b: 98-105.

Heinritzi K. Krankheiten des Verdauungstraktes. In: Schweinekrankheiten. Heinritzi K, Gindele H, Reiner G, Schnurrbusch U, eds. Stuttgart, Deutschland: Eugen Ulmer KG 2006c: 147-161.

Henderson JP, O'Hagan J, Hawe SM, Pratt MC. Anaemia and low viability in piglets infected with *Eperythrozoon suis*. Vet Rec 1997; 140: 144-146.

Henry SC. Clinical observations on eperythrozoonosis. J Am Vet Med Assoc 1979; 174: 601-603.

Hicks CA, Barker EN, Brady C, Stokes CR, Helps CR, Tasker S. Non-ribosomal phylogenetic exploration of Mollicute species: new insights into haemoplasma taxonomy. Infect Genet Evol 2014; 23: 99-105.

Hoelzle K, Grimm J, Ritzmann M, Heinritzi K, Torgerson P, Hamburger A, Wittenbrink MM, Hoelzle LE. Use of recombinant antigens to detect antibodies against *Mycoplasma suis*, with correlation of serological results to hematological findings. Clin Vaccine Immunol 2007a; 14: 1616-1622.

Hoelzle K, Doser S, Ritzmann M, Heinritzi K, Palzer A, Elicker S, Kramer M, Felder KM, Hoelzle LE. Vaccination with the *Mycoplasma suis* recombinant adhesion protein MSG1 elicits a strong immune response but fails to induce protection in pigs. Vaccine 2009; 27: 5376-5382.

Hoelzle LE, Adelt D, Hoelzle K, Heinritzi K, Wittenbrink MM. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood. Vet Microbiol 2003; 93: 185-196.

Hoelzle LE, Hoelzle K, Ritzmann M, Heinritzi K, Wittenbrink MM. *Mycoplasma suis* antigens recognized during humoral immune response in experimentally infected pigs. Clin Vaccine Immunol 2006; 13: 116-122.

Hoelzle LE. Zur Bedeutung der haemotrophen Mycoplasmen in der Veterinärmedizin unter besonderer Berücksichtigung der *Mycoplasma suis*-Infektion beim Schwein. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2007; 120: 34-41.

Hoelzle LE, Hoelzle K, Harder A, Ritzmann M, Aupperle H, Schoon HA, Heinritzi K, Wittenbrink MM. First identification and functional characterization of an immunogenic protein in unculturable haemotrophic Mycoplasmas (*Mycoplasma suis* HspA1). FEMS Immunol Med Microbiol 2007b; 49: 215-223.

Hoelzle LE, Hoelzle K, Helbling M, Aupperle H, Schoon HA, Ritzmann M, Heinritzi K, Felder KM, Wittenbrink MM. MSG1, a surface-localised protein of *Mycoplasma suis* is involved in the adhesion to erythrocytes. *Microbes Infect* 2007c; 9: 466-474.

Hoelzle LE, Helbling M, Hoelzle K, Ritzmann M, Heinritzi K, Wittenbrink MM. First LightCycler real-time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in clinical samples. *J Microbiol Methods* 2007d; 70: 346-354.

Hoelzle LE. Haemotrophic mycoplasmas: Recent advances in *Mycoplasma suis*. *Vet Microbiol* 2008; 130: 215-226.

Hoelzle LE, Felder KM, Hoelzle K. Porzine Eperythrozoonose: von *Eperythrozoon suis* zu *Mycoplasma suis*. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 2011; 39: 215-220.

Hoelzle LE, Zeder M, Felder KM, Hoelzle K. Pathobiology of *Mycoplasma suis*. *Vet J* 2014; In press

Hoffmann R, Saalfeld K. Ausbruch einer Eperythrozoonose in einem Schweinemastbestand. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1977; 84: 7-9.

Hoffmann R, Schmid DO, Hoffmann-Fezer G. Erythrocyte antibodies in Porcine Eperythrozoonosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1981; 2: 111-119.

Hsu FS, Liu MC, Chou SM, Zachary JF, Smith AR. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Eperythrozoon suis* antibodies in swine. *Am J Vet Res* 1992; 53: 352-354.

Imbach P, Kühne T, Gaedicke G. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. In: Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J, eds. Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag 2006: 357-365.

Jannasch C. Klinische Untersuchungen, Blutparameter und Erregerausscheidung von splenektomierten und nichtsplenektomierten Schweinen nach experimenteller Infektion mit *Mycoplasma suis*. Diss. med. vet. 2014. Ludwig-Maximilians-Universität.

Kinsley AT. Protozoan-like body in the blood of swine. J Am Vet Med Assoc 1932; 116.

Kixmüller M. Labordiagnostische Referenzbereiche bei unterschiedlichen Schweinerassen sowie histopathologische und immunhistochemische Untersuchung von Gehirnen älterer Sauen und Eber auf transmissible spongiforme Enzephalopathie im Rahmen der TSE-Studie. Diss. med. vet. 2004. Ludwigs-Maximilians-Universität.

Korn G, Mussgay M. Ein Fall von *Eperythrozoonose suis* mit differentialdiagnostischer Bedeutung bei einem Schweinepestverdacht. Zentralbl Veterinarmed B 1968; 15: 617-630.

Lang F. Hormone. In: Taschenatlas Pathophysiologie. Silbernagl S, Lang F, eds. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag KG 2013: 282-324.

Lang F, Abed M, Lang E, Foller M. Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. Antioxid Redox Signal 2014; 21: 138-153.

Liebich HG, Heinritzi K. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Eperythrozoon suis*. Tierärztl Prax 1992; 20: 270-274.

Manns MP. Hepatitiden. In: Klinische Pharmakologie. Wehling M, ed. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag KG 2011: 234-255.

Messick JB, Cooper SK, Huntley M. Development and evaluation of a polymerase chain reaction assay using the 16S rRNA gene for detection of *Eperythrozoon suis* infection. J Vet Diagn Invest 1999; 11: 229-236.

Messick JB, Walker PG, Raphael W, Berent L, Shi X. 'Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis' sp nov., 'Candidatus Mycoplasma haemolamae' sp nov. and Mycoplasma haemocanis comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002; 52: 693-698.

Messick JB. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet Clin Pathol* 2004; 33: 2-13.

Moritz A, Schwendenwein I, Kraft W. Hämatologie. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Kraft W, Dürr UM, eds. Stuttgart, Deutschland: 2014: 79-156.

Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully JG. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus Mycoplasma haemofelis', 'Candidatus Mycoplasma haemomuris', 'Candidatus Mycoplasma haemosuis' and 'Candidatus Mycoplasma wenyonii'. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 891-899.

Nonaka N, Thacker BJ, Schillhorn van Veen TW, Bull RW. In vitro maintenance of *Eperythrozoon suis*. *Vet Parasitol* 1996; 61: 181-199.

Oehlerking J, Kube M, Felder KM, Matter D, Wittenbrink MM, Schwarzenbach S, Kramer MM, Hoelzle K, Hoelzle LE. Complete genome sequence of the hemotrophic *Mycoplasma suis* strain KI3806. *J Bacteriol* 2011; 193: 2369-2370.

Peter H-H. Immunsystem. In: *Klinische Pathophysiologie*. Siegenthaler E, Blum HE, eds. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag KG 2006: 478-553.

Peteranderl W. Untersuchungen über den Glucose-, Lactat- und Pyruvatgehalt sowie den Säure-Basenhaushalt im venösen Blut bei der Eperythrozoonose des Schweines. Diss. med. vet. 1988. Ludwig-Maximilians-Universität.

Plank G, Heinritzi K. Disseminierte intravasale Gerinnung bei der Eperythrozoonose des Schweines. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1990; 103: 13-18.

Prullage JB, Williams RE, Gaafar SM. On the Transmissibility of *Eperythrozoon-Suis* by Stomoxys-Calcitrans and Aedes-Aegypti. Vet Parasitol 1993; 50: 125-135.

Quin AH. A Discussion of Some Diseases of Swine. Can Vet J 1960; 1: 246-250.

Richardson JA, Morter RL, Rebar AH, Olander HJ. Lesions of porcine necrotic ear syndrome. Vet Pathol 1984; 21: 152-157.

Rikihisa Y, Kawahara M, Wen BH, Kociba G, Fuerst P, Kawamori F, Suto C, Shibata S, Futohashi M. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H-muris*, *H-felis*, and *Eperythrozoon suis*. J Clin Microbiol 1997; 35: 823-829.

Ritzmann M, Grimm J, Heinritzi K, Hoelzle K, Hoelzle LE. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. Vet Microbiol 2009; 133: 84-91.

Romero-Gomez M, Otero MA, Sanchez-Munoz D, Ramirez-Arcos M, Larraona JL, Suarez Garcia E, Vargas-Romero J. Acute hepatitis due to *Mycoplasma pneumoniae* infection without lung involvement in adult patients. J Hepatol 2006; 44: 827-828.

Schilling V. *Eperythrozoon coccoides*, eine neue durch Splenektomie aktivierbare Dauerinfektion der weissen Maus. Klin Wochenschr 1928; 39: 1853-1855.

Schmidt D, Elger CE. Spezielle Syndrome. In: Praktische Epilepsiebehandlung Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag 2002: 162-180.

Schmidt U, Trautwein G, Hertrampf B, Ehard H, Fiedler HH. Thrombozytopenische Purpura beim Saugferkel. Morphologische, hämatologische und serologische Untersuchungen. Zentralbl Veterinarmed B 1977; 24: 386-397.

Schreiner SA, Hoelzle K, Hofmann-Lehmann R, Hamburger A, Wittenbrink MM, Kramer MM, Sokoli A, Felder KM, Groebel K, Hoelzle LE. Nanotransformation of the haemotrophic *Mycoplasma suis* during in vitro cultivation attempts using modified cell free Mycoplasma media. Vet Microbiol 2012a; 160: 227-232.

Schreiner SA, Sokoli A, Felder KM, Wittenbrink MM, Schwarzenbach S, Guhl B, Hoelzle K, Hoelzle LE. The surface-localised alpha-enolase of *Mycoplasma suis* is an adhesion protein. Vet Microbiol 2012b; 156: 88-95.

Schuller W, Heinritzi K, al-Nuktha S, Kolbl S, Schuh M. Serologische Verlaufsuntersuchungen mittels KBR und ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen die *Eperythrozoon-suis*-Infektion des Schweines. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1990; 103: 9-12.

Shin SR, Park SH, Kim JH, Ha JW, Kim YJ, Jung SW, Kim JB, Lee MS, Park CK. Clinical characteristics of patients with *Mycoplasma pneumoniae*-related acute hepatitis. Digestion 2012; 86: 302-308.

Silbernagl S. Blut. In: Taschenatlas der Pathophysiologie. Silbernagl S, Lang F, eds. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag KG 2013a: 30-69.

Silbernagl S. Temperatur, Energie. In: Pathophysiologie. Silbernagl S, Lang F, eds. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag KG 2013b: 24-29.

Smith AR, Rahn T. An indirect hemagglutination test for the diagnosis of *Eperythrozoon suis* infection in swine. Am J Vet Res 1975; 36: 1319-1321.

Smith JE, Cipriano JE, Hall SM. In vitro and in vivo glucose consumption in swine eperythrozoonosis. Zentralbl Veterinarmed B 1990; 37: 587-592.

Sokoli A, Groebel K, Hoelzle K, Amselgruber WM, Mateos JM, Schneider MK, Ziegler U, Felder KM, Hoelzle LE. *Mycoplasma suis* infection results endothelial cell damage and activation: new insight into the cell tropism and pathogenicity of hemotrophic mycoplasma. *Vet Res* 2013; 44: 6.

Splitter EJ. *Eperythrozoon suis*, the etiologic agent of ictero-anemia or an anaplasmosis-like disease in swine. *Am J Vet Res* 1950; 11: 324-330.

Splitter EJ. Eperythrozoonosis in swine. *Iowa State Univ Vet* 1951; 13: 77-80.

Stadler J, Jannasch C, Mack SL, Dietz S, Zols S, Ritzmann M, Hoelzle K, Hoelzle LE. Clinical and haematological characterisation of *Mycoplasma suis* infections in splenectomised and non-splenectomised pigs. *Vet Microbiol* 2014; 172: 294-300.

Stalker MJ, Hayes MA. Liver and biliary system. In: *Pathology of Domestic Animals*. Grant Maxie M, ed. München, Deutschland: Elsevier 2007: 297-389.

Tasker S, Peters IR, Day MJ, Willi B, Hofmann-Lehmann R, Gruffydd-Jones TJ, Helps CR. Distribution of *Mycoplasma haemofelis* in blood and tissues following experimental infection. *Microb Pathog* 2009; 47: 334-340.

Thiel W. On the Pathology and Diagnosis of Eperythrozoonosis of the Pig. *Prakt Tierarzt* 1983; 64: 692-397.

van der Merwe J, Prysliak T, Perez-Casal J. Invasion of bovine peripheral blood mononuclear cells and erythrocytes by *Mycoplasma bovis*. *Infect Immun* 2010; 78: 4570-4578.

Watanabe Y, Fujihara M, Suzuki J, Sasaoka F, Nagai K, Harasawa R. Prevalence of swine hemoplasmas revealed by real-time PCR using 16S rRNA gene primers. *J Vet Med Sci* 2012; 74: 1315-1318.

Weissenbacher-Lang C, Voglmayr T, Waxenecker F, Hofstetter U, Weissenböck H, Hoelzle K, Hoelzle LE, Welle M, Ogris M, Bruns G, Ritzmann M. Porcine ear necrosis syndrome: a preliminary investigation of putative infectious agents in piglets and mycotoxins in feed. *Vet J* 2012; 194: 392-397.

Wendt M, Epe C, Grummer B, Kamphues J, Kietzmann M, Rohde J, Weissenböck H. Diagnostik, Prophylaxe und Therapie von Erkrankungen des Verdauungstraktes in Schweinebeständen. In: Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand. grosse Beilage E, Wendt M, eds. Stuttgart, Deutschland: Eugen Ulmer KG 2013: 271-344.

Yuan C, Yang Z, Zhu J, Cui L, Hua X. Effect of an immunosuppressor (dexamethasone) on eperythrozoon infection. *Vet Res Commun* 2007; 31: 661-664.

Zachary JF, Smith AR. Experimental porcine eperythrozoonosis: T-lymphocyte suppression and misdirected immune responses. *Am J Vet Res* 1985; 46: 821-830.

Zachary JF, Basgall EJ. Erythrocyte membrane alterations associated with the attachment and replication of *Eperythrozoon suis*: a light and electron microscopic study. *Vet Pathol* 1985; 22: 164-170.

Zhang CY, Li YF, Jiang P, Chen W. Use of MSG1 protein in a novel blocking ELISA for the detection of *Mycoplasma suis* infection. *Vet J* 2012; 193: 535-538.

Zinn GM, Jesse GW, Dobson AW. Effect of eperythrozoonosis on sow productivity. *J Am Vet Med Assoc* 1983; 182: 369-371.

IX ANHANG

1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morbus maculosus	12
Abbildung 2: Zeitlicher Versuchsablauf und Probenentnahmeschema	23
Abbildung 3: Entnahme der Gewebestanzprobe	27
Abbildung 4: Zyanotische Ohrränder	37
Abbildung 5: Verlauf des klinischen Gesamtscores über 90 Tage von ID 13	39
Abbildung 6: Petechien an den Hinterextremitäten von ID 13	39
Abbildung 7: Mittelwerte, Standardabweichungen und Referenzbereiche der hämatologischen Parameter Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit und Leukozytenzahl der splenektomierten, nicht infizierten Tiere über den Versuchszeitraum von 90 Tagen	42
Abbildung 8: Mikroagglutination an der Wand des Reagenzgefäßes zum Zeitpunkt der akuten IAP an Tag 6 p.i.	43
Abbildung 9: Verlaufskurven und Referenzbereiche der hämatologischen Parameter Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit und Leukozytenzahl der splenektomierten, infizierten Tiere der Feldstammgruppe in den ersten 9 Tagen p.i.	44
Abbildung 10: Verlaufskurven, Standardabweichung und Referenzbereiche der Mittelwerte der hämatologischen Parameter Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit und Leukozytenzahl der Feldstamm- und Kontrollgruppe im Vergleich in den ersten 9 Tagen p.i.	46
Abbildung 11: Verlaufskurven und Referenzbereiche der Erythrozyten- und Leukozytenzahl der splenektomierten, nicht infizierten Tiere und des splenektomierten, infizierten Tieres (ID 13) über den Versuchszeitraum von 90 Tagen	48
Abbildung 12: Mittelwerte, Standardabweichungen und Referenzbereiche der klinisch-chemischen Blutparameter Glukose, Bilirubin und Harnstoff der splenektomierten, nicht infizierten Tiere über den Versuchszeitraum von 90 Tagen	49
Abbildung 13: Ikterisches Blutserum von ID 14 an Tag 6 p.i.	50
Abbildung 14: Verlaufskurven und Referenzbereiche der klinisch-chemischen Blutparameter Glukose, Bilirubin und Harnstoff der splenektomierten,	

infizierten Tieren in den ersten 9 Tagen p.i.	51
Abbildung 15: Verlaufskurven, Standardabweichung und Referenzbereiche der klinisch-chemischen Blutparameter Glukose, Bilirubin und Harnstoff der splenektomierten, nicht infizierten Gruppe und des splenektomierten, infizierten Tieres (ID 13) im Vergleich über 90 Versuchstage	53
Abbildung 16: Verlaufskurven und Referenzbereiche der einzelnen Parameter der Blutgasmessung pH, pCO ₂ , pO ₂ und HCO ₃ von ID 13	55
Abbildung 17: <i>M. suis</i> -Konzentration von ID 13 über den Versuchszeitraum von 90 Tagen	57
Abbildung 18: Korrelation zwischen der Erregermenge (<i>M. suis</i> /ml Blut) an Tag 4 p.i. und der Lebensdauer der splenektomierten, infizierten Tiere (Feldstammgruppe).....	58
Abbildung 19: Korrelation zwischen der Erregermenge und dem Mittelwert der Erythrozytenzahl in den ersten 7 Tagen p.i.	59
Abbildung 20: Korrelation zwischen der Erregermenge und den klinisch-chemischen Blutparametern Glukose und Bilirubin der splenektomierten, infizierten Tiere der Feldstammgruppe in den ersten 7 Tagen p.i.	60
Abbildung 21: Darstellung der <i>M. suis</i> -Konzentration im Blut und der ELISA OD-Werte von ID 13 innerhalb des Versuchszeitraums von 90 Tagen....	64
Abbildung 22: Kleine Ohrtrandgefäße mit Fibrinthromben von ID 14 an Tag 7 p.i. (markiert durch Pfeile), HE-Färbung	65
Abbildung 23: Ohrtrandgefäß mit Fibrinthrombus links im Bild von ID 14 an Tag 7 p.i. (markiert durch Pfeil)	65
Abbildung 24: Gelbfärbung der Blutgefäße von ID 11	66
Abbildung 25: Aszites bei ID 11	67
Abbildung 26: Gallenblasenbettödem ID 12	67
Abbildung 27: Herdförmige Aufhellungen der Leber von ID 11	67
Abbildung 28: Peripherlobuläre Parenchymnekrosen der Leber von ID 14	68

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bewertungssystem („Score-System“) nach STADLER et al. (2014) für die tägliche klinische Untersuchung	25
Tabelle 2: Verlauf Gesamtscore der täglichen klinischen Untersuchung der splenektomierten, infizierten Tiere der ersten zehn Tage p.i.	38

Tabelle 3: Erregermenge im Blut der splenektomierten, infizierten Tiere der Feldstammgruppe in den ersten 9 Tagen p.i.	56
Tabelle 4: Mittlere Erregermenge der splenektomierten, infizierten Tiere der Feldstammgruppe in den ersten 8 Tagen p.i.	56
Tabelle 5: Korrelation zwischen der Erregermenge und den hämatologischen Parametern Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit.....	59
Tabelle 6: Korrelation zwischen der Erregermenge im Blut und den klinisch-chemischen Blutparametern Glukose und Bilirubin	61
Tabelle 7: <i>M. suis</i> in Groß-, Kleinhirn und Leber der splenektomierten, infizierten Tiere.....	69

X DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Mathias Ritzmann für seine Unterstützung bei meiner Studie. Ich möchte ihm für seine freundliche, herzliche und immer gut gelaunte Art danken, die er seinen Mitarbeitern auch im größten Stress entgegen bringt.

Bei Frau Dr. Julia Stadler möchte ich mich ganz herzlich für die freundliche Zusammenarbeit und Betreuung bedanken, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich tatkräftig unterstützt hat.

Bei Herrn Prof. Ludwig E. Hoelzle und Frau Dr. Katharina Hoelzle aus dem Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim möchte ich mich besonders für die sehr angenehme und produktive Zusammenarbeit bedanken.

Stefanie Dietz, Sarah-Lena Mack und Christina Zübert danke ich für die nette Zusammenarbeit sowie ihre Unterstützung bei den Auswertungen im Labor.

Prof. Dr. W. Hermanns und Dr. M. Langenmayer aus dem Institut der Tierpathologie der LMU München möchte ich für die Hilfe bei den Untersuchungen der Gewebestanzproben danken.

Dr. med. vet. habil. W. Breuer aus dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit danke ich für die Unterstützung bei den pathologisch-anatomisch und pathologisch-histologischen Untersuchungen der Versuchstiere.

Frau Dr. Susanne Zöls möchte ich für ihre fröhliche und liebe Art danken, die Sie allen Doktoranden entgegen bringt, sowie ihre Unterstützung bei den statistischen Auswertungen.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Kollegin Frau Marie Isernhagen, die mich die ganze Zeit über unterstützt hat. Ich möchte mich bei ihr für viele lustige Stunden in der Klinik, ihre Assistenz bei den Proben tagen und den Splenektomien bedanken.

Auch meine Kollegin Jasmin Stark möchte ich besonders hervorheben. Vielen Dank für die vielen netten und lustigen Autofahrten.

Vielen Dank auch an die anderen Doktoranden Flo, Nils, Caro J., Tanja, Christine, Lisa, Lukas, Basti, Marion, Caro A. und Georg für das gute Arbeitsklima. Danke

euch und Pirmin für die netten Grillabende an der Klinik.

Vielen Dank an die Tierpfleger Gilio, Ebru und Sven für ihre Hilfe im Stall und die Betreuung meiner Versuchstiere.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Ehemann Matthias. Ihr habt mich immer unterstützt und an mich geglaubt.