

Aus dem Department für Nutztiere und öffentlicher Gesundheit in der Veterinärmedizin  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätsklinik für Schweine  
(Leiterin: Univ.Prof.<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup>med.vet. Andrea Ladinig, Dipl.ECPHM)

**Untersuchung zum Nachweis von *Mycoplasma hyopneumoniae*  
mittels PCR aus Oral Fluid**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von  
Susanne Schopper

Wien, im [März, 2022]

Betreuerin: Dr.med.vet. Lukas Schwarz  
Universitätsklinik für Schweine  
Veterinärmedizinische Universität Wien  
&  
PD Dr.med.vet. Joachim Spargser, Dipl. ECVM (Co-Betreuung)  
Institut für Mikrobiologie  
Veterinärmedizinische Universität Wien

BegutachterIn: Dipl.ECPHM Univ.-Prof. Dr.med.vet. Herbert Weissenböck  
Institut für Pathologie  
Veterinärmedizinische Universität Wien

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Fragestellung</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Literaturübersicht</b> .....	<b>6</b>
2.1. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	6
2.2. Epidemiologie .....	7
2.3. Pathogenität.....	8
2.4. Klinisches Erscheinungsbild.....	10
2.5. Läsionen .....	11
2.6. Nachweismethoden .....	14
2.7. Kontrollmaßnahmen .....	15
2.8. Eradikation .....	18
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
3.1. Speichelprobengewinnung und Vorbereitungen .....	19
3.2. Herstellung der MHP-Suspensionen.....	19
3.3. Aufbau der Versuchsreihe .....	20
3.3.1. Herstellung unterschiedlicher Matrices.....	20
3.3.1.1. Native Speichelstricke.....	20
3.3.1.2. Bekaute (used) Speichelstricke .....	22
3.3.1.3. Oral Fluid .....	22
3.3.2. Versetzen der Proben mit MHP-Suspension unterschiedlicher Konzentration .....	22
3.4. PCR.....	24
3.4.1. DNA-Extraktion.....	24
3.4.2. Durchführung einer Nested PCR.....	25
3.4.3. Quantitative PCR .....	26
3.4.4. Statistische Methodenerhebung .....	26
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>28</b>
4.1. Beobachtungen zur Probenentnahme .....	28
4.2. Ergebnisse der Nested PCR .....	28
4.3. Ergebnisse der quantitativen PCR .....	31
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>34</b>
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>37</b>
<b>7. Summary</b> .....	<b>38</b>
<b>8 Quellenverzeichnis</b> .....	<b>39</b>
<b>9 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>44</b>

## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
AIAO	All-in All-out
cm	Zentimeter
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EP	Enzootische Pneumonie
etc.	et cetera
MHP	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
OF	Oral Fluid
PCR	Polymerase Ketten Reaktion

# 1. Einleitung und Fragestellung

Diese Diplomarbeit befasst sich mit der Detektion von *Mycoplasma hyopneumoniae* (MHP) in Oral Fluids (OF). Genauer gesagt soll der Nachweis von MHP mittels PCR aus sogenannten Speichelproben (englisch: Oral Fluid) untersucht und beschrieben werden. Die erste Hypothese lautet, dass MHP in OF nur schwer nachweisbar ist, da MHP mit den Baumwollfasern der Speichelstricke interagiert und so nicht in der gewonnenen Oral Fluid enthalten ist. Die zweite Hypothese lautet, dass der Nachweis von MHP mittels PCR aus Oral Fluid zur Überwachung der Herdengesundheit nicht geeignet ist, da ein positiver Nachweis erst mit einer hohen Konzentration des untersuchten Bakteriums erzielt werden kann. Die Enzootische Pneumonie, verursacht durch MHP, ist weltweit verbreitet und kann zu einer schweren Lungenerkrankung mit hohen wirtschaftlichen Verlusten in der Schweineproduktion führen. Die Diagnose in frühen Stadien der MHP-Infektion ist ein kritischer Schritt für die rechtzeitige Intervention zur Begrenzung der Auswirkungen der Enzootischen Pneumonie und auch der Schlüssel zur Überwachung eines negativen Status einer Herde (Pieters et al. 2017).

Die Erstbeschreibung von MHP erfolgte im Jahr 1965 durch Maré und Switzer. Schon damals wusste man um die schwerwiegenden Folgen einer MHP-Infektion Bescheid (MARE und SWITZER 1965). Der Kern des Problems ergibt sich aus der Tatsache, dass die durch MHP verursachten pneumonischen Läsionen während der gesamten Wachstumsphase des Schweins bestehen bleiben können. Während dieser Zeit kann das betroffene Tier im Regelfall für andere Schweine infektiös bleiben. Obwohl selten tödlich, ist die Krankheit oft mit einer Verringerung der Wachstumsrate verbunden und die wirtschaftlichen Verluste sind so groß, dass die Enzootische Pneumonie heute als eine der wichtigsten Krankheiten bei Schweinen beschrieben wird (Goodwin et al. 1967, Maes 2020).

Die kommerzielle Nutzung der OF-basierten Diagnostik hat in den letzten Jahren stark zugenommen, da die Gewinnung der Proben praktischer ist und die wirtschaftlichen und physischen Vorteile (körperlich leichtere Arbeit) der Entnahme von OF anstelle von Blutproben überwiegen. Es ist wichtig zu beachten, dass OF auch Material, wie zum Beispiel andere Krankheitserreger, aus dem Atmungsstrakt enthalten können. Ebenso Umwelt- und Fäkalkontaminationen, andere Erreger aus der Nasenhöhle, Antikörper und Gaumensekret (Hernandez-Garcia et al. 2017).

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. *Mycoplasma hyopneumoniae*

*Mycoplasma hyopneumoniae* (MHP) ist ein zellwandloses Bakterium und zeigt bei der Anzucht pleomorphes Erscheinungsbild. MHP wird taxonomisch in die Klasse *Mollicutes*, die Ordnung *Mycoplasmatales* und die Familie *Mycoplasmataceae* eingeordnet. Wie bei allen Mykoplasmen besitzt MHP ein kleines Genom, keine Zellwand und ist pleomorph. MHP ist aufgrund seines langsamen Wachstums und des möglichen Überwucherns mit anderen Mykoplasmenarten des Schweines kulturell sehr schwer zu isolieren. Eine Bakterienkultur wird daher normalerweise nicht in der Routine-Diagnostik durchgeführt. Der Organismus besiedelt hauptsächlich die Schleimhautoberflächen der Luftröhre, Bronchien und Bronchiolen (Maes et al. 2018). MHP ist der Haupterreger einer chronischen Bronchopneumonie, die auch als Enzootische Pneumonie (EP) bekannt ist. Eine Infektion mit MHP zieht eine langfristige Besiedlung des Flimmerepithels in den luftführenden Atemwegen mit sich, wo es die angeborene und erworbene Immunabwehr unterdrückt. Dies ermöglicht es den natürlich auftretenden Bakterien der oberen Atemwege wie z.B.: *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Glaesserella* (vormals: *Haemophilus*) *parasuis* etc. sich zu vermehren und zum Krankheitsbild beizutragen (Maes et al. 2018).

Die EP zeichnet sich durch Chronizität, hohe Morbidität, niedrige Mortalität und verminderte Leistung aus. Die wirtschaftlichen Auswirkungen der EP sind erheblich und hängen hauptsächlich mit einem verringerten durchschnittlichen Tageszuwachs, einer erhöhten Futtermittelverwertung und einer erhöhten Anzahl von Aufzuchttagen zusammen, um das Marktgewicht zu erreichen. Obwohl MHP in den meisten Schweineherden endemisch auftritt, kann der Erreger bei Einschleppung in naiven Herden eine Endemie hervorrufen, die alle Altersgruppen von Schweinen gleichzeitig betrifft (Zimmerman et al. 2019). Auch bereits im Ferkelalter kann eine Infektion mit MHP stattfinden. Maßgeblich für das Ausmaß und den Schweregrad der Erkrankung sind verschiedenste Kofaktoren. Dies können große Schwankungen der Stalltemperatur sein, als auch zu hohe Besatzdichte, schlechte Ventilation, schlecht isolierte und feuchte Böden und verhältnismäßig starker und durchgehender Luftzug (Heinritzi et al. 2006).

Somit hat die frühzeitige Erkennung und Diagnose des Erregers im Zusammenhang mit sekundären Pathogenen, bakteriellen ebenso wie viralen Ursprungs, an Wichtigkeit gewonnen (Pieters et al. 2017).

## 2.2. Epidemiologie

Hausschweine (*Sus scrofa domesticus*) und Wildschweine (*Sus scrofa*) sind die einzigen Wirte, die an einer MHP-Infektion erkranken können. Bei Schweinen sind keine eindeutigen Hinweise auf eine altersabhängige Empfänglichkeit bekannt, obwohl die klinische Darstellung der Krankheit meistens im Aufzuchtferkelalter erkennbar wird (Maes et al. 2018).

Infektionen durch MHP sind mehr oder weniger in fast jedem Land vorhanden, in dem auch Schweine produziert und vermarktet werden. Eine niedrige Prävalenz mit einem Wert von 1 % weist die Schweiz nach Abschluss eines Eradikationsprogrammes auf. Vor dem Beginn der systematischen Seuchenbekämpfung verursachten die Atemwegserkrankungen bei Schweinen in der Schweiz geschätzte Verluste von mehreren Millionen Euro pro Jahr (STARK et al. 2007). Die Erregerübertragung erfolgt über respiratorische Sekrete bei direktem Kontakt infizierter Tiere. Die Eintrittspforte für die Mykoplasmen ist der Respirationstrakt. Daneben kann sich der Erreger auch in Form infektiöser Aerosole über längere Distanzen ausbreiten. Einmal erkrankte Tiere bleiben über einen langen Zeitraum (durchaus auch mehr als 7 Monate) infektiös, auch wenn die Lungenläsionen bereits abgeheilt sind. Dies würde die Lebensspanne eines Schweines in der Fleischproduktion überschreiten und sie so ab dem Zeitpunkt einer Infektion über ihre ganze Lebensspanne infektiös für Artgenossen machen (Maes 2020).

Muttertiere und ihre Ferkel in Zuchtbetrieben gelten als Reservoir für MHP-Infektionen für das gesamte Produktionssystem. Es wird angenommen, dass die Zirkulation von MHP folgend funktioniert: Altsauen in einem Betrieb haben eine bestehende Infektion und übertragen diese auf die neu zugekauften Jungsauen. Diese wiederum erhalten die Erregerausscheidung aufrecht und sind verantwortlich für einen großen Teil der oftmals asymptomatischen Weiterverbreitung (Pieters et al. 2009, Maes et al. 2018).

Da eine Erkrankung mit MHP in Österreich nicht anzeigepflichtig ist, gibt es keine genauen Statistiken wie viele Tiere erkranken. Eine Methode zur Erfassung der erkrankten Tiere ist die Fleischschau. Durch das Abheilen der Läsionen vor der Schlachtung oder das allgemeine Fehlen einer pathologischen Lungenzeichnung,

können jedoch viele erkrankte Tiere nicht identifiziert werden (Maes 2020). Ein weiterer bedeutsamer Risikofaktor für die Gesundheit von Schweinebeständen ist die Ausbreitung des Erregers in Form infektiöser Aerosole über Zu- bzw. Abluftsysteme. Wie zum Beispiel die Erreger der Maul- und Klauenseuche, Aujeszky'schen Krankheit und des Porzinen reproduktiven und respiratorischen Syndroms, kann sich auch MHP über weite Strecken per Luftweg ausbreiten. So konnte auch aufgezeigt werden, dass von einem Betrieb ausgehende infektiöse Aerosole für Infektionen in einem 9,2 km entfernten Betrieb verantwortlich waren (Otake et al. 2010). In den letzten zehn Jahren hat zusätzlich die Wildschweinpopulation in Europa zugenommen, was die Wahrscheinlichkeit eines möglichen Kontakts mit Hausschweinen und damit das Risiko der Übertragung von MHP und anderen Krankheitserregern erhöhen könnte (Malmsten et al. 2018).

### 2.3. Pathogenität

Die Pathogenität wird definiert, als die Fähigkeit von infektiösen Stoffen (zum Beispiel Viren, Bakterien und Pilzen) in bestimmten Organismen eine Erkrankung hervorzurufen. Dies ist abhängig von der Fähigkeit des Pathogens sich im Wirt zu vermehren, indem es z.B. das Immunsystem sabotiert oder umgeht (Shapiron-Ilan et al. 2005).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist über die Pathogenese der MHP-Infektion wenig bekannt. Man ist sich jedoch sicher, dass erst die Bindung des Pathogens an das Flimmerepithel des Respirationstraktes eine Besiedelung ermöglicht und im weiteren Verlauf auch eine Erkrankung. Diese erwähnte Besiedelung führt zur Ziliostase und Zilienverlust. Die Pathogenese umfasst somit eine langfristige Besiedelung der Epithelien des Respirationstraktes, eine Stimulierung einer Entzündungsreaktion und eine Unterdrückung der angeborenen und erworbenen Immunantwort (Blanchard et al. 1992, Maes 2020). Ebenso spielt auch eine Interaktion mit anderen Krankheitserregern eine wichtige Rolle (Maes 2020).

Pathogeninduzierte Zellveränderungen sowie die ausgelöste Wirtsreaktion tragen zur Krankheit bei. Bereits einen Tag nach Erregerübertragung kann MHP in enger Bindung mit den Zilien der Wirtszelle vorgefunden werden. Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchung konnte man diese engen Bindungen auch zwischen den Mykoplasmen und den Zwischenräumen der Zilien und der Spitzen der Mikrovilli der Epithelzellen

beobachten (Tajima und Yagihashi 1982). Die Schäden beschränken sich normalerweise auf den durch MHP verursachten Verlust von Zilien und den Zelltod sowie auf solche, die durch die Entzündungsreaktion des Wirts auf den Erreger verursacht werden (Leal Zimmer et al. 2020).

MHP muss bevor es dem Wirt Schaden zufügen kann, einige nicht-immunmedierte Barrieren umgehen. Da die ausgedehnte Epitheloberfläche des Respirationstrakts zwischen Nase und Alveolen ständig einer Vielzahl von Krankheitserregern ausgesetzt ist, welche auch potenziell Schaden anrichten können, gibt es einige Hindernisse, um die Lunge zu schützen und in einem nahezu sterilen Zustand zu erhalten. Diese Hindernisse umfassen zum Beispiel das Husten, anatomische Barrieren und aerodynamische Veränderungen. Immunmechanismen gehören im Zusammenhang mit der Erregerabwehr zu den sekundären Mechanismen. Zu den primären Abwehrmechanismen zählt die mukoziliäre Clearance. Gesunde Atemwegsoberflächen sind mit Flimmerepithelzellen ausgekleidet und mit einer Atemwegsoberflächenschicht bedeckt, die aus zwei Komponenten besteht: einer dickflüssigen Schleimschicht, die eingeatmete Partikel und fremde Krankheitserreger einschließt und einer Periziliarschicht mit niedriger Viskosität, die die Atemwegsoberflächen schmiert und das Ziliarklopfen für eine effiziente Schleimbeseitigung aus dem Organismus erleichtert. Das koordinierte Zusammenwirken dieser Komponenten an der Oberfläche der Atemwege führt zu einem sehr guten Schutz gegen alle Schadpartikel, die den Organismus schwächen können (Bustamante-Marin und Ostrowski 2017).

Um diese höchst spezifischen Abwehrmechanismen zu überwinden, benötigt MHP spezielle Oberflächenkomponenten, die sogenannten Adhäsine, mit welchen diese sich an den Wirt binden. Dieser Prozess der Anheftung ist sehr komplex und findet zwischen den Adhäsinen der Mykoplasmazellen und den Rezeptoren auf der Membran der Zilien statt. Eine Infektion mit MHP verursacht so eine Lungenentzündung durch eine Vielfalt von Mechanismen. Dazu gehören Schäden durch die enge Bindung an die Flimmerhärchen des Lungenepithels, deren Zerstörung und auch der Zelltod des Epithels (DeBey und Ross 1994). Ebenfalls hat sich gezeigt, dass MHP eine modulierende Wirkung auf das Immunsystem hat, wobei die Art dieser Modulation noch nicht gut verstanden ist. Alveolarmakrophagen und Lymphozyten, die durch MHP stimuliert werden, produzieren daraufhin pro-inflammatorische Zytokine,

die für die typischen Lungenläsionen und lymphatische Hyperplasie verantwortlich sind (Rodríguez et al. 2004).

An der Bakterien-Wirt-Interaktion sind verschiedenste Adhäsine beteiligt. Dieser Prozess ist dynamisch, komplex und noch nicht vollständig geklärt, man weiß jedoch, dass mehrere oberflächliche Moleküle des Erregers beteiligt sind. Das für die Bindung an Zilien hauptverantwortliche Adhäsine ist P97. Die Zilienbindungsaktivität dieses Proteins wurde am Carboxylterminus lokalisiert, der zwei Regionen (R1 und R2), bestehend aus sich wiederholenden Aminosäuresequenzen, umfasst (Hsu und Minion 1998). R1 stellt hier die Zilien bindende Region des Proteins dar. Um sich an die Zilien zu binden, sind acht Pentapeptide in der R1 Region nötig. Weiters können R1 und R2 an Heparin und Fibronectin binden (Minion et al. 2000, Deutscher et al. 2010)

Es wurde eine ganze Reihe von zusätzlichen Adhäsinen identifiziert, darunter Mhp182 (P102), Mhp 684 (P146), Mhp 493 (P159), Mhp 494 (P216), Mhp 683 (P135), Mhp 271, Mhp 107 und Mhp 108 (S116). Die Adhärenz wird jedoch hauptsächlich durch Interaktionen von Mitgliedern der Adhäsinfamilien P97, P102 und von P159 mit Glykosaminoglykanen und Fibronectin vermittelt, die die Oberfläche von Flimmerepithelzellen der Atemwege des Wirtes auskleiden (Zimmerman et al. 2019; Hsu und Minion 1998; Seymour et al. 2012).

Die meisten Proteine aus den Familien der P97/P102-Paralogenfamilien und P159 werden posttranslational prozessiert und gespalten, ein System, das bei vielen anderen oberflächenassoziierten Proteinen beobachtet wird (Seymour et al. 2010, Maes et al. 2018). Fragmente der P97/P102-Paralogfamilien und P159 verbleiben auf der Zelloberfläche und fungieren als Rezeptoren für extrazelluläre Matrixproteine und Plasminogen und beeinflussen so die Interaktion von MHP mit seinem Wirt (Maes et al. 2018).

## 2.4. Klinisches Erscheinungsbild

In Schweinebeständen treten zwei klinische Formen der durch MHP induzierten Erkrankung auf: epidemisch und endemisch. Im Unterschied zu einer Endemie, bei der eine Krankheit innerhalb einer Population fortwährend mit etwa gleicher Fallzahl auftritt (Reproduktionsrate = 1), verbreitet sich eine Epidemie mit einer viel größeren Reproduktionsrate (> 1). Dies bedeutet bei einer Infektionskrankheit, dass die Zahl an Infizierten zunimmt und die Zahl an Neuinfektionen ansteigt. MHP-Epidemien sind selten und treten nur auf, wenn MHP in eine nicht infizierte, immunologisch naive

Herde eintritt. Hier erfolgt die Ausbreitung der Krankheit sehr schnell und alle Altersgruppen können betroffen sein. Husten, akute Atemnot, Fieber und Todesfälle können auftreten.(Maes 2020).

Die endemische Krankheitsform der EP ist die häufigste Form und wird meistens in kontinuierlich infizierten Herden beobachtet. Das offensichtlichste klinische Zeichen ist unproduktiver keuchender Husten bei Mastschweinen. Der Beginn ist schleichend, betrifft zu Beginn nur einige Tiere und breitet sich langsam auf den Großteil der Herde aus. Der Husten kann bereits nach 2–3 Wochen verschwinden, aber auch während der gesamten Periode der Krankheit erhalten bleiben. Bei experimentellen Infektionen sind die klinischen Symptome hauptsächlich durch leichtes Fieber gekennzeichnet, gefolgt von trockenem Husten. Der Husten tritt 10 bis 14 Tage nach der Inokulation auf, erreicht einen maximalen Höhepunkt nach etwa 4–5 Wochen und verschwindet dann allmählich (Arsenakis et al. 2016). In endemischen Szenarios zeigt der Krankheitsverlauf eine hohe Morbidität, jedoch eine geringe Mortalität. Wenn MHP in eine naive Population eindringt, kann die Krankheit schwerwiegender sein und Tiere jeder Altersgruppe betreffen. Die Morbidität kann auf bis zu 100 % ansteigen (Zimmerman et al. 2019). Wenn andere bakterielle und/oder virale Erreger beteiligt sind, oder bei schlechter Luftqualität aufgrund von Feinstaub und Ammoniakbelastung der Stallluft, können sich die klinischen Symptome und das Allgemeinverhalten verschlimmern. Atemnot, Pyrexie, Anorexie, Lethargie und Todesfälle treten auf (Maes et al. 1996). Bei unkomplizierten Fällen kann ein unterschiedlicher Anteil der Tiere mehrere Wochen lang subklinisch infiziert bleiben ohne dass Anzeichen von Husten oder Lungenläsionen bei der Schlachtung erkenntlich werden (Maes et al. 2018)

Weitere bakterielle Organismen, wie *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Glaesserella parasuis* oder *Streptococcus suis* können den Krankheitsverlauf verschlimmern. Der Begriff Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) umfasst eine zusätzliche Besiedelung mit viralen Pathogenen, hauptsächlich porcines Circovirus Typ 2 (PCV2), Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom Virus (PRRSV) und Influenza-A-Virus (IAV) (Zimmerman et al. 2019).

## 2.5.Läsionen

Makroskopisch sichtbare Läsionen in der Lunge von mit MHP-infizierten Schweinen finden sich beidseitig in den apikalen, kardialen und intermediären Lappen und manchmal in den vorderen Teilen der Zwerchfelllappen und zeigen sich als interstitiell-

peribronchiale Pneumonie. In Impfstudien können sie 7–10 Tage nach der Infektion nachgewiesen werden und erreichen ihre maximale Ausdehnung 2–4 Wochen nach der Infektion. Die Läsionen sind beige/rosa oder pflaumenfarben, von fleischiger Konsistenz und können vom normalen Gewebe scharf abgegrenzt sein. Handelt es sich um eine unkomplizierte Infektion, sind nur wenige Teile der Lunge betroffen. Liegen konsolidierte dunklere Läsionen direkt neben hellrosa, emphysematösen Läsionen, erhält die Lunge eine schachbrettartige Musterung. Ebenso ist bei bis zu 62% der infizierten Tiere ein mukopurulenten Exsudat zu erkennen (Sørensen et al. 1997). Zusammenfassend werden diese makroskopischen Läsionen definiert als multilobuläre bis zusammenwachsende, rote bis dunkelrote, violette bis gräuliche, leicht bis stark konsolidierte Bereiche der kranialen Lungenlappen (apikal und kardial) und teilweise auch der intermediären Lappen (Batista Linhares et al. 2015). Beim Anschnitt einer von MHP-betroffenen Lunge ist die Konsistenz mäßig fest und die Schnittfläche feucht. Die bronchialen und mediastinalen Lymphknoten können geringgradig bis mittelgradig vergrößert sein. Während der chronischen Stadien sind die Läsionen purpur- bis dunkelrot. Sich bereits in Heilung befindliche Läsionen bestehen aus Fissuren kleiner kollabierter Alveolen (interlobuläre Narbenretraktionen) und bleiben bis zu 2–4 Monate nach der Infektion bestehen (Sørensen et al. 1997; Kobisch und Marois 2008)

Obwohl derartige Läsionen auf eine EP hindeuten, sind diese für MHP nicht pathognomon, da andere Organismen wie das Schweineinfluenzavirus oder die Koinfektionen von *Pasteurella multocida* und dem Virus der Aujeszky'schen Krankheit ähnliche Läsionen hervorrufen können (Done 1991).

Sowohl die klinischen Anzeichen als auch die makroskopischen Läsionen sind somit suggestiv und deuten nicht ausschließlich auf eine Infektion mit MHP hin. Andere Erreger wie Influenza A Virus (IAV) oder *P. multocida* sollten im Rahmen der wahrscheinlichsten Differentialdiagnosen in Betracht gezogen werden. Infektionen mit *P. multocida* können eine katarrhalisch-eitrige Lungenentzündung verursachen, die sich grob als kranioventrale pulmonale Konsolidierung zeigt (Maes et al. 2018)

Histologisch feststellbare Läsionen können je nach Dauer der Erkrankung stärker ausfallen. Die Veränderungen des Atemwegsgewebes (Trachea, Bronchien, Bronchiolen, Alveolargänge und Alveolen), die in der frühen Phase der Infektion bei den Ferkeln mit Anzeichen einer Lungenentzündung beobachtet werden, sind durch eine bronchioläre und lymphoretikuläre Hyperplasie und eine erhöhte perivaskuläre

Ansammlung mononukleärer Zellen gekennzeichnet. Läsionen im zweiten Stadium treten zwischen sieben und 28 Tagen nach der Infektion auf und sind durch eine ausgeprägte Akkumulation von Neutrophilen, Exsudat und Makrophagen in den Alveolen, Proliferation von alveolären Pneumozyten Typ II, zunehmende Ansammlung von Lymphozyten, Histozyten und Plasmazellen um Blutgefäße und leitende Atemwege und Vergrößerung von peribronchialen Lymphknoten gekennzeichnet. Das Bronchialepithel kann teilweise von Zilien befreit oder teilweise abgeschuppt sein (Blanchard et al. 1992). Läsionen, welche sich bereits tiefgreifend etabliert haben, treten 17–40 Tage nach der Infektion auf und sind gekennzeichnet durch progressive peribronchiale lymphoide Hyperplasie, vermehrte perivaskuläre mononukleäre Zellakkumulation und progressive Entwicklung einer alveolären Pneumonie. Späte und sich erholende Läsionen treten 69–210 Tage nach der Infektion auf. Eine große Anzahl von Lymphozyten und weniger Plasmazellen bilden ausgedehnte peribronchiale Manschetten, die auch viele große Lymphknoten enthalten, die Bronchiallumen komprimieren können. Scoring-Systeme wurden verwendet, um histologisch feststellbare Läsionen oder auch die Hustenfrequenz zu quantifizieren (Villarreal et al. 2009).

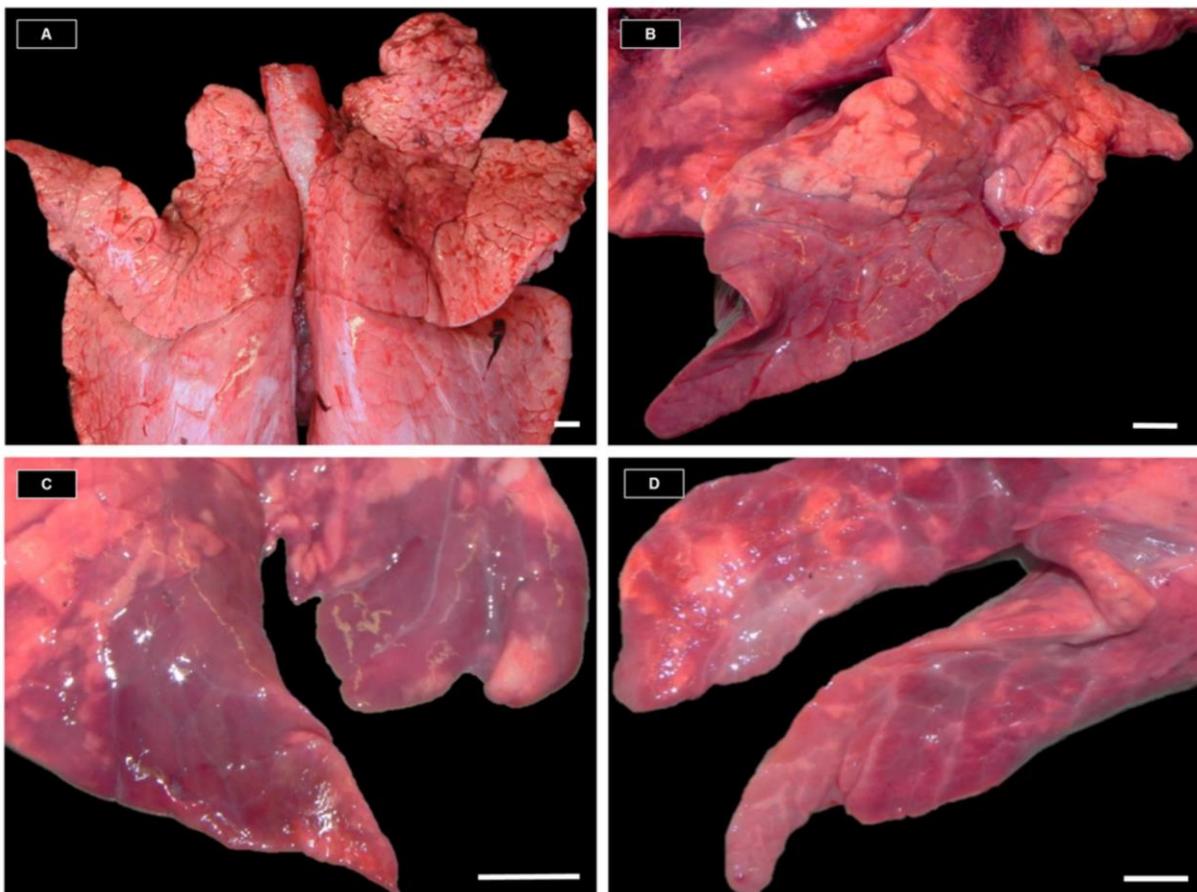


Abbildung 1: Schweinelungen mit und ohne makroskopisch sichtbarer Enzootischer Pneumonie-ähnlicher Läsionen (MaEPL). A: Lunge ohne MaEPL. B: Lunge mit MaEPL vom Frühtyp (rote bis dunkelrote multilobuläre bis koaleszierende konsolidierte Bereiche, die weniger als 50 % des Lappens betreffen). C: Lunge mit MaEPL vom Spättyp (multilobuläre bis koaleszierende blassviolette bis gräuliche Bereiche mit Anzeichen einer Retraktion des Parenchyms und Atelektase). D: Lunge mit MaEPL vom Spättyp (wie C, jedoch mit stärker ausgeprägter Fibrose). Messbalken = 1 cm (Batista Linhares et al. 2015).

## 2.6. Nachweismethoden

MHP verursacht nicht immer spezifische Läsionen, welche bei einer Sektion erkennbar sein müssen oder klinisches Verhalten, welche immer auftreten muss. Deswegen erweist sich die frühe Erkennung einer Infektion oft als schwierig. Der Verdacht beruht meist auf dem Zusammenspiel von mehreren Faktoren. Diese wären die Klinik (z.B. unproduktiver Husten, etc.), welche jedoch am wenigsten aussagekräftig ist, das Wissen um die Epidemiologie, typische Lungenläsionen und der direkte Erregernachweis (Zachary und McGavin 2013). Alle diese Zeichen untermauern die Vermutung bzw. die Tatsache, dass sich MHP im Bestand ausbreitet. Bezüglich der Klinik gibt es Methoden zur Quantifizierung des Hustens in der Herde, welche sich als sehr nützlich erwiesen haben. Hierzu werden computergesteuerte Monitoringsysteme in den Stallungen angebracht, um diese festzustellen (Nathues et al. 2012).

Der traditionelle Weg MHP nachzuweisen ist die Kultivierung auf Friis-Medium. Zum jetzigen Standpunkt wird die Kultivierung jedoch nur verwendet, wenn man ein Bakterienisolat für die Empfindlichkeitsüberprüfung benötigt. Dies begründet sich in einem erhöhten Kostenaufwand und in der Dauer der Anzucht. Für das Wachstum müssen in der Regel 4 bis 8 Wochen veranschlagt werden (Ter Laak et al. 1991). Zusätzlich besteht das Risiko, dass schneller wachsende Mykoplasmen, wie *M. hyorhinis*, oder andere Bakterien MHP bei der Kultivierung überwuchern (Thacker 2004).

Weiters können auch Verfahren wie die Immunhistochemie, die Immunfluoreszenz oder die *in-situ*-Hybridisierung zum Nachweis von MHP in Gewebeschnitten eingesetzt werden. Hierfür werden jedoch spezifische Antikörper bzw. Nukleinsäure-Sonden benötigt, welche oft nicht verfügbar sind und sich somit auch nicht als praktikabel erweisen. Die eben genannten Methoden haben ebenfalls den Nachteil, dass sie nur

an sehr frischen Proben eines toten Tieres angewandt werden können. Bereits degenerierte Lungenstücke bzw. Lungenstücke die hochgradig mit Brühwasser während des Schlachtprozesses in Kontakt kamen, sind nicht optimal und liefern oft falsch negative Ergebnisse. Auch die unterschiedliche Besiedelungsdichte der Bakterien in dem untersuchten Gewebe ist zu berücksichtigen. Hierfür sollten mehrere Lungengewebsproben vom selben Tier untersucht werden (Zimmerman et al. 2019) Aufgrund der hohen Genauigkeit und der schnellen Ergebnisfindung, hat sich die PCR als Bestätigungstest durchgesetzt. Die PCR stellt eine Methode des direkten Erregernachweises dar, bei der Nukleinsäure-Sequenzen vervielfältigt und anschließend die Amplifikationsprodukte sichtbar gemacht werden. Hier wurden mehrere Assays entwickelt zu denen z.B. die Nested- oder Real Time-PCR gehören. Hierfür geeignete Probenmatrizes stellen Proben von Lungen mit typischen MHP-Läsionen (Teile mit groben Läsionen die auch Bronchien einschließen) aber auch klinische Sammelproben. Zu Letzteren zählen Oral Fluids, Abstriche vom Nasenraum, Tonsillen und Bronchien aber auch die tracheobronchiale Lavage. Antikörper gegen MHP können auch in verschiedensten ELISA-Testsystemen gemessen werden (Pieters et al. 2017).

## 2.7. Kontrollmaßnahmen

Eine durch MHP-verursachte Infektion kann mittels einer Kombination mehrerer Maßnahmen kontrolliert werden. Dazu gehört die Optimierung der Biosicherheitsmaßnahmen und Haltungsbedingungen, sowie ein ausgeklügelter Einsatz von Impfungen. Die Verbesserung der Bewirtschaftungsmethoden ist für die Bekämpfung dieser Krankheit von entscheidender Bedeutung. Dies sind auch die ersten Maßnahmen, die ergriffen werden sollten, sobald MHP nachgewiesen wurde. Die All-in-All-out-Produktion (AIAO) ist eine der wichtigsten Maßnahme bei der Bekämpfung der EP, da der Zyklus der Erregerübertragung von den älteren auf die jüngeren Schweine unterbrochen werden kann. Sie ermöglicht es dem Schweineproduzenten, die Umgebungsbedingungen auf eine einheitliche Population abzustimmen und die Stalleinheiten zwischen den einzelnen Schweinegruppen zu reinigen. Die AIAO-Produktion führt auch zu einer besseren Leistung und weniger Lungenläsionen bei Schlachtschweinen. Das Mischen oder Umsortieren von Schweinen ist eine Quelle von Stress für die Tiere und erhöht die Wahrscheinlichkeit der Erregerübertragung. Daher ist dieses System, bei dem dieselben Schweine immer

als Gruppe durch die verschiedenen Produktionsstufen transportiert werden, einem System vorzuziehen, bei dem die Schweine während des Transfers von einer Einheit zur anderen umgruppiert werden (Maes et al. 2008).

Diese Eliminierung von Risikofaktoren hat zum Ziel, die Gefahr eines Eintrages von MHP von der Außenwelt in eine Herde und seine Ausbreitung innerhalb einer Herde zu reduzieren. Darüber hinaus ist es erforderlich, Belastungsfaktoren zu erkennen, die zur Entstehung der Erkrankung nach vorangegangener Infektion beitragen. Durch die Implementierung einer einzelnen Maßnahme, können oft nur wenige Erfolge erzielt werden, da alle genannten Punkte im Zusammenspiel stehen. Diese werden durch die Einführung einer Vakzination bzw. einer Applikation einer antibiotisch aktiven Substanz ergänzt (Zimmerman et al. 2019).

Antibiotika wie Tetrazykline und Makrolide werden häufig zur Behandlung von Atemwegserkrankungen wie EP eingesetzt (Vicca et al. 2004). Die medikamentöse Behandlung ist bei klinischen Erkrankungen erforderlich. Antibiotika aus den Wirkstoffklassen Tetrazykline, Makrolide, Lincosamide, Pleuromutiline, Fluorchinolone und Aminoglykoside sind potenziell gegen MHP wirksam.

Aufgrund der Lokalisierung des Organismus auf der Oberfläche der Atemwege ist davon auszugehen, dass nur solche antimikrobiellen Substanzen *in vivo* wirksam sind, die in der Lage sind, hohe Konzentrationen im Schleim und in den Flüssigkeiten des Respirationstrakts zu erreichen. Schweine, die mit wirksamen Antibiotika behandelt werden, haben weniger klinische Symptome und Lungenläsionen sowie eine geringere Anzahl von Sekundärinfektionen (Ciprián et al. 2012). Trotz des Erfolgs von Medikamentenprogrammen bei der Bekämpfung von MHP-Infektionen, wird oft nur ein Teilschutz erreicht. Die Ergebnisse können uneinheitlich sein, da Ausbrüche möglich sind, wenn die Behandlung abgebrochen wird (Zimmerman et al. 2019). Auch die präventive Medikation von Schweinen mit antimikrobiellen Mitteln sollte so weit wie möglich minimiert werden, um die Entwicklung einer antimikrobiellen Resistenz zu vermeiden. Die Anwendung von Antibiotika zur Prophylaxe ist nur in Ausnahmesituationen mit besonderem Grund vertretbar, z.B. nach einer Operation. Nur bei akuter Infektionsgefahr (insbesondere bei Vorliegen von entsprechenden Laborergebnissen) kann der metaphylaktische Einsatz von Antibiotika im Einzelfall auch ohne Anzeichen von klinischen Erkrankungen gerechtfertigt sein (Bundesministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit und Konsumentenschutz 2018).

Die Impfung gilt bis jetzt als eine der wirksamsten Methoden, um den Folgen einer MHP-Infektion entgegenzuwirken. Allen Impfungen ist gemein, dass sie eine Reduktion der Symptomatik und eine Verringerung der typischen Läsionen in der Lunge bewirken können bzw. sollen, eine sterile Immunität ist jedoch nicht zu erwarten. Impfstoffe gegen MHP werden weltweit eingesetzt und bestehen aus inaktivierten, adjuvantierten Ganzzellpräparaten, die intramuskulär verabreicht werden (Leal Zimmer et al. 2020). Eine Impfung reduziert klinische Symptome und Lungenläsionen und verbessert die Leistung der Tiere. Außerdem reduzieren die kommerziellen Impfstoffe die Anzahl der fremden Organismen im Respirationstrakt und verringern das Infektionsniveau in einer Herde. Allerdings haben Studien unter experimentellen und Feld-Bedingungen gezeigt, dass die Impfung nur zu einer begrenzten Verringerung der Übertragungsrate von MHP führt. Obwohl die Ergebnisse nicht auf die Feldbedingungen als solche extrapoliert werden können, wurde gezeigt, dass die Impfung allein mit den derzeitigen Bakterin-Impfstoffen wahrscheinlich nicht ausreicht, um MHP aus infizierten Schweinebeständen zu eliminieren (Meyns et al. 2006). In MHP-freien Beständen oder in Beständen mit sehr geringem Infektionsniveau wird die Impfung nicht empfohlen, da unter diesen Bedingungen der Nutzen der Impfung möglicherweise nicht ausreicht, um die Kosten der Impfung auszugleichen. In Beständen mit höheren Infektionsraten ohne offensichtliche klinische Anzeichen oder in Beständen mit klinischer Krankheit ist die Impfung wirtschaftlich gerechtfertigt (Maes et al. 2003).

Es gibt die Möglichkeit der one-shot (einmaligen) oder der two-shot (zweimaligen) Impfung. Die Einmalimpfung ist vor allem deshalb beliebt, weil sie einen geringeren Arbeitsaufwand erfordert und sich leichter in die routinemäßigen Bewirtschaftungspraktiken im Betrieb einfügen lässt. Bei der Einmalimpfung ist jedoch die Fähigkeit des Schweinezüchters oder des betrieblichen Mitarbeiters, richtig zu impfen, entscheidend für die Einhaltung der Impfvorschriften, da nur eine Injektion verabreicht wird und diese somit auch dringlichst richtig gesetzt werden muss. Die Impfung von Saugferkeln hat den Vorteil, dass eine Immunität induziert werden kann, bevor die Schweine infiziert werden und dass weniger Krankheitserreger vorhanden sind, die die Immunantwort beeinträchtigen können. Obwohl die Impfung in den meisten infizierten Beständen eine positive Wirkung hat, ist die Wirkung von Bestand zu Bestand unterschiedlich. Die unterschiedlichen Ergebnisse können auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein, wie z. B. unsachgemäße Lagerung des

Impfstoffs und Injektionstechnik, antigene Unterschiede zwischen Feldstämmen und Impfstoffstämmen, Vorhandensein von Krankheiten zum Zeitpunkt der Impfung und Interferenz der durch den Impfstoff induzierten Immunreaktionen durch mütterliche (kolostrale) Antikörper (Maes et al. 2008).

Eine Impfung gegen MHP kann einen Schutz vor klinischer Erkrankung vermitteln, erzeugt aber keine sterile Immunität, d. h. Kolonisierung, Ausscheidung und Neuinfektionen werden nicht verhindert (Michiels et al. 2017).

## 2.8. Eradikation

Eine gänzliche Eradikation aus einem positiven Schweinebestand ist grundsätzlich möglich. Zimmermann et al. (1989) hat verschiedene Verfahren und Vorgehensweisen beschrieben. Eine Möglichkeit wäre eine Teilsanierung mit jungtierfreiem Intervall und strategischer Medikation aller verbliebenen Tiere oder eine vollständige De- und Re-Population des Bestandes. Das Totalsanierungsprogramm umfasst die vollständige Räumung der Ställe durch Verkauf oder Keulung aller Tiere. Das partielle Sanierungsprogramm umfasst ein ferkel- und mastschweinfreies (<10 Monate) Intervall und die vorübergehende, 10-14-tägige Fütterung mit einem medikierten Futter. Nach Beendigung dieser Medikation wird der Betrieb mit dem normalen Tierverkehr fortgesetzt (Zimmermann et al. 1989).

In den USA wird ebenfalls ein Verfahren eingesetzt, das als „medicated-early-weaning“ bezeichnet wird und die vertikale Übertragung von der Sau auf die Ferkel unterbrechen soll. Vor und nach dem frühzeitigen Absetzen am 5. Lebenstag und der isolierten Aufzucht der Ferkel erfolgt eine intensive Behandlung der Ferkel mit wirksamen Antibiotika (Alexander et al. 1980).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Speichelprobengewinnung und Vorbereitungen

Die Speichelproben für die Untersuchungen wurden mittels Stricktechnik gewonnen. In jede Bucht mit maximal 25 Aufzuchtferkel wurde für 30 Minuten ein entwirrter Strick (Basko Aleksander Skoracki, Polen) gehängt. Aus 30 der bekauten Stricke wurde sofort Oral Fluid gewrungen und für die spätere Nutzung auf  $-80^{\circ}$  Celsius eingefroren. Der nun ausgewrungene Strick wurde verworfen. Weitere 30 bekaute (engl.: used) Stricke wurden eingesammelt und sofort auf  $-80^{\circ}$  Celsius bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Vorab wurden alle 60 Stricke gewogen, um die Differenz des Gewichtes vor und nach dem Bekauen ermitteln zu können. Für die nativen Proben wurde der Median der ermittelten Differenzen (50,73 aufgerundet auf 51 g bzw. ml) herangezogen, um weitere 30 Stricke im Labor mit dieser Menge an physiologischer Kochsalzlösung zu befeuchten. Diese wurden auch auf  $-80^{\circ}$  Celsius tiefgefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt mit der Bearbeitung zu beginnen. Dieser Prozess war notwendig, um eine einheitliche Vorbefeuchtung analog zur Bekauung und damit Befeuchtung mit Oral Fluid durch Schweine zu erreichen.

#### 3.2. Herstellung der MHP-Suspensionen

Zur Herstellung der MHP-Suspensionen wurde vorerst der MHP-Typstamm J<sup>T</sup> in modifiziertem Friis Medium (Institut für Mikrobiologie, Vetmeduni Wien) bis zur späten Log-Phase (beginnende Ansäuerung des Kulturmediums durch Glukose-Fermentation) angezüchtet. Im Anschluss wurden Aliquots zur Archivierung und späteren Nutzung bei minus  $80^{\circ}$  C eingefroren. Diese wurden vorerst mit einem Spritzenfilter mit einer Porengröße von  $0,45\ \mu\text{m}$  filtriert, um etwaige Zellaggregate zu entfernen. Darauf folgte die Lebendkeimzahlbestimmung durch Herstellung von Verdünnungsreihen (mit mod. Friis-Medium) und Ausplattieren auf Friis-Agar (3-fach Ansatz) zur Auszählung der Kolonie-bildenden Einheiten/ml. Nach Auftauen eines Aliquots wurde die Lebendkeimzahl in der Infektionssuspension (Verdünnung mit PBS -> Phosphat gepufferte Kochsalzlösung auf den höchsten Konzentrationswert eingestellt. Im Anschluss folgte die Herstellung der niederkonzentrierten Infektionssuspensionen durch fortlaufende 1:10 Verdünnung mit PBS. Zur Kontrolle

wurden Parallel-Ansätze auf Friis-Platten zur Überprüfung der Erregerkonzentration in den Infektionssuspensionen hergestellt.

### 3.3. Aufbau der Versuchsreihe

#### 3.3.1. Herstellung unterschiedlicher Matrices

Vor dem Beginn der praktischen Probensammlung wurden alle unbenutzten Stricke im Labor abgewogen, um das genaue Startgewicht zu ermitteln. Dieser Wert wurde zu einem späteren Zeitpunkt benötigt, um den Befeuchtungsgrad der bekauten Stricke zu ermitteln. Der erste praktische Schritt bestand aus dem Sammeln der Speicheltricke (60 Stück) an der Vetfarm Medau (30 bekaute Stricke und 30 Oral Fluids). Im Labor sind weitere 30 unbenützte Stricke mit dem entsprechenden Volumen an physiologischer NaCl-Lösung getränkt worden („native“ Kaustricke). Daraus ergibt sich eine Probengesamtzahl von 90. Da zeitlich nicht die ganze Durchführung des Versuchs an einem Tag stattfinden konnte, wurden die Proben nach dem Sammeln bis zur Weiterverwendung auf  $-80^{\circ}$  eingefroren. Die beprobten Tiere waren Schweine der Vetfarm Medau der Veterinärmedizinischen Universität Wien. Die Schweine wurden in Gruppen von maximal 25 Tieren gehalten und das Alter betrug zum Beprobungszeitpunkt zehn Wochen. Aus den gewonnenen Proben wurden drei Untersuchungsansätze parallel durchgeführt.

##### 3.3.1.1. Native Speichelstricke

Für die Herstellung der nativen Stricke wurden 30 handelsübliche Kaustricke für das Beprobieren von Speichel von Schweinen herangezogen. Diese wurden entwirrt und mit 51 ml physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) in einem frischen Probensäckchen aus Plastik vorbefeuchtet. Die getränkten Stricke wurden mindestens eine Minute per Hand massiert, um den Kauvorgang eines Schweines zu imitieren. Im Anschluss wurden alle im Labor befeuchteten Stricke bei  $-80^{\circ}$  C tiefgefroren, um eine gleiche Arbeitsreihenfolge zu gewährleisten.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die nativen Speichelstricke aufgetaut und mit den unterschiedlichen Konzentrationen einer MHP-Suspension für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss die Flüssigkeit durch Auswringen

gewonnen. Die gewonnenen Flüssigkeiten wurden im Anschluss mittels PCR weiter auf das Vorhandensein von MHP untersucht.

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Gewichtsunterschiede der Speichelstricke vor und nach Bekauen durch Schweine für die Ermittlung der zu verwendenden Menge an physiologischer Kochsalzlösung zur Vorbefeuchtung der nativen Kaustricke.

Strick	Buchnummer entnommen	Alter Tiere Wochen	Gewicht Tiere (kg)	Gewicht vor Einhängen (g)	Gewicht nach Bekauen (g)	Differenz
1	1	10	25	71,46	116,35	44,89
2	2	10	25	73,65	127,96	54,31
3	3	10	25	74,82	125,83	51,01
4	4	10	25	74,55	117,45	42,90
5	4	10	25	78,38	138,14	59,76
6	6	10	25	74,82	120,43	45,61
7	7	10	25	75,62	118,98	43,36
8	8	10	25	76,3	117,77	41,47
9	1	10	25	74,4	125,82	51,42
10	2	10	25	72,71	132,99	60,28
11	5	10	25	74,73	128,75	54,02
12	3	10	25	80,22	134,60	54,38
13	9	10	25	79,43	124,14	44,71
14	9	10	25	78,04	122,23	44,19
15	9	10	25	74,12	127,38	53,26
16	9	10	25	71,96	116,12	44,16
17	4	10	25	74,58	112,99	38,41
18	7	10	25	73,51	124,77	51,26
19	6	10	25	72,02	112,99	40,80
20	1	10	25	72,02	130,43	58,41
21	4	10	25	75,17	130,53	55,36
22	3	10	25	77,85	142,02	64,17
23	5	10	25	72,98	142,16	69,18
24	2	10	25	76,94	127,39	50,45
25	6	10	25	73,15	125,04	51,89
26	7	10	25	74,68	128,69	54,01
27	9	10	25	72,90	117,04	44,14
28	9	10	25	76,11	118,03	41,92
29	9	10	25	75,26	112,85	37,59
30	9	10	25	74,75	113,54	38,79
					Mittelwert	49,54
					Median	50,73

### 3.3.1.2. Bekaute (used) Speichelstricke

Im zweiten Ansatz dieser Versuchsreihe wurden Speichelstricke, die von maximal 25 Tiere bekaut wurden, herangezogen. Die Gewinnung der Speichelstricke erfolgt wie in der tierärztlichen Praxis üblich. Zuerst wurden 30 Stricke entwirrt und für jeweils eine halbe Stunde in die Bucht einer Schweinegruppe gehängt. Nach Ablauf der Zeit wurden die mit Speichel angesogenen Stricke eingesammelt und in Plastiksäcken einzeln verpackt. Um eine einheitliche Arbeitsreihenfolge einzuhalten, wurden auch diese Stricke im nächsten Arbeitsschritt bei minus 80° C tiefgefroren.

Um die endgültig benötigten mit MHP versetzten Oral Fluidproben zu erhalten, wurden die vorbereiteten eingefroren Stricke aufgetaut und für die Spikingversuche verwendet. Hier wurden wiederum die unterschiedlichen Konzentrationen der MHP-Suspensionen zugefügt, für 30 Minuten inkubiert, danach ausgewrungen und im Anschluss mittels PCR untersucht.

### 3.3.1.3. Oral Fluid

Bei der dritten Versuchsreihe wurde sofort nach dem Bekauen der Sticke durch die Schweine Oral Fluid durch Auspressen, wie in der tierärztlichen Routine üblich, gewonnen und im Labor bei minus 80° C tiefgefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde das zuvor so gewonnene Material wieder aufgetaut und mit den unterschiedlichen Konzentrationen der MHP-Suspension versetzt und im Anschluss direkt für den Nachweis genomischer DNA mittels PCR weiterverwendet. So entstanden 3 unterschiedliche Versuchsreihen mit jeweils 30 Proben.

### 3.3.2. Versetzen der Proben mit MHP-Suspension unterschiedlicher Konzentration

Bei der Durchführung der Spikingversuche wurde mit dem Leerwert begonnen und dieser gleichzeitig auf alle 3 Matrizes (nativ, bekaut und oral Fluid) angewendet. Danach folgte das Versetzen mit 1 ml MPH-Suspension mit Konzentrationswerten von  $10^1$  bis  $10^5$ . Somit wurden alle Proben mit einer genau definierten Menge an MHP versetzt beziehungsweise eine Kontrollreihe ohne hinzugefügte Bakterien erstellt. Von einer jeweiligen Konzentration wurden immer 5 Speichelproben so künstlich im Labor versetzt. Das gewonnene Material wurde in 15 ml Röhrchen aufgefangen und wieder bei -80° C gelagert, um an einem anderen Tag den Versuch fortzusetzen.

Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der Spikingreihe

MHP/ml	Nativ	Bekaut	Oral Fluid
0	5x	5x	5x
10	5x	5x	5x
100	5x	5x	5x
1000	5x	5x	5x
10000	5x	5x	5x
100000	5x	5x	5x
Summe	30	30	30

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung Probenart, Probennummer und MHP-Konzentration die für das Spiking verwendet wurde.

Strick Nummer	Konzentration der Lösung	Art
1-5	$10^5$	Bekaut
6-10	$10^4$	
11-15	$10^3$	
16-20	$10^2$	
21-25	$10^1$	
26-30	$10^0$	
31-35	$10^5$	OF
36-40	$10^4$	
41-45	$10^3$	
46-50	$10^2$	
51-55	$10^1$	
56-60	$10^0$	
61-65	$10^5$	Nativ
66-70	$10^4$	
71-75	$10^3$	
76-80	$10^2$	
81-85	$10^1$	
86-90	$10^0$	

## 3.4. PCR

### 3.4.1. DNA-Extraktion

Zu Beginn wurden die Proben aufgetaut und mittels Schwenken der 15 ml Probenröhrchen gut durchmischt. Danach wurde 1 ml jeder Probe in ein Eppendorf Tube überführt und für 10 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert. Danach fand sich am Boden des Tubes ein Pellet mit dem weitergearbeitet wurde. Der Überstand wurde abgegossen bzw. gründlich abpipettiert. Danach wurde für die DNA-Extraktion das Extraktionskit (Gene Elute Mammalian Genomic DNA Kit von Sigma-Aldrich, Deutschland) eingesetzt. Hierbei wurden 200  $\mu$ l Resuspensionslösung hinzugefügt und das Pellet mit der Spitze der Pipette von der Wand des Tubes abgelöst und wiederum gut auf einem Vortexer vermischt. Im Anschluss wurden 20  $\mu$ l Proteinase K und 200  $\mu$ l Lysis-Puffer hinzugefügt und bei 70°C für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden 200  $\mu$ l Ethanol zugefügt und gut gevortext. Danach wurde eine Filtereinheit vorbereitet, in welches dann die zuvor bearbeiteten Proben überführt wurden. Hierfür wurden 500  $\mu$ l Filter-Vorbereitungslösung in ein Röhrchen mit herausnehmbarer Filtereinheit überführt, abzentrifugiert und auf den feuchten Filter die zu untersuchende Probe vollständig aufgetragen. Dies waren zirka 500  $\mu$ l Probenmaterial, welches überführt werden musste. Das Röhrchen-Filterssystem wurde wieder in die Zentrifuge gestellt und mit 12.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Im Auffangröhrchen befanden sich nun die flüssigen Teile der Probe, welche verworfen werden konnten. Der Filter wurde in ein neues Auffangröhrchen platziert und mit einer Waschlösung zweimalig gewaschen. Ein drittes Mal wurde zentrifugiert, um eine ausreichende Trocknung des Filters zu gewährleisten. Nun wurde der Filter wieder in ein neues Auffangröhrchen platziert und mit 200  $\mu$ l Elutionslösung befüllt. Der befeuchtete Filter wurde für 5 Minuten inkubiert und dann ein letztes Mal mit 14.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Im Auffangröhrchen befand sich danach reine genomische DNA gelöst im Elutionspuffer zur weiteren Untersuchung.

### 3.4.2. Durchführung einer Nested PCR

Die Nested Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird in Situationen eingesetzt, in denen es notwendig ist, die Sensitivität und/oder Spezifität der PCR zu erhöhen, wie zum Beispiel in einer klinischen Probe mit einer heterogenen Population von Zelltypen welche in sehr geringen Mengen vorhanden sind. Bei der Nested PCR werden in der Regel zwei aufeinander folgende Amplifikationsreaktionen durchgeführt, bei denen jeweils ein anderes Primerpaar verwendet wird. Das Produkt der ersten Amplifikationsreaktion wird als Matrize für die zweite PCR verwendet. Die verbesserte Spezifität der Reaktion ergibt sich aus der Bindung von zwei getrennten Primerpaaren an dieselbe Zielvorlage (Green und Sambrook 2019). In der vorliegenden Studie wurde die von Kurth et al. (2002) publizierte Nested PCR zum Nachweis von MHP in klinischen Probenmaterial durchgeführt.

Als erster Schritt wurde ein Mastermix hergestellt. Dieser bestand aus destilliertem Wasser, OneTaq<sup>®</sup> Quick-Load<sup>®</sup> DNA-Polymerase (New England Biolabs, Deutschland) und dem Primerpaar 1 mit den Primersequenzen Mhp-1 5'-TAAACCCAACAAACCTAACT-3' und Mhp-2 5'-CAGATTCGCCAAATACAAAA -3 für die erste PCR bzw. Primerpaar 2 mit den Primersequenzen Mhp-3 5'-AAGTTCATTCGCGCTAGCCC -3' und Mhp-4 5'-GCTCCTACTCCATATTGCC -3 für die zweite PCR. Der Mastermix und die zuvor extrahierte DNA wurden in kleinen PCR-Reaktionsgefäßen gemischt und in den Thermocycler (Eppendorf, Mastercycler Nexus, Deutschland) eingesetzt.

Der Ansatz des Mastermix (25 µl) bestand aus neun µl destilliertem Wasser, 12,5 µl OneTaq<sup>®</sup> Quick-Load<sup>®</sup> DNA-Polymerase (New England Biolabs, Deutschland) 0,5 µl Primer 1 bzw. Primer 2 und 2,5 µl DNA. Dieser Ansatz wurde je nach Probenanzahl aufgerechnet.

Der erste Durchlauf wurde mit dem Programm HP1 durchgeführt. Das Programm HP1 setzt sich aus folgenden Schritten zusammen: Denaturierung bei 94°C für vier Minuten danach folgen 30 Zyklen Denaturierung bei 94°C für eine Minute, Annealing bei 49°C für eine Minute, Elongation bei 72°C für eine Minute. Danach folgt eine zusätzliche Elongation bei 72°C für sieben Minuten. Die so erhaltenen Produkte der ersten Amplifikation wurden für die zweite PCR vorbereitet. Zuerst wurde der Mastermix mit dem spezifischen Primerpaar für die zweite PCR angefertigt. Die zuvor erhaltenen PCR-Produkte wurden nun im Verhältnis 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt. Die

so hergestellte Verdünnung wurde weiter verwendet mit dem neu angefertigten Mastermix und wieder in den Thermocycler eingesetzt. Das nun verwendete Programm HP2 setzt sich aus folgenden Schritten zusammen: Denaturierung bei 92°C für zwei Minuten danach folgen 30 Zyklen Denaturierung bei 92°C für eine Minute, Annealing bei 56°C für eine Minute und Elongation bei 72°C für eine Minute. Eine zusätzliche Elongation bei 72°C für drei Minuten folgte. Mit den Produkten aus der zweiten Runde wurde nun weitergearbeitet. Alle Proben wurden einzeln auf ein zuvor hergestelltes Agarosegel aufgetragen und es wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Für die Herstellung des Gels wurden 6 Gramm Agarose (Lab Consulting, Österreich) in 300 ml TBE Puffer vermengt. Diese Mischung wurde in der Mikrowelle zum Sieden gebracht und dann langsam wieder auf zirka 70 °C abgekühlt und in eine Form gegossen. Nach Abkühlung und Aushärtung des Gels konnte weitergearbeitet werden. Nun wurde nach Befüllen der Geltaschen mit den Proben eine Spannung von 200-220 Volt angelegt. Die kürzeren DNA-Stränge bewegen sich schneller auf den plus Pol zu als die längeren. In jedem Ansatz wurde eine Positiv- (MHP-DNA), eine Negativkontrolle (ohne DNA) und ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt. (1 Kb plus DNA Ladder, New England Biolabs, Deutschland)

Anschließend wurden die Gele in einer Ethidiumbromid-Lösung (2,5 mg/ml) (Lab Consulting, Wien) für 20 min gefärbt. Nach Entfärben der Gele in einem Wasserbad für 10 min wurden die Amplifikationsprodukte mithilfe eines Transilluminators (Sigma-Aldrich, Deutschland) sichtbar gemacht und dokumentiert.

### 3.4.3. Quantitative PCR

Um die Ergebnisse gegenüberstellen zu können bzw. auch zu überprüfen, wurden alle Proben ebenfalls in ein externes Labor eingesandt und eine quantitative PCR durchgeführt. Hierfür wurden alle Proben sorgfältig in transportfähige Röhrchen gefüllt und auf Trockeneis an die IVD Gesellschaft für Innovative Veterinärdiagnostik GmbH (IVD GmbH, Seelze, Deutschland) gesendet. Die Proben wurden mit der dort etablierten Real-Time PCR untersucht.

### 3.4.4. Statistische Methodenerhebung

Die statistische Auswertung wurde von der Plattform für Bioinformatik und Biostatistik Statistik (Dr. Marlies Dolezal) mit der Statistiksoftware „R“ durchgeführt. Die

Diplomandin wurde dabei bei der Aufbereitung des Datenmaterials eingebunden. Aufgrund der Binär- bzw. Binomialverteilung der Zielvariable (erfolgreiche/nicht-erfolgreiche MHP-Detektion) wurden die Daten mittels logistischer Regression ausgewertet mit einem fixen kategorischen Effekt für die Behandlungsmethode mit 3 Faktorstufen (nativ, bekaut, OF) und einer kontinuierlich verteilten Kovariate für den Verdünnungsfaktor.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Beobachtungen zur Probenentnahme

Das Gewinnen der Proben an der VETFARM der Veterinärmedizinischen Universität stellte keine Schwierigkeit dar. Alle zu beprobenden Tiere zeigten außerordentlich großes Interesse an den Stricken. Alle Stricke wurden ausnahmslos mit einer ähnlichen Intensität von den Tieren bekaut. Um sicher zu gehen, dass keine Kontamination mit den Buchtenumgebungen stattfindet, wurden die Stricke mit einem ausreichenden Abstand zum Boden platziert und gut befestigt. Keine der Stricke wurden aus ihrer Halterung gerissen. Alle diese Faktoren wurden bedacht und auch kontrolliert, um ein gutes Ergebnis bei der Probengewinnung zu erzielen.

### 4.2. Ergebnisse der Nested PCR

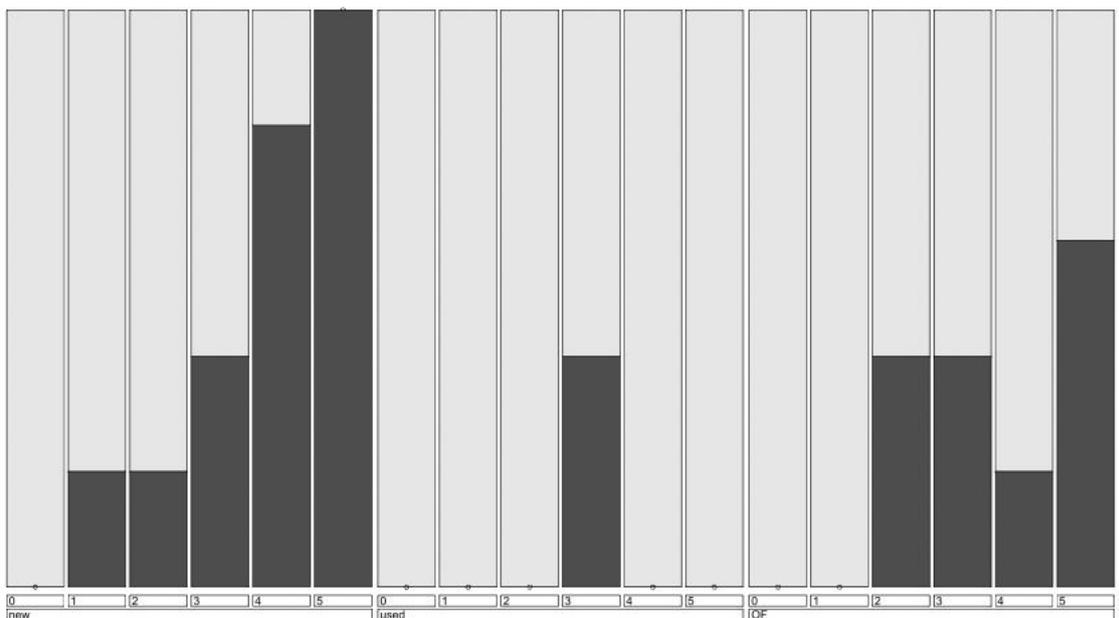


Abbildung 2: Balkendiagramm zur Darstellung des Anteils MHP-positiver Proben mittels Nested-PCR; negative Ergebnisse (hellgrau); positive Ergebnisse (dunkelgrau), new= native Kaurstricke mit NaCl befeuchtet, used= durch Schweine bekaute Kaurstricke, OF= oral Fluid.

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Wahrscheinlichkeiten (Probability), Standardabweichung, Unteres Konfidenzintervall, Oberes Konfidenzintervall

	Konz	Probability	SE	LCL	UCL
bekaut	1	0,0800	0,0940	0,00707	0,515
	2	0,0800	0,0665	0,01460	0,338
	3	0,0800	0,0543	0,02009	0,269
	4	0,0800	0,0665	0,01460	0,338
	5	0,0800	0,0940	0,00707	0,515
nativ	1	0,0939	0,0863	0,01397	0,431
	2	0,2559	0,1263	0,08563	0,558
	3	0,5329	0,1282	0,29374	0,758
	4	0,7911	0,1174	0,48479	0,938
	5	0,9263	0,0735	0,60374	0,990
OF	1	0,1390	0,1085	0,02656	0,488
	2	0,2089	0,1053	0,07042	0,479
	3	0,3017	0,0979	0,14810	0,518
	4	0,4141	0,1218	0,20905	0,654
	5	0,5363	0,1784	0,22091	0,825

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der Odds Ratio (Wahrscheinlichkeitsverhältnisse) unter Berücksichtigung der fdr (false discover rate); fette Markierungen heben signifikante Ergebnisse hervor (Signifikanz bei fdr < 0,05)

Kontraste	Konz.	Odds.Ratio	SE	df	z-Ratio	p-Wert	fdr
nativ / bekaut	1	1.191514	1.94357	Inf	0.107422	0.914454	0.914454
nativ / OF		0.642051	0.873902	Inf	-0.32553	0.744777	0.829403
bekaut / OF		0.538853	0.843912	Inf	-0.3948	0.692988	0.829403
nativ / bekaut	2	3.953971	4.430523	Inf	1.226854	0.219878	0.329816
nativ / OF		1.302146	1.197839	Inf	0.287003	0.77411	0.829403
bekaut / OF		0.329326	0.363912	Inf	-1.00515	0.314826	0.429308
<b>nativ / bekaut</b>	3	<b>13.12102</b>	<b>11.79864</b>	<b>Inf</b>	<b>2.86273</b>	<b>0.0042</b>	<b>0.021</b>
nativ / OF		2.640886	1.831275	Inf	1.400446	0.16138	0.268966
bekaut / OF		0.201271	0.175373	Inf	-1.83984	0.065792	0.140983
<b>nativ / bekaut</b>	4	<b>43.54134</b>	<b>50.02105</b>	<b>Inf</b>	<b>3.284865</b>	<b>0.00102</b>	<b>0.015305</b>
nativ / OF		5.355989	4.658591	Inf	1.929446	0.053675	0.140983
bekaut / OF		0.123009	0.127075	Inf	-2.02846	0.042513	0.140983
<b>nativ / bekaut</b>	5	<b>144.4894</b>	<b>241.308</b>	<b>Inf</b>	<b>2.977835</b>	<b>0.002903</b>	<b>0.021</b>
nativ / OF		10.8625	14.0512	Inf	1.844006	0.065182	0.140983
bekaut / OF		0.075179	0.110105	Inf	-1.76698	0.077231	0.144808

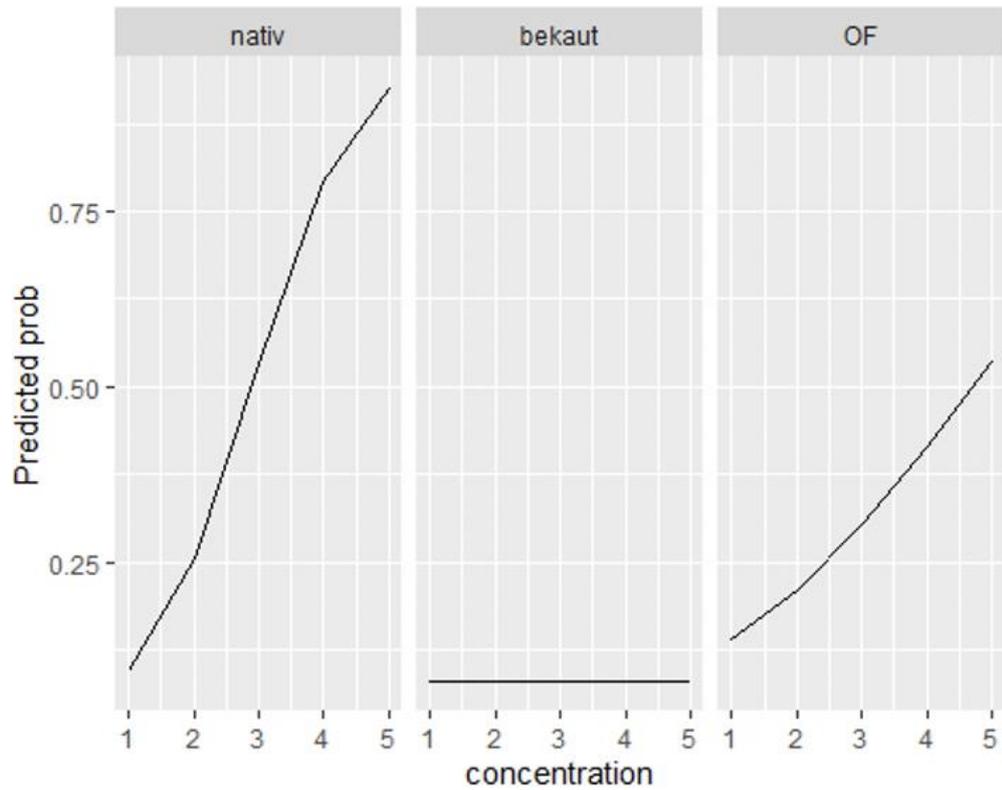


Abbildung 3: Grafische Darstellung der Wahrscheinlichkeiten auf ein positives Ergebnis mit den unterschiedlichen Konzentrationen

### 4.3. Ergebnisse der quantitativen PCR

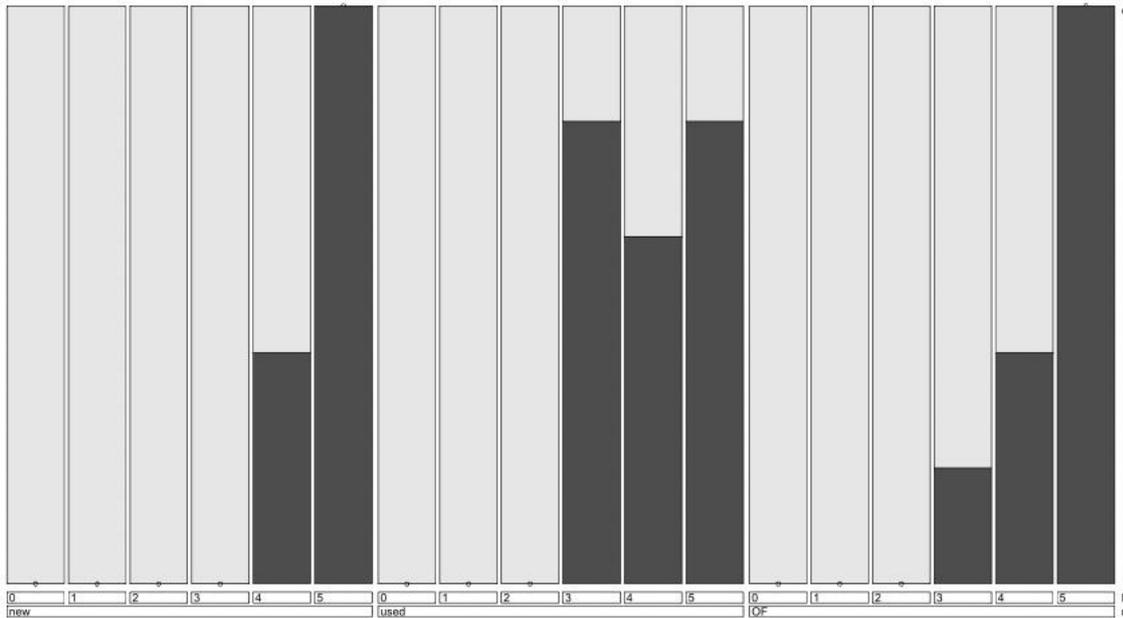


Abbildung 4: Balkendiagramm; negative Ergebnisse (hellgrau); positive Ergebnisse (dunkelgrau) für die dichotomisierte quantitative PCR, new= native Kaustricke mit NaCl befeuchtet, used= durch Schweine bekaute Kaustricke, OF= oral Fluid.

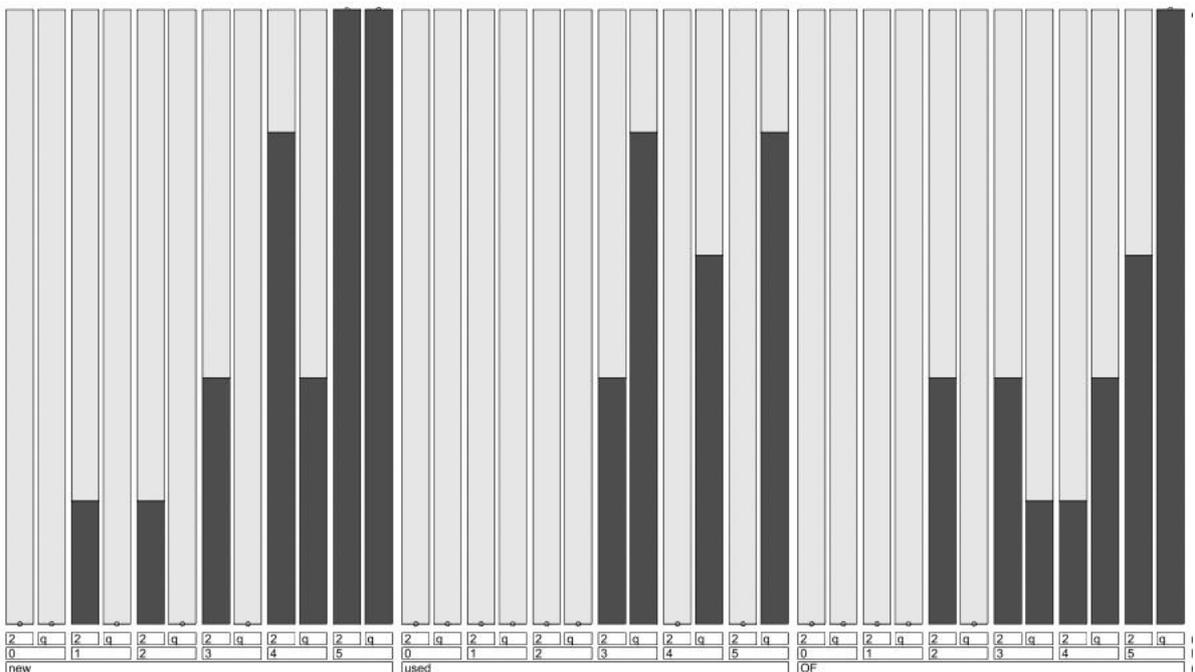


Abbildung 5: Balkendiagramm; negative Ergebnisse (hellgrau); positive Ergebnisse (dunkelgrau) für Nested PCR (2) und die dichotomisierte quantitative PCR (q) im Vergleich, new= native Kaustricke mit NaCl befeuchtet, used= durch Schweine bekaute Kaustricke, OF= oral Fluid,

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Wahrscheinlichkeiten (Probability), Standardabweichung, Unteres Konfidenzintervall, Oberes Konfidenzinterfall

	Konz	Prob	SE	LCL	UCL
bekaut	1	0,0536721	0,05940593	0,0056971	0,359552
	2	0,1628818	0,10612768	0,0406031	0,472173
	3	0,4003070	0,12766910	0,1905360	0,654337
	4	0,6960523	0,13364241	0,3990274	0,887620
	5	0,8870868	0,09785412	0,5365731	0,981587
nativ	1	0,0000000	0,00000000	0,0000000	1,000000
	2	0,0000000	0,00000000	0,0000000	1,000000
	3	0,0000000	0,00000989	0,0000000	1,000000
	4	0,4000000	0,21908900	0,1002311	0,799589
	5	1,0000000	0,00002225	0,0000000	1,000000
OF	1	0,0010348	0,00302063	0,0000034	0,241352
	2	0,0108838	0,02127340	0,0002288	0,346050
	3	0,1046544	0,10363986	0,0131983	0,505323
	4	0,5539008	0,12365914	0,2384809	0,831166
	5	0,9295263	0,08582883	0,5028627	0,994219

Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der Odds Ratio (Wahrscheinlichkeitsverhältnisse) unter Berücksichtigung des fdr (false discover rate)

Kontraste:	Konz	Odds Ratio	SE	z-Faktor	p-Wert
Nativ / bekaut	1	0	0,00e+00	-0,008	0,9937
Nativ / OF		0	0,00e+00	-0,007	0,9942
Bekaut / OF		55	1,72e+02	1,272	0,2035
Nativ / bekaut	2	0	0,00e+00	-0,008	0,9936
Nativ / OF		0	0,00e+00	-0,007	0,9941
Bekaut / OF		18	3,80e+01	1,272	0,1762
Nativ / bekaut	3	0	0,00e+00	-0,008	0,9934
Nativ / OF		0	0,00e+00	-0,007	0,9940
Bekaut / OF		6	7,00e+00	1,420	0,1557
Nativ / bekaut	4	0	0,00e+00	-1,112	0,2663
Nativ / OF		1	1,00e+00	-0,540	0,5893
Bekaut / OF		2	2,00e+00	0,648	0,5171
Nativ / bekaut	5	13100289	3,00e+10	0,007	0,9943
Nativ / OF		7803115	1,79e+10	0,007	0,9945
Bekaut / OF		1	1,00e+00	-0,317	0,7512

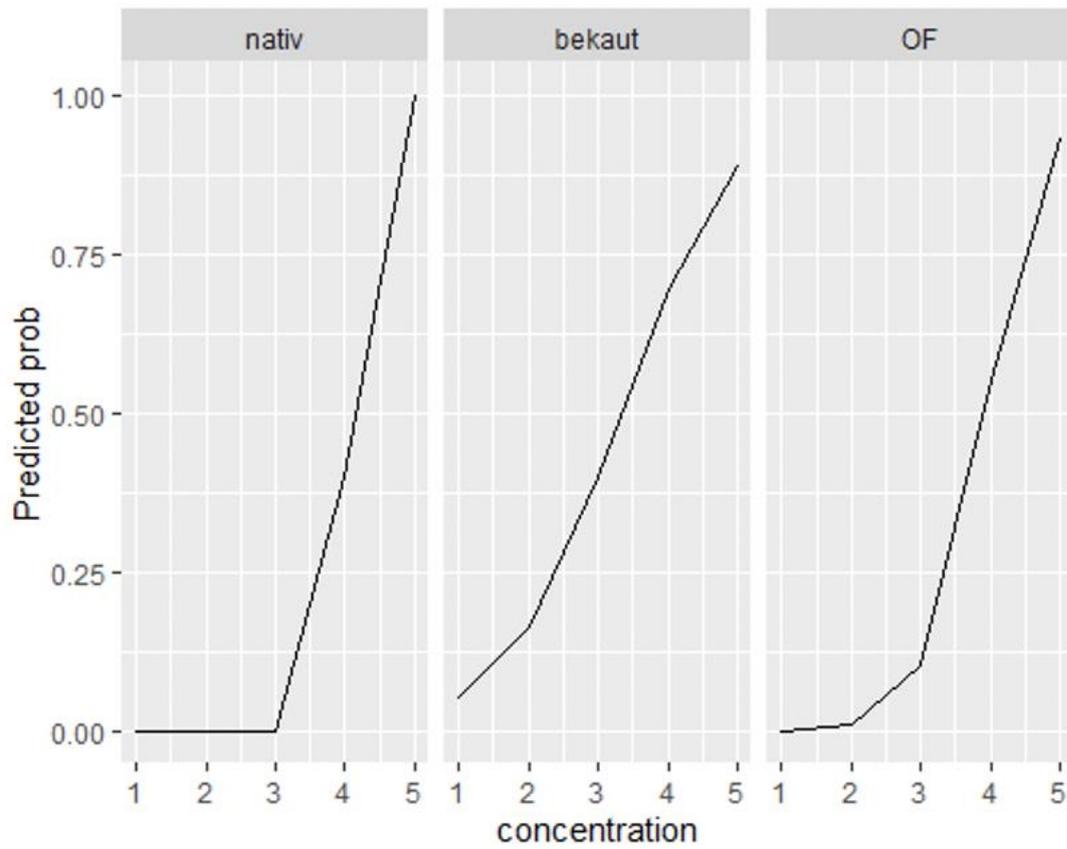


Abbildung 6: Grafische Darstellung der Wahrscheinlichkeiten auf ein positives Ergebnis mit den unterschiedlichen Konzentrationen

## 5. Diskussion

Diese Diplomarbeit verfolgte das Ziel eine weitverbreitete Methode zum Sammeln von Probenmaterial genauer hinsichtlich der Verwendbarkeit für die Diagnostik von MHP-Infektionen bei Schweinen zu evaluieren. Die Nützlichkeit der Probenahme von Oral Fluid für die Überwachung von Infektionen in Schweinepopulationen wird in der klinisch angewandten Schweinemedizin bereits anerkannt, aber ihr Wert als Instrument zur Unterstützung von Untersuchungen wurde bis dato weniger intensiv untersucht (Hernandez-Garcia et al. 2017).

Die OF-Probennahme erweist sich unter den meisten Betriebsbedingungen als unkompliziert, weniger arbeitsintensiv ungefährlicher und weniger aufdringlich als die Entnahme von Blutproben (Decorte et al. 2013). Die Hauptursache für das Versagen der Probenahme kann die Zerstörung der Probenahmeseile durch aggressives Kauen oder mangelnde Interaktion darstellen. Daher sollten bei der Planung OF-basierter Probenahmestrategien der Zeitpunkt und die Umgebungsbedingungen berücksichtigt werden, damit die Probenahme dann erfolgen kann, wenn die Schweine am ehesten mit den Entnahmeseilen interagieren. Bei der Entnahme für die Proben für die weiter folgenden Untersuchungen wurden diese Punkte weitestgehend berücksichtigt und somit stellte die Bereitwilligkeit der Schweine am Seil zu kauen kein Problem dar.

Eine weitere zu beachtende Hürde, stellt die Komplexität der Körperflüssigkeit „Oral Fluid“ dar. Sie beinhaltet mehrere Inhibitoren und abbauende Proteasen, welche die Auswertung der gewonnenen Proben im Labor erschweren kann (Decorte et al. 2013). Insgesamt wurden 90 Proben auf das Vorhandensein zuvor hinzugefügter definierter Konzentrationen an MHP untersucht. Es wurden 3 verschiedene Matrices miteinander verglichen, welche mittels PCR (Nested und Real time) untersucht wurden.

Eine der zwei zu Beginn der Arbeit aufgestellten Hypothesen lautete, dass die Bakterien direkt mit dem Kaustrickmaterial (=Baumwolle) in Form einer aktiven Bindung interagiert, wodurch MHP zum Großteil am Strick verbleibt. Dies konnte widerlegt werden, da mit allen drei Matrices positive Nachweise erzielt werden konnte. Die zweite Hypothese lautete, dass der Nachweis von MHP mittels PCR aus Oral Fluid zur Überwachung der Herdengesundheit nicht geeignet ist, da ein positiver Nachweis erst mit einer hohen Konzentration des untersuchten Bakteriums erzielt werden kann. Dies konnte in dieser wissenschaftlichen Arbeit teilweise bestätigt werden.

In den Grafiken eins, drei und vier werden positiv detektierte Ergebnisse und negative Ergebnisse getrennt (Grafik eins und drei) und zusammen (Grafik vier) veranschaulicht. Entgegen den Erwartungen, dass eine positive Detektion bei immer mehr hinzugefügten Bakterien auch dementsprechend ansteigt, kann nicht eindeutig beobachtet werden. Hier kann man erkennen, dass erst ab der Konzentrationsstufe drei die Nested PCR wie auch qPCR positive Ergebnisse liefern. Was hier erwähnt sei ist der Umstand, dass nicht durchgängig alle 5 Proben der jeweiligen Konzentration als positiv bewertet wurden. Bei den Konzentrationsstufen  $10^1$  und  $10^2$  kann nur die Nested PCR Proben als positiv erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass das Verfahren der Nested PCR für den Nachweis im unteren Konzentrationsbereich eine höhere Sensitivität aufweist. Die Sensitivität bleibt bei der qPCR bei niedrigen Konzentrationen immer bei null. Steigt aber dann bei höheren Konzentrationen auf 80% bis 100%. Die Nested PCR kann schon bei geringerer Bakterienkonzentration einen positiven Nachweis erbringen.

Bei den nativen Stricken können bei der Konzentration  $10^5$  alle Proben auch als positiv erkannt werden. Dies kann man darin begründen, dass bei der nativen Matrix keine Bakterien, welche sich autochthon in der Maulhöhle des Schweines befinden, zu einer Interaktion führen können. Anders ist dies bei der Matrix bekaut und bei der Matrix OF. Hier mischen sich vermutlich auch andere Bakterien, welche sich entweder am Tier oder in der Umgebung befinden und inhibitorische Stoffe in das zu untersuchende Material. Die Verwendung einer Nested PCR kann so häufig Nachweisprobleme lösen, die mit klinischen Gewebeproben verbunden sind, die einerseits eventuell geringe Kopienzahlen des Zielmoleküls vor einem hohen Hintergrund von Wirtsgewebe-DNA und Inhibitoren enthalten (Sachse 2004). In einer Matrix, die eben viele inhibitorische Stoffe und auch Fremd-DNA enthält scheint die Nested PCR wie sie in dieser Studie angewendet wurde als nicht geeignete PCR für OF. Für die Untersuchung von klinischen Proben (Lunge mit entsprechenden MHP-like Läsionen) scheint die Nested PCR hier hingegen eine adäquate PCR Methode mit ausreichend hoher Sensitivität zu sein.

Die Berechnung der Odds Ratio (Wahrscheinlichkeitsverhältnis) zeigt die Stärke eines Zusammenhangs von zwei Merkmalen. In Tabelle fünf und sieben wird die Odds Ratio von immer zwei Matrices gegenübergestellt. Nativ / bekaut, nativ / oral fluid bzw. bekaut / oral fluid. Die Ergebnisse wurden unter Berücksichtigung der false discover rate (Falscherkennungsrate) ausgewertet. Signifikante Ergebnisse konnten nur bei den

Berechnungen mit den Ergebnissen der Nested PCR, bei dem die Matrices nativ gegen bekaut gegenübergestellt wurden, erzielt werden. Bei einer Konzentration von  $10^3$  beträgt die Odds Ratio 13,12 und der fdr Wert 0,02. Somit ist es 13-mal wahrscheinlicher bei einer Konzentration von  $10^3$  nativ ein positives Ergebnis zu bekommen als bekaut. Bei einer Konzentration von  $10^4$  ist es somit 43,54-mal wahrscheinlicher nativ ein eine Detektion von MHP zu erreichen als bei bekaut. Bei einer Konzentration von  $10^5$  steigt die Odds Ratio auf 144,49.

Bei den Berechnungen der Wahrscheinlichkeitsverhältnisse für die quantitative PCR konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden.

Die Labordiagnostik ist ein wesentliches Instrument zur Überwachung des Status von *M. hyopneumoniae* in der Herde. Allerdings sollte die Diagnostik zur Ergänzung der regelmäßigen und aufmerksamen klinischen Beobachtung eingesetzt werden, da alle Parameter eng miteinander agieren.

Abschließend lässt sich festhalten, dass durch diese Studie gezeigt werden konnte, dass der Nachweis von MHP in OF bzw. aus Kaustricken unter gewissen Bedingungen funktionieren kann. Höchstwahrscheinlich ist die Menge an Erreger ausschlaggebend, ob die jeweilige PCR-Methode positive Proben als solche auch erkennt. Daraus lässt sich auch schließen, dass die angewendete PCR Methode maßgeblich zum Erfolg bzw. Misserfolg beitragen kann. In dieser Arbeit stellte sich die sehr sensitive Nested PCR als wenig geeignet für die Detektion von MHP in OF heraus, da diese offensichtlich anfälliger hinsichtlich inhibitorischer Substanzen und Beimengungen ist als es beispielsweise die qPCR war.

Für die praktizierenden Tierärzte kann die Entnahme von OF mittels Kaustricken in Betrieben relevant sein, wo es eben typische klinische Anzeichen einer Enzootischen Pneumonie gibt und eben hohe Erregermengen erwartet werden können. Für dieses Szenario mag die Entnahme von OF mittels Kaustricken eine schnelle, ökonomische und tierschonende Alternative zu herkömmlichen Proben (BAL, TBL, Lunge, etc.) für die MHP Diagnostik sein.

## 6. Zusammenfassung

*Mycoplasma hyopneumoniae* (MHP) ist das ätiologische Agens der Enzootischen Pneumonie (EP) der Schweine und ist maßgeblich an der Entstehung des Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) beteiligt. Der Erreger besiedelt und schädigt das zilienbesetzte respiratorische Epithel der luftleitenden Wege, moduliert das Immunsystem und erleichtert somit sekundären Erregern ein Eindringen und eine Proliferation in der Lunge.

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, die Nachweisbarkeit von MHP aus Kaustrickmaterial bzw. Oral Fluid mittels PCR-Verfahren unter experimentellen Bedingungen zu untersuchen.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden 90 Proben aus der VetFarm Medau der Veterinärmedizinischen Universität Wien entnommen und im Labor des Institutes für Mikrobiologie weiter aufgearbeitet. Der erste Schritt bestand aus der *in vitro* Infektion der Stricke bzw. des Oral Fluids mit einer definierten Konzentration MHP. Danach folgte die DNA-Extraktion und die Durchführung einer Nested PCR im Haus. Alle Proben wurden auch noch einmal extern untersucht und eine quantitative PCR durchgeführt.

Die gewonnenen Daten wurden statistisch aufgearbeitet und die so erhobenen Daten miteinander verglichen.

Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit widerlegen die Hypothese, dass MHP aufgrund der Interaktion mit den Baumwollfasern der Speichelstricke in Oral Fluids nur schwer nachweisbar ist. In den Proben aus der Matrix „bekaut“ konnten ebenso positive Proben detektiert werden, was eindeutig dagegenspricht, dass eine derart starke Interaktion zwischen MHP und Baumwollfasern entsteht, welche einen Nachweis mittels PCR erschwert bzw. unmöglich macht. Die zweite Hypothese, dass der Nachweis von MHP mittels PCR aus Oral Fluid zur Überwachung der Herdengesundheit nicht geeignet ist, da ein positiver Nachweis erst mit einer hohen Konzentration des untersuchten Bakteriums erzielt werden kann, kann als bestätigt angesehen werden.

## 7. Summary

*Mycoplasma hyopneumoniae* (MHP) is the etiologic agent of enzootic pneumonia (EP) and is a primary pathogen of the porcine respiratory disease complex (PRDC). The pathogen colonizes and damages the cilia-occupied respiratory epithelium of airways, modulating the immune system and thus facilitating secondary pathogens to invade and proliferate in the lungs.

The present work was carried out to investigate the suitability of oral fluids being used as sample for the detection of MHP employing PCR.

At the beginning of this work, 90 samples were taken from pigs kept at the VetFarm Medau of the University of Veterinary Medicine Vienna and further processed in the laboratory of the Institute of Microbiology. The first step consisted of *in vitro* infection of the ropes or oral fluid with a well-defined concentration of MHP. This was followed by DNA extraction and nested PCR. All samples were also examined externally using quantitative PCR.

The data obtained were statistically analyzed and compared.

The results of this thesis refute the hypothesis that MHP is difficult to detect in oral fluids because the pathogen interacts with the cotton fibers of the ropes and is thus not present in the oral fluid obtained. Positive samples could also be detected in the samples from the matrix "chewed", which clearly contradicts that such a strong interaction between sample and cotton fibers occurs, which would make detection by PCR difficult or impossible. The second hypothesis, that the detection of MHP by PCR in oral fluid is not suitable for monitoring herd health, because detection can only be achieved with a high concentration of the investigated bacterium, could be confirmed.

## 8. Quellenverzeichnis

Alexander, T.J.; Thornton, K.; Boon, G.; Lysons, R.J.; Gush, A.F. (1980): Medicated early weaning to obtain pigs free from pathogens endemic in the herd of origin. *The Veterinary Record* 106 (6), S. 114–119. DOI: 10.1136/vr.106.6.114.

Arsenakis, I.; Panzavolta, L.; Michiels, A.; Del Pozo Sacristán, R.; Boyen, F.; Haesebrouck, F.; Maes, D. (2016): Efficacy of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination before and at weaning against experimental challenge infection in pigs. *BMC Veterinary Research* 12, 63. DOI: 10.1186/s12917-016-0685-9.

Batista, L.; Mainity; Belloy, L.; Origi, F.C.; Lechner, I.; Segner, H.; Ryser-Degiorgis, M. (2015): Investigating the role of free-ranging wild boar (*Sus scrofa*) in the re-emergence of enzootic pneumonia in domestic pig herds: a pathological, prevalence and risk-factor study. *PloS One* 10 (3), e0119060. DOI: 10.1371/journal.pone.0119060.

Blanchard, B.; Vena, M.; Cavalier, A.; Le Lannic, J.; Gouranton, J.; Kobisch, M. (1992): Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 30 (4), S. 329–341. DOI: 10.1016/0378-1135(92)90020-T.

Bundesministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit und Konsumentenschutz (2018): Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln. <https://www.ris.bka.gv.at/> (Zugriff 10.04.2022)

Bustamante-Marin, X.M.; Ostrowski, L.E. (2017): Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9 (4). DOI: 10.1101/cshperspect.a028241.

Ciprián, A.; Palacios, J.M.; Quintanar, D.; Batista, L.; Colmenares, G.; Cruz, T. et al. (2012): Florfenicol feed supplemented decrease the clinical effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* experimental infection in swine in México. *Research in Veterinary Science* 92 (2), S. 191–196. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.01.010.

DeBey, M.C.; Ross, R.F. (1994): Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infection and immunity* 62 (12), S. 5312–5318. DOI: 10.1128/IAI.62.12.5312-5318.1994.

Decorte, I.; van der Stede, Y.; Nauwynck, H.; Regge, N.; Cay, A.B.; (2013): Effect of saliva stabilisers on detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluid by quantitative reverse transcriptase real-time PCR. *Veterinary Journal*, 197 (2), S. 224–228. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.02.001.

Deutscher, AT.; Jenkins, C.; Minion, F. Chris; Seymour, LM.; Padula, MP.; Dixon, NE. et al. (2010): Repeat regions R1 and R2 in the P97 paralogue Mhp271 of *Mycoplasma hyopneumoniae* bind heparin, fibronectin and porcine cilia. *Molecular Microbiology* 78 (2), S. 444–458. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07345.x.

Done, SH. (1991): Environmental factors affecting the severity of pneumonia in pigs. *The Veterinary Record* 128 (25), S. 582–586. DOI: 10.1136/vr.128.25.582.

Goodwin, RF.; Pomeroy, AP.; Whittlestone, P. (1967): Characterization of *Mycoplasma suis pneumoniae*: a mycoplasma causing enzootic pneumonia of pigs. *The Journal of Hygiene* 65 (1), S. 85–96. DOI: 10.1017/s0022172400045563.

Green, MIR; Sambrook, J. (2019): Nested Polymerase Chain Reaktion (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols* 2019. DOI: 10.1101/pdb.prot095182

Heinritzi, K.; Gindele, HR.; Reiner, G.; Schnurrbusch, U. (2006): Schweinekrankheiten. Stuttgart: Ulmer (UTB Veterinärmedizin Erkrankungen der Haustiere, 8325), [http://deposit.dnb.de/cgi-bin/dokserv?id=2755843&prov=M&dok\\_var=1&dok\\_ext=htm](http://deposit.dnb.de/cgi-bin/dokserv?id=2755843&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm).

Hernandez-Garcia, J.; Robben, N.; Magnée, D.; Eley, T.; Dennis, I.; Kayes, SM.; Thomson, J .R.; Tucker, A. W. (2017): The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex. *Journal??*, page, DOI:10.1186/s40813-017-0055-4

Hsu, T.; Minion, FC. (1998): Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infection and Immunity* 66 (10), S. 4762–4766. DOI: 10.1128/IAI.66.10.4762-4766.1998.

Kobisch, M.; Marois, C. (2008): Les mycoplasmoses porcines. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 161 (2), S. 179–184. DOI: 10.4267/2042/47941.

Kurth, KT., Hsu, T.; Snook, ER.; Thacker EL.; Thacker BJ.; Minion FC. (2002): Use of *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*, 14 (6), S 463 - 469. DOI: 10.1177/104063870201400603

Leal Zimmer, FMA.; Paes, JA.; Zaha, A.; Ferreira, HB. (2020): Pathogenicity & virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Virulence* 11 (1), S. 1600–1622. DOI: 10.1080/21505594.2020.1842659.

Maes, D.; Segales, J.; Meyns, T.; Sibila, M.; Pieters, M.; Haesebrouck, F. (2008): Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary Microbiology* 126 (4), S. 297–309. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.09.008.

- Maes, D.; Sibila, M.; Kuhnert, P.; Segalés, J.; Haesebrouck, F.; Pieters, M. (2018): Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. *Transboundary and Emerging Diseases* 65 Suppl 1, S. 110–124. DOI: 10.1111/tbed.12677.
- Maes, D.; Verdonck, M.; Deluyker, H.; Kruif, A. de (1996): Enzootic pneumonia in pigs. *The Veterinary Quarterly* 18 (3), S. 104–109. DOI: 10.1080/01652176.1996.9694628.
- Maes, D. (Hg.) (2020): *Mycoplasmas in swine*. First edition. Leuven, Belgium, Den Haag, the Netherlands: Acco.
- Maes, D.; Verbeke, W.; Vicca, J.; Verdonck, M.; Kruif, A. (2003): Benefit to cost of vaccination against *mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds under Belgian market conditions from 1996 to 2000. *Livestock Production Science* 83 (1), S. 85–93. DOI: 10.1016/S0301-6226(03)00039-3.
- Malmsten, A.; Magnusson, U.; Ruiz-Fons, F.; González-Barrio, D.; Dalin, A. (2018): A serologic survey of pathogens in wild boar (*Sus Scrofa*) in sweden. *Journal of Wildlife Diseases* 54 (2), S. 229–237. DOI: 10.7589/2017-05-120.
- Mare, C. J.; Switzer, W. P. (1965): New species: *Mycoplasma hyopneumoniae*; a causative agent of virus pig pneumonia. *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician* 60, S. 841–846.
- Meyns, T.; Dewulf, J.; Kruif, A.; Calus, D.; Haesebrouck, F.; Maes, D. (2006): Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine* 24 (49-50), S. 7081–7086. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.07.004.
- Michiels, A.; Arsenakis, I.; Boyen, F.; Krejci, R.; Haesebrouck, F.; Maes, D. (2017): Efficacy of one dose vaccination against experimental infection with two *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *BMC Veterinary Research* 13 (1), S. 274. DOI: 10.1186/s12917-017-1195-0.
- Minion, FC.; Adams, C.; Hsu, T. (2000): R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infection and Immunity* 68 (5), S. 3056–3060. DOI: 10.1128/IAI.68.5.3056-3060.2000.
- Nathues, H.; Spergser, J.; Rosengarten, R.; Kreienbrock, L.; (2012): Value of the clinical examination in diagnosing enzootic pneumonia in fattening pigs. *Veterinary Journal* 193 (2), S. 443–447. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.01.013.
- Otake, S.; Dee, S.; Corzo, C.; Oliveira, S.; Deen, J. (2010): Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Veterinary Microbiology* 145 (3-4), S. 198–208. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.03.028.

- Pieters, M.; Daniels, J.; Rovira, A. (2017): Comparison of sample types and diagnostic methods for in vivo detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* during early stages of infection. *Veterinary Microbiology* 203, S. 103–109. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.02.014.
- Pieters, M.; Pijoan, C.; Fano, E.; Dee, S. (2009): An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. *Veterinary Microbiology* 134 (3-4), S. 261–266. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.08.016.
- Rodríguez, F.; Ramírez, GA.; Sarradell, J.; Andrada, M.; Lorenzo, H. (2004): Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology* 130 (4), S. 306–312. DOI: 10.1016/j.jcpa.2003.12.008.
- Sachse, K. (2004): Specificity and Performance of PCR detection assays for microbial pathogens. *Molecular Biotechnology* 26 (1), S. 61–80. DOI: 10.1385/MB:26:1:61.
- Seymour, LM.; Deutscher, AT.; Jenkins, C.; Kuit, TA.; Falconer, L.; Minion, FC. et al. (2010): A processed multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (44), S. 33971–33978. DOI: 10.1074/jbc.M110.104463.
- Seymour, LM.; Jenkins, C.; Deutscher, AT.; Raymond, BBA.; Padula, MP.; Tacchi, JL. et al. (2012): Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. *Cellular Microbiology* 14 (1), S. 81–94. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2011.01702.x.
- Shapiro-Ilan, DI.; Fuxa, JR.; Lacey, LA.; Onstad, DW.; Kaya, HK. (2005): Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology* 88 (1), S. 1–7. DOI: 10.1016/j.jip.2004.10.003.
- Sørensen, V.; Ahrens, P.; Barfod, K.; Feenstra, AA.; Feld, NC.; Friis, NF. et al. (1997): *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Veterinary Microbiology* 54 (1), S. 23–34. DOI: 10.1016/S0378-1135(96)01266-7.
- Stark, KDC.; Miserez, R.; Siegman, S.; Ochs, H.; Infanger, P.; Schmidt, J. (2007): Erradicación de las enfermedades respiratorias enzoóticas de los cerdos mediante un programa de control nacional en Suiza. *Revue Scientifique et Technique OIE* 26 (3), S. 595–606. DOI: 10.20506/rst.26.3.1768.
- Tajima, M.; Yagihashi, T. (1982): Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infection and Immunity* 37 (3), S. 1162–1169. DOI: 10.1128/iai.37.3.1162-1169.1982.

- Ter Laak, EA.; Pijpers, A.; Noordergraaf, JH.; Schoevers, EC.; Verheijden, JH. (1991): Comparison of methods for in vitro testing of susceptibility of porcine *Mycoplasma* species to antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35 (2), S. 228–233. DOI: 10.1128/AAC.35.2.228.
- Thacker, EL. (2004): Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Animal Health Research Reviews* 5 (2), S. 317–320. DOI: 10.1079/AHR200491.
- Vicca, J.; Stakenborg, T.; Maes, D.; Butaye, P.; Peeters, J.; Kruif, A. de; Haesebrouck, F. (2004): In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (11), S. 4470–4472. DOI: 10.1128/AAC.48.11.4470-4472.2004.
- Villarreal, I.; Maes, D.; Meyns, T.; Gebruers, F.; Calus, D.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F. (2009): Infection with a low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolate does not protect piglets against subsequent infection with a highly virulent *M. hyopneumoniae* isolate. *Vaccine* 27 (12), S. 1875–1879. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.12.005.
- Zachary, JF.; McGavin, MD. 2013. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Fifth edition St.Louis: Elsevier Health Science
- Zimmerman, J.; Karriker, Locke A.; Ramirez, A. (2019): *Diseases of swine*. Eleventh edition. Online verfügbar unter <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119350927>.
- Zimmermann, W.; Tschudi, P.; Odermatt, W. (1989): Enzootische Pneumonie (EP): die Teilsanierung EP-reinfizierter Schweinezuchtbetriebe als Alternative zur Totalisierung. *La Revue Professionnelle des Vétérinaires*. DOI: 10.5169/seals-589620.

## 9. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schweinelungen mit und ohne makroskopisch sichtbarer Enzootischer Pneumonie-ähnlicher Läsionen

Abbildung 2: Balkendiagramm zur Darstellung des Anteils MHP-positiver Proben mittels nested-PCR; negative Ergebnisse (hellgrau); positive Ergebnisse (dunkelgrau), new= native Kaustricke mit NaCl befeuchtet, used= durch Schweine bekaute Kaustricke, OF= oral Fluid.

Abbildung 3: Grafische Darstellung der Wahrscheinlichkeiten auf ein positives Ergebnis mit den unterschiedlichen Konzentrationen

Abbildung 4: Balkendiagramm; negative Ergebnisse (hellgrau); positive Ergebnisse (dunkelgrau) für die dichotomisierte quantitative PCR), new= native Kaustricke mit NaCl befeuchtet, used= durch Schweine bekaute Kaustricke, OF= oral Fluid.

Abbildung 5: Balkendiagramm; negative Ergebnisse (hellgrau); positive Ergebnisse (dunkelgrau) für nested PCR und die dichotomisierte quantitative PCR im Vergleich, new= native Kaustricke mit NaCl befeuchtet, used= durch Schweine bekaute Kaustricke, OF= oral Fluid.

Abbildung 6: Grafische Darstellung der Wahrscheinlichkeiten auf ein positives Ergebnis mit den unterschiedlichen Konzentrationen

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Gewichtsunterschiede der Speichelstricke vor und nach Bekauen durch Schweine für die Ermittlung der zu verwendenden Menge an physiologischer Kochsalzlösung zur Vorbefeuchtung der nativen Kaustricke.

Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der Spikingreihe

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung Probenart, Probennummer und MHP-Konzentration die für das Spiking verwendet wurde.

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Wahrscheinlichkeiten (Probability), Standardabweichung, Unteres Konfidenzintervall, Oberes Konfidenzinterfall

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der Odds Ratio (Wahrscheinlichkeitsverhältnisse) unter Berücksichtigung der fdr (false discover rate); fette Markierungen heben signifikante Ergebnisse hervor (Signifikanz bei  $fdr < 0,05$ )

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Wahrscheinlichkeiten (Probability), Standardabweichung, Unteres Konfidenzintervall, Oberes Konfidenzinterfall

Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der Odds Ratio (Wahrscheinlichkeitsverhältnisse) unter Berücksichtigung des fdr (false discover rate)