

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

Evaluation der Verträglichkeit und Wirksamkeit der nadellos,
intradermal applizierten Vakzine Porcilis[®] M Hyo ID ONCE gegen
Mycoplasma hyopneumoniae unter Feldbedingungen

von Lisa Mariette Beffort

aus Luxemburg Stadt

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. M. Eddicks

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

Meiner Familie und meiner Cousine Micky

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	3
1.	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	3
1.1.	Taxonomie.....	3
1.2.	Morphologie	3
1.3.	Epidemiologie	4
1.4.	Genetische Variabilität und Pathogenese	6
1.5.	Makroskopische und histologische Veränderungen.....	8
1.6.	Klinische Symptome und Krankheitskomplexe	9
1.7.	Diagnostik	12
1.7.1.	Kulturelle Anzucht	12
1.7.2.	Immunfluoreszenz, Immunhistochemie und in-situ Hybridisierung.....	12
1.7.3.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	13
1.7.4.	Serologie.....	15
1.8.	Therapie.....	16
1.9.	Bekämpfungsmethoden.....	18
1.9.1.	Vakzination	18
1.9.2.	Elimination.....	20
2.	Impfstoffapplikation	22
2.1.	Nadellose intradermale Applikation.....	22
2.1.1.	Technik	22
2.1.2.	Penetration und Zuverlässigkeit	22
2.1.3.	Wirksamkeit nach nadelloser Applikation	23
2.1.4.	Antigenmenge des Impfstoffes.....	25
2.1.5.	Kreuzkontamination.....	26
2.1.6.	Schmerzempfindung.....	26
2.1.7.	Anwender- und Verbraucherschutz.....	27
2.2.	Wirksamkeit nach intramuskulärer Vakzination mittels Kanüle	29
2.3.	Lokale Hautreaktion.....	29
2.4.	Abszesse als Folge von Injektionen	30
3.	Immunologie	31
3.1.	Immunantwort nach einer <i>M. hyopneumoniae</i> Infektion	31

3.2.	Immunantwort nach einer Vakzination	34
3.2.1.	Intramuskuläre Impfstoffapplikation	34
3.2.2.	Intradermale Impfstoffapplikation	35
III.	MATERIAL UND METHODEN	38
1.	Anzeige eines Tierversuchsvorhabens	38
2.	Ziel der Untersuchung	38
3.	Versuchsbetrieb und -tiere	39
4.	Vakzine, Vakzination und Placebo	39
5.	Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau	40
6.	Klinische Untersuchungen	41
6.1.	Klinische Untersuchung	41
6.2.	Lokale Hautreaktion an der Applikationsstelle	42
6.3.	Innere Körpertemperatur	43
7.	Blutprobenentnahme	43
8.	Serologie	44
9.	Gewichtsentwicklung	45
10.	Lungenbefunde am Schlachthof	45
11.	Molekularbiologische Diagnostik	45
12.	Mortalität	46
13.	Statistik	46
IV.	ERGEBNISSE	49
1.	Verträglichkeit und Sicherheit des Impfstoffes	49
1.1.	Klinische Untersuchung	49
1.2.	Lokale Hautreaktion an der Applikationsstelle	51
1.3.	Innere Körpertemperatur	55
2.	Wirkung des Impfstoffes und Leistungsparameter	56
2.1.	Serologie	56
2.2.	Gewichtsentwicklung	58
2.3.	Mastdauer und Körpergewichte zum ersten Schlachttermin	60
2.4.	Lungenbefunde am Schlachthof	63

2.5.	Molekularbiologische Diagnostik	65
3.	Mortalität	65
V.	DISKUSSION	67
1.	Verträglichkeit und Sicherheit des Impfstoffes.....	67
1.1.	Klinische Untersuchung	67
1.2.	Lokale Hautreaktion an der Applikationsstelle	68
1.3.	Innere Körpertemperatur	71
2.	Wirkung des Impfstoffes und Leistungsparameter	72
2.1.	Serologie.....	72
2.2.	Gewichtsentwicklung	75
2.3.	Mastdauer und Körpergewichte zum ersten Schlachtttermin	77
2.4.	Lungenbefunde am Schlachthof.....	78
2.5.	Molekularbiologische Diagnostik	81
3.	Mortalität	83
VI.	SCHLUSSFOLGERUNG	84
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	85
VIII.	SUMMARY.....	88
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	91
X.	ANHANG	126
1.	Abbildungsverzeichnis	126
2.	Tabellenverzeichnis	127
XI.	DANKSAGUNG	128

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADWG	average daily weight gain	MKS	Maul- und Klauenseuche
BALF	bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit	ml	Milliliter
BALT	bronchus-associated lymphoid tissue	NaCl	Natriumchlorid
BDW	body weight	NK	natürliche Killerzellen
BHV-1	Bovines Herpes Virus Typ1	n-PCR	nested polymerase chain reaction
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe Virus	p.i.	post infectionem
bzw.	beziehungsweise	p.inj.	post injectionem
CD	cluster of differentiation	PCVAD	porcine circovirus associated diseases
cm	Zentimeter	PCV2	Porcines Circovirus Typ 2
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	PMWS	postweaning multisystemic wasting syndrome
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	ppm	parts per million
EP	Enzootische Pneumonie	PRDC	porcine respiratory disease complex
H1N1	Influenza A Stamm H1N1	PRRSV	porcine reproductive and respiratory syndrome virus
IDAL	IntraDermal Application of Liquids	q-PCR	quantitative polymerase chain reaction
IFN	Interferon	SHV-1	Suid Herpes Virus 1
Ig	Immunglobulin	SIV	Schweineinfluenza Virus
kBp	kilo Basenpaare	TLR	Toll-like receptor
LAMP	loop mediated isothermal amplification	TNF	Tumornekrosefaktor
MEW	medicated early weaning	u./ o.	und/ oder
M. hyo	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	z.B.	zum Beispiel
Mhp183	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> Gen 183	vs.	versus

I. EINLEITUNG

Mycoplasma (M.) hyopneumoniae ist der Primärerreger der Enzootischen Pneumonie der Schweine und maßgeblich am *Porcine Respiratory Disease Complex* beteiligt (THACKER & MINION, 2012). Es handelt sich um einen Erreger, der weltweit neben wirtschaftlichen Verlusten (MAES et al., 1996; THACKER & MINION, 2012) auch Schmerzen durch das Hervorrufen von entzündlichen Gewebeschädigungen (HENKE & ERHARDT, 2001) bei Schweinen verursacht. Neben der Optimierung von Management- und Stallklimatischen Faktoren gilt die Vakzination als wichtige Maßnahme bei der Kontrolle von *M. hyopneumoniae* Infektionen (MAES et al., 2008). Eine Impfung gegen *M. hyopneumoniae* soll die klinischen Symptome sowie die Lungenläsionen reduzieren und zudem die Mastleistungen verbessern (TZIVARA et al., 2007; MAES et al., 2008).

Einen zusätzlichen Aspekt zu herkömmlichen intramuskulär verabreichenden *M. hyopneumoniae* Vakzinen stellt die nadellose, intradermale Applikation des one-shot Impfstoffes Porcilis® M Hyo ID ONCE dar. Diese Injektionsmethode verhindert neben versehentlichen Selbstinjektionen auch das Vorkommen abgebrochener Kanülen im Schlachtkörper und soll bei den zu impfenden Tieren weniger Schmerz und Stress auslösen (CHASE et al., 2008). Folglich würde diese Art der Applikation nicht nur zum Arbeits- und Verbraucherschutz sondern auch zum Tierschutz beitragen. Weiterhin birgt die mehrfache Verwendung derselben Injektionskanüle das Risiko einer iatrogenen Verschleppung von Krankheitserregern (OTAKE et al., 2002; REINBOLD et al., 2010). Eine Übertragung von bakteriellen und viralen Pathogenen kann durch nadellose Applikationsmethoden vermindert werden (REINBOLD et al., 2010; BAKER et al., 2012).

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Sicherheit und Wirksamkeit der nadellos, intradermal applizierten Vakzine Porcilis® M Hyo ID ONCE für die Anwendung bei 21 Tage alten Saugferkeln zu überprüfen. Die intradermale Impfgruppe wurde mit einer intramuskulär, mittels M+PAC® geimpften Gruppe sowie einer Kontrollgruppe, die ausschließlich Adjuvans erhielt, verglichen. Zur Überprüfung der Sicherheit wurden die Studientiere nach der Impfung klinisch untersucht, die

lokale Hautreaktion an der Injektionsstelle beurteilt sowie die innere Körpertemperatur gemessen. Die Wirksamkeit wurde anhand der Gewichtsentwicklung der Studientiere und der Lungenbefunde am Schlachthof beurteilt. Zusätzlich wurden serologische und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Diese ermöglichen die Beurteilung des *M. hyopneumoniae* Antikörperverlaufes und den direkten Erregernachweis.

Eine Vakzination der Tiere gegen *M. hyopneumoniae* sollte im Vergleich zur Placebogruppe unabhängig vom verwendeten Impfstoff zu einer Verbesserung der Leistungsparameter und einer Verringerung der Lungenläsionen führen. Weiterhin basierte die Arbeitshypothese darauf, dass die intradermale Injektion von Porcilis® M Hyo ID ONCE der intramuskulären Injektion von M+PAC® nicht unterlegen sein würde.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. *Mycoplasma hyopneumoniae*

1.1. Taxonomie

Mycoplasmen gehören zu der Klasse der zellwandlosen Mollicutes, zu dem Stamm der Tenericutes zählend, beinhaltet diese Klasse vier Ordnungen (SELBITZ, 2011; VALENTIN-WEIGAND, 2011). Die Entomoplasmatales, die Acholeplasmatales, die Anaeroplasmatales sowie die Mycoplasmatales (VALENTIN-WEIGAND, 2011). Letztere wird in die Familie Mycoplasmataceae mit den Genera *Mycoplasma* und *Ureaplasma* unterteilt (VALENTIN-WEIGAND, 2011). Die Gattung *Mycoplasma* beinhaltet human- und veterinärmedizinisch bedeutsame Erreger für die eine ausgeprägte Wirtsanpassung typisch ist (VALENTIN-WEIGAND, 2011). Neben *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* zählen auch *M. hyorhinae*, *M. hyosynoviae* und *M. suis* zu den schweinespezifischen, pathogenen Mycoplasmen (THACKER & MINION, 2012). In der Schweinepopulation werden zusätzlich *M. flocculare*, *M. sualvi* und *M. hyopharyngis* isoliert, die jedoch als apathogen anzusehen sind (THACKER & MINION, 2012).

1.2. Morphologie

Die Bakterien der Gattung *Mycoplasma* sind nur von einer Zytoplasmamembran umgeben, die eine seltene dreifach laminierte Struktur besitzt und zusätzlich Sterole beinhaltet, die sonst nur bei eukaryontischen Membranen vorkommen (SELBITZ, 2011). Das Fehlen einer starren Zellwand bedingt das pleomorphe Aussehen dieser Erreger, es wurden kugel- und birnenförmige Zellen bis zu verzweigten oder helikalen Filamenten dokumentiert (TAJIMA & YAGIHASHI, 1982; VALENTIN-WEIGAND, 2011). Der Durchmesser von *M. hyopneumoniae* wurde mit 400 - 1200 nm beschrieben (TAJIMA & YAGIHASHI, 1982). Zusätzlich haben diese kleinen, zellwandlosen Bakterien eine geringe Genomgröße von nur 580 - 1350 kbp, die mit einer eingeschränkten Stoffwechselkapazität einhergeht (SELBITZ, 2011). Entsprechend kommen die Vertreter der Gattung *Mycoplasma* nur in kommensaler oder parasitärer Lebensweise vor (SELBITZ, 2011). *M. hyopneumoniae* hat zahlreiche radiale

Fibrillen an der Außenseite seiner Zytoplasmamembran, die eine Bindung zwischen den Mycoplasmen untereinander und ihrem Zielepithel ermöglichen (TAJIMA & YAGIHASHI, 1982).

1.3. Epidemiologie

Die Übertragung von *M. hyopneumoniae* erfolgt vorwiegend über direkten nasalen Kontakt (THACKER & MINION, 2012). Die Infektionskette in einem Bestand wird durch die Übertragung der Sauen auf die Ferkel aufrechterhalten, hierbei sinkt die nasale Ausscheidungsrate der Sauen mit zunehmender Parität (CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000). In einer Untersuchung von CALSAMIGLIA und PIJOAN (2000) schieden 52 % der Jungsauen und 39 % der Sauen der zweiten bis vierten Parität einer Herde den Erreger aus. Verglichen dazu wurde nur noch bei 35 % der Sauen in der fünften bis siebten Parität *M. hyopneumoniae* mittels nested (n-) PCR in Nasentupfern gefunden (CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000). Anschließend erfolgt eine Ausbreitung zwischen den Buchtengenossen (FANO et al., 2005a). Die Geschwindigkeit dieser horizontalen Ausbreitung wurde von MEYNS et al. (2004) untersucht, wobei ein Absetzferkel in einem Zeitraum von sechs Wochen im Mittel ein weiteres Tier infizierte. Eine raschere Übertragung wurde in einem Infektionsversuch belegt, bei dem der Erreger auch bei nicht infizierten Kontaktschweinen bereits sieben Tage nach der Infektion mittels Kultur nachgewiesen werden konnte (MAROIS et al., 2007). In einer Untersuchung von STÄRK et al. (1998) stieg während einer akuten Infektion mit Hustensymptomatik die Nachweisrate des Erregers aus Luftproben des Bestandes an. Zusätzlich wurden in einer weiteren Erhebung bis zu einem Umkreis von 9,2 km um einen infizierten Bestand noch infektiöse Erreger nachgewiesen (OTAKE et al., 2010). Es kommt somit auch zu einer Übertragung über Aerosole ohne direkten Kontakt zwischen den Tieren (LEON et al., 2001; FANO et al., 2005a, 2005b). Es besteht eine unterschiedlich lange Persistenz des Erregers. Nach experimenteller Infektion konnte *M. hyopneumoniae* mittels n-PCR sowohl bei den intratracheal infizierten, als auch bei zuvor *M. hyopneumoniae* negativen Kontakttieren aus Bronchialtupfern bis 185 Tage p.i. nachgewiesen werden (FANO et al., 2005a) und selbst 200 Tage p.i. kam es noch zu einer Übertragung des Erregers auf Sentinel-Tiere (PIETERS et al., 2009).

Bei Erhebungen in Nord-West-Deutschland wurden von 2578 beprobten

Muttersauen aus 67 unterschiedlichen Herden 65 % seropositiv auf *M. hyopneumoniae* getestet, wobei die geringste Seroprävalenz im einzelnen Bestand 14 % betrug (GROSSE BEILAGE et al., 2009). In Frankreich lag die Seroprävalenz bei Sauen in fünf geschlossenen Betrieben im Jahr 2010 bei mindestens 55 % (FABLET et al., 2011). Weiterhin gelang ein direkter Erregernachweis bei 2,4 % der beprobten Sauen (FABLET et al., 2011). Im selben Jahr wurden aus 125 Betrieben von 2500 Saugferkel Nasentupfer mittels real-time PCR untersucht. Insgesamt waren 3,9 % *M. hyopneumoniae* positiv, für diesen direkten Erregernachweis lag die Herdenprävalenz bei 36,8 %. (NATHUES et al., 2013b). In 50 Herden mit endemischer Atemwegsproblematik im Aufzuchtbereich konnte bei 11,2 % der drei bis sechs Wochen alten Ferkel *M. hyopneumoniae* mittels n-PCR in der BAL-Flüssigkeit nachgewiesen werden (MOORKAMP et al., 2009). In einer anderen Erhebung wurde bei 921 Absetzferkeln in 9,3 % der Fälle der Erreger aus Lungengewebe nachgewiesen (NATHUES et al., 2010). Wohingegen in 50 untersuchten Mastbetrieben in Belgien die mediane Seroprävalenz auf Herdenebene 88 % betrug (MAES et al., 1999a).

Als Faktoren die positiv mit der Seroprävalenz von Muttersauen korrelieren wurden ein fehlendes Rein-Raus-Verfahren der Abferkelabteile, ein zwei Wochen Rhythmus oder eine nicht berücksichtigte Quarantänezeit der Eber benannt (GROSSE BEILAGE et al., 2009). In Mastbetrieben mit ungeeigneten Stallgebäuden, schlechtem Management und ohne Direktbezug der Ferkel von einem Erzeuger konnte in einer Untersuchung von DIFRANCO et al. (1989) eine höhere Inzidenz klinischer Symptome und Lungenläsionen nachgewiesen werden.

Auf Bestandsebene erhöht sich das Risiko *M. hyopneumoniae* positiver Saugferkel wenn mehr als 120 Jungsauen im Jahr zugekauft werden, wenn sich mehr als 16 Abferkelbuchten in einem Abteil befinden, sowie wenn ein 2- oder 4-Wochen-Abferkelrhythmus besteht (NATHUES et al., 2013b). Ein Grund hierfür könnte darin bestehen, dass es bei diesen Wochenrhythmen und Größen der Abferkelabteile öfters zu einem Konflikt mit dem Rein-Raus-Prinzip kommt (NATHUES et al., 2013b). Eine Kolonisation des Erregers beim Absetzen steht in direktem Bezug mit dem Erregernachweis aus Bronchialtupfern, einer Serokonversion und der Häufigkeit sowie der Ausdehnung von Lungenläsionen am Schlachthof (FANO et al., 2007). Eine Reduzierung der Prävalenz in der

Aufzucht scheint eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der durch *M. hyopneumoniae* induzierten Pneumonie zu spielen (FANO et al., 2007). Das Risiko eines Einzeltieres zum Zeitpunkt des Absetzens *M. hyopneumoniae* positiv zu sein, wird durch hohe Temperaturen im Ferkelnest, durch die Durchführung des Zähneschleifens sowie eine zweifache Eisenapplikation reduziert (NATHUES et al., 2013a). Demgegenüber steigt das Risiko durch Produktionssysteme in denen Abferkelung, Aufzucht und Mast sich im gleichen- oder in nur zwei verschiedenen Gebäuden befinden (SIBILA et al., 2004b; MOORKAMP et al., 2009). Zusätzlich nehmen klimatische Faktoren Einfluss auf das Infektionsrisiko, welches durch hohe durchschnittliche wöchentliche Niederschläge und niedrige Außentemperaturen ansteigt (SEGALÉS et al., 2012).

1.4. Genetische Variabilität und Pathogenese

Nicht jede Infektion mit *M. hyopneumoniae* resultiert in einer klinisch feststellbaren Pneumonie (THACKER & MINION, 2012). Ihr Entstehen hängt vom Ausmaß der bakteriellen Kolonisation im Respirationstrakt, von der Virulenz des Stammes und von der anschließenden sekundären bakteriellen Besiedlung sowie den viralen Koinfektionen ab (THACKER & MINION, 2012).

Die multiple genetische Varianz von *M. hyopneumoniae* wurde von FREY et al. (1992) nachgewiesen und später von ARTIUSHIN und MINION (1996) sowie KOKOTOVIC et al. (1999) validiert. STAKENBORG et al. (2005a) bestätigten diese genetische Variabilität, welche sich auch auf der Proteinebene widerspiegelt (CALUS et al., 2007). Feldisolate unterschieden sich je nach Region: Auf Herden- und Tierebene wurden teils verschiedene (STAKENBORG et al., 2005a; NATHUES et al., 2011; CHARLEBOIS et al., 2014), teils gleiche Isolate gefunden (CALUS et al., 2007). Vereinzelt bestanden nur sehr geringe Homologien zu Impf- und Feldstämmen (CHARLEBOIS et al., 2014). *M. hyopneumoniae* kann mit Hilfe von Spaltungsvorgängen nach der Translation selektiv seine Oberflächenproteine variieren (DJORDJEVIC et al., 2004). Ob diese genetische Vielfalt auch direkt im Zusammenhang mit der bestehenden Varianz der Virulenz steht ist noch ungeklärt (THACKER & MINION, 2012). Hochvirulente Stämme von *M. hyopneumoniae* verursachen nicht nur häufiger, sondern auch schwerwiegendere Lungenentzündungen (VICCA et al., 2003).

Die Proteinprofile ließen in einer Studie von CALUS et al. (2007), bis auf ein

181 kilodalton Protein, welches vorwiegend bei zwei virulenten Stämmen nachgewiesen wurde, keine Rückschlüsse auf die Virulenz zu. Ein 5000 Basenpaar Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Fragment konnte nur bei mittel- bis hochvirulenten Stämmen detektiert werden (VICCA et al., 2003). Zurzeit sind die genauen Virulenzfaktoren von *M. hyopneumoniae* noch weitestgehend unerforscht (THACKER & MINION, 2012). Obwohl Genome von virulenten Stämmen bereits sequenziert sind, fehlt noch Klarheit über die genauen Mechanismen der Zelladhäsion, der Kolonisation, der Zytotoxizität und der Modulation des Immunsystems; man vermutet, dass multiple Gene in der Pathogenese eine Rolle spielen (THACKER & MINION, 2012). Bei kanadischen Feldisolaten ging das Fehlen eines bestimmten Genlokus mit einer geringeren Erregermenge und verringerten Lungenläsionen einher (CHARLEBOIS et al., 2014).

M. hyopneumoniae bindet mit Hilfe von Oberflächenproteinen und Kohlenhydraten an die Zilien der Epithelzellen des Respirationstraktes (ZIELINSKI & ROSS, 1993). Die Rezeptoren an den Flimmerepithelzellen bestehen vorwiegend aus Glykokonjugaten (ZHANG et al., 1994). Ein bereits gut untersuchtes Membranprotein, welches primär an der Adhäsion beteiligt ist, stellt das P97 dar (HSU & MINION, 1998; MINION et al., 2000). In vitro konnten monoklonale Antikörper gegen P97 dessen Adhäsion blockieren (ZHANG et al., 1995). Jedoch war eine entsprechende Impfung gegen P97 *in vivo* nicht ausreichend, um eine Kolonisation zu verhindern sowie die schwere der Lungenläsionen zu reduzieren (KING et al., 1997). WILTON et al. (2009) stellten fest, dass zusätzlich die Proteine P84 und P102 an der ziliären Bindung beteiligt sein könnten. Die Adhäsine P97 und P102 gehören zu zwei Proteinfamilien, die mittels Proteasen Spaltungsprozessen unterzogen werden, dies führt zu einer Steigerung der Komplexität der Oberflächenproteine des Erregers (DEUTSCHER et al., 2012).

Nach der Kolonisation des Flimmerepithels bilden sich Mikrokolonien an der Spitze sowie entlang der gesamten Länge der Zilien (JACQUES et al., 1992). Anschließend kommt es zur Ziliostase sowie zu einem Zilien- und Epithelzellverlust (BLANCHARD et al., 1992; DEBEY & ROSS, 1994). Zusätzlich kommt es zu einer Minderung der muzinproduzierenden Becherzellen und zu einer Veränderung der Zusammensetzung der gebildeten Sekrete (DEBEY

et al., 1992). Histologisch ist eine Infektion durch einen Anstieg der mononukleären Zellen im perivaskulären und peribronchialen Raum gekennzeichnet (BLANCHARD et al., 1992). Diese Akkumulation führt zu einer Kompression der Bronchien (BLANCHARD et al., 1992). Zudem kommt es zu einer vermehrten Produktion von proinflammatorischen und immunmodulatorischen Zytokinen wie z.B. IL-2, -4 und TNF- α (RODRÍGUEZ et al., 2004). Diese gesteigerte Zytokinproduktion ist an der Entstehung der Lungenläsionen und der lymphoretikulären Hyperplasie des bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) nach einer *M. hyopneumoniae* Infektion beteiligt (RODRÍGUEZ et al., 2004). MEYNS et al. (2007) stellten fest, dass eine stärkere Virulenz neben einer geringeren Generationszeit und tendenziell höheren Übertragungsraten (MEYNS et al., 2004), zusätzlich mit der Fähigkeit eine stärkere Entzündungsreaktion auszulösen, welche unter anderem durch höhere TNF- α Gehalte in der BALF gekennzeichnet ist, einhergeht (MEYNS et al., 2007).

1.5. Makroskopische und histologische Veränderungen

Eine akute Mycoplasmen-Pneumonie führt zu einer Verhärtung, einem Ödem und einer geminderten Retraktionsfähigkeit der Lunge, wobei eine chronische Enzootische Pneumonie (EP) sich makroskopisch in einer violett bis grauen Verfärbung und einer Konsolidierung der cranio-ventralen Anteile der Lunge mit lobulärer Ausprägung manifestiert (THACKER & MINION, 2012). Hat eine sekundäre Besiedlung mit pyogenen Bakterien stattgefunden, kommt es zur Anreicherung von mukopurulentem Exsudat in den Luftwegen und im Vergleich zur Monoinfektion ist meist ein größerer Anteil der Lunge betroffen (THACKER & MINION, 2012). Die tracheobronchialen Lymphknoten präsentieren sich vergrößert und verhärtet (THACKER & MINION, 2012). Das makroskopische Erscheinungsbild am Schlachthof wird durch den Infektionszeitpunkt bestimmt (ANDREASEN et al., 2001). Serokonvertieren die Tiere am Ende der Mast, ergeben die makroskopischen Untersuchungen am Schlachtband vorwiegend mycoplasmentypische katarrhalische Pneumonien, im Vergleich hierzu führt eine frühe Infektion häufig zu vermehrt cranio-ventralen Pleuritiden welche auf Sekundärinfektionen zurückzuführen sein könnten (ANDREASEN et al., 2001). Auch FRAILE et al. (2010) konnten einen Zusammenhang zwischen cranio-ventralen Konsolidierungen der Schlachtlungen und einer positiven Seroprävalenz

von *M. hyopneumoniae* feststellen.

In Bezug auf die histologisch nachweisbaren Veränderungen führt eine *M. hyopneumoniae* Infektion zu einer katarrhalischen, bronchointerstitiellen Pneumonie mit einer Infiltration der Lamina propria der Bronchien und Bronchiolen sowie der Alveolarsepten mit Entzündungszellen (SARRADELL et al., 2003). Ein bedeutender histologischer Befund ist die Hyperplasie der mononukleären Zellen des BALT, welche eine Obliteration des Lumens der Bronchiolen und eine Atelektase der umliegenden Alveolen verursacht (SARRADELL et al., 2003). Sie besteht vorwiegend aus Makrophagen, daneben findet man dendritische Zellen, T- und B-Lymphozyten, IgA⁺ und IgG⁺ Plasmazellen sowie mehr CD4⁺ Zellen als CD8⁺ Zellen (SARRADELL et al., 2003). Im Lumen der luftleitenden Wege und der Alveolen befindet sich seröse Flüssigkeit mit Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Plasmazellen (REDONDO et al., 2009; THACKER & MINION, 2012). Auf Tierebene wiesen VRANCKX et al. (2012b) nach, dass eine höhere Konzentration des Erregers in der BAL-Flüssigkeit in Zusammenhang mit einem schlechteren Lungenscore und einer höheren Anzahl an Immunzellen im BALT steht. Zusätzlich kann es zu einer Proliferation der Becherzellen und einer Hyperplasie der submucosalen Drüsen kommen (THACKER & MINION, 2012). Der Erreger selbst befindet sich an und zwischen den Zilien der Epithelzellen der Bronchien und Bronchiolen (SARRADELL et al., 2003) und anschließend auch vereinzelt in interstitiellen und alveolären Makrophagen und Typ 1-Pneumozyten (KWON et al., 2002).

1.6. Klinische Symptome und Krankheitskomplexe

Eine *M. hyopneumoniae* Infektion führt klinisch zu einem trockenen, unproduktiven Husten, der vor allem nach dem Auftreiben der Schweine auftritt (THACKER & MINION, 2012). Zumeist sind Absetz- und Mastschweine sowie junge Zuchttiere zuerst betroffen, wobei die Ausbreitung im Bestand in der Regel langsam verläuft (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Eine experimentelle Infektion rief nach 6-7 Tagen erste klinische Symptome hervor, wobei es zu einem stetigen Anstieg der Hustenrate bis vier Wochen nach der Infektion kam (SØRENSEN et al., 1997; VICCA et al., 2003). Eine reduzierte Futteraufnahme der betroffenen Tiere führt zum Auseinanderwachsen der Gruppe (THACKER & MINION, 2012). Eine Monoinfektion mit *M. hyopneumoniae* wird als

Mycoplasmen-Pneumonie bezeichnet; wobei der Begriff Enzootische Pneumonie die bakteriellen Sekundärinfektionen durch *P. multocida*, *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae* und *S. suis* miteinschließt (THACKER & MINION, 2012). Bei viralen Koinfektionen sind PCV2, SIV und PRRSV beteiligt und man spricht vom *Porcine Respiratory Disease Complex* (PRDC) welcher vorwiegend zwischen der 15. und 20. Lebenswoche auftritt (BROCKMEIER et al., 2002; THACKER & MINION, 2012). Diese, durch Sekundärinfektionen verkomplizierten Krankheitsverläufe mit zusätzlichen Symptomen wie Fieber, Dyspnoe und Niedergeschlagenheit, können auch mit vermehrter Mortalität einhergehen (SELBITZ, 2011; THACKER & MINION, 2012). Werden zusätzlich zur Mycoplasmeninfektion noch die beeinflussenden Umweltfaktoren berücksichtigt, spricht man von Mycoplasma induced Respiratory Disease (MIRD) (SELBITZ, 2011).

Untersuchungen der BAL-Flüssigkeit von klinisch kranken Schweinen durch PALZER et al. (2008) hatten zum Ziel das Zusammenwirken verschiedener Erreger in der Genese von Pneumonien nachzuweisen. Eine Isolation von *M. hyopneumoniae* war signifikant positiv-assoziiert mit dem Nachweis von PRRSV (EU) als auch mit bakteriellen Erregern wie *P. multocida*, *B. bronchiseptica* und *M. hyorhinitis* (PALZER et al., 2008). Nach einem positiven bakteriologischen Befund im Hinblick auf *P. multocida* wurde in 97,2 % der Fälle histopathologisch und immunhistologisch ebenfalls *M. hyopneumoniae* nachgewiesen (TAKEUTI et al., 2013). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung einer Koinfektion beider Erreger bei klinisch kranken Tieren (TAKEUTI et al., 2013). Eine experimentelle Inokulation beider Erreger rief bei den Tieren höheres Fieber, stärkeren Husten und Dyspnoe sowie größere, exsudative Lungenläsionen hervor als eine *M. hyopneumoniae* Monoinfektion (CIPRIAN et al., 1988). Eine Infektion mit einem *A. pleuropneumoniae* Stamm vom Serotyp 9 führte bei zehn Wochen alten Tieren zu fast keinen klinischen Symptomen (MAROIS et al., 2009). Kam es jedoch vier Wochen zuvor zu einer *M. hyopneumoniae* Infektion, verstärkte diese Koinfektion das Krankheitsbild mit Fieber, starkem Husten, schweren Lungenläsionen und einer höheren Mortalität im Vergleich zur jeweiligen Monoinfektion (MAROIS et al., 2009).

Eine retrospektive, ätiologische Analyse von Krankheitsfällen mit Respirationsproblematik ergab, dass in 88,2 % von 2872 untersuchten

Lungenproben mindestens zwei Erreger beteiligt waren, wobei SIV und PRRSV die häufigsten viralen Pathogene darstellten (CHOI et al., 2003). Bei einem positiven SIV Befund wurden häufig Koinfektionen mit *M. hyopneumoniae*, *P. multocida* und PRRSV nachgewiesen (CHOI et al., 2003). Eine Koinfektion von *M. hyopneumoniae* und SIV (H1N1) führte signifikant häufiger zu Husten, wengleich der weitere klinische Verlauf sowie der Pneumoniegrad nicht verstärkt wurden (THACKER et al., 2001). Es handelt sich vermutlich mehr um additive Auswirkungen beider Erreger, als um einer Potenzierung durch *M. hyopneumoniae* (THACKER et al., 2001). Im Vergleich zur *M. hyopneumoniae* Monoinfektion stieg der Grad der Lungenläsionen jedoch nach experimenteller Koinfektion mit einem niedrig pathogenen SIV Stamm (YAZAWA et al., 2004). Eine stärkere Ausprägung der mit SIV assoziierten klinischen Symptome und Lungenläsionen sowie zusätzlich einen größeren Gewichtsverlust der Tiere nach einer Doppelinfektion von *M. hyopneumoniae* und H1N1 konnten auch DEBLANC et al. (2012) nachweisen. Jedoch stellten sie diesen synergistischen Effekt nicht bei einer Koinfektion mit H1N2 fest (DEBLANC et al., 2012).

Im Vergleich hierzu werden die klinischen Symptome einer PRRSV Infektion und die hervorgerufenen makroskopischen und histologischen Lungenveränderungen durch eine gleichzeitige Infektion mit *M. hyopneumoniae* verstärkt (THACKER et al., 1999). Diese durch *M. hyopneumoniae* bedingte Potenzierung der PRRSV-bedingten makroskopischen Lungenläsionen wurde ebenfalls durch THACKER et al. (2000b) und THANAWONGNUWECH und THACKER (2003) belegt. Dementsprechend verringerte eine Impfung gegen *M. hyopneumoniae*, nach experimenteller Koinfektion, die PRRSV Virämie sowie die Schwere der Lungenläsionen; wohingegen eine PRRSV Vakzination keinen Einfluss auf die nasale Ausscheidung von *M. hyopneumoniae* und die mycoplasmentypischen Lungenläsionen hatte (PARK et al., 2014). Die Impfung gegen *M. hyopneumoniae* in Betrieben in denen eine PRRSV-Koinfektion auftritt ist der erste Schritt zur Kontrolle beider Pathogene (PARK et al., 2014).

Eine epidemiologische Erhebung zeigte, dass PCV2 positive Schweine, im Vergleich zu negativen Tieren, zusätzlich signifikant häufiger mit *M. hyopneumoniae* infiziert waren (DORR et al., 2007). Eine experimentelle Koinfektion beider Erreger verschlimmerte die mikroskopischen Läsionen und die

PCV2-Viruslast im Lungen- und lymphatischen Gewebe im Vergleich zur Monoinfektion (OPRIESSNIG et al., 2004). Zusätzlich zu diesen Potenzierungen steigerte eine gleichzeitig bestehende *M. hyopneumoniae* Infektion die Inzidenz des klinischen Krankheitsbildes *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome* (PMWS) (OPRIESSNIG et al., 2004). Eine ähnliche Potenzierung von *Porcine Circovirus Associated Diseases* (PCVAD) konnte auch in einem Infektionsversuch an Ebern festgestellt werden (OPRIESSNIG et al., 2011).

1.7. Diagnostik

Trockener Husten sowie EP-typische makroskopische Lungenläsionen können als erste Hinweise für eine *M. hyopneumoniae* Infektion dienen, wenngleich man eine definitive Diagnose erst mit dem Nachweis des Erregers aus Lungen mit EP-typischen Läsionen erhält (THACKER & MINION, 2012). Für den direkten und indirekten Erregernachweis gibt es unterschiedliche Untersuchungsmethoden.

1.7.1. Kulturelle Anzucht

Der Nachweis von *M. hyopneumoniae* mittels bakteriologischer Untersuchung gilt als Goldstandard, jedoch ist die Anzucht einerseits durch die langsame Wachstumsrate des Organismus und die hohen Ansprüche des Erregers an das Nährmedium sowie andererseits durch die Gefahr der Kontamination sehr anspruchsvoll (THACKER, 2004). Dies hat zur Folge, dass es unter Feldbedingungen zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann (THACKER, 2004). Im Vergleich zu anderen diagnostischen Methoden erwies sich die bakteriologische Untersuchung am wenigsten effizient und praktikabel, da es bei 53 % der Kulturen zur Kontamination mit anderen Erregern kam (HILTERMANN-LINDEN, 2004). Als Probenmaterial eignen sich sowohl Nasen- und Tonsillentupfer wobei sich Trachealtupfer und BAL-Flüssigkeit als sensitiver erwiesen (MAROIS et al., 2007). Eine geringere Gefahr einer Verunreinigung mit Kommensalen- und Umweltkeimen besteht, verglichen mit der endotrachealen Beprobung, bei einer transtrachealen Lavage (HENNIG-PAUKA et al., 2007). Lungengewebsproben eignen sich ebenfalls für die kulturelle Diagnostik, wobei für Proben, die mittels Biopsie gewonnen wurden, eine geringere Kontaminationsgefahr besteht (HEINRITZI et al., 2003).

1.7.2. Immunfluoreszenz, Immunhistochemie und in-situ Hybridisierung

Bei der Immunfluoreszenz (IF) und der Immunhistochemie (IHC) wird der

Erreger auf dem respiratorischen Epithel mit Hilfe von Anti-*M. hyopneumoniae*-Antikörpern visualisiert, die in-situ Hybridisierung hingegen bedient sich spezifischer Nukleinsäuren (THACKER & MINION, 2012). Die Detektion des Erregers auf dem Flimmerepithel bedingt, dass nur frische Gewebeproben verwendet werden können (THACKER & MINION, 2012). Die Sensitivität der IF nach experimenteller Infektion lag zunächst bei 96 %, sank dann jedoch 85 Tage nach der Infektion auf 18 % (SØRENSEN et al., 1997). Ein positiver IF-Nachweis aus Lungengewebeproben ging mit makroskopischen Lungenläsionen einher (MAROIS et al., 2007). Eine Korrelation zwischen dem Erregernachweis mittels IHC und den makroskopischen Lungenläsionen konnte in einer Untersuchung von MOORKAMP et al. (2010) ermittelt werden. Die immunhistochemische Untersuchung von Lungenproben mittels eines monoklonalen Antikörpers eignet sich als diagnostisches Mittel (MOORKAMP et al., 2008). Sie kann jedoch eine n-PCR, vor allem bei der Detektion einer frühen Infektion, vor Ausbildung makroskopischer Veränderungen, nicht ersetzen (MOORKAMP et al., 2010). Der Nachweis von *M. hyopneumoniae* typischen Nukleinsäure Sequenzen mittels in-situ Hybridisierung gelang auf der luminalen Seite der bronchialen und bronchiolären Epithelzellen, jedoch nicht im Zytoplasma dieser Zellen (KWON & CHAE, 1999; KWON et al., 2002). Zusätzlich wurde DNA in Makrophagen und Typ I Pneumozyten von natürlich infizierten Tieren gefunden (KWON & CHAE, 1999; KWON et al., 2002).

1.7.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Ein direkter molekularbiologischer Nachweis von *M. hyopneumoniae* mittels PCR erwies sich, sowohl bei experimentellen Infektionen, als auch in Feldversuchen, als sehr sensitiv und spezifisch (BLANCHARD et al., 1996; SØRENSEN et al., 1997; BAUMEISTER et al., 1998). Es konnte eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen der PCR und jenen der IF nachgewiesen werden, wobei die PCR in der frühen Infektionsphase eine höhere Sensitivität besaß (BLANCHARD et al., 1996). Ein weiterer Vorteil gegenüber der IF besteht darin, dass die zu untersuchenden Proben am lebenden Tier gewonnen werden können (BAUMEISTER et al., 1998). Als Probenmaterial für eine PCR Untersuchung eignen sich Nasen- und Tonsillentupfer, da sie gut mit dem Nachweis von *M. hyopneumoniae* aus Bronchialtupfern korrelieren. Jedoch sind Nasentupfer als Indikator für die Präsenz des Erregers im unteren Respirationstrakt den

Tonsillentupfern vorzuziehen (SIBILA et al., 2004a). Eine zuverlässigere Diagnostik ist jedoch mit Trachealtupfern zu erreichen (MAROIS et al., 2007). Auch FABLET et al. (2010) kommen zu dem Schluss, dass tracheobronchiale Tupfer und die transtracheale Lavage bei natürlich infizierten Schweinen die sensitivsten Beprobungsmethoden sind. Bei geringen histologischen Veränderungen ist die Untersuchung von BAL-Flüssigkeit jener von Lungenproben überlegen (MOORKAMP et al., 2008). Jedoch ist die Nachweishäufigkeit von *M. hyopneumoniae* bei moderaten bis starken Läsionen aus Lungengewebe größer (MOORKAMP et al., 2008).

Eine nested PCR, bei der zwei Sets von Primern verwendet werden, steigert die Sensitivität des Nachweises von *M. hyopneumoniae* aus Nasentupfern (CALSAMIGLIA et al., 1999). Es konnte eine signifikant bessere Sensitivität im Vergleich zur IF belegt werden (VERDIN et al., 2000). Wenngleich diese hohe Sensitivität auch bedingt, dass tote Mikroorganismen oder nur deren Fragmente nachgewiesen werden (CALSAMIGLIA et al., 1999). Zusätzlich erhöht sich bei einer n-PCR das Risiko der Kontamination während der Durchführung (CALSAMIGLIA et al., 1999; KURTH et al., 2002). Eine Erhebung von STÄRK et al. (1998) verdeutlicht diese hohe Kontaminationsgefahr, indem sogar aus Luftproben mittels n-PCR der Erreger nachgewiesen werden konnte. Eine n-PCR ist besonders wertvoll als ergänzendes diagnostisches Mittel bei fragwürdigen histologischen Ergebnissen (CALSAMIGLIA et al., 2000). Ein positives Resultat in der n-PCR von Bronchialtupfern korreliert mit der Präsenz von EP-typischen histologischen Lungenläsionen (CALSAMIGLIA et al., 2000; SIBILA et al., 2004a).

Die verschiedenen PCR-Systeme weisen Ungenauigkeiten auf, die durch die genetische Variabilität von *M. hyopneumoniae* verursacht werden (STRAIT et al., 2008). Eine real-time PCR, die auf dem Nachweis von drei proteincodierenden Genen basiert, soll falsch negative Testergebnisse, die durch diese Variabilität oder durch Kreuzreaktion mit andern Mycoplasmenarten bedingt sind, verhindern (MAROIS et al., 2010). Neben einer hohen Spezifität, ermöglicht eine real-time PCR ebenfalls eine Quantifizierung der Erregerlast (DUBOSSON et al., 2004; STRAIT et al., 2008; MAROIS et al., 2010).

Eine schnellere und kostengünstigere Methode stellt die *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP)-Untersuchung dar (LI et al., 2013). Neben

einer hohen Spezifität belegten Untersuchungen von Nasentupfern und Lungenproben mittels LAMP ihre hohe Sensitivität, welche mit der einer real-time PCR vergleichbar ist (LI et al., 2013).

1.7.4. Serologie

Zur Feststellung des *M. hyopneumoniae* Herdenstatus eignet sich besonders die Serologie, welche jedoch auf Einzeltierebene nicht als diagnostisches Mittel herangezogen werden sollte (THACKER & MINION, 2012). Hierbei werden die Serumproben der Tiere auf *M. hyopneumoniae* spezifische Antikörper untersucht. Allerdings werden rezente Infektionen nicht erfasst (THACKER & MINION, 2012). Ein serologisches Profil einer Herde kann man einerseits durch die Beprobung derselben Tiere über den gesamten Produktionszyklus (longitudinale Erfassung) oder andererseits durch die Beprobung unterschiedlicher Altersklassen (transversale Erhebung) erhalten (SIBILA et al., 2009). In den USA werden drei verschiedene Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) zum Nachweis von *M. hyopneumoniae* Antikörpern aus dem Serum eingesetzt; beim IDEXX[®] HerdChek- und dem Tween 20-ELISA handelt es sich um indirekte Tests, beim DAKO[®]-Test zudem um einen blocking ELISA (THACKER, 2004). Alle drei Systeme besitzen eine hohe Spezifität (THACKER, 2004), welche ebenfalls bei einem weiteren *M. hyopneumoniae* blocking-ELISA nachgewiesen wurde (SØRENSEN et al., 1997). Die höchste Sensitivität von 49 % besitzt der DAKO-ELISA (ERLANDSON et al., 2005). Im Vergleich hierzu liegt die Sensitivität vom Tween 20 bei 35,3 % und jene vom IDEXX-ELISA bei 37,3 % (ERLANDSON et al., 2005). Wenngleich der DAKO-ELISA frühe Infektionen signifikant besser nachweist (ERLANDSON et al., 2002), impliziert die insgesamt niedrige Sensitivität, dass es häufig zu falsch negativen Resultaten kommt. Eine experimentelle Infektion mit unterschiedlich virulenten Stämmen zeigte zudem, dass die Nachweishäufigkeit der einzelnen ELISA`s auch durch diese Varianz der Isolate beeinflusst wurde (STRAIT et al., 2004). Um diese Diskrepanz zu minimieren kann ein Western Blot, welcher auf mehrere *M. hyopneumoniae* Antigene zielt, als Bestätigungstest herangezogen werden (AMERI et al., 2006).

In einer Untersuchung von SØRENSEN et al. (1997) kam es nach experimenteller Infektion bereits nach acht Tagen zur Serokonversion während diese in einer Erhebung von OKADA et al. (2005) meist nach drei Wochen nachzuweisen war. Nach natürlicher Infektion ließ sich eine Serokonversion nach drei bis fünf

Wochen nachweisen (SORENSEN et al., 1993). Auch in Feldstudien konnte gezeigt werden, dass es am Ende der Aufzucht und meist in der Mastphase zur einer Serokonversion kommt (ANDREASEN et al., 2000; VICCA et al., 2002). Diese späte Serokonversion wird möglicherweise durch die Lokalisation des Erregers auf den Zilien des Atmungstraktes bedingt, welche im Vergleich zu invasiveren Erregern, erst zu einer späteren Auseinandersetzung mit dem Immunsystem des Wirtes führt (SIBILA et al., 2009). Ein falsch negatives Testergebnis kann somit nicht nur durch die Qualität des ELISA's verursacht sein, sondern auch durch eine Beprobung kurz nach der Infektion (ERLANDSON et al., 2005).

Um eine möglichst akkurate Aussage treffen zu können ist es hilfreich mehrere diagnostische Methoden zu kombinieren. Die Serologie eignet sich nicht um eine Erregerfreiheit festzustellen, hier wäre eine PCR Untersuchung vorzuziehen (THACKER & MINION, 2012). In Mastbeständen mit bekannt hoher Seroprävalenz kann die quantitative Erfassung von trockenem Husten, in Form eines Hustenindex, als diagnostisches Hilfsmittel herangezogen werden (NATHUES et al., 2012). Diese klinische Diagnostik in Kombination mit der Serologie vermag Infektionszeitpunkte zu erfassen und Vakzinationsmaßnahmen zu planen (THACKER & MINION, 2012).

1.8. Therapie

Eine antibakterielle Therapie reduziert die durch *M. hyopneumoniae* bedingten Symptome, führt jedoch nicht zu einer Erregerelimination oder einer Heilung bereits bestehender Läsionen (THACKER & MINION, 2012). Wichtig ist, dass ein angewendetes Antibiotikum hohe Wirkstoffkonzentrationen im Mukus und in den Schleimhäuten des Respirationstraktes erreicht, da der Erreger sich auf den Zilien der luftleitenden Wege befindet (THACKER & MINION, 2012). In Studien wurden positive Effekte einer Medikation mittels Tylosin, Tiamulin, Tilmicosin sowie Tulathromycin und Doxycyclin auf die Ausprägung der klinischen Symptome, die Inzidenz von Lungenläsionen und die Mastleistungsdaten festgestellt (HSU et al., 1983; LE GRAND & KOBISCH, 1996; BOUSQUET et al., 1998; MATEUSEN et al., 2001; NUTSCH et al., 2005; VICCA et al., 2005). In einem Infektionsversuch zeigten Tiere, die bereits vor der Infektion Chlortetracyclin übers Futter erhielten, signifikant weniger Husten und Lungenläsionen im Vergleich zu Tieren die erst bei Beginn der Symptome

behandelt wurden (THACKER et al., 2006). Eine Medikation erst bei Auftreten der Symptome vermochte hingegen nur die Anzahl an Erregern in der Lunge im Vergleich zu unbehandelten Tieren zu reduzieren (THACKER et al., 2006). Eine Untersuchung in drei Mastbetrieben in Frankreich zeigte, dass eine Medikation von 11 mg/kg Körpergewicht Tetracyclin übers Futter für acht Tage zu einer signifikanten Verbesserung der Mastleistungsdaten führte (BOUSQUET et al., 1998). Weiterhin sank, bei der vorliegenden Koinfektion von *M. hyopneumoniae* und *P. multocida*, die Morbidität signifikant in der behandelten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (BOUSQUET et al., 1998). Eine Verabreichung von Chlortetracyclin (500 ppm) zu Beginn der respiratorischen Symptome, mit sieben therapiefreien Tagen zwischen den zwei Behandlungswochen, reduzierte die Inzidenz von *M. hyopneumoniae* typischen Lungenläsionen gegenüber einer dreiwöchigen Medikation mittels Tylosin (DEL POZO SACRISTAN et al., 2012). Eine Injektion von Florfenicol reduzierte für kurze Zeit die klinischen Symptome einer experimentellen *M. hyopneumoniae* Infektion, jedoch wurden die makroskopischen und histologischen Lungenläsionen nicht signifikant verringert (DEL POZO SACRISTÁN et al., 2012). Eine Verabreichung des gleichen Wirkstoffes übers Futter minimierte signifikant die makroskopischen Ausdehnungen der Lungenläsionen im Vergleich zu unbehandelten Tieren (CIPRIÁN et al., 2012). Eine Kombination aus einer Impfung gegen *M. hyopneumoniae* und einer zusätzlichen antibiotischen Therapie mittels Lincomycin während der Mast zeigte keine Verbesserung der klinischen Symptome, der Lungenläsionen und der Mastleistungsdaten im Vergleich zu der alleinigen Anwendung beider Bekämpfungsmethoden (MATEUSEN et al., 2002). Auch Makrolidantibiotika reduzieren die Symptome einer *M. hyopneumoniae* Infektion und senken die Inzidenz von Lungenläsionen (VICCA et al., 2005). Dies konnte im Infektionsversuch, mit einem 21-tägigen Einsatz von Tylosin (100mg/kg Futter) belegt werden (VICCA et al., 2005). Eine zweiwöchige Fütterungsantibiose von 137,5 ppm oder 165 ppm Tiamulin reduzierte die Hustenrate von infizierten Tieren und verringerte signifikant den Grad der Lungenläsionen (HAMMER et al., 2010).

In Feldversuchen muss berücksichtigt werden, dass es sich meist um Infektionen mit mehreren Erregern handelt, was die Interpretation der Wirksamkeit der Antiinfektiva gegen *M. hyopneumoniae* beeinflusst (THACKER & MINION,

2012). Die Wirksamkeit verschiedener Kombinationen von Fütterungsantibiotika, bei einer Koinfektion von *M. hyopneumoniae* mit *A. pleuropneumoniae* und *P. multocida* wurde in einem Infektionsversuch untersucht (STIPKOVITS et al., 2001). Eine Kombination aus Valnemulin und Chlortetracyclin wirkte, im Hinblick auf die Reduktion klinischer Symptome sowie makroskopischer und histologischer Veränderungen der Lungen, am besten, gefolgt von einer Kombination aus Tiamulin und Chlortetracyclin (STIPKOVITS et al., 2001).

Antibiotika, wie Penicillin, Ampicillin, Amoxicillin und Cephalosporine deren Wirkungsprinzip auf der Interaktion mit der bakteriellen Zellwandsynthese basiert, eignen sich nicht zur Therapie von *M. hyopneumoniae* Infektionen, da es sich um einen zellwandlosen Erreger handelt (THACKER & MINION, 2012). Zusätzlich wird bereits von erworbenen Resistenzen gegen potentiell wirksame Antibiotikagruppen berichtet. VICCA et al. (2004) stellten in *in vitro* Untersuchungen Resistenzen bei fünf *M. hyopneumoniae* Feldstämmen gegenüber Fluorchinolonen fest. Zusätzlich erwies sich ein Stamm als resistent gegenüber Makroliden und einem Lincosamid (VICCA et al., 2004). Auch bei anderen Feldstämmen konnten Resistenzen gegenüber letzteren beiden Gruppen festgestellt werden (STAKENBORG et al., 2005b). Eine ähnliche Resistenzlage, mit zusätzlichen Resistenzen gegenüber Chlortetracyclinen ermittelte auch THONGKAMKOON et al. (2013) bei thailändischen Feldisolaten.

1.9. Bekämpfungsmethoden

1.9.1. Vakzination

Impfungen von Saugferkeln gegen *M. hyopneumoniae* in der ersten bis zur dritten Lebenswoche als Einfach- oder Zweifach Vakzination, haben sich sowohl in Infektions- als auch in Feldversuchen als wirksam erwiesen (THACKER et al., 1998; DAWSON et al., 2002; JONES et al., 2005; REYNOLDS et al., 2009; TASSIS et al., 2012; WILSON et al., 2012). Die im Handel erhältlichen Impfstoffe basieren auf dem kompletten Organismus, in Form von Ganzzellvakzinen, oder auf Membranproteinen in Kombination mit verschiedenen Adjuvanzen (THACKER & MINION, 2012). Laut WALDERS et al. (2005) besteht die Möglichkeit der Etablierung einer auf dem Keyhole Limpet Hemocyanin Peptid basierenden, wirksamen Markervakzine zur Unterscheidung zwischen Feld- und Impfantikörpern.

Eine Vakzination gegen *M. hyopneumoniae* verhindert nicht die Kolonisation des Atmungstraktes (LE GRAND & KOBISCH, 1996; REYNOLDS et al., 2009; PIETERS et al., 2010; VILLARREAL et al., 2011b). Jedoch wird bei geimpften Tieren eine geringere Erregerprävalenz im oberen Atmungstrakt gefunden, was im Rückschluss auf eine reduzierte Ausscheidung bei vakzinierten Tieren hindeutet (BACCARO et al., 2006; SIBILA et al., 2007). In anderen Studien hingegen konnte eine Vakzination die Übertragung von *M. hyopneumoniae* während der Aufzucht nicht signifikant reduzieren (MEYNS et al., 2006; VILLARREAL et al., 2011a). Ihr Erfolg liegt vielmehr in der Reduzierung von mycoplasmentypischen Lungenveränderungen und der Verbesserung der täglichen Zunahmen im Vergleich zu ungeimpften Tieren (MAES et al., 1999b; KYRIAKIS et al., 2001; SIUGZDAITE et al., 2003; REYNOLDS et al., 2009; WILSON et al., 2012). Eine Erhebung von Schlachtbefunden zeigte, dass es bei geimpften Tieren im Vergleich zu ungeimpften Tieren, signifikant weniger häufig zu einer cranio-ventralen Konsolidierung des Lungengewebes kam und die Läsionen im Mittel geringer ausgeprägt waren (POMMIER et al., 2000; FRAILE et al., 2010). Selbst bei vorhandenen maternalen Antikörpern wird eine Verringerung der Prävalenz von Lungenläsionen beobachtet (REYNOLDS et al., 2009). Die verbesserten Mastleistungsdaten spiegeln sich auch in einer signifikant höheren Futterverwertung wider (MAES et al., 1999b). Zweifach geimpfte Tiere zeigten eine um 13 % gesteigerte Futterverwertung im Vergleich zur ungeimpften Kontrollgruppe (KYRIAKIS et al., 2001). Zusätzlich wird eine Optimierung der Fleischqualität mit einem höheren Anteil an Magerfleisch und einer besseren Wasserbindungskapazität von SIUGZDAITE et al. (2003) beschrieben.

Eine einmalige Impfung gegen *M. hyopneumoniae* reduzierte signifikant die Prävalenz von Lungenveränderungen in einem Betrieb indem sowohl durch *M. hyopneumoniae* als auch durch virale Pathogene bedingte respiratorische Symptome während der Mast auftraten (DEL POZO SACRISTÁN et al., 2014). Zusätzlich wurde bei den geimpften Tieren eine Minderung der Nachweisrate von *M. hyopneumoniae* mittels n-PCR in der BALF festgestellt (DEL POZO SACRISTÁN et al., 2014). Eine numerische Reduzierung der Erregerlast in der BAL-Flüssigkeit von geimpften und später infizierten Tieren konnten auch VRANCKX et al. (2012a) mittels q-PCR nachweisen. Eine kombinierte Impfung gegen PRRSV und *M. hyopneumoniae* erwies sich im Hinblick auf die Reduktion

makroskopischer Lungenläsionen einer alleinigen Impfung gegen *M. hyopneumoniae* gleichwertig (DREXLER et al., 2010). Demgegenüber steht eine Erhebung von THACKER et al. (2000b) die zeigte, dass die Präsenz von PRRSV (sowohl Feld- als auch Impfvirus) zum Zeitpunkt einer *M. hyopneumoniae* Vakzination, die Wirksamkeit letzterer reduziert.

Eine Überprüfung von drei verschiedenen Impfstoffen, innerhalb von 20 verschiedenen Betrieben, zeigte anhand der Ausdehnung der mycoplasmentypischen Läsionen am Schlachthof eine unterschiedliche Effizienz der Impfstrategien (HILLEN et al., 2014). In einer weiteren Erhebung von BACCARO et al. (2006) zeigte sich, dass beide untersuchte Impfstoffe zu einer Verbesserung der Mastleistungsdaten führten, wenngleich ein Produkt im Hinblick auf die Reduzierung der Lungenläsionen dem anderen signifikant überlegen war. Eine Verbesserung der Qualität der Impfung sowie des Impfzeitpunktes führte in einem geschlossenen Betrieb mit 350 Sauen, zu besseren Mastleistungen, geringeren Lungenscores und einer geringen Mortalität (GUILMOTO, 2010).

1.9.2. Elimination

Eine Minderung der Prävalenz der durch *M. hyopneumoniae* induzierten Pneumonien kann durch eine Verbesserung des Stallklimas, einer Optimierung der Belegdichte, durch Rein-Raus-Verfahren, durch ein räumliches Aufteilen der Alters- und Produktionsgruppen, durch Reduktion der Herkünfte, durch Medikation und durch Impfmaßnahmen gelingen (MAES et al., 2008; THACKER & MINION, 2012). Eine komplette Eradikation ist mit diesen Maßnahmen jedoch nicht zu erreichen (MAES et al., 2008).

Die konsequenteste Eradikationsmethode ist das *Depopulation and Repopulation*, bei dem die ganze Herde mit *M. hyopneumoniae* naiven Tieren neu aufgebaut wird (YESKE, 2007). Hierzu können spezifisch-pathogen-freie Tiere, die nach Schnittentbindung isoliert aufgezogen wurden, verwendet werden (GINDELE, 2006). Als Alternative wird das *Medicated Early Weaning* (MEW) gesehen. Die Sauen werden ab dem 110. Trächtigkeitstag sowie die komplette Säugezeit mittels Antibiotika (Tiamulin und Trimethoprim-Sulfonamid) behandelt (ALEXANDER et al., 1980). Gleichmaßen werden die Ferkel ab ihrer Geburt bis zu ihrem 10. Lebenstag therapiert und bereits am fünften Lebenstag in gesonderte

Aufzuchtbuchten umgestallt (ALEXANDER et al., 1980). In der Schweiz wurde ein kostengünstigeres Teilsanierungskonzept angewendet. Das Prinzip dieser Eradikationsmethode basiert auf einem 10 bis 14-tägigem jungtierfreien Zeitraum, in dem die im Bestand verbleibenden, über 10 Monate alten Tiere, zwei Wochen antibiotisch behandelt werden (ZIMMERMANN et al., 1989). In den USA und Kanada wird dieses Verfahren mit multiplen Vakzinationen der Sauherde, sowie einem räumlich getrennten Zuchtprogramm kombiniert (MAES et al., 2008). Es gibt Fallberichte von erfolgreichen Eradikationen ohne vollständige Depopulation. In einem Mastbetrieb wurden die *M. hyopneumoniae* positiven Tiere antibiotisch behandelt, währenddessen nur negative und geimpfte Tiere neu eingestallt wurden (HEINONEN et al., 2011). Weiterhin wurden beide Tiergruppen in unterschiedlichen Stallabteilen mit eigener Lüftung und Güllekanälen gehalten (HEINONEN et al., 2011). Ein geschlossener Betrieb mit 3800 Sauen erreichte die Mycoplasmeneradikation durch Impfung der Sauherde, Medikation der Sauen und der neugeborenen Ferkel mit Antibiotika sowie Depopulation des Flatdeck und der Mastställe vor der Neueinstellung mit *M. hyopneumoniae* negativen Tieren (GEIGER & GROTH, 2010). Ebenfalls erfolgreich war eine Teildepopulation mit dem Verbleib von Sauen ab dem dritten Wurf, in Kombination mit einer Antibiotikaverabreichung (BRUNER, 2014). Eine Herdenschließung mit kombinierter antibiotischer Medikation erwies sich als effektiver verglichen zur alleinigen Medikation mit Tulathromycin, wenngleich beide Strategien erfolgreich waren (YESKE, 2010).

Jedoch kommt es häufig zur Wiedereinschleppung von *M. hyopneumoniae* durch eine Übertragung über die Luft oder über Zukauf von infizierten jedoch serologisch negativen Tieren (MAES et al., 2008). Jährliche Reinfektionsquoten von 2,6 - 10 % wurden beschrieben (MAES et al., 2008). In der Schweiz lag die Reinfektionsquote im Jahr 2000 von sanierten Betrieben bei 2,6 %, wobei als Risikofaktoren Mastanlagen, benachbarte infizierte Bestände und die Nähe zu Parkplätzen von Tiertransporten eruiert wurden (HEGE et al., 2002).

2. Impfstoffapplikation

2.1. Nadellose intradermale Applikation

2.1.1. Technik

Das IDAL Gerät (*Intra Dermal Application of Liquids*) zählt zu den nadellosen Hochgeschwindigkeits-Flüssigkeitsinjektoren. Bei diesen Geräten wird ein Flüssigkeitsstrahl mittels Druckluft durch eine Düse mit geringem Durchmesser gepresst, um das Volumen in die Haut zu applizieren; ähnliche nadellose Strahlinjektoren werden bereits mehr als 50 Jahre zur parenteralen Injektion von Impfstoffen und Medikamenten in der Humanmedizin eingesetzt. (MITRAGOTRI, 2006). Eine Geschwindigkeit von 80-100 m/s bei einem Durchmesser von 152 µm gilt als Schwellenwert, damit die kinetische Energie des Flüssigkeitsstrahles ausreicht, um die Haut von Schweinen zu durchdringen (SCHRAMM & MITRAGOTRI, 2002). Der Durchmesser des IDAL Düsenkopfes beträgt 250 µm im Vergleich zum Außendurchmesser von 800 µm einer 21 G Kanüle von Braun Sterican[®] nach DIN EN ISO 7864. Das IDAL Gerät arbeitet mit einer maximalen Geschwindigkeit von 80-130 m/s.

Das IDAL Gerät zählt zu den *multi-use-nozzle* Injektoren, bei denen der Düsenkopf wiederverwendbar ist und in direktem Kontakt mit der Haut steht. In der humanmedizinischen Forschung finden neben solchen Injektoren auch *disposable-cartridge* Injektoren ihren Einsatz (MITRAGOTRI, 2005). Diese neueren Geräte haben einen auswechselbaren Düsenkopf, der nicht direkt mit dem Patient in Kontakt kommt und nach jeder Injektion ausgetauscht wird (MITRAGOTRI, 2005).

2.1.2. Penetration und Zuverlässigkeit

Die Penetrationstiefe einer nadellos applizierten Flüssigkeit ist linear von ihrem Volumen abhängig, zusätzlich wird sie durch die Hautdicke an der Injektionsstelle sowie der Distanz zwischen Hautoberfläche und Muskelfaszien beeinflusst (WAGNER et al., 2004). Die Geschwindigkeit und der Durchmesser des Flüssigkeitsstrahls beeinflussen, welche Gewebeschichten durchdrungen werden und wie sich das Verteilungsmuster darstellt (SCHRAMM-BAXTER & MITRAGOTRI, 2004). Durch die einwirkenden Scherkräfte des Gewebes verlangsamt sich der Strahl und es kommt zur einer verstärkten seitlichen

Ausbreitung (SHERGOLD et al., 2006). Die anschließende Verteilung folgt dem Weg des geringsten Widerstandes entlang den Leitstrukturen wie Nerven, Blutgefäßen, Bindegewebsfasern und Muskelfasziën (BENNETT et al., 1971; ELGENEIDY et al., 1974; WAGNER et al., 2004; ANN PRÆSTMARK JUUL et al., 2012). Nach einer Injektion von 0,1 ml fluoreszierender Substanz in die porcine Vordergliedmaße stellten WAGNER et al. (2004) fest, dass ihre Verteilung besonders entlang der Haarschäfte und der Fasern des Bindegewebes stattfand; hierbei wurde ihr kegelartiges Verteilungsmuster durch natürliche Barrieren wie Muskelfasziën variiert.

Mehrere Studien heben hervor, dass die Penetration des Injektates von der Hautbeschaffenheit bei Mensch und Tier abhängig ist; neben der Hautdicke- und Behaarung beeinflussen auch das Alter des Tieres und die Applikationsstelle die Qualität der Penetration (SCHRAMM & MITRAGOTRI, 2002; WAGNER et al., 2004; JONES et al., 2005). Bei sehr hohen Geschwindigkeiten kommt es zum Zurückspritzen der Flüssigkeit, weil die Aufnahmekapazität der Haut überschritten ist; ist die erzeugte Geschwindigkeit hingegen zu niedrig, wird die gewünschte Penetrationstiefe nicht erreicht (SCHRAMM & MITRAGOTRI, 2002; STACHOWIAK et al., 2009). Eine optimale Penetration mit einem verringerten Prozentsatz an Residualsubstanz kann erreicht werden, indem während der Injektion die Geschwindigkeiten variiert werden (STACHOWIAK et al., 2009). Durch zu große Volumina wird ebenfalls die Aufnahmekapazität der Haut erschöpft, was zu einem Rückfluss des Präparates führt und die Zuverlässigkeit der Injektion mindert (ELGENEIDY et al., 1974). Eine Varianz der applizierten Menge kann zudem durch die Eigenschaften des Produktes wie z.B. seine Viskosität bedingt werden, jedoch ist eine Varianz von im Durchschnitt 0,005 ml bei einem Applikationsvolumen von 0,1 bis 0,5 ml als sehr gering anzusehen (SCHLOESSER et al., 2008). Bei einer Impfstoffstudie konnte bei nadelloser Applikation vermehrt Impfstoff auf der Hautoberfläche der Kälber beobachtet werden, die Immunitätsausbildung wurde dadurch jedoch nicht negativ beeinflusst (REY et al., 2013).

2.1.3. Wirksamkeit nach nadelloser Applikation

Neben einer nadellosen Impfstoffanwendung wird zurzeit auch eruiert, inwiefern sich dieses Injektionsverfahren generell für die Applikation von Antibiotika, von Eisenpräparaten oder von anderen Arzneimitteln eignet (APLEY & THACKER,

2003; ALMOND & ROBERTS, 2004; APLEY et al., 2007; SCHLOESSER et al., 2008; UHL, 2013). Was den Stand der Forschung zur nadellosen Impfstoffapplikation betrifft, gibt es diverse Studien zu unterschiedlichen Erregern und Tierspezies (PAQUIN et al., 2005; WESLEY & LAGER, 2005; ROSALES et al., 2006; MOUSEL et al., 2008; COLDITZ & PAULL, 2010).

Bei Rindern konnten nach einer nadellosen subkutanen Impfung gegen BHV-1 und BVDV gleichermaßen ausgeprägte serologische Verlaufskurven erzielt werden, wie nach einer Injektion mittels Kanüle (REY et al., 2013). Auch eine nadellose, transdermale Impfung gegen Clostridien rief mit einer subkutanen Applikation vergleichbare Antikörpertiter hervor (WOOLUMS et al., 2011). Teilweise konnten sogar höhere Antikörperkonzentrationen nach nadelloser Impfung nachgewiesen werden (SMITH et al., 2005; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006; REY et al., 2013).

Eine intradermale, nadellose Impfung von Schweinen während eines Influenza (H3N2) Infektionsversuches führte zu einer signifikanten Reduktion der Lungenveränderungen und höheren IgG-Antikörpergehalten in der BAL-Flüssigkeit verglichen mit ungeimpften, infizierten Kontrolltieren (RAPP-GABRIELSON et al., 2003). Hierbei konnte eine zur intramuskulären Impfung vergleichbare humorale Immunitätsausbildung, was neutralisierende Antikörper angeht, nachgewiesen werden (RAPP-GABRIELSON et al., 2003). Der IDAL Vakzinator wurde in mehreren Studien zur Impfung gegen PRRSV eingesetzt. In einer Studie von MARTELLI et al. (2009) konnte nach nadelloser, intradermaler Applikation, eine Reduzierung der Inzidenz, der Stärke und der Dauer der klinisch sichtbaren respiratorischen Symptome beobachtet werden. Auch konnte die durchschnittliche Viruslast im Blut der Studientiere nach einem PRRSV-Challenge signifikant reduziert werden im Vergleich zur ungeimpften Kontrollgruppe (MARTELLI et al., 2007).

Ein *M. hyopneumoniae* Infektionsversuch erwies, dass bei Tieren nach einer intradermalen, nadellosen Impfstoffapplikation signifikant weniger Lungenveränderungen und höhere IgA- und IgG-Antikörpertiter in der Lungenspülflüssigkeit auftraten als bei ungeimpften Schweinen (JONES et al., 2005). Zusätzlich hatten die intradermal geimpften Tiere, unabhängig davon, ob die Injektion mittels Kanüle oder nadellos durchgeführt wurde, im Vergleich zu den intramuskulär geimpften Schweinen höhere Antikörpertiter im Serum

(JONES et al., 2005). Bei einer Impfung von 130 Schweinen sowohl gegen *M. hyopneumoniae* als auch gegen SHV-1 ergaben sich keine Unterschiede in der Ausprägung der humoralen Immunantwort zwischen beiden Applikationsmethoden (nadellos, transdermal und Kanüle, intramuskulär) (HOUSER et al., 2004). Unabhängig von der Applikationsmethode kam es bei den vakzinierten Tieren zu einem signifikant höheren Antikörperanstieg im Vergleich zur ungeimpften Kontrollgruppe (HOUSER et al., 2004). Eine Feldstudie in Griechenland zeigte, dass eine intradermale nadellose Impfung gegen *M. hyopneumoniae* gegenüber ungeimpften Tieren sowohl zu einer Reduktion von EP-typischen Läsionen und Pleuritiden am Schlachthof, als auch zu verbesserten Leistungsdaten führte (TASSIS et al., 2012). Die nadellose intradermale Impfstoffapplikation ergab analoge tägliche Gewichtszunahmen und Endmastgewichte im Vergleich zur intramuskulären Impfung mittels Kanüle (TASSIS et al., 2012).

2.1.4. Antigenmenge des Impfstoffes

In einer Erhebung von PANDYA et al. (2012) wurden Rinder mit 1/4 und 1/16 der empfohlenen Antigenmenge (1/4 der Adjuvansmenge) gegen MKS intradermal geimpft. Sieben Tage nach dieser nadellosen Impfstoffapplikation wurde anhand eines Infektionsversuches eine Protektion gegen die klinischen Ausprägungen nachgewiesen (PANDYA et al., 2012). In einer ähnlichen Studie wurden Schweine intradermal mit 1/10 der empfohlenen Impfdosis gegen MKS geimpft (EBLÉ et al., 2009). Die Tiere waren gleichermaßen gegen eine subklinische Virusausscheidung und die generalisierte Form der MKS geschützt wie mit vollständiger Dosis intramuskulär geimpfte Schweine (EBLÉ et al., 2009). In einer weiteren Untersuchung von BERNARDY et al. (2008) wurden Schweine sowohl mit verdünnten als auch mit höher konzentrierten *Actinobacillus pleuropneumoniae* Impfstoffen geimpft. Diese Verdünnungsstufen hatten bei intradermaler Injektion keinen Einfluss auf die Ausbildung der Antikörper im Vergleich zur unverdünnten, intramuskulären Anwendung (BERNARDY et al., 2008). Die intradermale Applikation von einem Drittel der empfohlenen Antigenmenge führte zu weniger Lungenläsionen als eine intramuskuläre Impfung mit Standarddosis (BERNARDY et al., 2008). Insgesamt konnte festgestellt werden, dass eine intradermale Impfung es ermöglicht geringere Antigendosen zu verwenden, um intramuskulären Impfungen ebenbürtige Immunantworten

hervorzurufen (BERNARDY et al., 2008).

Eine intradermale Impfung rief selbst bei Verwendung der Hälfte der intramuskulären Impfdosis gegen *M. hyopneumoniae* und SIV (H1N1 und H3N2) eine, im Verlauf und Ausprägung gleichwertige, humorale Immunantwort hervor (GERGEN et al., 2002). JONES et al. (2005) konnten nachweisen, dass eine intradermale Impfung mit relativ geringem Antigengehalt nach einem Infektionsversuch mit einem virulenten *M. hyopneumoniae* Stamm einen ausreichenden Schutz ergab. Allgemein wird vermutet, dass die vergleichbare Wirkung einer geringeren Antigenmenge bei intradermaler Applikation auf die Immunitätsfunktionen der Haut zurückzuführen sind (MITRAGOTRI, 2005; EBLÉ et al., 2009).

2.1.5. Kreuzkontamination

Laut OTAKE et al. (2002) kann PRRSV von infizierten Tieren über einen mehrfachen Gebrauch von Injektionskanülen auf naive Tiere übertragen werden. In einer Studie von BAKER et al. (2012) wurde die Übertragungsmöglichkeit von PRRSV durch die wiederholte Verwendung von einem nadellosen Injektionsgerät und einer Kanüle eruiert. Hierbei fand eine Übertragung von infizierten zu naiven Tieren über die Verwendung derselben Injektionskanüle statt (BAKER et al., 2012). Jedoch konnte selbst durch den Gebrauch eines nadellosen Impfsystems die Übertragung nicht komplett verhindert werden, wenn auch die Anzahl an seropositiven und PCR positiven Tieren signifikant geringer war wie bei der Übertragung mittels Kanüle (BAKER et al., 2012). Bei einer Übertragungsstudie von *Anaplasma marginale* bei Stieren wurde der Erreger iatrogen über Injektionskanülen übertragen, wobei eine Verschleppung über nadellose Verfahren ausblieb (REINBOLD et al., 2010).

Ein Hepatitis B Ausbruch in der Humanmedizin wurde 1985 auf die Anwendung von einem nadellosen „multi-use-nozzle“-Injektor zurückgeführt (CANTER et al., 1990). HOFFMAN et al. (2001) gehen davon aus, dass nicht nur die Oberfläche der Injektoren sondern auch ihr Leitungssystem verunreinigt werden kann, indem Flüssigkeit am Ende der Applikation, wenn der Druck im Gerät abgesunken ist, zurückschießt.

2.1.6. Schmerzempfindung

Der erste Schritt bei der Perzeption noxischer Signale ist die Aktivierung von

Nozizeptoren (SANN, 2005). Mechano- und polymodale Nozizeptoren der Haut reagieren auf Nadelstiche und bewirken eine Schmerzempfindung der Injektion (SANN, 2005). ARENDT-NIELSEN et al. (2006) belegten, dass der Punktionsschmerz positiv und signifikant mit dem Durchmesser der Kanüle sowie dem Auftreten von Blutungen bei der Punktion korreliert. Nadellose Applikationsverfahren gelten in der Humanmedizin als Alternative zu konventionellen Injektionsverfahren (BENNETT et al., 1998; JIMENEZ et al., 2006) und man erwartet sich eine Steigerung der Akzeptanz von Impfungen, da viele Menschen zusätzlich unter einer Nadel-Phobie leiden (GIUDICE & CAMPBELL, 2006).

In Studien von COOPER et al. (2000) und SOONAWALA et al. (2013) wurde der Punktionsschmerz mit einer Kanüle schmerzhafter bewertet als die Applikation mit einem nadellosen Injektor (COOPER et al., 2000). Zusätzlich war die Schmerzhaftigkeit der Applikationsstelle nach einer konventionellen Injektion signifikant höher (BENNETT et al., 1998; JIMENEZ et al., 2006). Selbst bei einer klinisch stärkeren Ausprägung der lokalen Reaktionen wurde die nadellose Impfung von den Probanden bevorzugt (EPSTEIN et al., 2002). Bei Pferden konnte nach einer intramuskulären, nadellosen Impfstoffapplikation keine Schmerzreaktion nachgewiesen werden (PHILLIPS et al., 2011).

Es gibt jedoch gegenwärtig auch für nadellose Methoden mehrere Berichte über die Schmerzhaftigkeit der Applikation und das Entstehen von lokalen Reaktionen mit Schwellungen, Rötungen und Hämatomen (BAREILLE et al., 1997; JACKSON et al., 2001; DORR et al., 2003). Diese Symptome könnten durch die Penetrationstiefe des Hochgeschwindigkeits-Flüssigkeitsstrahls erklärt werden, da tiefere Injektionen mit einer stärkeren Verletzung der Zellintegrität sowie einer Stimulation von freien Nervenendigungen einhergehen können (MITRAGOTRI, 2006; ARORA et al., 2007). In der Veterinärmedizin rief eine nadellose Applikation von Eisendextran bei drei Tage alten Saugferkeln mit dem Injektionsgerät *Pulse*[®] 250 eine stärkere schmerzbedingte Stressreaktion hervor, als eine Applikation mittels Kanüle (UHL, 2013).

2.1.7. Anwender- und Verbraucherschutz

Versehentliche Selbstinjektionen führen neben einem Gewebetrauma vor allem zu lokalen Hautreaktionen, die durch das injizierte Präparat bedingt sind; zusätzlich

besteht die Gefahr der Übertragung von Infektionserregern (WEESE & JACK, 2008). Eine Umfrage unter 2532 Tierärztinnen ergab, dass 64 % mindestens einmal eine versehentliche Selbstinjektion erlitten, die sich in 50,4 % der Fälle bei Impfstoffapplikationen ereignete wobei in 16,4 % der Injektionen eine unerwünschten Nebenwirkung auftrat (WILKINS & BOWMAN, 1997). Stichverletzungen mittels Kanülen wurden von 71 % der befragten Tierärzthelferinnen angegeben (VAN SOEST & FRITSCHI, 2004). Ähnliche Zahlen ergab auch eine Umfrage unter SchweinetierärztInnen, wobei im Median mehr als zwei Injektionsverletzungen pro Jahr berichtet wurden und dies in 40 % der Fälle bei einer Impfstoffapplikation und in 35 % der Fälle bei einer Antibiotikaverabreichung vorkam (HAFER et al., 1996). In einer weiteren Befragung von 664 TierärztenInnen ergab sich aus 58,9 % Selbstinjektionen mit kontaminierten Kanülen innerhalb von 12 Monaten, dass diese Verletzungen ein großes Problem des Arbeitsschutzes darstellten (LEGGAT et al., 2009). Als Risikofaktoren gelten unter anderem Arbeitsverhältnisse in Klein- und Gemischtpraxen, wenig Erfahrung und lange Arbeitszeiten (LEGGAT et al., 2009).

Gelegentlich werden Fragmente von Kanülen in Schlachttierkörpern und in Fleischprodukten gefunden (FUNK & WAGSTROM, 2012). Dies stellt ein gesundheitliches Risiko für den Endverbraucher dar und wirkt sich nachteilig auf seine Einstellung gegenüber der Fleischindustrie aus (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006; FUNK & WAGSTROM, 2012). In einer Untersuchung von HOFF und SUNDBERG (1999) brachen Hypodermische Kanülen erst wenn gebogene Kanülen wiederverwendet wurden. Die Gefahr von abgebrochenen Kanülen im Schlachtkörper versucht man z.B. mit dem amerikanischen *Pork Quality Assurance Plus (PQA Plus)*-Programm zu minimieren, indem Landwirte eingehend in der Handhabung von Kanülen ausgebildet werden (ANONYMOUS, 2006). In einem Bericht von 2008 wurden bei 2,43 % von 4000 visuell untersuchten Schlachtkörpern von Mastschweinen Schäden festgestellt, die mit einer Injektion in Verbindung gebracht wurden (DANIELS, 2008). Bei 3200 untersuchten Sauen hatten 15,1 % entsprechende Läsionen wobei der Hauptanteil der Schäden sich im Nackenbereich befand (DANIELS, 2008). Zusätzlich gaben 25 % der bestandsbetreuenden Tierärzte an, dass sie bei Zuchttieren nadellose Injektionsverfahren benutzen, im Vergleich zu 8 % bei Mastschweinen zudem

verwendeten 40 % der Tierärzte detektierbare Kanülen (DANIELS, 2008). Die Gefahr von abgebrochenen Kanülen in Fleischprodukten könnte durch diese detektierbaren Kanülen, aber auch durch eine bessere Handhabung und Anwendung von stabileren Kanülen, sowie durch die Verwendung von nadellosen Injektionsmethoden minimiert oder vermieden werden (DU, 2009).

2.2. Wirksamkeit nach intramuskulärer Vakzination mittels Kanüle

Multiple Studien über intramuskulär applizierte *M. hyopneumoniae* Impfstoffe belegen deren Wirkung meist über eine Reduzierung der klinischen Symptome und der Lungenveränderungen oder eine Verbesserung der Leistungsparameter (MAES et al., 1999b; KYRIAKIS et al., 2001; DAWSON et al., 2002; BACCARO et al., 2006; SIBILA et al., 2007). Ein Vergleich von vier verschiedenen Impfstoffen ergab, dass gegenüber den ungeimpften Kontrolltieren bei allen geimpften Tieren signifikant weniger Lungenläsionen nachweisbar waren (THACKER et al., 1998). Auch WILSON et al. (2012) konnten zeigen, dass eine intramuskuläre Impfung in der ersten Lebenswoche zu einer Reduzierung der durch *M. hyopneumoniae* bedingten Lungenläsionen und zu einer Verbesserung der Tageszunahmen führte. Weiterhin hatten die intramuskulär vakzinierten Tiere in einem Infektionsversuch einen geringeren Lungen- und Histopathologiescore, als die Kontrolltiere; die korrespondierenden Ergebnisse der q-PCR belegten eine stärkere bakterielle Last in der Tracheobronchialsputtflüssigkeit der nicht geimpften Tieren (WOOLLEY et al., 2013).

2.3. Lokale Hautreaktion

Nach einer transdermalen Applikation kommt es zu einem Funktionsverlust des Gewebes welcher in Zusammenhang mit Druck- und Scherkräften gebracht werden kann (ARORA et al., 2007). Die Applikation von Injektionspräparaten, ob mit Kanüle oder ohne, führt zur Ausbildung einer Entzündungsreaktion wobei ihr Grad vom Injektionsvolumen und den Eigenschaften des Präparates abhängt (ELICKER & SIPOS, 2009; UHL, 2013). Lokale Hautreaktionen werden makroskopisch anhand der Charakteristika dieser Entzündungsreaktion beurteilt, zu den Kardinalsymptomen zählen Rötung, Erwärmung, Schwellung, Schmerz und Funktionsverlust (BAUMGÄRTNER & SCHMIDT, 2011).

In einer humanmedizinischen Untersuchung rief eine intradermale Applikation

mit oder ohne Kanüle im Vergleich zur intramuskulären Anwendung signifikant häufiger gerötete, juckende und verhärtete lokale Hautreaktionen hervor (NELSON et al., 2013). Angesichts der Injektionsmethode traten bei Kälbern nach nadelloser Impfung signifikant häufiger lokale Hautreaktionen im Vergleich zur Applikation mittels Kanüle auf (REY et al., 2013). Eine Applikation von viskösen Arzneimitteln (wie z.B. Eisendextran und Vitamin-E-Selen) mit dem nadellosen *Pulse*[®] 250 Injektor bei Schweinen führte ebenfalls zu signifikant stärker ausgeprägten lokalen Hautreaktionen als eine Injektion mittels Nadel, dieser Unterschied war jedoch in der histologischen Untersuchung der Entzündungsreaktion nicht nachweisbar (UHL, 2013). Nach nadellosen Impfstoffapplikationen gegen Hepatitis A und B bei Menschen wurde im Vergleich zu Impfungen mittels Kanüle vermehrt über schmerzhafte, geschwollene und gerötete Injektionsstellen berichtet (MATHEÏ et al., 1997; WILLIAMS et al., 2000). Auch in weiteren humanmedizinischen Studien wurde häufiger über Schwellungen und Rötungen nach einer nadellosen Applikationsmethode berichtet, wenngleich eine intradermalen Verabreichung mittels Kanüle eine höhere Schmerzhaftigkeit aufwies (SOONAWALA et al., 2013).

Eine nadellose, transdermale Impfung von Rindern gegen Clostridien führte zu geringeren lokalen Hautreaktionen als eine subkutane Injektion des Impfstoffes (WOOLUMS et al., 2011). Eine nadellose Impfstoffinjektion bei Rindern mit dem *Pulse*[®] 250 induzierte ebenfalls eine geringere Ausprägung der lokalen Hautreaktion als eine Applikation mittels Kanüle (IMSILP et al., 2005). Bei Letzterer wies die makroskopische und histologische Untersuchung der Injektionsstelle auf eine stärkere Entzündungsreaktion hin (IMSILP et al., 2005). Bei einer intradermalen Injektion von verschiedenen humanen Papillomavakzinen rief die Verabreichung mittels Kanüle im Vergleich zur nadellosen Alternative neben einer schmerzhafteren Applikation, zusätzlich eine größere Ausdehnung der Hyperämie der lokalen Reaktion hervor (NELSON et al., 2013). Weitere Parameter der lokalen Hautveränderungen wie Schwellung, Konsistenz und Juckreiz unterschieden sich nicht zwischen den beiden Injektionsmethoden (NELSON et al., 2013).

2.4. Abszesse als Folge von Injektionen

In einer amerikanischen Erhebung von 1992, die alle schweinedichten Regionen

umfasste, wurden in der Schlachthalle bei 13,4 % und im Zerlegebereich bei 11,1 % der Schlachthälften Teilverwerfungen durchgeführt (CANNON et al., 1996). Davon waren 3,9 % in der Schlachthalle sowie 13,5 % in der Zerlegung als Folge von fehlerhaften Injektionen gelistet (CANNON et al., 1996). HOUSER et al. (2004) zeigten in einer Studie an 130 Schweinen, dass nach nadellosen Injektionen von Impfstoffen im Vergleich zu herkömmlichen Injektionsverfahren keine vermehrten Läsionen an Schlachttierkörpern nachweisbar waren. In der letztgenannten Studie wurden im Fall visuell feststellbarer Veränderungen an der Injektionsstelle diese wie auch die tributären Lymphknoten histopathologisch untersucht. Bei jeweils zwei Tieren beider Gruppen wurden lokale Reaktionen nachgewiesen und Abszesse oder Granulome wurden nicht verzeichnet (HOUSER et al., 2004). In Kanada wurden bei vergleichenden Untersuchungen zwischen nadellosen, transdermalen Impfungen und Impfungen mit Injektionskanülen keine vermehrten Läsionen festgestellt, die zu Verwerfungen am Schlachthof führen würden (PAQUIN et al., 2005). Eine weitere Studie untersuchte ebenfalls diese zwei Applikationsmethoden im Hinblick auf das Auftreten von Abszessen in der Nacken- und Schulterregion am Schlachthof; hierbei erhielten die Schweine zwei Impfstoffapplikationen und eine Eiseninjektion (KING et al., 2010). Insgesamt wurden 3134 Schlachttierkörper untersucht, die Inzidenz von Abszessen lag bei 0,53 % und es ergab sich kein Unterschied hinsichtlich des Injektionsverfahrens (KING et al., 2010). Im Gegensatz dazu wurden bei GERLACH et al. (2012) vermehrt Abszesse nach einer nadellosen Applikation nachgewiesen; wenngleich die Inzidenzrate für Abszesse mit 5,6 % insgesamt relativ gering war. Diese kontroversen Ergebnisse beruhen gegebenenfalls darauf, dass in dieser Studie unmittelbar vor der Injektion, die Haut mit einem Inokulum von *Arcanobacterium pyogenes* kontaminiert wurde (GERLACH et al., 2012).

3. Immunologie

3.1. Immunantwort nach einer *M. hyopneumoniae* Infektion

Die Immunität wird unterteilt in die angeborene und erworbene Immunität (MURPHY, 2012b). Eine weitere Kategorisierung wäre jene in eine humorale Immunantwort basierend auf den Immunglobulinen und eine zelluläre Immunantwort, die beide über verschiedene Mechanismen eng miteinander verbunden sind (VAN ALSTINE, 2012). Zu der zellulär-medierten

Immunantwort gehören v.a. natürliche Killerzellen, zytotoxische T-Zellen und aktivierte Makrophagen (VAN ALSTINE, 2012). Diese zellulär-mediierte Immunantwort ist besonders wichtig bei der Kolonisation durch virale Pathogene, zudem scheint sie eine Hauptrolle bei der Abwehr einer *M. hyopneumoniae* Infektion zu spielen (THACKER et al., 2000a; LOWE et al., 2005; FORT et al., 2009; MARTELLI et al., 2009). Nach einer natürlichen Infektion mit *M. hyopneumoniae* wurden vorwiegend Makrophagen im BALT gefunden, zusätzlich konnten T- und B-Lymphozyten, IgA⁺ und IgG⁺ Plasmazellen sowie dendritische Zellen nachgewiesen werden; CD4⁺ Zellen überwiegen im Vergleich zu CD8⁺ Zellen in infizierten Tieren (SARRADELL et al., 2003). Auch REDONDO et al. (2009) fanden heraus, dass im Verlauf der Infektion die Anzahl an CD8⁺ Zellen abfiel und die der CD4⁺ Zellen anstieg; letztere stimulieren die Antikörpersekretion über B-Lymphozyten und aktivieren Makrophagen. In einer Untersuchung von VRANCKX et al. (2012b) trat die höchste Anzahl an Makrophagen im BALT vier Wochen nach der Infektion mit einem hochvirulentem *M. hyopneumoniae* Stamm auf.

M. hyopneumoniae Antigene werden durch antigenpräsentierende Zellen wie z.B. Makrophagen mit Hilfe von TLR2/TLR6 Rezeptoren erkannt (MUNETTA et al., 2003). Es konnte nachgewiesen werden, dass einer Blockierung dieser Rezeptoren eine Reduzierung der Sekretion von TNF- α durch alveoläre Makrophagen bewirkte (MUNETTA et al., 2003). Makrophagen produzierten nach Kontakt mit *M. hyopneumoniae* neben TNF- α auch andere Zytokine, wie Interleukin (IL)-1 bzw. IL-1 β und IL-6 (RODRÍGUEZ et al., 2004; CHOI et al., 2006; DAMTE et al., 2011), welche eine zentrale Rolle in der Initiierung der Entzündungsreaktion einnehmen, eine lymphoretikuläre Hyperplasie des BALT hervorrufen und in Zusammenhang mit Lungenläsionen stehen (RODRÍGUEZ et al., 2004; CHOI et al., 2006). ASAI et al. (1994) belegten, dass im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren oder Tieren ohne Läsionen IL-6 in der BAL-Flüssigkeit von Tieren mit makroskopischen Lungenläsionen u./o. einer Hyperplasie vom lymphatischen Gewebe signifikant erhöht war. CHOI et al. (2006) konnten zeigen, dass die Zytokinexpression in nicht infizierten Tieren oder in Tieren ohne Lungenläsionen minimal war. Insgesamt wurden nach experimenteller und natürlicher *M. hyopneumoniae* Infektion höhere Konzentrationen der Zytokine IL-1- α und - β , IL-2, -4, -6, -8, -10, -12 und TNF- α und IFN- γ im bronchoalveolären Exsudat, im

BALT und den mononukleären Zellen der Alveolarsepten nachgewiesen (RODRÍGUEZ et al., 2004; LORENZO et al., 2006; RODRÍGUEZ et al., 2007; REDONDO et al., 2009). Ein hochvirulenter *M. hyopneumoniae* Stamm induziert tendenziell höhere Konzentrationen an IL-1 β und TNF- α in der BAL-Flüssigkeit und eine größere Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe als ein niedrig virulenter Stamm (MEYNS et al., 2007). Auch bei einer Koinfektion mit PRRSV konnte in *in vitro* und *in vivo* Studien gezeigt werden, dass die Alveolarmakrophagen vermehrt IL-1, IL-8, IL-10, IL-12 und TNF- α sezernierten (THANAWONGNUWECH et al., 2004).

IL-1 wird sowohl von Epithelzellen als auch von Makrophagen gebildet und bewirkt neben Fieber eine Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen (SCHREIBER, 2012). IL-4 wird von Mastzellen und T-Zellen gebildet und vermittelt eine Differenzierung von CD4 T-Zellen in Th2-Zellen und eine Aktivierung von B-Zellen (SCHREIBER, 2012). IL-10 wird von Monozyten gebildet und wirkt dagegen suppressiv auf die Makrophagenfunktion (SCHREIBER, 2012). IL-12, welches von Makrophagen sezerniert wird, induziert die Differenzierung von CD4 T-Zellen zu Th1-Zellen und aktiviert natürliche Killerzellen (SCHREIBER, 2012). Somit sind einige dieser Botenstoffe Aktivatoren von CD4 T-Helferzellen und stimulieren sowohl die zelluläre Immunantwort über die Aktivierung von Makrophagen (Th1-Antwort), als auch die humorale Kaskade der Immunantwort über die Interaktion mit B-Zellen und die daraus resultierende Produktion von Immunglobulinen (Th1- und Th2-Antwort) (MURPHY, 2012a).

Im Hinblick auf die humorale Immunantwort konnte hingegen keine Relation zwischen der Höhe der gemessenen Antikörpertiter im Serum und der Schutzwirkung einer Impfung nach Infektion gefunden werden (DJORDJEVIC et al., 1997; THACKER et al., 1998; VRANCKX et al., 2012b). Im Gegensatz dazu spielt vermutlich die lokale humorale Immunität eine wichtige Rolle während der Infektion, da es zu einem signifikanten Anstieg von IgA⁺ und IgG⁺ Lymphozyten und Plasmazellen im BALT, in den Bronchienwänden und den Alveolarsepten kommt (SARRADELL et al., 2003).

3.2. Immunantwort nach einer Vakzination

3.2.1. Intramuskuläre Impfstoffapplikation

Die exakten protektiven Mechanismen einer Vakzination gegen *M. hyopneumoniae* sind noch nicht völlig verstanden, man geht davon aus, dass vorwiegend lokale mukosale Antikörper und die zelluläre Immunität beteiligt sind (THACKER et al., 2000a). Nach einer Infektion mit einem hochvirulenten *M. hyopneumoniae* Stamm war die Anzahl an Makrophagen im BALT von ungeimpften Schweinen signifikant höher als die von geimpften Tieren (VRANCKX et al., 2012b). Weitere Untersuchungen belegten eine signifikante Reduktion der Erregerlast sowie der Makrophagen, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten in der BAL-Flüssigkeit geimpfter Schweine im Vergleich zu ungeimpften Kontrolltieren (OKADA et al., 2000). Einerseits kam es zu einer Verringerung der B-Lymphozyten im Lungengewebe nach intramuskulärer Impfung, was auf eine Hemmung der Lymphozytenproliferation durch die Vakzination schließen lässt (THACKER et al., 2000a). Andererseits war im Blut die Anzahl an IFN- γ produzierenden Lymphozyten erhöht, dies könnte belegen, dass die Impfung zur Aktivierung von Makrophagen und der zellulären Immunität beiträgt (THACKER et al., 2000a). Der Botenstoff TNF- α war nur in der BAL-Flüssigkeit von ungeimpften, infizierten Tieren erhöht; eine Impfung könnte somit vor einer durch TNF- α hervorgerufenen Entzündungsreaktion schützen (THACKER et al., 2000a). Einen vermeintlich regulatorischen Effekt einer intramuskulären Impfung auf die Zytokinexpression konnte nachgewiesen werden, da die höchsten Konzentrationen an Il-1 β und Il-6 in der BALF von ungeimpften Tieren gefunden wurden (THACKER et al., 2000a). Eine Untersuchung von MARCHIORO et al. (2013) konnte die niedrigen Werte von TNF- α in geimpften Tieren nicht bestätigen, jedoch wurden höhere Gehalte an Il-10 und Il-12 in bronchialen Lymphknoten bei vakzinierten Tieren gefunden. In einer weiteren Untersuchung wurden 21 Tage nach einem Infektionsversuch wiederum höhere Konzentrationen an TNF- α , Il-1 und -6 sowie eine stärkere Aktivität von Plasmin in der Tracheobronchialflüssigkeit von ungeimpften- im Vergleich zu geimpften Schweinen nachgewiesen (WOOLLEY et al., 2013). Diese Ergebnisse gingen mit einem vermindertem Hustenindex und einem geringerem Pathologiescore der geimpften Tiere einher (WOOLLEY et al., 2013). Die mukosale humorale Immunität konnte durch eine Impfung verbessert werden,

indem es zu einem größeren Anstieg der *M. hyopneumoniae* spezifischen IgA- und IgG-Antikörper in der BAL-Flüssigkeit im Vergleich zur ungeimpften Kontrollgruppe kam (OKADA et al., 2000; THACKER et al., 2000a; MARCHIORO et al., 2013). Die systemische humorale Immunitätsausbildung wurde durch höhere Konzentrationen von spezifischen IgG-Antikörpern im Serum vakzinierter Tiere belegt (THACKER et al., 2000a; VRANCKX et al., 2012a; MARCHIORO et al., 2013).

In Infektionsstudien konnte der Grad der Lungenläsionen durch eine Impfung reduziert werden, wobei dieses klinische Phänomen dafür spricht, dass die gemessenen Veränderungen der mukosalen Antikörper und der zellulären Immunität sowie die einhergehende Beeinflussung der Entzündungsreaktion wichtig für die Kontrolle der durch *M. hyopneumoniae* bedingten Pneumonie sind (OKADA et al., 2000; THACKER et al., 2000a).

3.2.2. Intradermale Impfstoffapplikation

Eine intramuskuläre Impfung involviert nicht die antigenpräsentierenden Zellen der Haut wie die Langerhans- und die dermalen dendritischen Zellen (COMBADIÈRE & LIARD, 2011). Die sich in der Epidermis befindenden Langerhans-Zellen, sind ein Typ von unreifen dendritischen Zellen (MURPHY, 2012a). Sie können Antigene phagozytieren oder nach der Antigenaufnahmen zum regionalen Lymphknoten migrieren, wo sie sich zu gereiften dendritischen Zellen differenzieren, die sowohl naive CD4 als auch CD8 T-Zellen aktivieren (MURPHY, 2012a).

Eine intradermale Vakzination gegen PRRSV konnte eine mit der intramuskulären Impfung vergleichbare zelluläre Immunantwort mit teilweise höheren Anteilen an natürlichen Killerzellen und PRRSV-spezifischen IFN- γ produzierenden Zellen auslösen (MARTELLI et al., 2009). Nach der intradermalen Impfung kam es zu einem vergleichbaren, bisweilen stärkeren Anstieg von CD8⁺ T-Lymphozyten sowie zu einem Absinken der CD4⁺CD8⁻ T-Helfer Zellen bis drei Wochen nach der Vakzination (BORGHETTI et al., 2003; MARTELLI et al., 2007). Dieses Absinken an CD4⁺CD8⁻ T-Helfer Zellen könnte durch eine chemotaktische Verlagerung dieser Zellen in die lymphatischen Gewebe erklärt werden, wobei der Anstieg an CD8⁺ Zellen eine frühe immunologische Aktivierung durch die Impfung widerspiegelt (BORGHETTI et

al., 2003; MARTELLI et al., 2007). In einer Studie von FERRARI et al. (2011) wurden Ferkel mittels IDAL Gerät gegen SHV-1 geimpft. Diese Impfung rief eine zur intramuskulären Applikation vergleichbare Menge an virusneutralisierenden Antikörpern, an INF- γ sekretierenden Zellen und an natürlichen Killerzellen hervor (FERRARI et al., 2011). Zwei Wochen nach der Boosterimpfung war die Anzahl an CD8 β^+ Zellen im Blut, die hauptsächlich zytotoxische T-Zellen darstellen, bei den intradermal geimpften Tieren signifikant höher als bei den intramuskulär geimpften Ferkeln (FERRARI et al., 2011). Bei einer weiteren intradermalen Impfung gegen das SHV-1 wurde eine der intramuskulären Impfung vergleichbare Stimulation der spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort festgestellt. Es konnte ebenfalls ein signifikant stärkerer Anstieg der peripheren, zytotoxischen T-Lymphozyten nach intradermaler Applikation nachgewiesen werden (GOZIO et al., 2006). Eine intradermale Impfung konnte auch bei Ferkeln, welche noch virusneutralisierende, maternale Antikörper gegen SHV-1 zum Zeitpunkt der Impfung besaßen, eine starke humorale und zelluläre Immunantwort hervorrufen (FERRARI et al., 2011). Diese war der Immunantwort nach intramuskulärer Vakzination gleichwertig (FERRARI et al., 2011). In einer Untersuchung von NECHVATALOVA et al. (2012) konnten Ferkel selbst bei hohen maternalen Antikörpertitern nach intradermaler Impfung eine zell-mediierte Immunantwort gegen ein Versuchsantigen, das Keyhole Limpet Hemocyanin, ausbilden.

MARTELLI et al. (2014) verglichen drei verschiedene *M. hyopneumoniae* Impfstoffe und deren Applikation in Bezug auf die systemische und lokale Immunitätsausbildung. Die Konzentrationen an IgM- und IgG-Antikörpern in der BALF unterschieden sich nicht zwischen den verschiedenen Studiengruppen; wohingegen die IgA-Antikörpertiter acht Wochen nach der Impfung in der intradermal geimpften, sowie in einer der beiden intramuskulär geimpften Gruppen signifikant höher waren als in der ungeimpften und der zweiten intramuskulär geimpften Gruppe (MARTELLI et al., 2014). Diese spezifischen und lokalen IgA-Antikörper könnten eine Schlüsselfunktion in der Prävention der Adhäsion des Mikroorganismus an das Epithel des Atmungstraktes einnehmen (MARTELLI et al., 2014). Zusätzlich wurde die mukosale Immunität anhand der Genexpression von Zytokinen in der BALF beurteilt. Es gab keinen Unterschied in der Expression von IFN- γ , TNF- α und IL-6 während in der intradermal

geimpften Gruppe die Interleukin-10 Expression acht Wochen nach der Impfung signifikant höher war (MARTELLI et al., 2014). Dies könnte einhergehen mit einer positiven Th2-medierten Immunantwort, die wiederum die IgA-Sekretion stimulieren würde (MARTELLI et al., 2014). Zusätzlich kann dieser Anstieg von IL-10 einem Inhibitor der Makrophagenaktivität (SCHREIBER, 2012), auch auf einen protektiven Effekt der Impfung auf die Gewebeläsionen, die durch eine exzessive Produktion von inflammatorischen Zytokinen bedingt sind, hindeuten (MARTELLI et al., 2014). Hinsichtlich der systemischen, zellulären Immunität wurde in ihrer Untersuchung die Anzahl an *M. hyopneumoniae* spezifischen IFN- γ sezernierenden Zellen, der mononukleären Zellen des peripheren Blutes, eruiert. Sowohl intradermal geimpfte Tiere, als auch eine intramuskulär geimpfte Gruppe zeigten einen signifikant höheren Gehalt an IFN- γ sezernierenden Zellen im Vergleich mit der ungeimpften Kontrollgruppe und der zweiten intramuskulären Impfgruppe (MARTELLI et al., 2014). Beide Impfstoffe bewirkten somit eine Th1-spezifische Immunantwort (MARTELLI et al., 2014).

In Untersuchungen von MARTELLI et al. (2014) konnte die intradermale Impfung eine systemische humorale und zelluläre, wie auch eine lokale humorale Immunantwort auslösen. Diese lokale, humorale Immunitätsausbildung konnten auch JONES et al. (2005) durch höhere IgA- und IgG-Antikörpertiter in der BALF von intradermal geimpften im Vergleich zu nicht-vakzinierten Tieren hervorheben.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Anzeige eines Tierversuchsvorhabens

Am 6. Juni 2013 wurde die Anzeige des Tierversuchsvorhabens „Vergleichende Untersuchung des intradermal per IDAL Gerät applizierten Impfstoffes Porcilis® M Hyo ID ONCE mit dem intramuskulär verabreichten Impfstoff M+PAC® in Bezug auf die lokale, sowie die systemische Verträglichkeit und Wirksamkeit unter Feldbedingungen in Deutschland“ mit dem Zeichen 7221.3-2.1-018/13 vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt.

2. Ziel der Untersuchung

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Sicherheit und Wirksamkeit des intradermal applizierten *Mycoplasma hyopneumoniae* Impfstoffes Porcilis® M Hyo ID ONCE (Intervet Deutschland GmbH, ein Unternehmen der MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim) bei Ferkeln in der dritten Lebenswoche unter den in Deutschland üblichen Produktionsbedingungen zu untersuchen. Eine mit Porcilis® M Hyo ID ONCE geimpfte Gruppe wurde mit einer weiteren, Impfgruppe, die intramuskulär die *M. hyopneumoniae* Vakzine M+PAC® (Intervet Deutschland GmbH, ein Unternehmen der MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim) erhielt, verglichen. Zusätzlich wurde jeder Vakzinegruppe eine dazugehörige ungeimpfte Kontrollgruppe, welche das Placebo Diluvac® Forte (Intervet Deutschland GmbH, ein Unternehmen der MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim) erhielt, gegenübergestellt.

Der Impfstoff Porcilis® M Hyo ID ONCE wurde mit dem IDAL (*Intra Dermal Application of Liquids*) Gerät intradermal appliziert. Bei den M+PAC® geimpften Tieren wurde die Applikation mit einer Kanüle intramuskulär vorgenommen. Als Sicherheitsparameter wurde eine klinische Untersuchung durchgeführt und die lokale Hautreaktion an der Injektionsstelle sowie die Rektaltemperatur ermittelt und bewertet. Die Überprüfung der Wirksamkeit wurde über die Gewichtsentwicklung der Tiere, die Mastdauer und die Lungenbefunde am Schlachthof sichergestellt. Zusätzlich wurde der Verlauf der Antikörpertiter im Serum analysiert, ein direkter Erregernachweis aus Lungengewebsproben

durchgeführt und die Mortalität erhoben.

3. Versuchsbetrieb und -tiere

Der Versuchsbetrieb befindet sich an zwei Standorten in Mecklenburg-Vorpommern. Ein Ferkelerzeuger mit einem angeschlossenen Flatdeck, sowie einer 5 km entfernten Mastanlage mit 7860 Plätzen. Der geschlossene Betrieb hält 1000 Zuchtsauen in einem 1-Wochen-Rhythmus mit 4350 Aufzuchtplätzen. Die Sauen werden gegen Parvovirose, Rotlauf (Parvoruvac[®], Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland), PCV2 (Ingelvac CircoFLEX[®], Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) und E. coli (Gletvax[®] 6, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) geimpft. Die Ferkel werden am 14. Lebenstag gegen Porcines Circovirus Typ 2 (Ingelvac CircoFLEX[®], Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) geimpft. Insgesamt wurden 420 Saugferkel in der dritten Lebenswoche in die Studie eingeschlossen. In der vierten Lebenswoche wurden die Tiere ins gereinigte und desinfizierte Flatdeck umgestallt. Nach sieben Wochen im Flatdeck wurden die Tiere in die Mastanlage verbracht. Alle Tiere wurden im Flatdeck zehn Tage mit aniMedica[®] Enteroxid N (aniMedica GmbH, Senden-Bösensell, Deutschland) über das Futter behandelt. Zudem wurde im Mastbereich eine Bestandsbehandlung mit Pulmodox[®] (Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe, Deutschland) über fünf Tage durchgeführt.

4. Vakzine, Vakzination und Placebo

Für diese Feldstudie wurden zwei bereits für die Anwendung ab dem 21. Lebenstag zugelassene Impfstoffe verwendet. Beide stammen von der Firma Intervet Deutschland GmbH, ein Unternehmen der MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim, Deutschland. Einerseits der Inaktivimpfstoff Porcilis[®] M Hyo ID ONCE, der nadellos mit dem IDAL Vakzinators intradermal appliziert wurde, andererseits der Inaktivimpfstoff M+PAC[®] der intramuskulär mittels Kanüle geimpft wurde. Als Placebo wurde Diluvac[®] Forte derselben Firma benutzt, eine Emulsion auf Basis von dl- α -Tocopherolacetat die je nach Gruppe intradermal, nadellos als auch intramuskulär mittels Kanüle appliziert wurde. Als Applikationsstelle diente für alle Studientiere die rechte, seitliche Halsregion am Ohrgrund, am Übergang von unbehaarter zu behaarter Haut.

Eine Dosis des Impfstoffes Porcilis[®] M Hyo ID ONCE besteht aus 0,2 ml. Sie enthält ein inaktiviertes Ganzzellkonzentrat vom *M. hyopneumoniae* Stamm 11 und als Adjuvanzien 34,6 mg dünnflüssiges Paraffin, sowie dl- α -Tocopherolacetat zu 2,5 mg. Bei dem Impfstoff M+PAC[®] besteht eine Dosis aus 2 ml einer weißlichen Emulsion. Diese enthält neben dem inaktivierten *M. hyopneumoniae* J-Stamm, als Adjuvanzien 0,268 ml dünnflüssiges Mineralöl sowie 2,0 mg Aluminiumhydroxid. Des Weiteren beinhaltet der Impfstoff als Konservierungsmittel 0,20 mg Thiomersal pro 2 ml Impfeinheit.

Der IDAL Vakzinator (*Intra Dermal Application of Liquids*, Intervet Deutschland GmbH, ein Unternehmen der MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim, Deutschland) appliziert 0,2 ml der Flüssigkeit mit einer Geschwindigkeit von 80-130 m/s in die Haut. Bei der intramuskulären Applikation wurden je 2 ml der Vakzine beziehungsweise des Placebos mittels sterilen 0,8 x 25 mm großen Einmalkanülen (Sterican[®], Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz) und Impfpistolen (Intervet Deutschland, Unternehmen der MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim, Deutschland) verabreicht. Diese Impfpistolen ermöglichten eine exakte Dosierung des Injektionspräparates. Um den üblichen Produktionsbedingungen gerecht zu werden, wurden die Einmalkanülen nach jedem Wurf gewechselt.

5. Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau

In die Studie wurden 420 klinisch gesunde Saugferkel im Alter von 21 (+3) Tagen eingeschlossen. Impffähige Ferkel wurden gewogen und bekamen eine grüne, fortlaufend nummerierte Ohrmarke (MS[®] Tag rund, MS Schippers GmbH, Kerken, Deutschland) eingezeichnet. Mit Hilfe einer Randomisierungsliste wurden die Tiere nach Gewicht und Geschlecht gleichmäßig auf die vier Impfgruppen verteilt (Tabelle 1). Zusätzlich wurden durch diesen Randomisierungsplan 20 % der Studientiere aus den vier Gruppen in eine Safety-Gruppe eingeteilt. Bei diesen 84 Tieren wurde die zuvor eingezeichnete Ohrmarke durch eine rosafarbige Ohrmarke ersetzt. Die Safety-Gruppe diente zur Erhebung der Sicherheitsparameter sowie der serologischen und molekularbiologischen Untersuchungen. Die Studie war nach dem „masked observer“-Verfahren verblindet. Die Randomisierung und Impfung wurde durch Klinikmitarbeiter durchgeführt, die anschließend keine weiteren Daten erhoben.

Tabelle 1 - Einteilung der Tiere in die vier Studiengruppen

Studiengruppe	Applikation
M Hyo ID ONCE, n=138	0,2 ml Porcilis [®] M Hyo ID ONCE (IDAL), i.d., nadellos
Kontrolle i.d., n=70	0,2 ml Diluvac [®] Forte (IDAL), i.d., nadellos
M+PAC [®] , n=144	2 ml M+PAC [®] , i.m., mit Kanüle
Kontrolle i.m., n=68	2 ml Diluvac [®] Forte, i.m., mit Kanüle

6. Klinische Untersuchungen

Die klinischen Untersuchungen wurden an den 84 Tieren der Safety-Gruppe durchgeführt. Die Tabelle 2 zeigt ihre Aufteilung in die verschiedenen Studiengruppen.

Tabelle 2 - Verteilung der Safety-Tiere auf die vier Studiengruppen

Studiengruppe	Applikation
M Hyo ID ONCE, n=28	0,2 ml Porcilis [®] M Hyo ID ONCE (IDAL), i.d., nadellos
Kontrolle i.d., n=13	0,2 ml Diluvac [®] Forte (IDAL), i.d., nadellos
M+PAC [®] , n=30	2 ml M+PAC [®] , i.m., mit Kanüle
Kontrolle i.m., n=13	2 ml Diluvac [®] Forte, i.m., mit Kanüle

6.1. Klinische Untersuchung

Bei den 20 % der Tiere, die zur Safety-Gruppe zählten, wurde 30 bis 60 Minuten nach der Applikation, sowie anschließend sieben Tage lang, einmal täglich eine klinische Untersuchung durchgeführt. Das Allgemeinbefinden sowie das Vorhandensein von Appetit, Niesen, Husten und Atemnot wurden dokumentiert. Der Schweregrad der Veränderungen wurde anhand des Scores der Tabelle 3 beurteilt. Bei der täglichen Bewertung konnten maximal neun Scorepunkte erreicht werden.

Tabelle 3 - Score der klinischen Untersuchung

Parameter	Schweregrad	Score
Allgemeinbefinden	ungestört	0
	reduziert	1
	somnolent	2
	apathisch	3
Niesen	nicht vorhanden	0
	vorhanden	1
Husten	nicht vorhanden	0
	vorhanden	1
Atemnot	keine Veränderung	0
	leichte Dyspnoe	1
	mäßige Dyspnoe	2
	starke Dyspnoe	3
Appetit	erhalten	0
	keine Futteraufnahme	1

6.2. Lokale Hautreaktion an der Applikationsstelle

Bei den Ferkeln der Safety-Gruppe wurde die Applikationsstelle 30 bis 60 Minuten nach der Injektion der Testsubstanzen auf sichtbare u./ o. tastbare Hautreaktionen untersucht. Diese Untersuchung wurde an den folgenden sieben Tagen einmal täglich wiederholt. Neben der Ausdehnung der Veränderungen wurden auch die Konsistenz und das Auftreten von vermehrter Wärme u./ o. Rötung beurteilt. Die Beurteilung und Quantifizierung der Veränderungen erfolgte nach dem Score der folgenden drei Tabellen (Tabelle 4, Tabelle 5, Tabelle 6). Bei der täglichen Bewertung konnten maximal acht Scorepunkte erreicht werden.

Tabelle 4 bis Tabelle 6 - Lokaler Hautreaktionscore der Applikationsstelle**Tabelle 4 - Scorepunkte lokale Reaktion, Durchmesser**

Score	Durchmesser (cm)
0	0
1	> 0 - 0,5
2	> 0,5 - 1
3	> 1 - 1,5
4	> 1,5

Tabelle 5 - Scorepunkte lokale Reaktion, Konsistenz

Score	Konsistenz
0	keine Reaktion
1	weich
2	kompakt
3	hart

Tabelle 6 - Scorepunkte lokale Reaktion, Entzündungszeichen

Score	Entzündungszeichen
0	nicht warm und gerötet
1	warm und/ oder gerötet

6.3. Innere Körpertemperatur

Bei den 84 Tieren der Safety-Gruppe wurde sowohl vor als auch im Zeitraum von 30 bis 60 Minuten nach der Injektion und an den darauffolgenden vier Tagen jeweils einmal täglich die innere Körpertemperatur gemessen. Diese Messung erfolgte rektal mittels eines digitalen Thermometers der Firma SCALA Electronic GmbH, Stahnsdorf, Deutschland.

7. Blutprobenentnahme

Bei den Tieren der Safety-Gruppe erfolgten regelmäßige Blutentnahmen. Die Erste fand vor der Applikation der Testsubstanzen statt. Weitere Blutentnahmen folgten vier und zwölf Wochen nach dem Studieneinschluss. An Tag 145, am Ende der Mastperiode, erfolgte die letzte Blutentnahme. Bei den ersten drei Terminen wurden 0,80 x 40 mm große sterile Einmalkanülen (Sterican[®], Braun

Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz) benutzt, später dann 1,10 x 50 mm große Kanülen der gleichen Firma. Bei den Saugferkeln wurde die *Vena cava cranialis* punktiert, später wurde das Blut aus der *Vena jugularis externa* gewonnen. Die Blutproben wurden zentrifugiert und das Serum auf zwei Röhrchen (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 2,0 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verteilt und bei -22 °C bis zur serologischen Diagnostik tiefgefroren.

8. Serologie

Die gewonnenen Blutproben wurden im Labor der Klinik für Schweine in Oberschleißheim untersucht. Ziel war es, die Serokonversion nach der Vakzination beziehungsweise nach einer etwaigen Feldinfektion zu bestimmen. Zur Auswertung wurde der IDEXX® ELISA *M. hyopneumoniae* Ab Monoblocking (IDEXX® Laboratories Inc. One IDEXX Drive Westbrook, Maine U.S.A.) verwendet. Es handelt sich hierbei um einen indirekten ELISA zur quantitativen Erfassung von *M. hyopneumoniae* Antikörpern. Die im Serum enthaltenen Antikörper binden sich an Antigene, welche auf der Mikrotiterplatte fixiert sind. An diese nun angehefteten Antikörper binden sich Spezies-spezifische Antikörper, die mit einem Enzym gekoppelt sind. Zwischen den verschiedenen Schritten werden die ungebundenen Antikörper durch mehrere Waschvorgänge herausgewaschen. Durch Zugabe von TMB-Substrat als Enzymsubstrat entsteht eine Farbreaktion die anschließend gemessen wird. Die Intensität der entstandenen Farbreaktion ist direkt proportional zur Menge der Antikörper in der Probe. Der ELISA wurde mit dem Thunder Bolt™ (Goldstandard Diagnostics U.S.A.) Vollautomaten gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Dieser Pipetierautomat führt alle Waschschrte durch, misst die Intensität der gegebenenfalls entstehenden Farbreaktion und errechnet dann basierend auf nachfolgender Formel automatisch die Ergebnisse.

$$\frac{P}{PK} = \frac{P(630) - NK\bar{x}}{PK\bar{x} - NK\bar{x}}$$

Eine Probe gilt als positiv, wenn das Verhältnis Probe zur Positivkontrolle (P/PK) über 0,4 liegt. Diese Grenze bezeichnet man als Cut-off Wert.

9. Gewichtsentwicklung

Das Gewicht der Tiere wurde im Verlauf der Studie mehrfach erhoben. Am Einschlusstag (Tag 0) fand die erste Wiegung der Saugferkel statt. Sie wurden mit einer Plateauwaage (MS Wiegeplateau, Schippers GmbH, Kerken, Deutschland) gewogen. Bei den anschließenden Wiegungen an Studientag T 55 (Mastbeginn) und an Studientag T 145 (Mastende) wurde eine mobile digitale Selektionswaage (Mobile Einzeltierwaage, Meier-Brakenberg GmbH & Co. KG, Extertal, Deutschland) verwendet.

10. Lungenbefunde am Schlachthof

Insgesamt wurden die Studientiere an drei Terminen in Abhängigkeit des gewünschten Schlachtgewichtes von ca. 115 – 120 kg geschlachtet. Der erste Termin fand am Studientag T 146 statt, der letzte drei Wochen später am Studientag T 167. Eine individuelle Zuordnung der Geschlinge gelang anhand der Studienohrmarken. Die Geschlinge wurden am Schlachtband in Anlehnung an den Lungenscore nach CHRISTENSEN et al. (1999) untersucht. Hierfür wurde der dreidimensionale Umfang der EP-typischen Veränderungen mittels Prozentangaben zwischen 0 % und 100 % bewertet. Jeder einzelne Lungenlappen (*Lobus (L.) cranialis sinister*, *L. medialis sinister*, *L. caudalis sinister*, *L. cranialis dexter*, *L. medialis dexter*, *L. caudalis dexter*, *L. accessorius*) wurde entsprechend visuell und palpatorisch untersucht. Die Prozentangaben der Lungenläsionen der einzelnen Lungenlappen wurden durch folgende Formel zu einem Gesamtscore zusammengefasst: $(0,05 \times L. \textit{cranialis sinister}) + (0,05 \times L. \textit{medialis sinister}) + (0,30 \times L. \textit{caudalis sinister}) + (0,10 \times L. \textit{cranialis dexter}) + (0,10 \times L. \textit{medialis dexter}) + (0,35 \times L. \textit{caudalis dexter}) + (0,05 \times L. \textit{accessorius})$. Dieser errechnete Lungenscore gibt den prozentualen Anteil des makroskopisch veränderten Lungengewebes am gesamten Lungengewebe wider.

11. Molekularbiologische Diagnostik

Am Schlachthof wurden von 75 Tieren der Safety-Gruppe Lungenproben gewonnen und zur weiteren molekularbiologischen Untersuchung an die Klinik für Schweine im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, der Justus-Liebig-Universität Giessen, gesendet. Jeweils 20 - 50 mg Lungengewebe wurde zur DNA Extraktion verwendet, welche mit dem Testkit INSTANT Virus

RNA Kit (Analytik Jena AG, Deutschland) durchgeführt wurde. Anschließend wurde 2,5 µl extrahierte DNA für die q-PCR nach STRAIT et al. (2008), welche auf den Primern Mhp183F, Mhp183R und der Sonde Mhp183P basiert, benutzt. Dieser direkte Nachweis von *M. hyopneumoniae* spezifischer Genomfragmente wurde mit Hilfe eines 7300 real-time PCR Systems (Applied Biosystems, Deutschland) mit folgendem Temperaturprotokoll: DNA Polymerase Aktivierung bei 95°C für 15 min mit anschließend 40 Zyklen mit einer Denaturierung bei 95°C für 15 sek und einer Annealing und Extensionsphase von 60 sek bei 60°C, durchgeführt (HILLEN et al., 2014).

12. Mortalität

Während der Studie verendet aufgefundene sowie aus Tierschutzgründen getötete Studientiere wurden notiert.

13. Statistik

Die Datenauswertung und die Diagrammerstellung wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel (Microsoft Office 2010) und der Statistiksoftware SPSS 20.0 (IBM[®] SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Jedes Einzeltier war eine Statistische Einheit. Von quantitativen Werten wurde das arithmetische Mittel, der Median, die Standardabweichung, die Varianz, das Minimum und das Maximum berechnet. Die Prüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors. Das Signifikanzniveau lag bei 5 % mit einem Konfidenzintervall von 95 %. Die Nullhypothese basierte darauf, dass kein Unterschied zwischen den Studiengruppen innerhalb der untersuchten Parameter besteht.

Ein statistisches Gutachten galt als Grundlage für die Berechnung der Tierzahlen der einzelnen Versuchsgruppen. Für die Wirksamkeitsanalyse des Impfstoffes Porcilis[®] M Hyo ID ONCE wurden die Lungenläsionen, die Gewichtsentwicklung und zusätzlich die Ergebnisse der serologischen und molekularbiologischen Untersuchungen als abhängige Variablen benutzt. Die Sicherheitsbeurteilung basierte auf der Analyse der Allgemeinuntersuchung, der lokalen Hautreaktion sowie der Ergebnisse der rektalen Körpertemperatur und Mortalität.

Die Mittelwerte der errechneten Lungenscores der drei Studiengruppen wurden

anhand des Mann-Whitney-U-Tests miteinander verglichen. Für jede Studiengruppe wurde die Häufigkeitsverteilung der Lungenscores für die unterschiedlichen Kategorien, 0 %, >0 %-5 %, >5 %-10 %, >10 %-20 % und >20 %-100 % anhand des Chi-Quadrat-Test ermittelt und untereinander verglichen. Zudem wurde die Häufigkeitsverteilung der aufgetretenen Pleuritiden mit Hilfe dieses Tests bewertet. Der Vergleich der Häufigkeitsverteilung der Studiengruppen zu den drei Schlachterminen wurde ebenfalls anhand des Chi-Quadrat-Test berechnet und die Mittelwerte der Mastdauer wurden mittels Mann-Whitney-U-Test gegenübergestellt. Die mittleren Endmastgewichte der Tiere des ersten Schlachtermins waren nicht normalverteilt und wurden anhand des Kruskal-Wallis-Test miteinander verglichen.

Der Vergleich der Mittelwerte der drei Studiengruppen der normalverteilten Gewichts- und Mastleistungsdaten wurde anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA berechnet. Weiterhin wurden Post-hoc-Mehrfachvergleiche (Bonferroni) für den paarweisen Vergleich zwischen den Gruppenmittelwerten benutzt; hierbei handelt es sich um T-Tests mit einer Anpassung des Signifikanzniveaus an Mehrfachvergleiche. Für die nicht-normalverteilten Daten der serologischen- und molekularbiologischen Untersuchungen wurde die Häufigkeitsverteilung positiver Tiere mit Hilfe des Chi-Quadrat Tests berechnet und die Mittelwerte der Antikörpertiter und der Erregermenge der drei Studiengruppen mit Hilfe des Mann-Whitney-U Test verglichen.

Insgesamt wurden bei den genannten Parametern die beiden Vakzinegruppen untereinander sowie jeweils mit der Placebogruppe verglichen. Wegen diesen drei Paarvergleichen wurde eine Korrektur der Signifikanzniveaus nach Bonferroni-Holm angewendet. Diese lagen somit bei 1,7 %, 2,5 % und 5 %.

Für die Sicherheitsparameter wurden die Gruppenvergleiche der Mittelwerte der beiden Scores der klinischen Untersuchung und der Lokalreaktion zwischen den verschiedenen Injektionsmethoden- und Präparaten, mit Hilfe des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Testverfahrens durchgeführt. Bei errechneter Signifikanz wurden anschließend die Gruppen paarweise mit Hilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test verglichen. Da es sich um mehrere aufeinander basierende Paarvergleiche handelte (M Hyo ID ONCE mit Kontrolle i.d.; M+PAC[®] mit Kontrolle i.m.; Kontrolle i.d. mit Kontrolle i.m.;

M Hyo ID ONCE mit M+PAC[®]) wurde eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni-Holm verwendet; folglich wurden die Signifikanzniveaus auf 1,25 %, 1,67 %, 2,5 % und 5 % angehoben. Die Analyse der Häufigkeitsverteilung der Anzahl klinischer Veränderungen, der Anzahl maximal aufgetretener lokaler Hautveränderungen und der Persistenz der Veränderungen wurde mittels Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Die Nullhypothese belief sich darauf, dass alle Applikationsmethoden gleichwertige Veränderungen hervorrufen. Die Mittelwerte der nicht-normalverteilten Temperaturdaten wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis- und anschließend mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Die nicht-normalverteilten Mortalitätsdaten wurden anhand des Chi-Quadrat-Test zwischen den Studiengruppen verglichen.

IV. ERGEBNISSE

In die Studie wurden insgesamt 420 Tiere mit einem Alter von 21 bis 24 Lebenstagen eingeschlossen. In die Studiengruppe M Hyo ID ONCE wurden 138, in die intradermale Kontrollgruppe 70, in die M+PAC[®]-Gruppe 144 und in die intramuskuläre Kontrollgruppe 68 Tiere eingeschlossen. Von insgesamt 395 Tieren konnte nach der Schlachtung ein Lungenscore erhoben werden. Die restlichen 25 Tiere sind entweder im Verlauf der Studie verstorben (13 Tiere), wurden aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet (ein Tier) oder konnten infolge verlorener Ohrmarke nicht mehr eindeutig identifiziert werden (11 Tiere).

1. Verträglichkeit und Sicherheit des Impfstoffes

1.1. Klinische Untersuchung

Die 84 Tiere der Safety-Gruppe wurden 30 bis 60 Minuten nach der Injektion und an den folgenden sieben Tagen einmal täglich klinisch untersucht. Für jedes einzelne Tier wurde neben der Beurteilung des Allgemeinbefindens das Vorhandensein von Appetit, Niesen, Husten und Atemnot erhoben.

Resultierend aus diesen Beobachtungen wurden die Häufigkeiten des Auftretens einer Veränderung der unterschiedlichen klinischen Parameter errechnet. Eine Minderung des Appetits wurde bei keinem Tier über den gesamten Untersuchungszeitraum festgestellt. Eine Reduzierung des Allgemeinbefindens, eine leichte Dyspnoe oder Husten trat nur bei jeweils einem Tier an einem Untersuchungstag auf. Niesen trat bei insgesamt 19 Tieren auf. Zwischen 3,3 % bis maximal 33,3 % der Tiere einer Studiengruppe wiesen eine Abweichung eines Parameters auf. Zusammenfassend trat eine Veränderung eines klinischen Parameters nie länger als einen Tag auf und war stets nur als geringgradig einzustufen. Bei einem Tier wurde ein reduziertes Allgemeinbefinden beobachtet. Das Auftreten der klinischen Veränderungen war gleichmäßig auf die Vakzine- und Placebogruppen verteilt. Die Häufigkeitsverteilung ist in der Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7 - Anzahl der Tiere mit klinischen Auffälligkeiten zwischen den Kontroll- und Vakzinegruppen

	M Hyo ID ONCE n=28	Kontrolle i.d. n=13	M+PAC® n=30	Kontrolle i.m. n=13
Parameter	Anzahl der Tiere mit Veränderungen			
Allgemeinbefinden beeinträchtigt	0	0	1	0
Niesen	5	2	10	2
Husten	0	0	1	0
Dyspnoe	1	0	0	0
Anorexie	0	0	0	0

Zusätzlich wurde anhand dieser Untersuchungen ein klinischer Gesamtscore pro Tier über den Untersuchungszeitraum errechnet. Die maximal zu erreichende Punktzahl je Tier beläuft sich auf 72 Punkte. In der Abbildung 1 ist der mittlere Gesamtscore je Studiengruppe dargestellt. Von allen untersuchten Tieren erreichte ein Tier der M+PAC®-Gruppe einmalig ein Maximum von zwei Scorepunkten. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und Vakzinegruppen hinsichtlich dieses klinischen Gesamtscores.

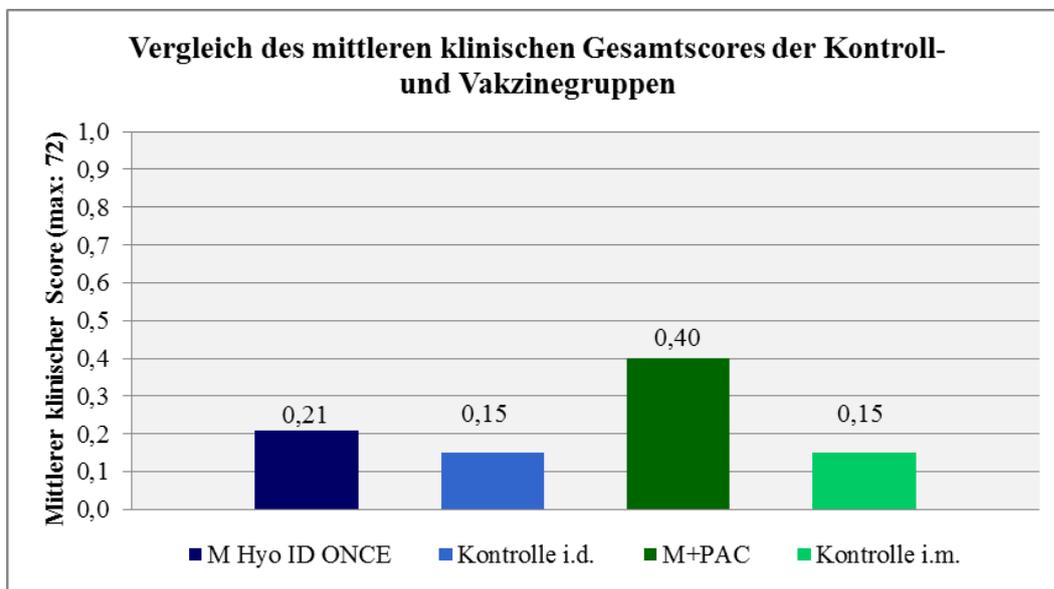


Abbildung 1 - Mittlerer klinischer Gesamtscore der Kontroll- und Vakzinegruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum im Vergleich

1.2. Lokale Hautreaktion an der Applikationsstelle

Eine aufgetretene lokale Hautreaktion an der Injektionsstelle wurde anhand ihres Durchmessers in cm, ihrer Konsistenz und vermehrter Wärme u./ o. Rötung beurteilt. Für jeden dieser Parameter wurden einzeln, je nach Schweregrad der Veränderung, Scorepunkte vergeben. Die Tabelle 8 zeigt die Anzahl der Tiere für die vier Studiengruppen, bei denen eine lokale Hautreaktion auftrat, sowie deren Häufigkeitsverteilung innerhalb der verschiedenen Grade der beurteilten Parameter. Die größten aufgetretenen Umfangsvermehrungen hatten einen Durchmesser von 1,5 cm, waren von harter Konsistenz und vermehrt warm u./ o. gerötet. Eine vermehrte Wärme der Injektionsstelle trat teilweise isoliert, ohne eine anhand der Parameter Umfangsvermehrung und Konsistenz abgrenzbare lokale Reaktion, auf. Die restlichen Tiere wiesen keine Veränderungen an der Injektionsstelle auf.

Tabelle 8 - Anzahl der Tiere mit einer lokalen Hautreaktion, Verhärtung und Rötung u./ o. Wärme an der Injektionsstelle. Häufigkeitsverteilung der maximal aufgetretenen verschiedenen Grade

	Score	M Hyo ID ONCE n = 28	Kontrolle i.d. n = 13	M+PAC® n = 30	Kontrolle i.m. n = 13
Durchmesser	1	8	4	20	5
	2	9	2	2	0
	3	6	0	0	0
	4	0	0	0	0
gesamt		23 (82,1%)	6 (46,2%)	22 (73,3%)	5 (38,5%)
Konsistenz	1	2	2	13	4
	2	11	4	8	1
	3	10	0	1	0
gesamt		23 (82,1%)	6 (46,2%)	22 (73,3%)	5 (38,5%)
Rötung u./ o. Wärme	1	20	3	24	8
gesamt		20 (71,4%)	3 (23,1%)	24 (80,0%)	8 (61,5%)

Insgesamt wiesen 82,1 % der Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe, 46,2 % der Tiere der intradermalen Kontrolle sowie 73,3 % der Tiere der M+PAC®-Gruppe und 38,5 % der Tiere der intramuskulären Kontrolle sichtbare lokale Hautreaktionen auf. Bei der statistischen Auswertung wurden die vier

Studiengruppen wie folgt miteinander verglichen, M Hyo ID ONCE zur Kontrolle i.d.; M+PAC[®] zur Kontrolle i.m.; beide Kontrollen; sowie beide Impfgruppen. Bis auf den Parameter „Rötung u./ o. Wärme“ konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Studiengruppen für die Anzahl der Tiere bei denen eine lokale Hautreaktion auftrat, festgestellt werden. Zwanzig Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe hatten eine vermehrt gerötete u./ o. warme Injektionsstelle im Vergleich zu drei Tieren der intradermalen Kontrolle ($p = 0,006$).

Zudem unterschieden sich die beiden Kontrollgruppen nicht in der Häufigkeitsverteilung der maximal aufgetretenen Veränderungen jedes einzelnen Parameters während der acht Untersuchungszeitpunkte (Tabelle 8). Der Gruppenvergleich zwischen den beiden nadellos intradermal applizierten Substanzen ergab signifikante Unterschiede bei dem Auftreten von härteren (Score: 3, $p = 0,017$) und vermehrt geröteten u./ o. wärmeren Reaktionen ($p = 0,006$). Im Vergleich dazu gab es keine signifikanten Unterschiede bei der Häufigkeitsverteilung zwischen den beiden intramuskulär injizierten Substanzen (M+PAC[®] zur Kontrolle i.m.). Zusätzlich ergab die Häufigkeitsverteilung zwischen den beiden Impfstoffen, dass es nach der Applikation von Porcilis[®] M Hyo ID ONCE signifikant häufiger zu größeren (Score: 3, $p = 0,009$) und härteren (Score: 3, $p = 0,002$) Reaktionen an der Injektionsstelle kam. Die Anzahl an Tieren, bei denen maximal eine bis 0,5 cm Durchmesser große (Score: 1, $p = 0,005$) und weiche (Score: 1, $p = 0,002$) Umfangsvermehrung auftrat, war hingegen signifikant höher nach einer Applikation von M+PAC[®].

Tabelle 9 - Anzahl der Tiere mit einer lokalen Hautreaktion an der Injektionsstelle länger als einen Tag bzw. Persistenz an Tag 7

Anzahl der Tiere					
Persistenz	M Hyo ID ONCE (a) n = 28	Kontrolle i.d. (b) n = 13	M+PAC [®] (c) n = 30	Kontrolle i.m. (d) n = 13	Signifikanzen
> einen Tag	21	4	11	3	a, b: $p=0,014$ a; c: $p=0,004$
an Tag 7	10	2	0	0	a, c: $p=0,000$

Die Analyse der Persistenz der lokalen Reaktionen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen sowie zwischen den beiden intramuskulären Gruppen (Tabelle 9). In der M Hyo ID ONCE-Gruppe konnten signifikant häufiger lokale Hautreaktionen beobachtet werden, die länger als einen

Tag persistierten, im Vergleich zur intradermalen Kontrolle sowie zur M+PAC[®]-Gruppe ($p = 0,014$, $p = 0,004$). Am letzten Beobachtungszeitpunkt, sieben Tage nach der Injektion, wiesen noch 10 Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe und zwei Tiere der intradermalen Kontrollgruppe eine lokale Hautveränderung auf (Tabelle 9 und Abbildung 2). Die Häufigkeitsverteilung des Parameters, „Persistenz an Tag 7“, unterschied sich nur zwischen den beiden Impfstoffgruppen signifikant voneinander ($p = 0,000$).

Eine Übersicht über den zeitlichen Verlauf der lokalen Hautreaktionen ist in der Abbildung 2 dargestellt. Die Mittelwerte des täglichen lokalen Hautreaktionsscores (Summe aus den täglichen Scores Durchmesser, Konsistenz und Entzündungszeichen) jeder Studiengruppe wurden ermittelt. Die maximal zu erreichenden täglichen acht Scorepunkte wurden bei keinem Tier vergeben. Der höchste tägliche Score eines Tieres lag bei sieben Scorepunkten für die M Hyo ID ONCE-Gruppe, bei vier Scorepunkten für die Kontrolle i.d., bei fünf Scorepunkten für die M+PAC[®]-Gruppe und drei Scorepunkten für die Kontrolle i.m.

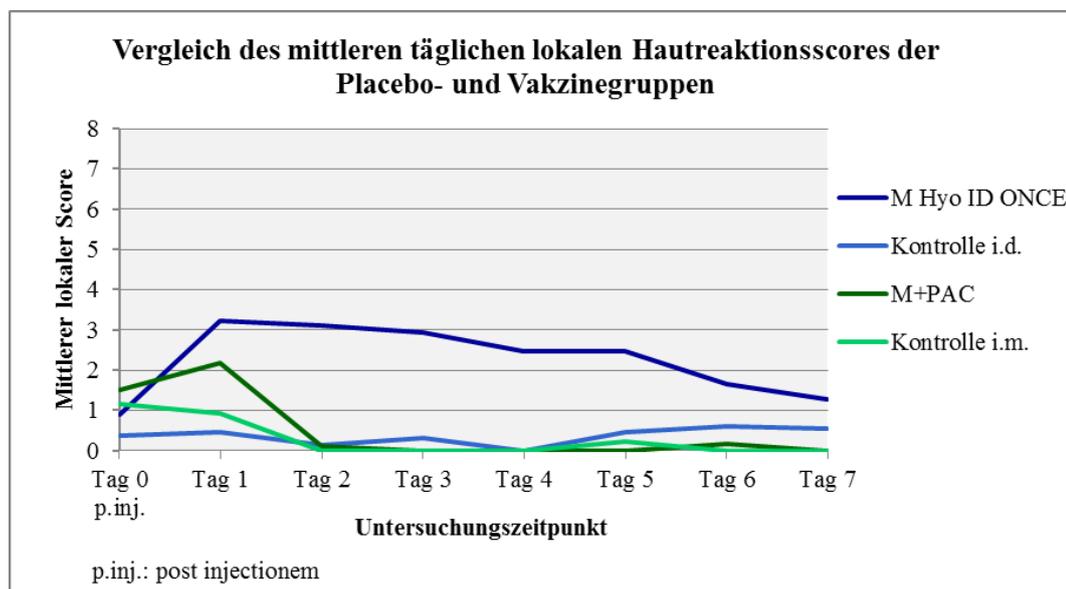


Abbildung 2 - Vergleich des Verlaufs des mittleren täglichen lokalen Hautreaktionsscores der Kontroll- und Vakzinegruppen

Für die drei Merkmale Durchmesser, Konsistenz und Entzündungszeichen wurde jeweils ein einzelner Score errechnet. Dieser setzt sich aus der Summe der täglichen Scores der acht Untersuchungszeitpunkte zusammen, wobei die Mittelwerte der Studiengruppen der Tabelle 10 zu entnehmen sind. Die mittleren

Scores der einzelnen Parameter, unterschieden sich weder zwischen den beiden Kontrollgruppen, welche mittels verschiedener Injektionsmethoden Diluvac[®] Forte erhielten, noch zwischen den beiden per Nadel geimpften Gruppen (M+PAC[®] und Kontrolle i.m.). Für alle drei Parameter ergaben sich signifikant höhere mittlere Scores der M Hyo ID ONCE-Gruppe im Vergleich zur intradermalen Kontrollgruppe. Tiere, die mit Porcilis[®] M Hyo ID ONCE geimpft wurden, hatten signifikant höhere mittlere Scores der Parameter Durchmesser und Konsistenz, als Tiere die mit M+PAC[®] geimpft wurden.

Tabelle 10 - Mittlerer Score der Lokalreaktionen als Summe der Scores der acht Untersuchungszeitpunkte, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Studiengruppen

Parameter	Studiengruppe	Score					Signifikanzen
		n	MW	SD	Min.	Max.	p
Durchmesser Maximum: 32	M Hyo ID ONCE, a	28	7,07	6,37	0	21	a, c: p=0,000
	Kontrolle i.d. b	13	1,23	1,83	0	6	a, b: p=0,001
	M+PAC [®] , c	30	1,23	1,07	0	4	c, d: p=0,097
	Kontrolle i.m., d	13	0,69	1,03	0	3	b, d: p=0,591
Konsistenz Maximum: 24	M Hyo ID ONCE, a	28	8,89	7,26	0	22	a, c: p=0,000
	Kontrolle i.d., b	13	1,46	2,07	0	6	a, b: p=0,001
	M+PAC [®] , c	30	1,60	1,48	0	5	c, d: p=0,047
	Kontrolle i.m., d	13	0,77	1,24	0	4	b, d: p=0,496
Entzündungszeichen Maximum: 8	M Hyo ID ONCE, a	28	2,04	2,08	0	6	a, c: p=0,197
	Kontrolle i.d., b	13	0,23	0,44	0	1	a, b: p=0,001
	M+PAC [®] , c	30	1,10	0,76	0	3	c, d: p=0,333
	Kontrolle i.m., d	13	0,85	0,80	0	2	b, d: p=0,048

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der acht Untersuchungszeitpunkte liefert der lokale Gesamtscore, der die Summe der täglich erreichten Scorepunkte darstellt. Auch hier wurde das Maximum von 64 Punkten nie erreicht. Ein Tier der M Hyo ID ONCE-Gruppe hatte mit 49 Scorepunkten den höchsten vergebenen Wert. Die Mittelwerte der lokalen Gesamtscores der vier Studiengruppen sind in der Tabelle 11 dargestellt. Die M Hyo ID ONCE-Gruppe hat einen signifikant höheren mittleren Gesamtscore der Lokalreaktion gegenüber

der intradermalen Kontrolle und der M+PAC[®]-Gruppe. Die mittleren lokalen Gesamtscores der M+PAC[®]-Gruppe und der intramuskulären Kontrollgruppe sowie beider Kontrollgruppen untereinander, unterscheiden sich nicht signifikant.

Tabelle 11 - Mittlerer Gesamtscore der Lokalreaktion als Summe der Scores der acht Untersuchungszeitpunkte, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Studiengruppen

Studiengruppe	Tierzahl	Gesamtscore (max: 64)				Signifikanzen
	n	MW	SD	Min.	Max.	p
M Hyo ID ONCE, a	28	18,00	15,23	0	49	a, c: p=0,000
Kontrolle i.d., b	13	2,92	4,09	0	13	a, b: p=0,001
M+PAC [®] , c	30	3,93	3,08	0	12	c, d: p=0,083
Kontrolle i.m., d	13	2,31	2,96	0	9	b, d: p=0,881

1.3. Innere Körpertemperatur

Die durchschnittliche innere Körpertemperatur der Ferkel der verschiedenen Studiengruppen überschritt nach der Injektion sowie in den darauffolgenden vier Tagen nicht den von GROSSE BEILAGE (2013) angegebenen physiologischen Bereich von 38,9 bis 40,1 °C bei Saugferkeln und 38,7 bis 39,9 °C bei Absetzferkeln. Einen Tag nach der Impfung (Tag 1) war die durchschnittliche Körpertemperatur der Tiere, die mittels M+PAC[®] geimpft wurden, mit 39,4 °C signifikant höher als jene der anderen drei Gruppen (Abbildung 3). Die höchste Differenz zwischen den durchschnittlichen Körpertemperaturen betrug 0,43 °C zum Zeitpunkt Tag 1 zwischen der M+PAC[®]-Gruppe und der intramuskulären Kontrollgruppe. Die größten Differenzen zwischen den gemessenen Werten vor und nach der Injektion waren 1,9 °C bei einem ungeimpften Ferkel, 0,7 °C bei einem mit M+PAC[®] und 0,4 °C bei einem mit Porcilis[®] M Hyo ID ONCE geimpften Tier.

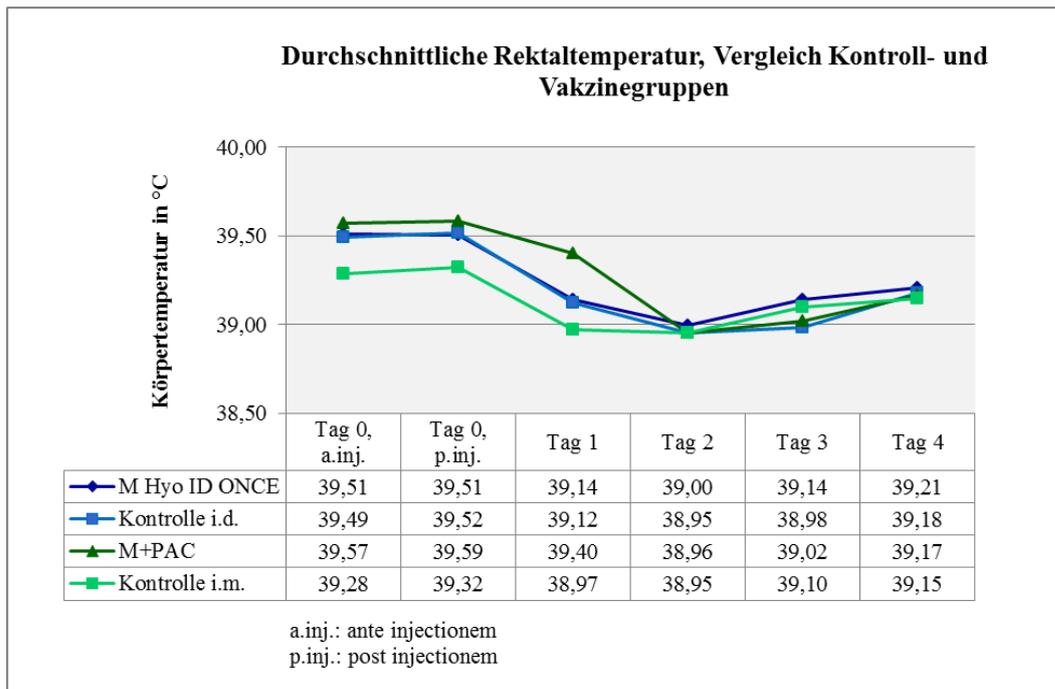


Abbildung 3 - Vergleich der durchschnittlichen inneren Körpertemperaturen der Kontroll- und Vakzinegruppen

2. Wirkung des Impfstoffes und Leistungsparameter

Für die serologische Auswertung und die Leistungsparameter wurden die Tiere der beiden Kontrollgruppen zu einer gemeinsamen Placebogruppe zusammengeschlossen.

2.1. Serologie

Von den Tieren der Safety-Gruppe wurden vor der Impfung, vier und zwölf Wochen post injectionem (p.inj.) und am Ende der Mast Blutproben gewonnen. Die Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen werden als Verhältnis der Probe zur positiv Kontrolle (P/PK) angegeben. Ein P/PK-Verhältnis über 0,4 gilt als positives Ergebnis. Anhand dieser serologischen Ergebnisse wurden Mittelwerte der Antikörpertiter der zwei Impfgruppen und der Placebogruppe berechnet (Abbildung 4). Zusätzlich wurde für jeden Untersuchungszeitpunkt die Anzahl seropositiver Tiere bestimmt.

Am 21. Lebenstag der Ferkel (Studientag T 0) waren acht Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe (32 %), vier Ferkel der M+PAC[®]-Gruppe (14 %) sowie vier Tiere der Placebogruppe (18 %) seropositiv (Abbildung 5). Die Häufigkeitsverteilung der seropositiven Tiere unterschied sich nicht zwischen den

Versuchsgruppen, zudem gab es keine signifikanten Differenzen der mittleren Antikörpertiter.

Vier Wochen nach der Impfung hatten die mittels M+PAC[®] geimpften Tiere sowohl signifikant höhere mittlere Antikörpertiter ($P/PK = 0,801$, Abbildung 4) als auch einen signifikant größeren Anteil an seropositiven Tieren im Vergleich zur anderen Vakzine- und zur Placebogruppe ($p = 0,000$). Zu diesem Zeitpunkt waren drei der Porcilis[®] M Hyo ID ONCE geimpften Tiere seropositiv. Zusätzlich war das mittlere P/PK-Verhältnis dieser Gruppe mit $0,145$ signifikant höher als jenes der Kontrollgruppe ($p = 0,003$). Insgesamt kam es zum Absinken der Antikörpertiter der M Hyo ID ONCE- und der Kontrollgruppe vom Studientag T 0 bis vier Wochen nach der Impfung.

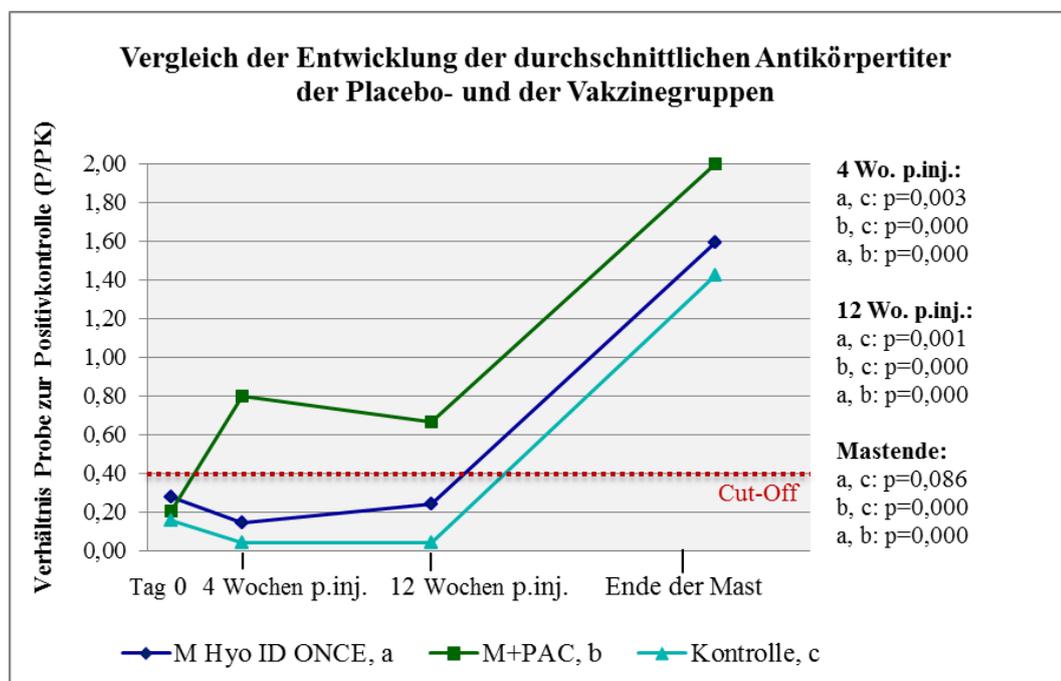


Abbildung 4 - Verlauf der mittleren Antikörpertiter der Placebo- und der Vakzinegruppen im Vergleich, mit signifikanten Unterschieden der mittleren P/PK-Werte zwischen den Studiengruppen

Zwölf Wochen nach Studienbeginn waren die mittleren P/PK-Verhältnisse beider Vakzinegruppen signifikant höher als jene der Placebogruppe. 77 % der Tiere der M+PAC[®]- und 16 % der Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe waren 12 Wochen nach der Impfung seropositiv (Abbildung 5). Zu diesem Untersuchungszeitpunkt waren alle Tiere der Placebogruppe seronegativ. Die mittleren Antikörpertiter der M+PAC[®]-Gruppe waren zu jedem Untersuchungszeitpunkt signifikant höher als

jene der M Hyo ID ONCE-Gruppe. Bei allen drei Studiengruppen kam es zu einem Anstieg der mittleren Antikörpertiter zwischen dem Zeitpunkt 12 Wochen p.inj. und der letzten Beprobung kurz vor der Schlachtung. Am Mastende waren alle untersuchten Studientiere seropositiv (Abbildung 5). Die Tiere der M+PAC[®]-Gruppe hatten zu diesem Zeitpunkt signifikant höhere mittlere Antikörpertiter als die ungeimpften Tiere und die Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe.

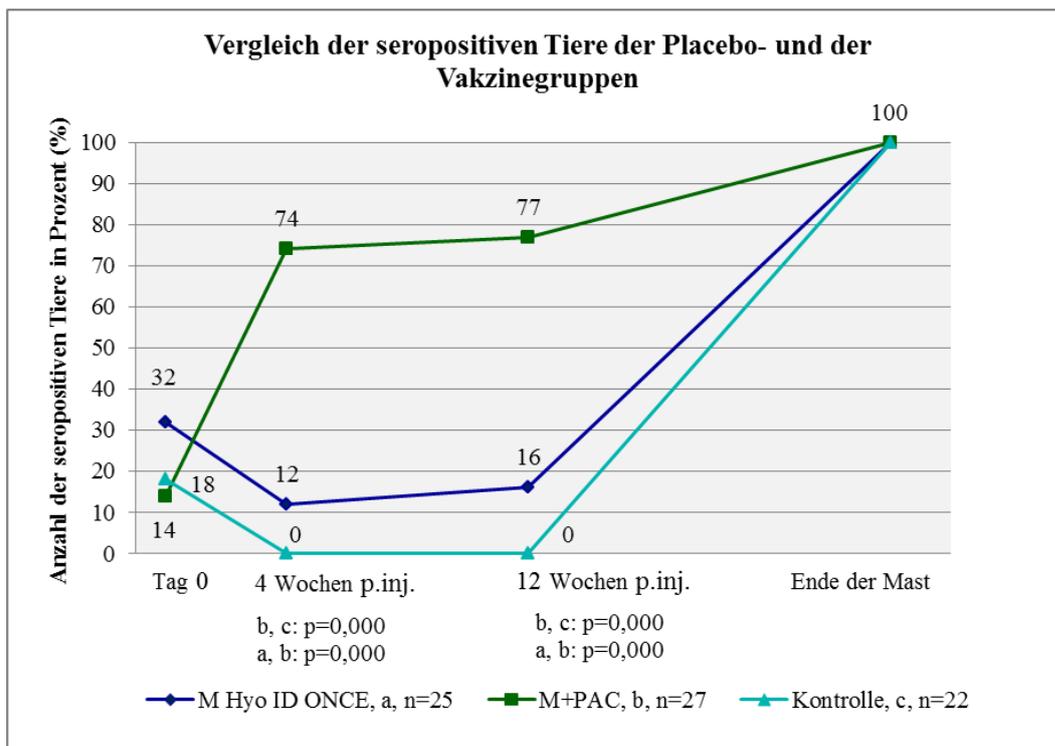


Abbildung 5 - Anzahl seropositiver Tiere der Placebo- und der Vakzinegruppen im Vergleich, mit signifikanten Unterschieden zwischen den Studiengruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten

2.2. Gewichtsentwicklung

Das Körpergewicht der Tiere wurde mittels Einzeltierwiegungen am Studientag T 0 (21. Lebenstag der Ferkel), zur Einstallung in die Mast (T 55) und am Ende der Mastphase, einen Tag bevor die ersten Tiere zur Schlachtung gingen (T 145), erfasst. Anhand dieser Daten wurden die durchschnittlichen Körpergewichte der Tiere der einzelnen Studiengruppen für jeden Untersuchungszeitpunkt berechnet. Zusätzlich wurden die mittleren täglichen Zunahmen der Tiere zwischen dem 21. Lebenstag und der Masteinstellung, während der Mastperiode sowie über den gesamten Untersuchungszeitraum ermittelt.

Zum Studienbeginn unterschieden sich die mittleren Gewichte der Placebo- und Vakzinegruppen nicht signifikant (Abbildung 6). Ebenfalls ergaben sich keine signifikanten Differenzen der mittleren täglichen Zunahmen während der Periode vom 21. Lebenstag der Tiere bis zur Masteinstellung (T 0 – T 55). Zu Mastbeginn wogen die Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe durchschnittlich 30,2 kg, jene der M+PAC[®]-Gruppe 30,3 kg und die Kontrolltiere 29,5 kg. Am Ende der Mast (T 145) ergaben sich signifikante Unterschiede der mittleren Körpergewichte zwischen den Vakzinegruppen und der Placebogruppe (Abbildung 6). Am Studientag 145 wogen die Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe durchschnittlich 112,4 kg im Vergleich zu den im Mittel 4,1 kg leichteren Kontrolltieren ($p = 0,005$). Die Tiere der M+PAC[®]-Gruppe waren mit einem mittleren Gewicht von 113,5 kg ebenfalls signifikant schwerer als die Kontrolltiere (Differenz: 5,2 kg).

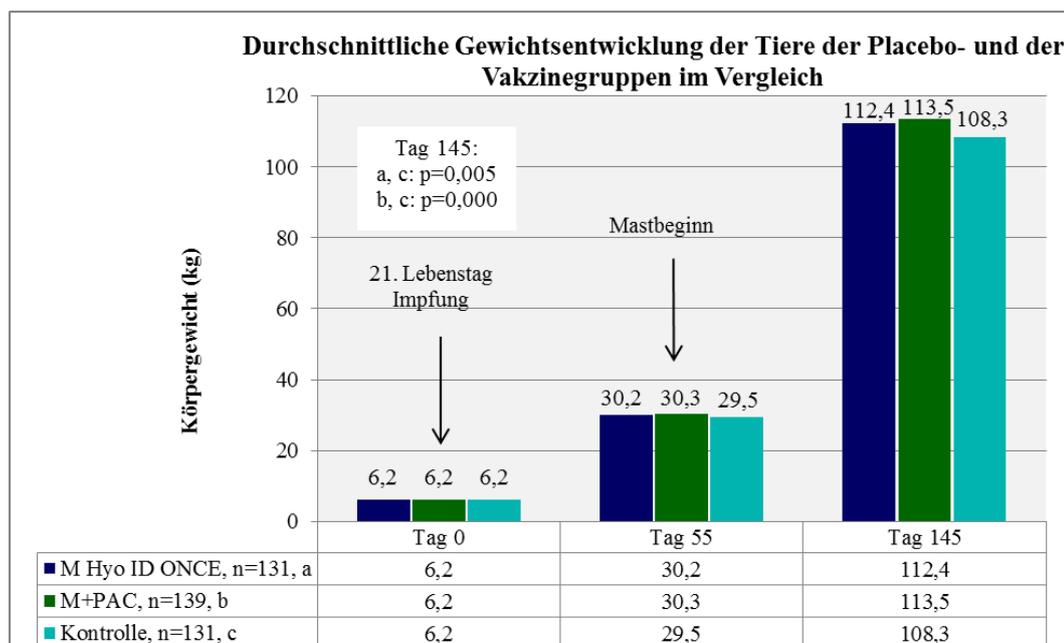


Abbildung 6 - Vergleich der mittleren Gewichte (kg) der Placebo- und der Vakzinegruppen, mit Signifikanzen zwischen den Studiengruppen

Betrachtet man die täglichen Zunahmen während der Mastphase, hatten die Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe im Durchschnitt 37 g, jene der M+PAC[®]-Gruppe 48 g höhere Tageszunahmen, als die Tiere der Placebogruppe (Abbildung 7). Diese Differenzen der Tageszunahmen waren signifikant ($p \leq 0,005$). Betrachtet man den gesamten Untersuchungszeitraum hatten die mit Porcilis[®] M Hyo ID ONCE geimpften Tiere im Durchschnitt 28 g signifikant

höhere mittlere Tageszunahmen im Vergleich zu den ungeimpften Tieren. Die mittleren täglichen Zunahmen über den Zeitraum T0 – T145 der M+PAC[®]-Gruppe waren um 36 g ebenfalls signifikant höher als jene der Placebogruppe.

Zwischen den beiden Vakzinegruppen gab es zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikante Unterschiede in Bezug auf die mittleren Körpergewichte und die mittleren täglichen Zunahmen.

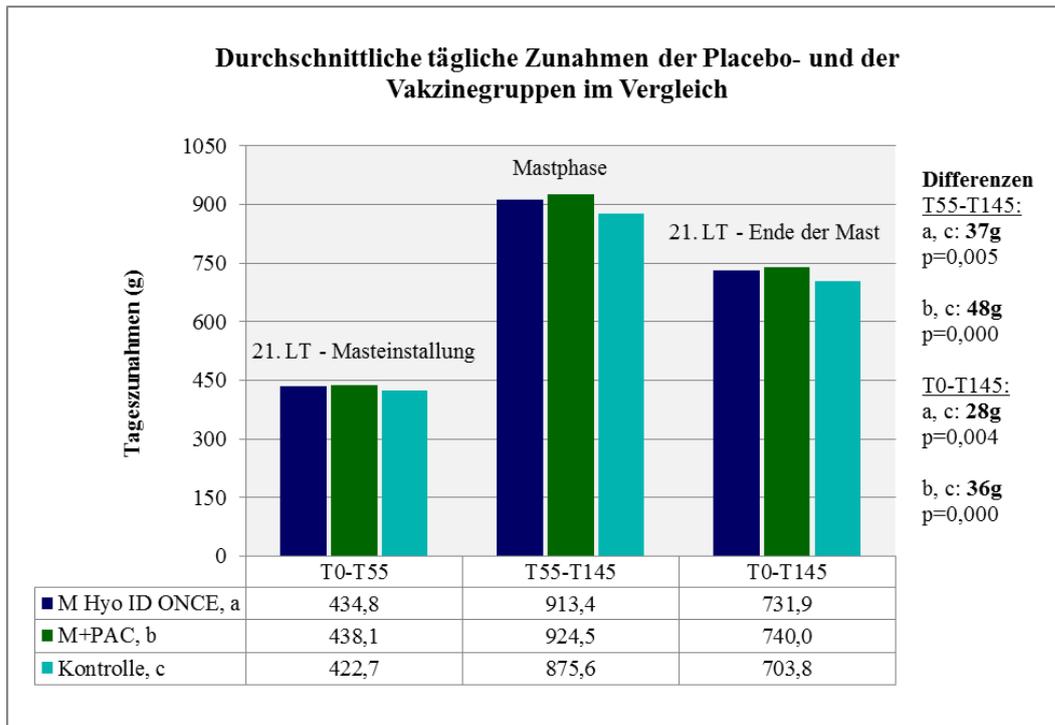


Abbildung 7 - Vergleich der mittleren täglichen Zunahmen der Placebo- und der Vakzinegruppen mit den signifikanten Gewichtsunterschieden

2.3. Mastdauer und Körpergewichte zum ersten Schlachtermin

Die Tiere wurden an drei verschiedenen Terminen geschlachtet (T 146, T 153 und T 167). Sie befanden sich zwischen 91 und 112 Tage im Maststall. Anschließend wurde die Häufigkeitsverteilung der Tiere der Placebo- und Vakzinegruppen zu den drei Schlachterminen verglichen und die durchschnittliche Mastdauer jeder Studiengruppe berechnet (Tabelle 12).

Tabelle 12 - Vergleich der mittleren Mastdauer der Placebo- und der Vakzinegruppen mit Häufigkeitsverteilung der Tiere innerhalb der Schlachtermine

	Anzahl der Tiere je Schlachttermin			Gesamte Tierzahl	Mittlere Mastdauer in Tagen
	1. Termin	2. Termin	3. Termin		
Masttage	91	98	112		
Anzahl der Tiere (n)	167	176	52	395	
M Hyo ID ONCE	60 (46,9 %)	53 (41,4 %)	15 (11,7 %)	128	96,4
M+PAC [®]	67 (48,9 %)	53 (38,7 %)	17 (12,4 %)	137	96,3
Kontrolle	40 (30,8 %)	70 (53,8 %)	20 (15,4 %)	130	98

Nach 91 Masttagen wurden 46,9 % der Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe, 48,9 % der Tiere der M+PAC[®]-Gruppe, sowie 30,8 % der Schweine der Placebogruppe geschlachtet. Die beiden Vakzinegruppen hatten einen signifikant größeren Anteil an der ersten Schlachtpartie, im Vergleich zur Placebogruppe ($p \leq 0,01$). Die zweite Schlachtung fand nach 98 Masttagen statt und es wurden 70 Tiere der Placebogruppe im Vergleich zu jeweils 53 Tieren beider Vakzinegruppen geschlachtet. Hierbei war der Anteil der Placebogruppe an der Gesamtzahl zum zweiten Termin geschlachteter Tiere signifikant höher als jener der M+PAC[®]-Gruppe ($p = 0,014$). Beim letzten Schlachttermin ergab sich kein Unterschied in der Häufigkeitsverteilung zwischen den Studiengruppen. Die unterschiedliche Verteilung der Studiengruppen auf die drei Schlachtermine ergab eine mittlere Mastdauer von 96,3 bis 96,4 Tagen für die beiden Vakzinegruppen (Tabelle 12). Vergleichsweise hatte die Placebogruppe eine im Durchschnitt um 1,6 Tage zur M Hyo ID ONCE-Gruppe und 1,7 Tage zur M+PAC[®]-Gruppe signifikant ($p \leq 0,014$) verlängerte Mastperiode mit einem Mittelwert von 98 Tagen.

Zusätzlich wurde das mittlere Körpergewicht (T 145) der Tiere, die nach 91 Masttagen geschlachtet wurden, ermittelt und zwischen den Placebo- und Vakzinegruppen verglichen (Abbildung 8). Die Endmastgewichte von zwei Tieren der M Hyo ID ONCE- sowie von drei Tieren der Kontrollgruppe konnten nicht erhoben werden, diese Tiere wurden jedoch in den Berechnungen der mittleren Mastdauer und des Lungenscores berücksichtigt.

Endmastgewichte der Tiere der Placebo- und Vakzinegruppen zum ersten Schlachtermin im Vergleich

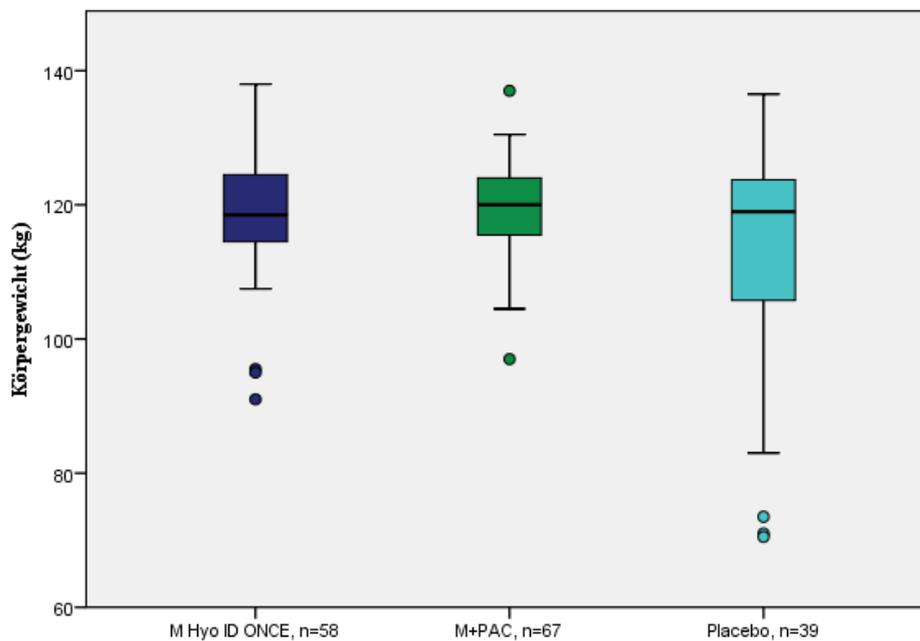


Abbildung 8 - Vergleich der Körpergewichte (kg) der Placebo- und der Vakzinegruppen zum ersten Schlachtermin

Zum ersten Schlachtermin wurden die vakzinierten Tiere mit mittleren Endmastgewichten von 119,0 kg (M Hyo ID ONCE) und 119,4 kg (M+PAC[®]) sowie die Tiere der Placebogruppe mit einem mittleren Endmastgewicht von 113,4 kg geschlachtet (Tabelle 13). Die mittleren Endmastgewichte der Tiere der ersten Schlachtpartie unterschieden sich nicht signifikant.

Tabelle 13 - Vergleich der mittleren Endmastgewichte (kg) der Placebo- und der Vakzinegruppen zum ersten Schlachtermin

Studiengruppe	Tierzahl	Endmastgewicht (kg)			
		MW	SD	Min.	Max.
M Hyo ID ONCE	58	119,0	9,0	91,0	138,0
M+PAC [®]	67	119,4	6,5	97,0	137,0
Kontrolle	39	113,4	16,7	70,5	136,5

2.4. Lungenbefunde am Schlachthof

Insgesamt konnten am Schlachthof die Lungen von 395 Tieren (M Hyo ID ONCE-Gruppe: n = 128, M+PAC[®]-Gruppe: n = 137, Placebogruppe: n = 130) mit dem in Kapitel III.9. beschriebenen Score beurteilt werden. Neben dem mittleren Lungenscore jeder Studiengruppe wurde eine Kategorisierung der prozentualen Veränderungen vorgenommen. Anschließend wurden die Tiere anhand ihres erreichten Scores den unterschiedlichen Kategorien zugeteilt.

Betrachtet man die Gesamtheit der durchschnittlichen Lungenveränderungen (Abbildung 9), ergibt sich ein signifikant niedrigerer mittlerer Lungenscore von 2,51 % der M Hyo ID ONCE-Gruppe als jener der M+PAC[®]- und der Placebogruppe ($p = 0,034$; $p = 0,000$). Der ermittelte durchschnittliche Lungenscore der Placebogruppe lag bei 4,27 % wohingegen jener der M+PAC[®]-Gruppe signifikant niedriger bei 3,72 % lag (Abbildung 9).

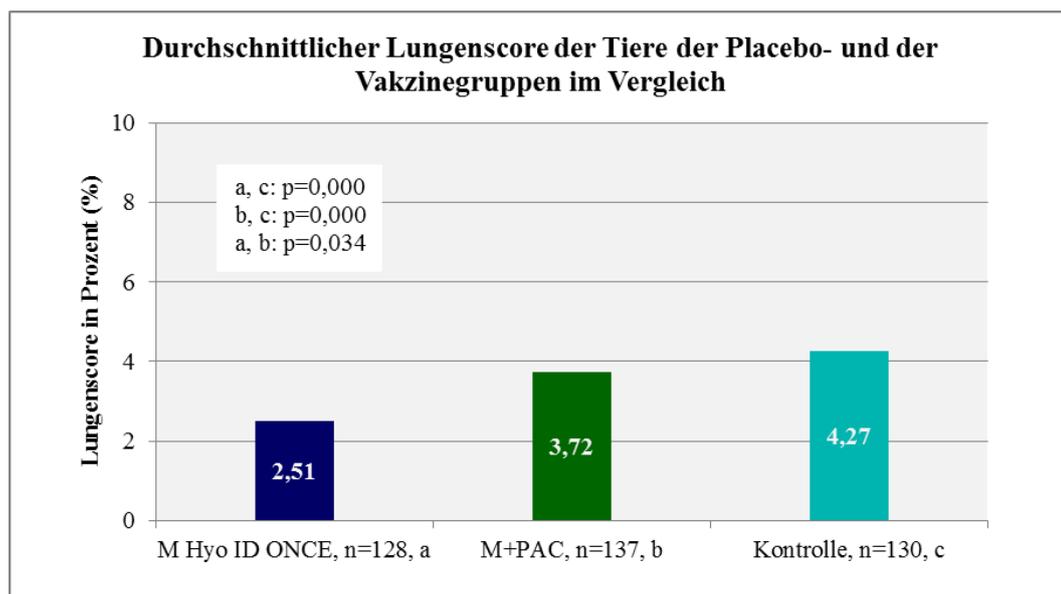


Abbildung 9 - Vergleich der mittleren Lungenveränderungen der Tiere der Placebo- und der Vakzinegruppen in Prozent

Bei 31,3 % der mittels Porcilis[®] M Hyo ID ONCE geimpften Tiere wurden keine Lungenveränderungen beobachtet (Abbildung 10). Dahingegen hatten 16,1 % der Tiere der M+PAC[®]-Gruppe sowie 7,7 % der Tiere der Placebogruppe unveränderte Lungen. Die Tiere beider Vakzinegruppen hatten signifikant häufiger unveränderte Lungen im Vergleich zur Placebogruppe ($p \leq 0,039$); zusätzlich waren im Vergleich zu der M+PAC[®]-Gruppe signifikant mehr Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe in dieser Kategorie zu finden ($p = 0,004$).

Weiterhin befanden sich im Bereich von bis zu 5 % Lungenveränderungen signifikant ($p = 0,017$) mehr Tiere der M+PAC[®]-Gruppe (75,2 %) im Vergleich zur M Hyo ID ONCE-Gruppe (60,9 %). In der Kategorie >5 % – 10 % Lungenläsionen befanden sich 2,3 % der Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe, 3,6 % der Tiere der M+PAC[®]-Gruppe und 9,2 % der Placebo-Tiere. Der Bereich >10 % - 20 % beinhaltete 4,7 % der Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe, 1,5 % der Tiere der M+PAC[®]-Gruppe, sowie 6,9 % der Tiere der Placebogruppe. In der Kategorie über 20 % Lungenläsionen befanden sich 4 Tiere der Placebogruppe (3,1 %), sowie 5 Tiere der M+PAC[®]-Gruppe (3,6 %) und ein Tier der M Hyo ID ONCE-Gruppe (0,8 %). Die Häufigkeitsverteilung in diesen letzten drei Kategorien ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen (Abbildung 10).

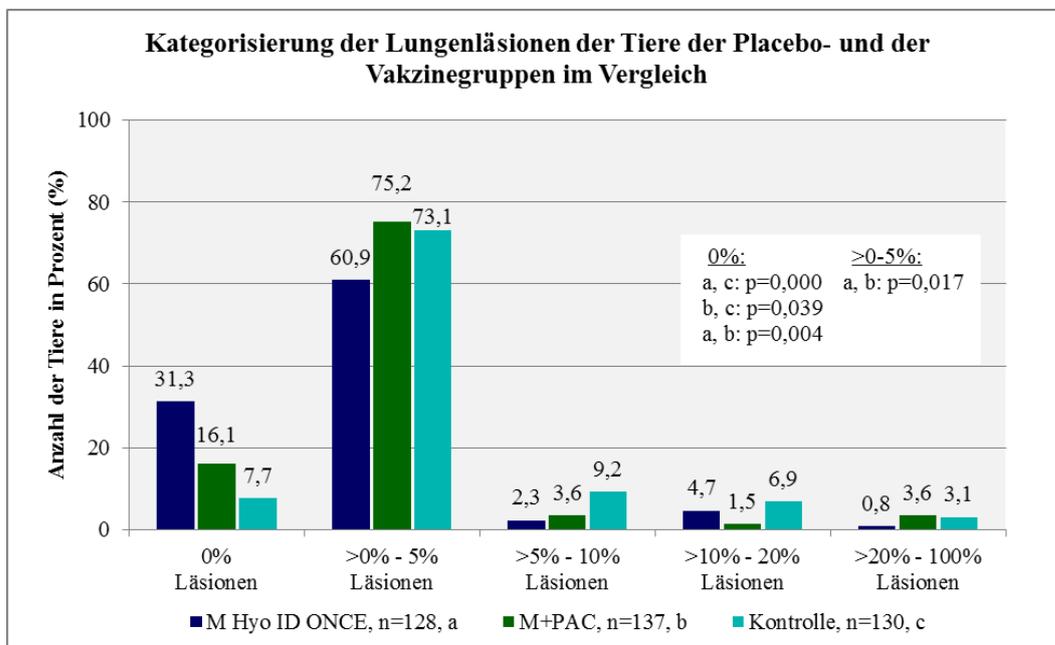


Abbildung 10 - Vergleich der Häufigkeitsverteilung der Tiere der Placebo- und Vakzinegruppen innerhalb der unterschiedlichen Kategorien der Lungenläsionen, mit Signifikanzen zwischen den Studiengruppen

Bei der Erhebung des Lungenscores wurde zusätzlich das Vorhandensein einer Pleuritis beurteilt. Die Häufigkeitsverteilung des Auftretens von Pleuritiden zwischen den drei Studiengruppen ist in der Tabelle 14 dargestellt. Bei 14,1 % der Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe, bei 11,7 % der Tiere der M+PAC[®]-Gruppe und bei 14,6 % der Tiere der Placebogruppe traten Pleuritiden auf. Diese Häufigkeiten unterschieden sich nicht signifikant.

Tabelle 14 - Auftreten von Pleuritiden innerhalb der Studiengruppen

Studiengruppe	Tierzahl gesamt	Anzahl der Tiere mit Pleuritis
M Hyo ID ONCE	n=128	18 (14,1 %)
M+PAC [®]	n=137	16 (11,7 %)
Placebo	n=130	19 (14,6 %)

2.5. Molekularbiologische Diagnostik

Insgesamt wurden von 75 Tieren der Safety-Gruppe Lungenproben mittels q-PCR auf *M. hyopneumoniae* untersucht. Ein Nachweis von *M. hyopneumoniae* spezifischen Genomfragmenten gelang bei 5/26 Tieren der M Hyo ID ONCE-Gruppe, bei 7/27 Tieren der M+PAC[®]-Gruppe und bei 9/22 Tieren der Placebogruppe (Tabelle 15). Die Häufigkeitsverteilung dieser positiven q-PCR Ergebnisse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Studiengruppen ($p = 0,257$). Die mittlere Erregerlast pro μg DNA betrug $5,9 \times 10^3$ bei den mit Porcilis[®] M Hyo ID ONCE geimpften Tieren, $1,0 \times 10^4$ bei den mit M+PAC[®] geimpften Tieren und $2,7 \times 10^3$ bei den ungeimpften Kontrolltieren (Tabelle 15). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied der mittleren Erregerlast pro μg DNA zwischen der Placebo- und den Vakzinegruppen ($p = 0,297$).

Tabelle 15 - Vergleichende Anzahl *M. hyopneumoniae* q-PCR positiver Lungenproben und mittlere Erregerlast der Placebo- und Vakzinegruppen

Studiengruppe	Tierzahl	Anzahl positiver Tiere q-PCR	Erreger pro μg DNA			
			MW	SD	Min.	Max.
M Hyo ID ONCE	26	5	$5,9 \times 10^3$	$2,9 \times 10^4$	0	$1,5 \times 10^5$
M+PAC [®]	27	7	$1,0 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	0	$2,7 \times 10^5$
Kontrolle	22	9	$2,7 \times 10^3$	$7,5 \times 10^3$	0	$3,2 \times 10^4$

3. Mortalität

Insgesamt wurden 420 Tiere in die Studie eingeschlossen. Die erhobene Mortalität von insgesamt 14 Tieren setzt sich aus den verendeten und getöteten Tieren zusammen. Dies ergibt eine Mortalität von 3,3 %. Bis zum Absetzen verendete jeweils ein Tier beider Vakzinegruppen. Hierbei handelte es sich um Erdrückungsverluste. Im Verlauf der Aufzucht verendeten jeweils zwei Tiere der

M Hyo ID ONCE-Gruppe und der Placebogruppe und ein Tier der M+PAC[®]-Gruppe. Während der Mast kam es zu einem Verlust von jeweils zwei Tieren der drei Studiengruppen. Am Ende der Mast wurde ein Tier der M+PAC[®]-Gruppe aus Tierschutzgründen getötet. Zusammenfassend verendeten jeweils fünf Tiere der beiden Vakzinegruppen und vier Tiere der Placebogruppe. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung verendeter bzw. getöteter Tiere zwischen der Placebo- und den Vakzinegruppen. Keines der Tiere verendete in einem zeitlichen Zusammenhang nach der Injektion. Die restlichen elf Tiere von denen keine Lungenscores erhoben werden konnten, verloren im Laufe der Mast oder während des Schlachtvorgangs ihre Ohrmarke und waren nicht mehr identifizierbar.

V. DISKUSSION

1. Verträglichkeit und Sicherheit des Impfstoffes

1.1. Klinische Untersuchung

Bei der täglichen klinischen Untersuchung, während eines Zeitraumes von sieben Tagen nach der Impfstoffapplikation, wurden die Parameter Allgemeinbefinden, Appetit, Niesen, Husten und Atemnot beurteilt. Der Appetit war bei allen Tieren stets erhalten, ein vermindertes Allgemeinbefinden sowie Husten trat bei einem Tier der M+PAC®-Gruppe auf und Dyspnoe wurde einmalig bei einem Tier der M Hyo ID ONCE-Gruppe beobachtet. Niesen trat gleichmäßig verteilt in allen vier Studiengruppen auf. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der Häufigkeitsverteilung der klinischen Symptome zwischen den Kontroll- und Vakzinegruppen. Neben dieser gleichmäßig verteilten Inzidenz der beobachteten klinischen Veränderungen, weist der niedrige klinische Gesamtscore auf die geringe Ausprägung der aufgetretenen klinischen Symptome hin. Letzterer unterscheidet sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den Kontroll- und Vakzinegruppen.

Nebenwirkungen nach der Applikation von *M. hyopneumoniae* Impfstoffen bei Ferkeln sind in unterschiedlichen Untersuchungen beschrieben. So zeigten Tiere in einer Studie von ZIMMERMANN (2012), nach einer Applikation eines one-shot *M. hyopneumoniae* Impfstoffes in der ersten Lebenswoche, vermehrt Zeichen von Niedergeschlagenheit und reduziertem Allgemeinbefinden. Zudem kam es in einer weiteren Erhebung von DREXLER et al. (2010) nach einer Kombinationsimpfung gegen *M. hyopneumoniae* und PRRSV in der vierten Lebenswoche bei wenigen Tieren zu transienten systemischen Nebenwirkungen. Weitere systemische Reaktionen wie Erbrechen, Atemnot und Ataxie, die unmittelbar nach einer Impfstoffapplikation in einer Studie von MAES et al. (1999b) auftraten, wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht beobachtet. Die in der Packungsbeilage von Porcilis® M Hyo ID ONCE und M+PAC® beschriebenen Nebenwirkungen wie Anzeichen von Unbehagen, Tachypnoe bis hin zu Emesis und Anorexie traten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht bzw. nicht vermehrt auf. In einigen weiteren Studien wurden bei Impfungen gegen *M. hyopneumoniae* bei über drei Wochen alten Ferkeln ebenfalls keine klinisch

relevanten Nebenwirkungen beschrieben (KYRIAKIS et al., 2001; DAWSON et al., 2002; TASSIS et al., 2012; KRISTENSEN et al., 2014).

1.2. Lokale Hautreaktion an der Applikationsstelle

Das Auftreten von lokalen Hautreaktionen wurde sowohl zwischen den Impfstoffgruppen und ihren Kontrollgruppen (M Hyo ID ONCE vs. Kontrolle i.d.; M+PAC[®] vs. Kontrolle i.m.) sowie zwischen den beiden Kontrollgruppen (Kontrolle i.d. vs. Kontrolle i.m.) und zwischen den beiden Impfstoffgruppen (M Hyo ID ONCE vs. M+PAC[®]) verglichen.

Bei der statistischen Auswertung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen was das Auftreten von lokalen Hautreaktionen an der Injektionsstelle anbelangt. Die Betrachtung des Gesamtscores der lokalen Hautreaktionen sowie deren Persistenz zeigte, dass die Ausprägung der lokalen Hautreaktionen nach der nadellosen, intradermalen Applikation von Diluvac[®] Forte mit jener nach der intramuskulären Applikation mittels Injektionskanüle desselben Präparates vergleichbar war. Diese Ergebnisse decken sich nicht mit jenen von UHL (2013). Hier traten nach einer nadellosen Injektion signifikant häufiger Umfangsvermehrungen, Verfärbungen und Verhärtungen auf. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf die Varianz der applizierten Volumina zurückzuführen sein. In der vorliegenden Studie wurde bei der nadellosen Injektion nur 0,2 ml Diluvac[®] Forte appliziert im Vergleich zur intramuskulären Injektion von 2 ml desselben Präparates. Einige Autoren gehen davon aus, dass die Ausprägung der lokalen Hautreaktion unter anderem auch durch das applizierte Volumen beeinflusst wird (BARNETT et al., 1996; ELICKER & SIPOS, 2009). Die Entstehung von lokalen Hautreaktionen, die allein auf die Applikationsform wie die intradermale Injektion oder die intramuskulären Applikation mittels Kanüle zurückzuführen sind, ist somit nur bedingt vergleichbar. Dies wird durch die Ergebnisse anderer Autoren unterstützt, die ein häufigeres Auftreten sowie vermehrt gerötete lokale Hautreaktionen mit härterer Konsistenz nach nadelloser Applikation beobachteten (WILLIAMS et al., 2000; REY et al., 2013; SOONAWALA et al., 2013).

Vergleicht man die nadellose, intradermale Injektion von Porcilis[®] M Hyo ID ONCE mit der alleinigen intradermalen Injektion des Adjuvans Diluvac[®] Forte, traten nach der Impfstoffapplikation signifikant

häufiger härtere und gerötete u./o. wärmere lokale Hautreaktionen auf. Anhand der mittleren Scores der einzelnen Parameter und des mittleren Gesamtscores wird deutlich, dass die aufgetretenen Hautreaktionen nach der Applikation der Vakzine sowohl signifikant größer und härter als auch geröteter u./o. wärmer waren. Zudem ruft eine intradermale Applikation von Porcilis® M Hyo ID ONCE neben einer stärkeren auch eine länger andauernde lokale Hautreaktionen hervor als eine alleinige Applikation des Adjuvans. Insgesamt sind die hier aufgetretenen lokalen Hautreaktionen wie in weiteren Studien von GERGEN et al. (2002), JONES et al. (2005) und BERNARDY et al. (2008) nach nadelloser, intradermaler Impfstoffapplikation dokumentiert wurde von geringer, meist transientser Ausprägung. Auch nach intramuskulären Impfstoffapplikationen traten vorübergehend lokale Hautreaktionen auf, die ebenfalls als klinisch nicht relevant bewertet wurden (GERGEN et al., 1999; LILLIE, 2004; ZIMMERMANN, 2012). Bezogen auf den Durchmesser der lokalen Hautveränderungen nach der Applikation verschiedener Impfstoffe, wurden in anderen Studien Hautveränderungen mit geringem ($< 0,5$ cm) (ZIMMERMANN, 2012) bis mittelgradigem Durchmesser ($\leq 1,5$ cm) (HILMER, 2013) dokumentiert. Diese Ergebnisse sind mit jenen der vorliegenden Arbeit vergleichbar. In einer Untersuchung von HILMER (2013) rief die Applikation eines auf Aluminiumhydroxid basierenden Influenza-Impfstoffes bei Schweinen, im Vergleich zur NaCl-Injektion, häufiger Umfangsvermehrungen und höhere Temperaturverläufe an der Applikationsstelle hervor. Diese Ergebnisse bestätigen den Einfluss des Impfstoffes auf die Ausprägung der lokalen Hautreaktion. Nach der alleinigen Applikation von Adjuvanzen wie z.B. Diluvac® Forte können lokale Hautreaktionen entstehen, da es in einer Untersuchung von VITORIANO-SOUZA et al. (2012) nach einer intradermalen Injektion verschiedener Adjuvanzen bei Mäusen jeweils zu einer Migration von Entzündungszellen, wie z.B. neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, an die Applikationsstelle kam. Die lokale Entzündungsreaktion an der Injektionsstelle ist durch die Adjuvanzen bedingt und scheint wichtig für die Ausbildung der Immunantwort zu sein (VITORIANO-SOUZA et al., 2012).

Der Vergleich der intramuskulären Impfstoffapplikation mit der intramuskulären Injektion von Diluvac® Forte ergab keine signifikanten Unterschiede was die Anzahl und die Ausprägung der lokalen Hautreaktionen betraf. Es gilt jedoch zu

beachten, dass der Impfstoff M+PAC[®] dünnflüssiges Mineralöl und Aluminiumhydroxid beinhaltet und nicht auf Diluvac[®] Forte als Adjuvans basiert. Letzteres beinhaltet dl- α -Tocopherolacetat und könnte stärkere lokale Hautreaktionen verursachen als die Adjuvanzen von M+PAC[®] und somit die lokalen Hautreaktionen nach einer M+PAC[®] Applikation im Vergleich relativieren.

Um eine vergleichende Aussage über die Sicherheit der Applikation beider Impfstoffe zu treffen, wurden das Auftreten und die Ausprägungen der Reaktionen an der Injektionsstelle nach der Applikation beider Vakzine gegenübergestellt. Die mit Porcilis[®] M Hyo ID ONCE geimpften Tiere zeigten signifikant häufiger größere und härtere lokale Hautreaktionen. Wohingegen in den Kategorien „bis 0,5 cm Durchmesser“ und „weiche Konsistenz“ die Tiere der M+PAC[®]-Gruppe signifikant häufiger vertreten waren. Zudem persistierten die Hautreaktionen nach der intradermalen Applikation von Porcilis[®] M Hyo ID ONCE signifikant länger. Da beide Kontrollgruppen sich nicht signifikant in der Häufigkeit und dem Grad der lokalen Hautreaktionen unterschieden, lässt sich schließen, dass die Unterschiede zwischen beiden Impfstoffgruppen auf den applizierten Vakzinen beruhen und nicht auf der Injektionsmethode. Eine unterschiedliche Ausprägung der lokalen Hautreaktionen je nach appliziertem Präparat wird auch von anderen Autoren beschrieben (GREEN et al., 1987; WILLSON et al., 1995; ELICKER, 2006; HILMER, 2013; NELSON et al., 2013). In einer Studie von ELICKER und SIPOS (2009) rief eine Impfung mittels M+PAC[®] verglichen mit einer Applikation von Suvayxn[®] M.hyo stärkere Schwellungen und vermehrt Wärme an der Injektionsstelle hervor. Weiterhin belegen Untersuchungen der lokalen Hautreaktion nach Impfstoffapplikation, dass die Art und die Stärke der Entzündungsreaktion vorwiegend von der Zusammensetzung des Impfstoffes abhängen (ELICKER & SIPOS, 2009; HILMER, 2013). Im vorliegenden Vergleich der M Hyo ID ONCE-Gruppe mit der M+PAC[®]-Gruppe sollte man zusätzlich bedenken, dass einerseits zwei unterschiedliche Volumina appliziert wurden und sich andererseits auch die Tiefe der Injektion unterscheidet. Die unterschiedliche Stärke der sichtbaren und palpierbaren lokalen Reaktion könnte man somit auch dadurch erklären, dass nach einer intramuskulären Injektion die Entzündungsreaktion in tieferen Gewebeschichten lokalisiert ist. Dies konnte zum Teil auch in einer Untersuchung

von UHL (2013) festgestellt werden. Die Tiefe der Hauptlokalisierung der Entzündungsreaktion nach intramuskulären Impfstoffapplikationen korrelierte zudem in einer Studie von HILMER (2013) mit der Länge der verwendeten Kanüle.

1.3. Innere Körpertemperatur

Der Vergleich der durchschnittlichen inneren Körpertemperatur ergab einen Tag nach der Injektion signifikante Unterschiede zwischen den M+PAC[®] geimpften Tieren und den drei anderen Studiengruppen. Die mittlere innere Körpertemperatur von 39,4 °C der mit M+PAC[®] geimpften Tiere lag jedoch im physiologischen Bereich von 38,9 bis 40,1 °C für Saugferkel (GROSSE BEILAGE, 2013). Weiterhin kam es innerhalb der M+PAC[®]-Gruppe weder zu einem Anstieg der mittleren inneren Körpertemperatur unmittelbar nach der Vakzination, noch zu einem Überschreiten des maximalen Grenzwertes für Absetzferkel von 39,9 °C (GROSSE BEILAGE, 2013) während des gesamten Untersuchungszeitraumes. Insgesamt sind diese Differenzen nicht als klinisch relevant zu betrachten.

Sowohl in einer Feldstudie von DAWSON et al. (2002) als auch von WILSON et al. (2012) wurden nach einer *M. hyopneumoniae* Vakzination von Ferkeln kein signifikanter Temperaturunterschied zwischen den Placebo- und Vakzinegruppen beschrieben. Diese Ergebnisse decken sich mit jenen der vorliegenden Arbeit für die restlichen Messzeitpunkte. Zudem verblieb die mittlere innere Körpertemperatur bei allen vier Studiengruppen im physiologischen Temperaturbereich (GROSSE BEILAGE, 2013). Weiterhin führte in einer Untersuchung von HILMER (2013) die Injektion einer *M. hyopneumoniae* Vakzine auch unter experimentellen Bedingungen zu keiner signifikanten Erhöhung der mittleren inneren Körpertemperatur gegenüber der Injektion von physiologischer Kochsalzlösung. Der in der Packungsbeilage angegebene, maximale Anstieg von 2 °C nach der Applikation von Porcilis[®] M Hyo ID ONCE wurde nicht beobachtet. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass es nach der Applikation beider Impfstoffe zu keiner erheblichen Akute-Phase-Antwort kommt, die durch die Sekretion von endogenen Pyrogenen wie IL-1, IL-6 und TNF- α mit Fieber gekennzeichnet wäre (BAUMGÄRTNER & SCHMIDT, 2011). Eine solche Reaktion kann durch die Applikation von Medikamenten ausgelöst werden (BAUMGÄRTNER & SCHMIDT, 2011).

In Bezug auf die Sicherheit der Impfstoffapplikation, kann man unter den gegebenen Bedingungen abschließend festhalten, dass nach einer Vakzination mit Porcilis® M Hyo ID ONCE vergleichbare klinische Symptome erhoben wurden, wie nach der Injektion von M+PAC® oder der alleinigen Injektion des Placebos Diluvac® Forte. Die aufgetretenen lokalen Reaktionen gingen weder mit einer Beeinträchtigung der Tiere, noch mit einer Erhöhung der mittleren inneren Körpertemperatur über den physiologischen Bereich hinaus, einher. Die makroskopisch sichtbaren Entzündungsreaktionen nach der Impfstoffapplikation, als Zeichen der Aktivierung des Immunsystems, sollten nicht ausschließlich negativ bewertet werden. Demzufolge kann eine intradermale Vakzination mit Porcilis® M Hyo ID ONCE bei 21 Tage alten, gesunden Tieren als sicher eingestuft werden.

2. Wirkung des Impfstoffes und Leistungsparameter

2.1. Serologie

Zu Studienbeginn am 21. Lebenstag waren zwischen 14 % und 32 % der Tiere *M. hyopneumoniae* seropositiv. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der mittleren Antikörpertiter und der Anzahl seropositiver Tiere zwischen den Studiengruppen. Der vorliegende Betrieb war vor Studienbeginn nicht *M. hyopneumoniae* frei. Sehr wahrscheinlich handelt es sich somit bei den am 21. Lebenstag nachgewiesenen Antikörpern um maternale Antikörper, da diese in einer Untersuchung von MORRIS et al. (1994) eine mediane Halbwertszeit von 15,8 Tagen hatten. Bei WALLGREN et al. (1998) wurden maternale Antikörper teilweise noch bei 6,5 Wochen alten Ferkeln nachgewiesen und ihre Persistenz war von der vorherigen Konzentration im Serum der Sau abhängig. Es besteht hingegen die geringe Möglichkeit, dass die nachgewiesenen Antikörper auch auf eine frühe Infektion der Saugferkel zurückzuführen sein könnten, da über eine nasale Ausscheidung der Sauen *M. hyopneumoniae* übertragen wird (CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000). Dies ist jedoch in der vorliegenden Untersuchung eher unwahrscheinlich, da einerseits der Antikörperverlauf für eine späte Infektion spricht und andererseits eine Erhebung von NATHUES et al. (2010) eine niedrige Prävalenz von *M. hyopneumoniae* Infektionen im Saugferkelalter in Deutschland belegt. Hierbei konnte der Erreger nur bei 2,0 % der Tiere im Lungengewebe mittels molekularbiologischen

Untersuchungen nachgewiesen werden (NATHUES et al., 2010).

Vier Wochen nach der Vakzination waren die mittleren Antikörpertiter der M+PAC[®]-Gruppe signifikant höher als jene der Placebo- sowie der M Hyo ID ONCE-Gruppe und auch der Anteil seropositiver Tiere lag mit 74 % signifikant über jenem der beiden Vergleichsgruppen (0 % - 12 %). Dieser Anstieg der mittleren Antikörpertiter der intramuskulär geimpften Tiere spricht für eine Reaktion auf die Vakzination und wurde auch in anderen Studien beobachtet (THACKER et al., 2000a; SIUGZDAITE et al., 2003; METTLER, 2009). Dieses Phänomen konnte hingegen in der intradermalen Impfgruppe der vorliegenden Arbeit und bei einer weiteren two-shot Vakzination in der ersten und vierten Lebenswoche (SCHREIBER, 2002) nicht festgestellt werden. ZIMMERMANN (2012) beobachtete ebenfalls nur einen geringen Anteil von 7,9 % - 8,1 % seropositiver Tiere sechs bis acht Wochen nach einer intramuskulären one-shot *M. hyopneumoniae* Vakzination in der ersten Lebenswoche. Jedoch lässt diese niedrige humorale Immunantwort nach der Impfstoffapplikation keinen Rückschluss auf die Effektivität der Vakzination zu, da in einer Erhebung von LILLIE (2004) nach einer one-shot Impfung in der ersten Lebenswoche ebenfalls kein Anstieg der Antikörpertiter nach Impfung auftrat, obwohl die Wirksamkeit der Vakzination anhand von gesteigerten Mastleistungen und einer Minderung des Lungenscores belegt wurde.

Vier Wochen nach der Injektion waren alle ungeimpften Tiere seronegativ. Demgegenüber waren drei Tiere, die mit Porcilis[®] M Hyo ID ONCE geimpft wurden, seropositiv. Dies führte dazu, dass die M Hyo ID ONCE-Gruppe signifikant höhere mittlere Antikörpertiter gegenüber der Placebogruppe aufwies. Dies gilt gleichermaßen für den Zeitpunkt 12 Wochen *post injectionem*.

Am Ende der Mastphase hingegen waren alle Tiere der verschiedenen Studiengruppen seropositiv. Der in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesene konstante Anstieg der mittleren Antikörpertiter sowie die steigende Anzahl seropositiver Tiere zwischen den Zeitpunkten 12 Wochen *post injectionem* und dem Mastende lassen auf eine Infektion zwischen der 19. und 21. Lebenswoche schließen. Da spezifische Antikörper drei bis fünf Wochen nach einer *M. hyopneumoniae* Infektion im Serum nachweisbar sind und bis 15 Wochen *post infectionem* persistieren können (SORENSEN et al., 1993; OKADA et al., 2005). Die im vorliegenden Studienbetrieb stattgefundene Feldinfektion hat

einen erneuten Antigenkontakt zur Folge, welcher eine Stimulierung der durch die Vakzination gebildeten B- und T-Gedächtniszellen bewirkt (AHMED & GRAY, 1996; MURPHY, 2012c). Dieser Booster Effekt der Feldinfektion erklärt die signifikant höheren mittleren Antikörpertiter, sowie die höhere Anzahl seropositiver Tiere der M+PAC[®]-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe. Eine Steigerung der Antikörpertiter nach der Infektion wurde bei geimpften Tieren ebenfalls von REYNOLDS et al. (2009) nachgewiesen. Zudem bestätigt die signifikant höhere Anzahl seropositiver Tiere der M+PAC[®]-Gruppe, verglichen zur Placebogruppe, eine Untersuchung von MARTELLI et al. (2006) wobei die Ferkel einmalig in der ersten Lebenswoche geimpft wurden als auch eine Erhebung von VILLARREAL et al. (2012) bei der die Ferkel verschiedene two-shot *M. hyopneumoniae* Impfstoffe erhielten.

Des Weiteren wiesen in der vorliegenden Untersuchung die intradermal geimpften Tiere am Ende der Mast keine signifikant höheren Antikörpertiter gegenüber den ungeimpften Tieren auf. Zusätzlich konnte, wie in Feldstudien von BACCARO et al. (2006) und SIBILA et al. (2007), kein Unterschied des Prozentsatzes seropositiver Tiere zwischen vakzinierten und ungeimpften Tieren kurz vor der Schlachtung nachgewiesen werden. Neben der erwähnten fehlenden Serokonversion nach der intradermalen Impfstoffapplikation scheint auch die Anzahl seropositiver Tiere und die Höhe der gemessenen Antikörpertiter am Ende der Mastphase keine direkte Aussage über die Protektivität der Vakzine zuzulassen, da in einer Studie von DEL POZO SACRISTÁN et al. (2014) eine einmalige, intramuskuläre Vakzination gegen *M. hyopneumoniae* zur einer signifikanten Reduktion der Lungenläsionen führte, obwohl nur ein geringer Anteil von 6,9 %- 8,6 % der vakzinierten Tiere in der Mitte der Mastperiode seropositiv war (DEL POZO SACRISTÁN et al., 2014). Zusätzlich konnte in Untersuchungen von DJORDJEVIC et al. (1997) und THACKER et al. (1998) keine Korrelation zwischen der Höhe der induzierten Antikörpertiter im Serum und der Protektivität einer Impfung in Bezug auf die Reduktion von Lungenläsionen nachgewiesen werden.

Außerdem zeigt der Vergleich der beiden vorliegenden Impfgruppen, dass die intramuskuläre Injektion von M+PAC[®] gegenüber der intradermalen Applikation von Porcilis[®] M Hyo ID ONCE signifikant höhere mittlere Antikörpertiter induzierte. Entgegen diesen Ergebnissen beobachteten JONES et al. (2005), dass

eine intradermale Impfung gegen *M. hyopneumoniae* in einer experimentellen Studie signifikant höhere Antikörpertiter hervorrief, als eine intramuskuläre Applikation derselben Vakzine. In anderen *M. hyopneumoniae* Impfstoffstudien, induzierten hingegen beide Applikationswege vergleichbare Antikörpertiter (HOUSER et al., 2004; MARTELLI et al., 2014). Eine mögliche Erklärung für die in der vorliegenden Studie niedrigeren mittleren Antikörpertiter nach der Injektion von Porcilis® M Hyo ID ONCE liegt in der intradermalen Applikationsmethode. Eine intradermale Impfung stimuliert die Langerhans-Zellen und die dermalen dendritischen Zellen als antigenpräsentierende Zellen (COMBADIÈRE & LIARD, 2011) und aktiviert neben den gemessenen systemischen Immunglobulinen auch andere Pfeiler der Immunantwort. Nach einer intradermalen Impfung gegen *M. hyopneumoniae* wurde eine, mit einer intramuskulären Impfung vergleichbare, Konzentration an IgA sowie eine stärkere Genexpression von IL-10 in der BAL-Flüssigkeit nachgewiesen. Dies spricht einerseits für eine Induktion der lokalen humoralen Immunität, welche die Adhäsion des Erregers verhindern könnte und andererseits für die Verstärkung der spezifischen zellulären Immunantwort, die sich in einem Anstieg der IFN- γ sezernierenden Zellen im Blut widerspiegelt (MARTELLI et al., 2014). Diese Aktivierung der zellulären Immunität gilt als besonders wichtig für die Schutzwirkung einer *M. hyopneumoniae* Vakzine (THACKER et al., 2000a).

2.2. Gewichtsentwicklung

Die durchgeführte Randomisierung stellte sicher, dass zu Studienbeginn kein signifikanter Unterschied zwischen den mittleren Körpergewichten der Studiengruppen bestand. Bis zum Ende der Aufzuchtphase konnte kein signifikanter Unterschied der mittleren täglichen Zunahmen zwischen den Studiengruppen festgestellt werden. Bei Untersuchungen von METTLER (2009), DEL POZO SACRISTÁN et al. (2014) und KRISTENSEN et al. (2014) unterschieden sich geimpfte und ungeimpfte Tiere ebenfalls nicht in ihrer Gewichtszunahme während der Aufzuchtperiode. Den serologischen Ergebnissen der vorliegenden Studie entsprechend, war ein Einfluss der Vakzine auf die Gewichtsentwicklung der Tiere erst in der Mastphase zu erwarten. Die Ermittlung der mittleren Körpergewichte der einzelnen Vakzinegruppen zeigte, dass geimpfte Tiere im Vergleich zu den Placebotieren am Mastende signifikant schwerer waren. Die one-shot vakzinierten Tiere der vorliegenden Untersuchung hatten bis

zu 5,2 kg höhere Endmastgewichte gegenüber den Placebotieren. Diese Zuwachsleistung ist mit jener nach einer two-shot Vakzination vergleichbar, wobei kurz vor der Schlachtung 4 kg bis 6 kg höhere Endmastgewichte bei vakzinierten Tieren gegenüber ungeimpften Tieren nachgewiesen werden konnten (SIUGZDAITE et al., 2003; TZIVARA et al., 2007). Jedoch bleibt zu beachten, dass diese two-shot geimpften Tiere teils eine vergleichbare teils eine verlängerte Mastperiode gegenüber den Tieren der vorliegenden Studie aufwiesen.

In Bezug auf die täglichen Zunahmen zeigte eine Meta-Analyse über Impfstoffstudien der neunziger Jahre, dass vakzinierte Tiere im Mittel 21 g höhere tägliche Zunahmen hatten als ungeimpfte Tiere (JENSEN et al., 2002). Eine Steigerung der mittleren Tageszunahmen um 23 g (DAWSON et al., 2002), sowie der Mastleistung nach einmaliger, intramuskulärer *M. hyopneumoniae* Vakzination konnte weiterhin durch METTLER (2009) und WILSON et al. (2012) belegt werden. In der vorliegenden Arbeit hatten die mit M+PAC[®] geimpften Tiere im Mittel 36 g höhere tägliche Zunahmen während des gesamten Studienzeitraums. Im Hinblick auf eine intradermale Applikation führte in einer Feldstudie von TASSIS et al. (2012) eine einmalige Impfung von Ferkeln ab dem 28. Lebenstag zu einer um 23 g signifikant höheren täglichen Zuwachsleistung gegenüber ungeimpften Kontrolltieren. Dieser Einfluss einer intradermalen Vakzination gegen *M. hyopneumoniae* auf die Gewichtsentwicklung zeigte sich ebenfalls in der vorliegenden Studie, so wiesen die mit Porcilis[®] M Hyo ID ONCE geimpften Tiere gegenüber der Placebogruppe über den gesamten Studienzeitraum gesehen 28 g höhere tägliche Zunahmen auf. Weitere nicht-infektiöse Faktoren, die Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Tiere nehmen wie die Genetik, das Geschlecht und die Fütterung spielen in der vorliegenden Arbeit keine Rolle, da alle Studientiere von einer Zuchtlinie abstammten, die Randomisierung nach Geschlecht durchgeführt wurde und alle Tiere dasselbe Futter erhielten.

Demgegenüber führte in einer Untersuchung von DEL POZO SACRISTÁN et al. (2014) eine intramuskuläre Impfung am 21. Lebenstag zu keiner signifikanten Mastleistungssteigerung im Vergleich zur Kontrollgruppe. In weiteren Feldstudien konnte durch eine einmalige Impfung um die vierte Lebenswoche ebenfalls keine signifikante Verbesserung der Mastleistungsdaten nachgewiesen werden (BACCARO et al., 2006; KRISTENSEN et al., 2014). Diese kontroversen

Ergebnisse des Einflusses einer Vakzination gegen *M. hyopneumoniae* auf die Gewichtsentwicklung der Tiere verdeutlichen, dass der Erfolg einer Impfung gemessen an den Mastleistungssteigerungen, durch multiple Faktoren wie dem Management, dem Impf- und Infektionszeitpunkt, dem Infektionsdruck sowie dem Vorliegen von Koinfektionen in der Herde beeinflusst wird.

Hervorzuheben bleibt, dass zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der mittleren Gewichte und Tageszunahmen zwischen den Tieren beider Vakzinegruppen bestanden. In einer vergleichbaren Studie von TASSIS et al. (2012) wurden ebenfalls nach einer *M. hyopneumoniae* Impfung keine Unterschiede zwischen beiden Applikationsmethoden in Bezug auf die Mastleistungsdaten berichtet.

Abschließend bleibt für die vorliegende Feldstudie angesichts der Gewichtsentwicklung der Tiere festzuhalten, dass die Applikation beider Impfstoffe zu Mastleistungssteigerungen gegenüber der Placebogruppe führte. Zudem sind die hier festgestellten Zuwachsleistungen vor dem Hintergrund zu sehen, dass alle Studientiere in einem Stallabteil gemeinsam mit weiteren 280 nicht vakzinierten Tieren aufgestellt waren. Dies führte zu einem höheren Infektionsdruck als unter üblichen Produktionsbedingungen, wo typischerweise alle Tiere eines Mastdurchganges geimpft werden. Somit lässt sich vermuten, dass es bei einer geschlossenen Impfdecke zu einer größeren Leistungssteigerung durch die Vakzination kommen könnte.

2.3. Mastdauer und Körpergewichte zum ersten Schlachtermin

Die beiden Vakzinegruppen hatten eine um 1,6 - 1,7 Tage signifikant verkürzte mittlere Mastdauer gegenüber der Placebogruppe. Diese verkürzte Mastdauer zeigte sich darin, dass signifikant mehr Tiere beider Vakzinegruppen beim ersten Termin geschlachtet wurden. In einer Untersuchung von CHARLIER et al. (1993) erreichten two-shot geimpften Tiere 2,1 Tage, sowie in einer Studie von MAES et al. (1999b) bis fünf Tage schneller ein Gewicht von 100 kg gegenüber ungeimpften Tieren. LE GRAND und KOBISCH (1996) konnten nach einer two-shot Impfung eine mittlere Reduktion der Mastdauer um 2,4 Tage feststellen, welche mit jener in der vorliegenden Arbeit gefundenen Verkürzung vergleichbar ist. In der vorliegenden Studie wird die Verkürzung der Mastperiode der beiden Vakzinegruppen zusätzlich anhand der signifikant höheren Tageszunahmen der

geimpften Tiere in der Mastphase und der höheren mittleren Körpergewichte, einen Tag vor dem ersten Schlachtermin, belegt.

Die Körpergewichte der vakzinierten Tiere zum ersten Schlachtermin betragen im Mittel zwischen 119,0 kg und 119,4 kg. Im Vergleich wogen die Tiere der Placebogruppe durchschnittlich 113,4 kg. Wenngleich dieser Unterschied nicht signifikant war, wiesen die geimpften Tiere tendenziell höhere mittlere Körpergewichte auf. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Kontrolltiere im Mittel deutlich leichter geschlachtet wurden als die Tiere beider Impfgruppen. Dies impliziert, dass die Kontrolltiere der ersten Schlachtpartie teilweise vor Erreichen des angestrebten Endmastgewichtes von 120 kg verkauft wurden. Dass sich diese Differenzen nicht statistisch signifikant unterscheiden, könnte sich durch die große Standardabweichung von 16,7 kg innerhalb der Placebogruppe und die geringeren Tierzahlen innerhalb der drei Studiengruppen erklären.

2.4. Lungenbefunde am Schlachthof

Die makroskopischen Lungenveränderungen einer chronischen Enzootischen Pneumonie (EP) sind durch violett bis graue Konsolidierungen der cranio-ventralen Anteile der Lunge gekennzeichnet (THACKER & MINION, 2012). Für die Erfassung und Quantifizierung dieser EP-typischen Veränderungen wurde ein Lungenscore am Schlachthof erhoben. Dieser gibt den prozentualen Anteil der Lungenveränderungen am gesamten Lungengewebe wider. Die Beurteilung der Lungenscores der vorliegenden Studie ergab signifikant niedrigere durchschnittliche Werte bei den Vakzinegruppen im Vergleich zur Placebogruppe. Mit Porcilis[®] M Hyo ID ONCE geimpfte Tiere hatten einen mittleren Lungenscore von 2,51 % gegenüber der Placebogruppe mit 4,27 %. Eine signifikante Reduktion des mittleren Lungenscore nach einer einmaligen Impfung gegen *M. hyopneumoniae* konnte auch in anderen Studien belegt werden (DAWSON et al., 2002; BACCARO et al., 2006; REYNOLDS et al., 2009; WILSON et al., 2012). Bei KRISTENSEN et al. (2014) führte eine Vakzination mit M+PAC[®] in der vierten Lebenswoche ebenfalls zu einem niedrigeren mittleren Lungenscore im Vergleich zu einer Placebogruppe. In der vorliegenden Arbeit wurden die EP-typischen Lungenläsionen zusätzlich anhand ihres Schweregrades in Kategorien eingeteilt. Hierbei zeigte sich, dass geimpfte Tiere signifikant weniger Lungenläsionen entwickelten. Insgesamt traten bei 31,3 % der mit Porcilis[®] M Hyo ID ONCE und bei 16,1 % der mit M+PAC[®] geimpften Tiere

keine Veränderungen auf. Demgegenüber wiesen nur 7,7 % der ungeimpften Tiere Lungen ohne makroskopisch sichtbare Veränderung auf. Betrachtet man die Gruppen mit über 5 % Veränderungen wird deutlich, dass hier die ungeimpften Tiere, verglichen mit den beiden vakzinierten Gruppen, stärker vertreten waren. Eine Reduktion der Prävalenz von Lungenläsionen konnte auch in Studien von REYNOLDS et al. (2009) und WILSON et al. (2012) nach einer einmaligen *M. hyopneumoniae* Impfung in der ersten Lebenswoche beobachtet werden. Insgesamt wurden in der Erhebung von WILSON et al. (2012) bei 18 % der vakzinierten Tiere keine Läsionen gefunden, im Vergleich zu 6,7 % der Placebotiere. Nach einer einmaligen Vakzination mit M+PAC® in der vierten Lebenswoche beobachteten KRISTENSEN et al. (2014) ebenfalls eine Reduktion der Anzahl der Tiere mit Lungenläsionen. Die Vakzination mit einem anderen *M. hyopneumoniae* Impfstoff konnte jedoch die Prävalenz und den mittleren Lungenscore gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant reduzieren (KRISTENSEN et al., 2014).

Die in der vorliegenden Arbeit bestehende Reduktion der Prävalenz von EP-typischen Lungenläsionen vakzinierter Tiere zusammen mit deren verbesserten Tageszunahmen gegenüber ungeimpften Tieren unterstützen Ergebnisse von PAGOT et al. (2007) die zeigten, dass eine negative Korrelation zwischen den Gewichtszunahmen und der Prävalenz von Lungenläsionen besteht. Zudem zeigte die Erhebung in Frankreich einen Zusammenhang zwischen dem Schlachalter und dem Grad der beobachteten Lungenläsionen (PAGOT et al., 2007). Vergleichsweise konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass vakzinierte Tiere gegenüber den ungeimpften Kontrolltieren signifikant niedrigere mittlere Lungenscores aufwiesen und zugleich eine signifikant kürzere Mastperiode hatten.

Weiterhin zeigte sich in der vorliegenden Studie, beim Vergleich der beiden Impfgruppen, dass die intradermal geimpften Tiere (2,51 %) einen signifikant niedrigeren durchschnittlichen Lungenscore gegenüber den intramuskulär geimpften Schweinen (3,72 %) aufwiesen. Dies könnte auf die unterschiedliche Applikationsart zurückzuführen sein. Eine intradermale Injektion aktiviert die epidermalen Langerhans- und die dermalen dendritische Zellen (COMBADIÈRE & LIARD, 2011), welche als antigenpräsentierende Zellen einerseits über eine Stimulierung der T-Zellen die erworbene, zelluläre Immunantwort sowie

andererseits über B-Lymphozyten die humorale Immunantwort initiieren (CHASE & KUNNEY, 2012). Nach einer intradermalen Impfung gegen *M. hyopneumoniae* konnte eine signifikant höhere Genexpression von IL-10 in der BAL-Flüssigkeit gegenüber intramuskulär- und ungeimpften Tieren nachgewiesen werden (MARTELLI et al., 2014). Dies könnte einerseits für eine verstärkte lokale humorale, als auch andererseits für eine Blockierung der überschießenden Zytokinexpression sprechen (MARTELLI et al., 2014). In einer weiteren Studie von FERRARI et al. (2011) induzierte eine intradermale Impfstoffapplikation gegen das Suid Herpesvirus Typ-1 (SHV-1), im Vergleich zur intramuskulären Applikation, zwei Wochen nach der Boosterimpfung, eine verstärkte Stimulierung der zytotoxischen CD8 β ⁺ T-Zellen und eine schnellere Erhöhung der regulierenden CD25⁺ Zellen. In anderen Untersuchungen führte eine intradermale Impfstoffapplikation neben einer vergleichbaren lokalen und systemischen humoralen- sowie zellulären Immunantwort (MARTELLI et al., 2014) teilweise zu einer verstärkten Stimulation der zellulären Immunantwort gegenüber einer intramuskulären Vakzination (MARTELLI et al., 2009; FERRARI et al., 2011). Die verstärkte zelluläre Immunantwort war beispielsweise durch höhere Konzentrationen von IFN- γ sezernierenden Zellen und natürlichen Killerzellen im Blut gekennzeichnet (MARTELLI et al., 2009).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine erhebliche genetische Varianz zwischen *M. hyopneumoniae* Stämmen (FREY et al., 1992) innerhalb und zwischen verschiedenen Herden (STAKENBORG et al., 2005a; CHARLEBOIS et al., 2014) besteht und dass teilweise weniger als 55 % Homologie zwischen Impf- und Feldstämmen gefunden wird (CHARLEBOIS et al., 2014). Neben der Varianz auf Genomebene zeigte sich ebenfalls eine Heterogenität des Proteoms zwischen verschiedenen Herden (CALUS et al., 2007). Weiterhin beobachteten VILLARREAL et al. (2011b), dass eine Vakzination, je nach Virulenz des zirkulierenden Stammes, eine unterschiedlich stark ausgeprägte Protektion in Bezug auf die klinischen Symptome und die Lungenläsionen induzierte. Somit könnte der verbesserte Lungenscore der M Hyo ID ONCE-Gruppe auch anhand des verwendeten Impfstoffes erklärt werden. Der Impfstamm von Porcilis[®] M Hyo ID ONCE (Stamm 11) könnte einen genetisch höheren Verwandtschaftsgrad mit jenem in der Studienpopulation zirkulierenden *M. hyopneumoniae* Stamm haben und somit eine stärkere Protektion hervorrufen,

als der J-Stamm von M+PAC®.

Darüber hinaus ergab die Verteilung der aufgetretenen Pleuritiden keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Studiengruppen. Bei 14,1 % der intradermal, bei 11,7 % der intramuskulär geimpften Tiere und 14,6 % der Placebotiere wurden Pleuritiden am Schlachthof festgestellt. In Belgien wurde eine ähnliche Prävalenz und Verteilung von Pleuritiden nach einer einmaligen Vakzination am 21. Lebenstag erhoben. Hierbei traten bei 11,6 % der geimpften und bei 12,3 % der nicht geimpften Tieren Pleuritiden auf (DEL POZO SACRISTÁN et al., 2014). Diese Ergebnisse gehen damit einher, dass Pleuritiden nicht primär zu den makroskopisch sichtbaren Veränderungen nach einer *M. hyopneumoniae* Infektion zählen (THACKER & MINION, 2012; GROSSE BEILAGE et al., 2013).

Zusammenfassend bedeutet dies, dass die intradermale Vakzination mit Porcilis® M Hyo ID ONCE sowohl gegenüber ungeimpften Tieren, als auch gegenüber intramuskulär mit M+PAC® vakzinierten Tieren, zu einer signifikanten Reduktion der Prävalenz und des Grades EP-typischer Lungenläsionen führte.

2.5. Molekularbiologische Diagnostik

Die am Schlachthof entnommenen Lungenproben wurden mittels q-PCR auf *M. hyopneumoniae* untersucht. Der Erreger wurde sowohl bei Tieren der Placebo- als auch bei Tieren beider Vakzinegruppen nachgewiesen. Anhand dieses direkten Nachweises *M. hyopneumoniae* spezifischer Genomfragmente in Kombination mit den makroskopischen Lungenveränderungen und der Serokonversion der Tiere in der Endmast konnte die Relevanz von *M. hyopneumoniae* im vorliegenden Betrieb zum Zeitpunkt der Studiendurchführung belegt werden.

In der M Hyo ID ONCE-Gruppe wurde bei fünf von insgesamt 26 Tieren, in der M+PAC®-Gruppe bei sieben von 27 beprobten Tieren *M. hyopneumoniae* aus Lungengewebe nachgewiesen. Demgegenüber konnte bei neun der 22 untersuchten Tiere der Kontrollgruppe der Erreger im Lungengewebe gefunden werden. Eine Feldstudie von HILLEN et al. (2014) belegt, dass auch bei vakzinierten Tieren zum Zeitpunkt des Schlachtens *M. hyopneumoniae* aus Lungengewebe mittels q-PCR nachweisbar war und der Erregernachweis mit dem Grad der makroskopischen und histopathologischen Veränderungen korrelierte. In der vorliegenden Studie ergab der Häufigkeitsvergleich der q-PCR-positiven

Lungenproben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen. DEL POZO SACRISTÁN et al. (2014) konnten bei geimpften Tieren eine numerische Reduzierung der Nachweisrate von *M. hyopneumoniae* gegenüber ungeimpften Tieren mittels n-PCR aus BAL-Flüssigkeit nachweisen. Auch bei SIBILA et al. (2007) konnte bei der Nachweisrate von *M. hyopneumoniae* aus Bronchialtupfern kein Unterschied zwischen vakzinierten und ungeimpften Endmasttieren festgestellt werden, jedoch wurde bei vakzinierten Tieren eine geringere Prävalenz des Erregers im oberen Respirationstrakt gefunden. Ebenso wiesen BACCARO et al. (2006) nach einer one-shot Vakzination eine Reduzierung der Anzahl an *M. hyopneumoniae* positiven Tonsillentupfer zu Mastende nach. Insgesamt belegen diese Ergebnisse, dass eine Vakzination weder vor einer Kolonisation schützt, noch zu einer vollständigen Erregerelimination führt, so konnte *M. hyopneumoniae* in anderen Studien ebenfalls bei vakzinierten Tieren, sowohl aus BAL-Flüssigkeit, Bronchialtupfern als auch aus Lungenproben, mittels n-PCR nachgewiesen werden (MEYNS et al., 2006; SIBILA et al., 2007; PIETERS et al., 2010; VILLARREAL et al., 2011a; FREY, 2014). Diese Feststellungen können durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Angesichts der Erregermenge in den Lungenproben der vorliegenden Arbeit ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Studiengruppen. Eine Reduktion der mittleren Erregermenge durch eine Vakzination in der dritten Lebenswoche konnte somit nicht festgestellt werden. Mit diesen Ergebnissen einhergehend konnten VRANCKX et al. (2012a) bei geimpften Tieren gegenüber ungeimpften Tieren, nach einer experimentellen Infektion mit niedrig- und hochpathogenen *M. hyopneumoniae* Stämmen, keine signifikante Reduktion der Erregermenge mittels q-PCR in der BAL-Flüssigkeit nachweisen. Im Gegensatz dazu konnte bei OKADA et al. (1999) nach einer two-shot Vakzination neben einer Verringerung der Lungenläsionen ebenfalls eine signifikante Reduktion der Erregerlast im Lungengewebe mittels bakteriologischer Untersuchung nachgewiesen werden, wenngleich die Impfung die Kolonisation nicht verhindern konnte. In einer weiteren Studie von WOOLLEY et al. (2013) wurde nach einer experimentellen Infektion eine geringere bakterielle Last der Tracheobronchialflüssigkeit mittels q-PCR bei vakzinierten gegenüber ungeimpften Tieren nachgewiesen. Zudem konnte nach

einer einmaligen Kombinationsimpfung gegen *M. hyopneumoniae* und PCV2 ebenfalls eine signifikante Reduzierung der Erregerlast in Nasentupfern nach experimenteller Infektion nachgewiesen werden (KIM et al., 2011).

Eine mögliche Erklärung warum keine statistisch signifikante Reduktion der mittleren Erregerlast nach Vakzination festzustellen ist, liegt in der im Vergleich zur Studie von OKADA et al. (1999) mit > 85 % positiven Lungenproben, relativ geringen Anzahl positiver Proben in der vorliegenden Arbeit (>19 %). Weiterhin wurden die Lungenproben stets am Übergang von unverändertem zu verändertem Gewebe entnommen. Die nachgewiesene vergleichbare Erregerlast bei geimpften und ungeimpften Tieren in der vorliegenden Studie könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Erregerlast an *M. hyopneumoniae* innerhalb des veränderten Gewebes nicht durch die Impfung beeinflusst wird. Betrachtet man zusätzlich die mittleren Lungenscores, kam es zu einer signifikanten Reduzierung der Fläche des betroffenen Lungengewebes. Somit könnte man schlussfolgern, dass die Vakzination keinen direkten Einfluss auf die Erregerlast im veränderten Gewebe hat, sondern vielmehr zur Eingrenzung des flächenhaften Umfangs der Lungenläsionen beiträgt.

3. Mortalität

Bis zur Schlachtung verendeten 13 Tiere und eines wurde aus Tierschutzgründen getötet. Davon gehörten jeweils fünf Tiere zu den beiden Vakzinegruppen und vier Tiere zur Placebogruppe. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Mortalität zwischen den Studiengruppen. Dies bestätigt die Ergebnisse weiterer Feldstudien, die ebenfalls keinen Einfluss der Vakzination gegen *M. hyopneumoniae* auf die Mortalität nachweisen konnten (KYRIAKIS et al., 2001; METTLER, 2009; HERBICH et al., 2013; KRISTENSEN et al., 2014). Zudem verendete keines der Tiere in einem kurzen zeitlichen Abstand nach der Injektion der Vakzine, was eine anaphylaktische Schockreaktion ausschließen lässt. Neben Erdrückungsverlusten wurden die Verdachtsdiagnosen Enteritis, Arthritis und Traumata gestellt. Abschließend kann hieraus die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Todesfälle sehr wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit der Applikation beider Impfstoffe stehen.

VI. SCHLUSSFOLGERUNG

In der vorliegenden Studie wurde die Sicherheit und Wirksamkeit einer nadellosen, intradermalen Vakzination von Ferkeln im Alter von 21 (+3) Tagen mit dem Inaktivimpfstoff Porcilis® M Hyo ID ONCE unter den in Deutschland üblichen Produktionsbedingungen evaluiert.

Als Sicherheitsparameter wurde mitunter die lokale Hautreaktion an der Injektionsstelle beurteilt. Eine intradermale, nadellose Impfstoffapplikation führte zu größeren, härteren und vermehrt geröteten u./ o. wärmeren Hautreaktionen, als die alleinige Injektion des Adjuvans. Die größten Veränderungen hatten einen Durchmesser von 1,5 cm. Die weitere Evaluierung der Verträglichkeit des Impfstoffes anhand der klinischen Untersuchungen, der Temperaturverlaufskontrollen und der Mortalität ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Applikation der Vakzine oder der alleinigen Injektion des Adjuvans. Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung und der lokalen Hautreaktion an der Injektionsstelle lassen den Schluss zu, dass die nadellose, intradermale Vakzination als sicher zu bewerten ist.

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen mit einer Serokonversion zum Ende der Mastphase, gemeinsam mit den makroskopischen Lungenläsionen und dem direkten Erregernachweis aus Lungengewebe, sprechen für eine Belastung der Tiere durch *M. hyopneumoniae* im Laufe des Untersuchungszeitraumes. Sowohl die Anzahl der Tiere mit makroskopisch sichtbaren Lungenläsionen als auch die Ausdehnung dieser Läsionen wurde durch die Impfung signifikant reduziert. In der Mastphase und über den gesamten Studienzeitraum hatten geimpfte Tiere signifikant höhere mittlere tägliche Zunahmen. Die dementsprechend signifikant höheren mittleren Endmastgewichte vakzinierter Tiere gehen mit einer signifikanten Verkürzung der Mastperiode einher. Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass eine einmalige Vakzination in der dritten Lebenswoche selbst bei einem späten Infektionszeitpunkt, einen belastbaren Schutz bis zum Mastende aufrechterhalten konnte.

Als Fazit bleibt festzuhalten, dass eine einmalige nadellose, intradermale Vakzination mit dem Inaktivimpfstoff Porcilis® M Hyo ID ONCE mittels IDAL Vakzinators als sicher und wirksam einzustufen ist.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Sicherheit und Wirksamkeit der nadellos, intradermal applizierten one-shot Vakzine Porcilis® M Hyo ID ONCE (Intervet Deutschland GmbH, ein Unternehmen der MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim, Deutschland) gegen *M. hyopneumoniae* unter Feldbedingungen in Deutschland zu beurteilen.

Hierfür wurde ein geschlossener Betrieb mit 1000 Zuchtsauen in Nordostdeutschland, welcher bis zu Studienbeginn keine Vakzination gegen den Erreger einsetzte, ausgewählt. In den Voruntersuchungen wurde *M. hyopneumoniae* sowohl direkt mittels q-PCR aus Lungengewebsproben als auch indirekt mittels serologischer Diagnostik nachgewiesen. 420 gesunde Saugferkel wurden im Alter von 21 (+3) Tagen in die Studie eingeschlossen und randomisiert in zwei Vakzine- und zwei Kontrollgruppen eingeteilt. Für die Wirksamkeitsparameter wurden die beiden Kontrollgruppen zu einer Placebogruppe zusammengeschlossen. Die Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe erhielten einmalig, nadellos mit dem IDAL Gerät, 0,2 ml Porcilis® M Hyo ID ONCE intradermal. Der zugehörigen intradermalen Kontrollgruppe wurde 0,2 ml Diluvac® Forte nadellos appliziert. Die Tiere der M+PAC®-Gruppe erhielten einmalig, intramuskulär 2 ml M+PAC® mittels Kanüle und der intramuskulären Kontrollgruppe wurde 2 ml Diluvac® Forte mit der Kanüle injiziert. Als Applikationsstelle diente die seitliche Nackenregion am Ohrgrund. Zur Evaluierung der Sicherheit des Impfstoffes wurden 20 % der Studientiere einer Safety-Gruppe zugeteilt. Diese Tiere wurden nach der Injektion täglich sieben Tage klinisch untersucht und eine aufgetretene lokale Hautreaktion beurteilt. Bei den Tieren der Safety-Gruppe wurde vor und nach der Applikation sowie an den folgenden vier Tagen die innere Körpertemperatur gemessen. Für den Nachweis von *M. hyopneumoniae* Antikörpern wurden von diesen Tieren Blutproben an Tag 0, vier und zwölf Wochen nach Studienbeginn sowie am Ende der Mast gewonnen. Zur Überprüfung der Wirksamkeit wurden die Gewichte der Tiere an den Studientagen T 0, T 55 und T 145 erhoben und der prozentuale Anteil des makroskopisch veränderten Lungengewebes jedes Lungenlappens am Schlachthof beurteilt. Zur Ermittlung der Belastung der Tiere mit *M. hyopneumoniae* während des Studienzeitraumes wurde bei den Tieren der

Safety-Gruppe ein direkter Erregernachweis aus Lungengewebe mittels q-PCR durchgeführt.

Die Ergebnisse der klinischen Untersuchungen nach der Injektion ergaben keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Auftretens und der Ausprägung der klinischen Symptome zwischen den Kontroll- und Vakzinegruppen. Eine nadellose, intradermale Vakzination rief lokale Hautreaktionen hervor, die signifikant größer, härter und geröteter u./ o. wärmer waren als jene nach alleiniger intradermaler Applikation des Adjuvans. Die Gegenüberstellung der zwei Verabreichungswege von Diluvac[®] Forte als Placebo mittels nadelloser, intradermaler Applikation und intramuskulärer Injektion mittels Kanüle, ergab keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit und Ausprägung sichtbarer und palpierbarer lokaler Hautreaktionen. Nach der Applikation von Porcilis[®] M Hyo ID ONCE wurden signifikant größere und härtere lokale Hautreaktionen beobachtet als nach der Injektion von M+PAC[®]. Zudem persistierten die Hautreaktionen nach intradermaler Impfstoffapplikation signifikant länger. Insgesamt waren die beobachteten Hautreaktionen jedoch von geringem Durchmesser bis maximal 1,5 cm und transienter Natur. Nach der Injektion konnte keine Erhöhung der mittleren inneren Körpertemperatur über den physiologischen Bereich hinaus gemessen werden.

Die serologischen Untersuchungen zeigten, dass vier und zwölf Wochen nach der Impfstoffapplikation signifikant weniger Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe im Vergleich zur M+PAC[®]-Gruppe seropositiv waren. Demzufolge konnte in den ersten Wochen nach der intradermalen Vakzination mit Porcilis[®] M Hyo ID ONCE, im Gegensatz zur intramuskulären Impfung mit M+PAC[®], keine Serokonversion nachgewiesen werden. Am Ende der Mastphase waren hingegen alle Tiere unabhängig ihrer Studiengruppe seropositiv. Folglich hatte eine Infektion mit *M. hyopneumoniae* im Laufe des Untersuchungszeitraumes stattgefunden.

Die Mastleistung betreffend, war ein signifikanter Unterschied der mittleren Endmastgewichte von 4,1 kg zwischen den mit Porcilis[®] M Hyo ID ONCE vakzinierten und den ungeimpften Kontrolltieren feststellbar. Zusätzlich waren die mittleren täglichen Zunahmen der vakzinierten Tiere sowohl in der Mastphase, als auch über die gesamte Studienzeit signifikant um 37 g beziehungsweise 28 g höher. Diese verbesserten Tageszunahmen führten dazu,

dass die vakzinierten Tiere gegenüber der Placebogruppe eine um 1,6 Tage verkürzte Mastperiode hatten. Diese Wirksamkeitsparameter betreffend, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Vakzinegruppen.

Bezüglich der EP-typischen Lungenläsionen, reduzierte die Impfung mit Porcilis® M Hyo ID ONCE signifikant den prozentualen Anteil des makroskopisch veränderten Lungengewebes im Vergleich zur ungeimpften Kontrollgruppe. Folglich hatten signifikant mehr Tiere der M Hyo ID ONCE-Gruppe (31,3 %) makroskopisch unveränderte Lungen, als Tiere der Placebogruppe (7,7 %). Zusätzlich kam es zu einer signifikanten Reduktion des mittleren Lungenscores der M Hyo ID ONCE-Gruppe im Vergleich zur M+PAC®-Gruppe. Die Untersuchung der Lungenproben der Safety-Gruppe mittels q-PCR lieferte einen direkten Nachweis von *M. hyopneumoniae*. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen bezüglich der Häufigkeit des Nachweises und der Erregerlast gefunden werden. Die Anzahl verendeter oder getöteter Tiere im Verlauf der Studie unterschied sich nicht signifikant zwischen den Studiengruppen, zudem war kein direkter Zusammenhang zwischen der Impfstoffapplikation und dem Versterben eines Tieres gegeben.

Die Gegenüberstellung beider Impfstoffe zeigte, dass es nach der Applikation zu einer Steigerung der Mastleistungsdaten gegenüber ungeimpften Tieren kam. Zusätzlich konnte nach der intradermalen Applikation von Porcilis® M Hyo ID ONCE eine signifikante Reduktion der Prävalenz und des Grades EP-typischer Lungenläsionen gegenüber der herkömmlichen intramuskulären Vakzination mit M+PAC® nachgewiesen werden.

Abschließend kann die nadellose, intradermale Applikation des Impfstoffes Porcilis® M Hyo ID ONCE bei 21 Tage alten Ferkeln als sicher und wirksam beurteilt werden.

VIII. SUMMARY

The aim of the present study was to assess the safety and efficacy of the intradermal one-shot vaccine Porcilis® M Hyo ID ONCE (Intervet Deutschland GmbH, MSD Animal Health, Unterschleißheim, Germany) against *M. hyopneumoniae* under field conditions in Germany.

The trial was carried out in a commercial 1000 sow farrow-to-finish farm in the north-eastern part of Germany without any recent *M. hyopneumoniae* vaccination. A positive serological *M. hyopneumoniae* status of the finishing herd was proven by ELISA. Examinations of lung samples obtained from pigs at slaughter confirmed the presence of *M. hyopneumoniae* by q-PCR. 420 healthy suckling piglets of 21 (+3) days of age were randomly assigned to two vaccine- and two control groups. To analyse the efficacy parameters, the pigs of the two control groups were united into one control group. The intradermal vaccination group received a single 0.2 ml dose of Porcilis® M Hyo ID ONCE with the needle-free IDAL device. The intradermal control group received 0.2 ml Diluvac® Forte with the needle-free IDAL device. The respective intramuscular vaccination group received a single 2 ml dose M+PAC® by needle and the respective intramuscular control group received 2 ml Diluvac® Forte by needle. The skin or muscles of the lateral neck were used as injection site. 20 % of the piglets were randomly included in a safety-group for the safety assessments in which clinical observations and an injection site reaction score were daily recorded for seven days after vaccination. Furthermore, the rectal temperature was evaluated prior to and for four days after vaccination. Blood samples for serology were collected from these pigs prior to vaccination, four and twelve weeks after vaccination and at the end of finishing. For the efficacy parameters each pig was weighed on day T0, T55 and T145. Furthermore, the percentage of pneumonic lung lesions observed in each lobe was scored at the slaughterhouse. Lung samples of the safety-animals were collected and analyzed by q-PCR for the detection of *M. hyopneumoniae* in lung tissue.

The results of the clinical examinations showed no significant differences concerning the frequency and degree of the observed clinical signs between vaccinated and non-vaccinated groups. After the intradermal vaccination with

Porcilis[®] M Hyo ID ONCE the observed local reactions were significantly larger, harder, warmer and/ or more reddened compared to those after an intradermal application of Diluvac[®] Forte. After an intradermal or intramuscular injection of Diluvac[®] Forte the observed amount and quality of the visible and palpable injection site reactions did not differ significantly between the two control groups. After the injection of Porcilis[®] M Hyo ID ONCE significantly larger and harder local reactions were observed compared to those after the injection of M+PAC[®]. Furthermore, the local reactions persisted significantly longer after the intradermal vaccination. In general, the observed injection site reactions were of minor extent with a maximum diameter of 1.5 cm. The mean rectal temperatures of the vaccinated and unvaccinated piglets remained within the physiological range over the observation period.

Four and twelve weeks after vaccination significantly more pigs of the M+PAC[®]-group were seropositive for *M. hyopneumoniae* compared to the M Hyo ID ONCE-group. These results show that there was no seroconversion during the first weeks after the intradermal vaccination contrary to the intramuscular vaccination with M+PAC[®]. At the end of finishing all pigs were seropositive. Consequently, an infection with *M. hyopneumoniae* had taken place during the course of the study.

At the end of finishing the mean body weight (BDW) was significantly higher (4.1 kg) for the animals of the M Hyo ID ONCE group compared to the animals of the control group. The average daily weight gain (ADWG) of the pigs vaccinated with Porcilis[®] M Hyo ID ONCE was significantly higher within the finishing period (37 g) and over the entire study period (28 g). These improved performance parameters produce a significant reduction of the mean finishing period by 1.6 days for the vaccinated animals compared to unvaccinated animals. Within the animals of the vaccinated groups no significant differences concerning BDW and ADWG were observed.

Analysis of the percentage of pneumonic lung lesions showed a significantly lower mean lung lesion score for the pigs vaccinated with Porcilis[®] M Hyo ID ONCE compared to those of the control group. Hence a significantly higher amount of these vaccinated pigs had lungs without visible lesions (31.3 %) compared to the control group (7.7 %). Moreover, the mean lung lesion score of the M Hyo ID ONCE-group was significantly lower in comparison

to the M+PAC[®]-group. The analysis of lung samples by q-PCR confirmed the presence of *M. hyopneumoniae*. The frequency of q-PCR-positive results and the mean bacterial load did not differ significantly between vaccinated and unvaccinated pigs. No significant difference regarding the mortality rate was observed between the study groups and none of the mortalities was related to the administration of the vaccine.

In conclusion, both vaccinated groups had significantly improved average daily weight gains and mean body weights at the end of finishing compared to the control group. No differences concerning these performance parameters were observed between the vaccinated piglets. Furthermore, an intradermal vaccination of Porcilis[®] M Hyo ID ONCE significantly reduced the mean lung lesion score compared to an intramuscular administration of M+PAC[®].

The study results indicate that an intradermal, needle-free vaccination of piglets at 21 days of age with Porcilis[®] M Hyo ID ONCE is both safe and efficacious.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996; 272: 54-60.

Alexander TJ, Thornton K, Boon G, Lysons RJ, Gush AF. Medicated early weaning to obtain pigs free from pathogens endemic in the herd of origin. *Vet. Rec.* 1980; 106: 114-119.

Almond GW, Roberts JD. Practical application for a needless injection device. 18th Congress of the International Pig Veterinary Society, 2004. Hamburg, Germany. 842.

Ameri M, Zhou EM, Hsu WH. Western blot immunoassay as a confirmatory test for the presence of anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* antibodies in swine serum. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2006; 18: 198-201.

Andreasen M, Nielsen JP, Bækbo P, Willeberg P, Bøtner A. A longitudinal study of serological patterns of respiratory infections in nine infected Danish swine herds. *Prev. Vet. Med.* 2000; 45: 221-235.

Andreasen M, Mousing J, Thomsen LK. No simple association between time elapsed from seroconversion until slaughter and the extent of lung lesions - in Danish swine. *Prev. Vet. Med.* 2001; 52: 147-161.

Ann Præstmark Juul K, Bengtsson H, Eyving B, Kildegaard J, Lav S, Poulsen M, Serup J, Stallknecht B. Influence of hypodermic needle dimensions on subcutaneous injection delivery – a pig study of injection deposition evaluated by CT scanning, histology, and backflow. *Skin. Res. Technol.* 2012; 18: 447-455.

Anonymous. 2006. One is too many National Pork Board
http://www.pork.org/Certification/2341/pqaPlusMaterials.aspx#.U_yOFaNCpJs.

Zugriff am 26.08.2014

Apley MD, Thacker BJ. 2003. Determination of the pharmacokinetics of procaine penicillin in swine administered by intramuscular injection and with a needleless injection device. Research Abstract. National Pork Board. Pork Checkoff. http://www.pork.org/ResearchDetail/44/DeterminationoftheP.aspx#.U_yIGaNCPI

s. Zugriff am: 26.08.2014

Apley MD, Coetzee JF, Imerman PM, Karriker LA, Gehring R. Ampicillin pharmacokinetics in swine following needle-free, intramuscular, and intravenous administration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2007; 30: 417-421.

Arendt-Nielsen L, Egekvist H, Bjerring P. Pain following controlled cutaneous insertion of needles with different diameters. *Somatosens. Mot. Res.* 2006; 23: 37-43.

Arora A, Hakim I, Baxter J, Rathnasingham R, Srinivasan R, Fletcher DA, Mitragotri S. Needle-free delivery of macromolecules across the skin by nanoliter-volume pulsed microjets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007; 104: 4255-4260.

Artiushin S, Minion FCS. Arbitrarily primed PCR analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates demonstrates genetic heterogeneity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996; 46: 324-328.

Asai T, Okada M, Ono M, Mori Y, Yokomizo Y, Sato S. Detection of interleukin-6 and prostaglandin E2 in bronchoalveolar lavage fluids of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994; 44: 97-102.

Baccaro MR, Hirose F, Umehara O, Gonçalves LCB, Doto DS, Paixão R, Shinya LT, Moreno AM. Comparative efficacy of two single-dose bacterins in the control of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine raised under commercial conditions in Brazil. *Vet. J.* 2006; 172: 526-531.

Baker SR, Mondaca E, Polson D, Dee SA. Evaluation of a needle-free injection

device to prevent hematogenous transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Swine Health Prod.* 2012; 20: 123-128.

Bareille P, MacSwiney M, Albanese A, DeVile C, Stanhope R. Growth hormone treatment without a needle using the Preci-Jet 50 transjector. *Arch. Dis. Child.* 1997; 76: 65-67.

Barnett PV, Pullen L, Williams L, Doel TR. International bank for foot-and-mouth disease vaccine: assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants. *Vaccine* 1996; 14: 1187-1198.

Baumeister AK, Runge M, Ganter M, Feenstra AA, Delbeck F, Kirchhoff H. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 1984-1988.

Baumgärtner W, Schmidt P. Entzündung. In: *Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin*. 2011. ed: Baumgärtner W, Gruber AD. Enke, Stuttgart. 180-221.

Bennett CR, Mundell RD, Monheim LM. Studies on tissue penetration characteristics produced by jet injection. *J. Am. Dent. Assoc.* 1971; 83: 625-629.

Bennett J, Nichols F, Rosenblum M, Condry J. Subcutaneous administration of midazolam: A comparison of the Bioject jet injector with the conventional syringe and needle. *J. Am. Dent. Assoc.* 1998; 56: 1249-1254.

Bernardy J, Nechvatalova K, Krejci J, Kudlacková H, Brazdova I, Kucerova Z, Faldyna M. Comparison of different doses of antigen for intradermal administration in pigs: The *Actinobacillus pleuropneumoniae* model. *Vaccine* 2008; 26: 6368-6372.

Blanchard B, Vena MM, Cavalier A, Lannic JL, Gouranton J, Kobisch M. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 1992; 30: 329-341.

Blanchard B, Kobisch M, Bové JM, Saillard C. Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. *Mol. Cell. Probes* 1996; 10: 15-22.

Borghetti P, De Angelis E, Miduri F, Gozio S, Blanchaert A, Alborali LG, Cordioli P, Lombardi G, Quintavalla C, Guazzetti S, Martelli P. Intradermal and intramuscular Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PPRS) vaccination in piglets: changes of peripheral lymphocyte subpopulations. *Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, 2003. Rome, Italy. 77-78.

Bousquet E, Pommier P, Wessel-Robert S, Morvan H, Benoit-Valiergue H, Laval A. Efficacy of doxycycline in feed for the control of pneumonia caused by *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma hyopneumoniae* in fattening pigs. *Vet. Rec.* 1998; 143: 269-272.

Brockmeier SL, Halbur PG, Thacker EL. Porcine Respiratory Disease Complex. In: *Polymicrobial Diseases*. 2002. ed: Brodgen K, Guthmiller J. ASM Press, Washington. 231-275.

Bruner L. Use of parity segregation in *Mycoplasma hyopneumoniae* elimination. *Annual Meeting AASV*, 2014. USA. 543.

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

Calsamiglia M, Collins JE, Pijoan C. Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. *Vet. Microbiol.* 2000; 76: 299-303.

Calsamiglia M, Pijoan C. Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. *Vet. Rec.* 2000; 146: 530-532.

Calus D, Baele M, Meyns T, de Kruif A, Butaye P, Decostere A, Haesebrouck F, Maes D. Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *Vet. Microbiol.* 2007; 120: 284-291.

Cannon JE, Morgan JB, McKeith FK, Smith GC, Sonka S, Heavner J, Meeker DL. Pork chain quality audit survey: quantification of pork quality characteristics. *J. Muscle Foods* 1996; 7: 29-44.

Canter J, Mackey K, Good LS, Roberto RR, Chin J, Alter MJ, Horan JM. An outbreak of hepatitis b associated with jet injections in a weight reduction clinic. *Arch. Intern. Med.* 1990; 150: 1923-1927.

Charlebois A, Marois-Créhan C, Hélie P, Gagnon CA, Gottschalk M, Archambault M. Genetic diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates of abattoir pigs. *Vet. Microbiol.* 2014; 168: 348-356.

Charlier P, Jambers B, Martinod S. Efficacité d'un vaccin contre *Mycoplasma hyopneumoniae* utilisé dans des élevages infectés en France. *Journées Rech. Porcine en France*, 1993. 345-350.

Chase CCI, Daniels CS, Garcia R, Milward F, Nation T. Needle-free injection technology in swine: progress towards vaccine efficacy and pork quality. *J. Swine Health Prod.* 2008; 16: 254-261.

Chase CCI, Kunney JK. Immune System. In: *Diseases of Swine*, 10th Edition edn. 2012. ed: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. Wiley-Blackwell, 227-250.

Choi C, Kwon D, Jung K, Ha Y, Lee YH, Kim O, Park HK, Kim SH, Hwang KK, Chae C. Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Comp. Pathol.* 2006; 134: 40-46.

Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Retrospective analysis of etiologic agents

associated with respiratory diseases in pigs. *Can. Vet. J.* 2003; 44: 735-737.

Christensen G, Sorensen V, Mousing J. Diseases of the Respiratory System. In: *Diseases of Swine*, 8th edn. 1999. ed: Straw BE, D`Allaire S, Mengelin WL, Taylor DJ. 913-940.

Ciprian A, Pijoan C, Cruz T, Camacho J, Tortora J, Colmenares G, Lopez-Revilla R, de la Garza M. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can. J. Vet. Res.* 1988; 52: 434-438.

Ciprián A, Palacios JM, Quintanar D, Batista L, Colmenares G, Cruz T, Romero A, Schnitzlein W, Mendoza S. Florfenicol feed supplemented decrease the clinical effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* experimental infection in swine in México. *Res. Vet. Sci.* 2012; 92: 191-196.

Colditz IG, Paull DR. Needle-free vaccination in sheep. *Aust. Vet. J.* 2010; 88: 368.

Combadiere B, Liard C. Transcutaneous and intradermal vaccination. *Hum. Vaccin.* 2011; 7: 811-827.

Cooper JA, Bromley LM, Baranowski AP, Barker SGE. Evaluation of a needle-free injection system for local anaesthesia prior to venous cannulation. *Anaesthesia* 2000; 55: 247-250.

Damte D, Lee SJ, Hwang MH, Gebru E, Choi MJ, Lee JS, Cheng H, Park SC. Inflammatory responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* in murine alveolar macrophage cell lines. *N. Z. Vet. J.* 2011; 59: 185-190.

Daniels CS. 2008. Survey of injection methodologies and carcass defects in pork production. Research Abstract. National Pork Board. Pork Checkoff. <http://www.pork.org/ResearchDetail/1316/SurveyofInjectionMet.aspx#.VCbhtBZ>

[aBws](#). Zugriff am: 28.08.2014

Dawson A, Harvey RE, Thevasagayam SJ, Sherington J, Peters AR. Studies of the field efficacy and safety of a single-dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine for pigs. *Vet. Rec.* 2002; 151: 535-538.

DeBey MC, Jacobson CD, Ross RF. Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 1992; 53: 1705-1710.

DeBey MC, Ross RF. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect. Immun.* 1994; 62: 5312-5318.

Deblanc C, Gorin S, Quéguiner S, Gautier-Bouchardon AV, Ferré S, Amenna N, Cariolet R, Simon G. Pre-infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* modifies outcomes of infection with European Swine Influenza Virus of H1N1, but not H1N2, subtype. *Vet. Microbiol.* 2012; 157: 96-105.

Del Pozo Sacristan R, Rodriguez AL, Sierens A, Vranckx K, Boyen F, Dereu A, Haesebrouck F, Maes DG. Efficacy of in-feed medication with chlortetracycline in a farrow-to-finish herd against a clinical outbreak of respiratory disease in fattening pigs. *Vet. Rec.* 2012; 171: 645.

Del Pozo Sacristán R, Thiry J, Vranckx K, López Rodríguez A, Chiers K, Haesebrouck F, Thomas E, Maes D. Efficacy of florfenicol injection in the treatment of *Mycoplasma hyopneumoniae* induced respiratory disease in pigs. *Vet. J.* 2012; 194: 420-422.

Del Pozo Sacristán R, Sierens A, Marchioro SB, Vangroenweghe F, Jourquin J, Labarque G, Haesebrouck F, Maes D. Efficacy of early *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination against mixed respiratory disease in older fattening pigs. *Vet. Rec.* 2014; 174: 197.

Deutscher AT, Tacchi JL, Minion FC, Padula MP, Crossett B, Bogema DR, Jenkins C, Kuit TA, Walker MJ, Djordjevic SP. Mycoplasma hyopneumoniae surface proteins Mhp385 and Mhp384 bind host cilia and glycosaminoglycans and are endoproteolytically processed by proteases that recognize different cleavage motifs. *J. Proteome Res.* 2012; 11: 1924-1936.

Difranco E, Marois P, Descoteaux JP, Lacroix M, Flipot P. Enzootic pneumonia in feeder pigs: Observations on causal factors. *Can. Vet. J.* 1989; 30: 241-245.

Djordjevic SP, Eamens GJ, Romalis LF, Nicholls PJ, Taylor V, Chin J. Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against Mycoplasma hyopneumoniae with vaccines containing a denatured membrane antigen pool and adjuvant. *Aust. Vet. J.* 1997; 75: 504-511.

Djordjevic SP, Cordwell SJ, Djordjevic MA, Wilton J, Minion FC. Proteolytic processing of the Mycoplasma hyopneumoniae cilium adhesin. *Infect. Immun.* 2004; 72: 2791-2802.

Dorr HG, Zabransky S, Keller E, Otten BJ, Partsch CJ, Nyman L, Gillespie BK, Lester NR, Wilson AM, Hyren C, van Kuijk MA, Schuld P, Schoenfeld SL. Are needle-free injections a useful alternative for growth hormone therapy in children? Safety and pharmacokinetics of growth hormone delivered by a new needle-free injection device compared to a fine gauge needle. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2003; 16: 383-392.

Dorr PM, Baker RB, Almond GW, Wayne SR, Gebreyes WA. Epidemiologic assessment of Porcine Circovirus Type 2 coinfection with other pathogens in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2007; 230: 244-250.

Drexler CS, Witvliet MH, Raes M, van de Laar M, Eggen AAS, Thacker EL. Efficacy of combined Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Mycoplasma hyopneumoniae vaccination in piglets. *Vet. Rec.* 2010; 166: 70-74.

Du W. 2009. On-farm prevention of broken needles

<http://www.omafra.gov.on.ca/english/food/foodsafety/producers/09-005.htm>

Zugriff am 26.08.2014

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

Eblé PL, Weerdmeester K, van Hemert-Kluitenberg F, Dekker A. Intradermal vaccination of pigs against FMD with 1/10 dose results in comparable vaccine efficacy as intramuscular vaccination with a full dose. *Vaccine* 2009; 27: 1272-1278.

ElGeneidy AK, Bloom AA, Skerman JH, Stallard RE. Tissue reaction to jet injection. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1974; 38: 501-511.

Elicker S. Untersuchungen zur Festlegung tierschutzkonformer Injektionsvolumina bei Schweinen. *Diss. med. vet.* 2006. Ludwig-Maximilians-Universität. München.

Elicker S, Sipos W. The tissue compatibility of different *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines is mainly dependent upon their adjuvants. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 2009; 122: 348-353.

Epstein JE, Gorak EJ, Charoenvit Y, Wang RB, Freyberg N, Osinowo O, Richie TL, Stoltz EL, Trespalacios F, Nerges J, Ng J, Fallarme-Majam V, Abot E, Goh L, Parker S, Kumar S, Hedstrom RC, Norman J, Stout R, Hoffman SL. Safety, tolerability, and lack of antibody responses after administration of a PfCSP DNA malaria vaccine via needle or needle-free jet injection, and comparison of intramuscular and combination intramuscular/intradermal routes. *Hum. Gene Ther.* 2002; 13: 1551-1560.

Erlandson K, Thacker B, Wegner M, Evans R, Thacker E. Evaluation of three

serum antibody ELISA tests for *Mycoplasma hyopneumoniae*. 17th Congress of the International Pig Veterinary Society, 2002. Ames, USA. 74.

Erlandson KR, Evans RB, Thacker BJ, Wegner MW, Thacker EL. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Swine Health Prod.* 2005; 13: 198-203.

Fablet C, Marois C, Kobisch M, Madec F, Rose N. Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. *Vet. Microbiol.* 2010; 143: 238-245.

Fablet C, Marois C, Kuntz-Simon G, Rose N, Dorenlor V, Eono F, Eveno E, Jolly JP, Le Devendec L, Tocqueville V, Queguiner S, Gorin S, Kobisch M, Madec F. Longitudinal study of respiratory infection patterns of breeding sows in five farrow-to-finish herds. *Vet. Microbiol.* 2011; 147: 329-339.

Fano E, Pijoan C, Dee S. Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Can. J. Vet. Res.* 2005a; 69: 223-228.

Fano E, Pijoan C, Dee S. Evaluation of the aerosol transmission of a mixed infection of *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet. Rec.* 2005b; 157: 105-108.

Fano E, Pijoan C, Dee S, Deen J. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs. *Can. J. Vet. Res.* 2007; 71: 195-200.

Ferrari L, Borghetti P, Gozio S, De Angelis E, Ballotta L, Smeets J, Blanchaert A, Martelli P. Evaluation of the immune response induced by intradermal vaccination by using a needle-less system in comparison with the intramuscular route in conventional pigs. *Res. Vet. Sci.* 2011; 90: 64-71.

Fort M, Fernandes LT, Nofrarias M, Díaz I, Sibila M, Pujols J, Mateu E, Segalés

J. Development of cell-mediated immunity to Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009; 129: 101-107.

Fraile L, Alegre A, Lopez-Jimenez R, Nofrarias M, Segales J. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Vet. J.* 2010; 184: 326-333.

Frey J, Haldimann A, Nicolet J. Chromosomal Heterogeneity of Various *Mycoplasma hyopneumoniae* Field Strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1992; 42: 275-280.

Frey T. Wirksamkeit einer two-shot Vakzine nach experimenteller Infektion von Endmastschweinen mit *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Diss. med. vet.* 2014. Ludwig-Maximilians-Universität. München.

Funk J, Wagstrom E. Preharvest food safety, zoonotic diseases, and the human health interface. In: *Diseases of Swine*. 2012. ed: Zimmermann JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. Wiley-Blackwell, 165-178.

Geiger JO, Groth D. *Mycoplasma hyopneumoniae* elimination in a 3800 sow, multi-site system. 21st Congress of the International Pig Veterinary Society, 2010. Vancouver, Canada. 640.

Gergen L, Rapp-Gabrielson V, Wasmoen T. Evaluation of injection site reactions after intramuscular or subcutaneous injection of swine with M+Pac™ adjuvanted with a dual-action, oil-in-water adjuvant, Emunade™. Annual meeting AASV, 1999. USA. 209-211.

Gergen L, Eddy B, McCalmon P, Loskutov A, Wasmoen T. Needle-free vaccination for *Mycoplasma hyopneumoniae* and Swine Influenza Virus. 17th Congress of the International Pig Veterinary Society, 2002. Ames, USA. 288.

Gerlach BM, Houser TA, Hollis LC, Tokach MD, Nietfeld JC, Higgins JJ, Anderson GA, Goehring BL. Incidence and severity of *Arcanobacterium pyogenes* injection site abscesses with needle or needle-free injection. *Meat Sci.* 2012; 92: 805-807.

Gindele HR. Tierärztliche Bestandsbetreuung. In: *Schweinekrankheiten 2006*. ed: Heinritzi K, Gindele HR, Reiner G, Schnurrbusch U. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart. 353-361.

Giudice EL, Campbell JD. Needle-free vaccine delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2006; 58: 68-89.

Gozio S, Ferrari L, Borghetti P, De Angelis E, Smeets J, Blanchaert A, Martelli P. Specific humoral and cell-mediated immune response in pigs vaccinated intradermally (I.D.A.L.[®]) against Aujeszky's disease. 19th Congress of the International Pig Veterinary Society, 2006. Copenhagen, Denmark. 152.

Green DS, Green MJ, Hillyer MH, Morgan KL. Injection site reactions and antibody responses in sheep and goats after the use of multivalent clostridial vaccines. *Vet. Rec.* 1987; 120: 435-439.

Grosse Beilage E, Rohde N, Krieter J. Seroprevalence and risk factors associated with seropositivity in sows from 67 herds in north-west Germany infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Prev. Vet. Med.* 2009; 88: 255-263.

Grosse Beilage E, Nathues H, Grummer B, Hartung J, Kamphues J, Kietzmann M, Rohde J, Spindler B, Weissenböck H. Diagnostik, Prophylaxe und Therapie von Atemwegserkrankungen in Schweinebeständen. In: *Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand*, Band 1. 2013. ed: Grosse Beilage E, Wendt M. Eugen Ulmer Stuttgart. 200-270.

Grosse Beilage E. Klinische Untersuchungen von Schweinebeständen. In: *Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand*, Band 1. 2013. ed: Grosse Beilage E, Wendt M. Eugen Ulmer, Stuttgart. 15-52.

Guilmoto H. Porcine Respiratory Disease Complex, from diagnosis to efficient prevention: the role of infection dynamics and the quality of vaccination. 21st Congress of the International Pig Veterinary Society, 2010. Vancouver, Canada. 682.

Hafer AL, Langley RL, Morrow WEM. Occupational hazards reported by swine veterinarians in the United States. *J. Swine Health Prod.* 1996; 4: 128-141.

Hammer JM, King S, Roberts E, Roycroft L. Efficacy of Denagard® 10 (tiamulin hydrogen fumarate) in-feed antibiotic in a *Mycoplasma hyopneumoniae* infection model study. 21st Congress of the International Pig Veterinary Society, 2010. Vancouver, Canada. 639.

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

Heinonen M, Laurila T, Vidgren G, Levonen K. Eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine finishing herd without total depopulation. *Vet. J.* 2011; 188: 110-114.

Heinritzi K, Steinhausen G, Hermanns W, Wolf G, Darbés J. Untersuchungen zur ultraschallgeführten Lungenbiopsie beim Schwein. *Tierarztl. Prax.* 2003; 31: 264-272.

Henke J, Erhardt W. Wie entsteht Schmerz? In: Schmerzmanagement bei Klein- und Heimtieren. 2001. ed: Henke J, Erhardt W. Enke Verlag, Stuttgart. 11-21.

Hennig-Pauka I, Bremerich S, Nienhoff H, Schröder C, Ganter M, Blecha F, Waldmann KH, Gerlach GF. Comparison of three common methods of lung lavage in healthy pigs. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 2007; 54: 428-433.

Herbich E, Heissenberger B, Ladinig A, Griessler A, Ritzmann M, Weissenbacher-Lang C, Hennig-Pauka I. Feldstudie zur simultanen Vakzination gegen das porcine Circovirus Typ 2 und *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tierärztl. Prax. Ausg. G. N. 2013; 41: 279-288.

Hillen S, von Berg S, Köhler K, Reinacher M, Willems H, Reiner G. Occurrence and severity of lung lesions in slaughter pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with different strategies. Prev. Vet. Med. 2014; 113: 580-588.

Hilmer C. Vergleichende Untersuchung von histopathologischen Veränderungen nach Injektion unterschiedlicher Adjuvantien mittels Thermographiekamera und histopathologischer Untersuchung. Diss. med. vet. 2013. Ludwig-Maximilians-Universität. München.

Hiltermann-Linden E. Vergleich von Methoden zum Nachweis von *Mycoplasma hyopneumoniae*-Infektionen beim Schwein sowie epidemiologische Untersuchungen über die Verbreitung der Enzootischen Pneumonie im Weser-Ems Gebiet im Jahre 1996. Diss. med. vet. 2004. Tierärztliche Hochschule. Hannover.

Hoff SJ, Sundberg P. Breakage and deformation characteristics of hypodermic devices under static and dynamic loading. Am. J. Vet. Res. 1999; 60: 292-298.

Hoffman PN, Abuknesha RA, Andrews NJ, Samuel D, Lloyd JS. A model to assess the infection potential of jet injectors used in mass immunisation. Vaccine 2001; 19: 4020-4027.

Houser TA, Sebranek JG, Thacker BJ, Baas TJ, Nilubol D, Thacker EL, Kruse F. Effectiveness of transdermal, needle-free injections for reducing pork carcass defects. Meat Sci. 2004; 68: 329-332.

Hsu FS, Yeh TP, Lee CT. Tiamulin feed medication for the maintenance of weight gains in the presence of mycoplasmal pneumonia in swine. J. Anim. Sci. 1983; 57: 1474-1478.

Hsu T, Minion FC. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect. Immun.* 1998; 66: 4762-4766.

Imsilp K, Poapolathep A, Poapolathep S, Pattanatanang K, Noonpugdee C, Mounghai K, Atthi R, Rugsri N, Tohniti K, Kasorndokbua C (2005) Effectiveness of a needle-free injection system (Pulse250[®]) comparing to a conventional method on haemorrhagic septicaemia vaccination. In: *Veterinary Medicine and Livestock Development Annual Conference, Bangkok, Thailand.* 66

Jackson LA, Austin G, Chen RT, Stout R, DeStefano F, Gorse GJ, Newman FK, Yu O, Weniger BG. Safety and immunogenicity of varying dosages of trivalent inactivated influenza vaccine administered by needle-free jet injectors. *Vaccine* 2001; 19: 4703-4709.

Jacques M, Blanchard B, Foiry B, Girard C, Kobisch M. In vitro colonization of porcine trachea by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Ann. Rech. Vet.* 1992; 23: 239-247.

Jensen CS, Ersbøll AK, Nielsen JP. A meta-analysis comparing the effect of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* on daily weight gain in pigs. *Prev. Vet. Med.* 2002; 54: 265-278.

Jimenez N, Bradford H, Seidel KD, Sousa M, Lynn AM. A comparison of a needle-free injection system for local anesthesia versus EMLA[®] for intravenous catheter insertion in the pediatric patient. *Anesth. Analg.* 2006; 102: 411-414.

Jones GF, Rapp-Gabrielson V, Wilke R. Intradermal vaccination for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Swine Health Prod.* 2005; 13: 19-27.

Kim D, Kim CH, Han K, Seo HW, Oh Y, Park C, Kang I, Chae C. Comparative efficacy of commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine Circovirus 2 (PCV2) vaccines in pigs experimentally infected with *M. hyopneumoniae* and PCV2. *Vaccine* 2011; 29: 3206-3212.

King D, Painter T, Holtkamp D, DuBois P, Wang C. Effect of injection tool on incidence of head and neck abscesses at slaughter. *J. Swine Health Prod.* 2010; 18: 290-293.

King KW, Faulds DH, Rosey EL, Yancey Jr RJ. Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. *Vaccine* 1997; 15: 25-35.

Kokotovic B, Friis NF, Jensen JS, Ahrens P. Amplified-fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 3300-3307.

Kristensen C, Vinther J, Svensmark B, Baekbo P. A field evaluation of two vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Acta Vet. Scand.* 2014; 56: 24.

Kurth KT, Hsu T, Snook ER, Thacker EL, Thacker BJ, Minion FC. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2002; 14: 463-469.

Kwon D, Chae C. Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in lungs from naturally infected pigs by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *Vet. Pathol.* 1999; 36: 308-313.

Kwon D, Choi C, Chae C. Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. *Vet. Pathol.* 2002; 39: 584-587.

Kyriakis SC, Alexopoulos C, Vlemmas J, Sarris K, Lekkas S, Koutsovit-Papadopoulou M, Saoulidis K. Field study on the efficacy of two different vaccination schedules with HYORESP® in a *Mycoplasma hyopneumoniae*-infected commercial pig unit. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 2001; 48: 675-684.

Le Grand A, Kobisch M. Comparison of the use of a vaccine and sequential antibiotic treatment in a herd infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Res.* 1996; 27: 241-253.

Leggat PA, Smith DR, Speare R. Exposure rate of needlestick and sharps injuries among Australian veterinarians. *J. Occup. Med. Toxicol.* 2009; 4: 25.

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

Li J, Minion FC, Petersen AC, Jiang F, Yang S, Guo P, Li J, Wu W. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and convenient detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *World J Microbiol Biotechnol* 2013; 29: 607-616.

Lillie K. Untersuchungen zur Wirkung und Verträglichkeit eines inaktivierten *Mycoplasma hyopneumoniae* - One-Shot-Impfstoffes (Stellamune One) bei unterschiedlichen Vakzinationszeitpunkten. *Diss. med. vet.* 2004. Ludwig-Maximilians-Universität. München.

Lorenzo H, Quesada Ó, Assunção P, Castro A, Rodríguez F. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006; 109: 199-207.

Lowe JE, Husmann R, Firkins LD, Zuckermann FA, Goldberg TL. Correlation of cell-mediated immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus with protection against reproductive failure in sows during outbreaks of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in commercial herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005; 226: 1707-1711.

Maes D, Verdonck M, Deluyker H, De Kruif A. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet. Q.* 1996; 18: 104-109.

Maes D, Deluyker H, Verdonck M, Castryck F, Miry C, Vrijens B, de Kruif A. Risk indicators for the seroprevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae*, Porcine Influenza Viruses and Aujeszky's disease virus in slaughter pigs from fattening pig herds. *Zentralbl Veterinarmed B* 1999a; 46: 341-352.

Maes D, Deluyker H, Verdonck M, Castryck F, Miry C, Vrijens B, Verbeke W, Viaene J, de Kruif A. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. *Vaccine* 1999b; 17: 1024-1034.

Maes D, Segales J, Meyns T, Sibila M, Pieters M, Haesebrouck F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet. Microbiol.* 2008; 126: 297-309.

Marchioro SB, Maes D, Flahou B, Pasmans F, Del Pozo Sacristán R, Vranckx K, Melkebeek V, Cox E, Wuyts N, Haesebrouck F. Local and systemic immune responses in pigs intramuscularly injected with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. *Vaccine* 2013; 31: 1305-1311.

Marois C, Le Carrou J, Kobisch M, Gautier-Bouchardon AV. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Vet. Microbiol.* 2007; 120: 96-104.

Marois C, Gottschalk M, Morvan H, Fablet C, Madec F, Kobisch M. Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 2009; 135: 283-291.

Marois C, Dory D, Fablet C, Madec F, Kobisch M. Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 108: 1523-1533.

Martelli P, Terreni M, Guazzetti S, Cavirani S. Antibody response to *Mycoplasma*

hyopneumoniae infection in vaccinated pigs with or without maternal antibodies induced by sow vaccination. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 2006; 53: 229-233.

Martelli P, Cordioli P, Alborali LG, Gozio S, De Angelis E, Ferrari L, Lombardi G, Borghetti P. Protection and immune response in pigs intradermally vaccinated against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) and subsequently exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain. *Vaccine* 2007; 25: 3400-3408.

Martelli P, Gozio S, Ferrari L, Rosina S, De Angelis E, Quintavalla C, Bottarelli E, Borghetti P. Efficacy of a modified live Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain: Clinical protection and cell-mediated immunity. *Vaccine* 2009; 27: 3788-3799.

Martelli P, Saleri R, Cavalli V, De Angelis E, Ferrari L, Benetti M, Ferrarini G, Merialdi G, Borghetti P. Systemic and local immune response in pigs intradermally and intramuscularly injected with inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines. *Vet. Microbiol.* 2014; 168: 357-364.

Mateusen B, Maes D, Hoflack G, Verdonck M, De Kruif A. A comparative study of the preventive use of tilimicosin phosphate (Pulmotil premix®) and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in a pig herd with chronic respiratory disease. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 2001; 48: 733-741.

Mateusen B, Maes D, Van Goubergen M, Verdonck M, de Kruif A. Effectiveness of treatment with lincomycin hydrochloride and/or vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* for controlling chronic respiratory disease in a herd of pigs. *Vet. Rec.* 2002; 151: 135-140.

Matheï C, Van Damme P, Meheus A. Hepatitis B vaccine administration: comparison between jet-gun and syringe and needle. *Vaccine* 1997; 15: 402-404.

Mettler S. Untersuchungen zur Wirksamkeit zweier *Mycoplasma hyopneumoniae* Impfstoffe bei verschiedenen Haltungssystemen innerhalb eines Betriebes. Diss. med. vet. 2009. Ludwig-Maximilians-Universität. München.

Meyns T, Maes D, Dewulf J, Vicca J, Haesebrouck F, Kruif Ad. Quantification of the spread of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs using transmission experiments. *Prev. Vet. Med.* 2004; 66: 265-275.

Meyns T, Dewulf J, de Kruif A, Calus D, Haesebrouck F, Maes D. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine* 2006; 24: 7081-7086.

Meyns T, Maes D, Calus D, Ribbens S, Dewulf J, Chiers K, de Kruif A, Cox E, Decostere A, Haesebrouck F. Interactions of highly and low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates with the respiratory tract of pigs. *Vet. Microbiol.* 2007; 120: 87-95.

Minion FC, Adams C, Hsu T. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect. Immun.* 2000; 68: 3056-3060.

Mitragotri S. Immunization without needles. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5: 905-916.

Mitragotri S. Current status and future prospects of needle-free liquid jet injectors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006; 5: 543-548.

Moorkamp L, Nathues H, Spersger J, Tegeler R, Grosse Beilage E. Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. *Vet. J.* 2008; 175: 273-275.

Moorkamp L, Hewicker-Trautwein M, Grosse Beilage E. Occurrence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in coughing piglets (3-6 weeks of age) from 50 herds with a history of endemic respiratory disease. *Transbound. Emerg. Dis.*

2009; 56: 54-56.

Moorkamp L, Grosse Beilage E, Hewicker-Trautwein M. Immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in piglets. *Tierarztl. Prax. Ausg. G. N.* 2010; 38: 357-362.

Morris CR, Gardner IA, Hietala SK, Carpenter TE, Anderson RJ, Parker KM. Persistence of passively acquired antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. *Prev. Vet. Med.* 1994; 21: 29-41.

Mousel MR, Leeds TD, White SN, Herrmann-Hoesing LM. Technical note: comparison of traditional needle vaccination with pneumatic, needle-free vaccination for sheep. *J. Anim. Sci.* 2008; 86: 1468-1471.

Muneta Y, Uenishi H, Kikuma R, Yoshihara K, Shimoji Y, Yamamoto R, Hamashima N, Yokomizo Y, Mori Y. Porcine TLR2 and TLR6: identification and their involvement in *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *J. Interferon Cytokine Res.* 2003; 23: 583-590.

Murphy K. T cell-mediated immunity. In: Janeway's Immunobiology, 8th edn. 2012a. ed: Garland Science, 335-386.

Murphy K. Basic concepts in immunology. In: Janeway's Immunobiology, 8th edn. 2012b. ed: Garland Science, 1-36.

Murphy K. Dynamics of adaptive immunity. In: Janeway's Immunobiology, 8th edn. 2012c. ed: Garland Science, 429-464.

Nathues H, Kubiak R, Tegeler R, Grosse Beilage E. Occurrence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling and nursery pigs in a region of high pig density. *Vet. Rec.* 2010; 166: 194-198.

Nathues H, Grosse Beilage E, Kreienbrock L, Rosengarten R, Spergser J. RAPD

and VNTR analyses demonstrate genotypic heterogeneity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs housed in a region with high pig density. *Vet. Microbiol.* 2011; 152: 338-345.

Nathues H, Spergser J, Rosengarten R, Kreienbrock L, Grosse Beilage E. Value of the clinical examination in diagnosing enzootic pneumonia in fattening pigs. *Vet. J.* 2012; 193: 443-447.

Nathues H, Doehring S, Woeste H, Fahrion AS, Doherr MG, grosse Beilage E. Individual risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning. *Acta Vet. Scand.* 2013a; 55: 44.

Nathues H, Woeste H, Doehring S, Fahrion AS, Doherr MG, Grosse Beilage E. Herd specific risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning. *Acta Vet. Scand.* 2013b; 55: 30.

Nechvatalova K, Bernardy J, Krejci J, Kudlacková H, Leva L, Faldyna M. Intradermal vaccination of pigs. 22nd Congress of the International Pig Veterinary Society, 2012. Korea. 319.

Nelson EAS, Lam HS, Choi KC, Ho WCS, Fung LWE, Cheng FWT, Sung RYT, Royals M, Chan PKS. A pilot randomized study to assess immunogenicity, reactogenicity, safety and tolerability of two human papillomavirus vaccines administered intramuscularly and intradermally to females aged 18–26 years. *Vaccine* 2013; 31: 3452-3460.

Nutsch RG, Hart FJ, Rooney KA, Weigel DJ, Kilgore WR, Skogerboe TL. Efficacy of tulathromycin injectable solution for the treatment of naturally occurring Swine respiratory disease. *Vet. Ther.* 2005; 6: 214-224.

Okada M, Sakano T, Senna K, Maruyama T, Murofushi J, Okonogi H, Sato S. Evaluation of *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccine in pigs under field conditions. *J. Vet. Med. Sci.* 1999; 61: 1131-1135.

Okada M, Asai T, Ono M, Sakano T, Sato S. Cytological and immunological changes in bronchoalveolar lavage fluid and histological observation of lung lesions in pigs immunized with *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccine prepared from broth culture supernate. *Vaccine* 2000; 18: 2825-2831.

Okada M, Asai T, Futo S, Mori Y, Mukai T, Yazawa S, Uto T, Shibata I, Sato S. Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody and recombinant antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 2005; 105: 251-259.

Opriessnig T, Thacker EL, Yu S, Fenaux M, Meng XJ, Halbur PG. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.* 2004; 41: 624-640.

Opriessnig T, Madson DM, Schalk S, Brockmeier S, Shen HG, Beach NM, Meng XJ, Baker RB, Zanella EL, Halbur PG. Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) vaccination is effective in reducing disease and PCV2 shedding in semen of boars concurrently infected with PCV2 and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Theriogenology* 2011; 76: 351-360.

Otake S, Dee SA, Rossow KD, Joo HS, Deen J, Molitor TW, Pijoan C. Transmission of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by needles. *Vet. Rec.* 2002; 150: 114-115.

Otake S, Dee S, Corzo C, Oliveira S, Deen J. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet. Microbiol.* 2010; 145: 198-208.

Pagot E, Pommier P, Keïta A. Relationship between growth during the fattening period and lung lesions at slaughter in swine. *Rev. Med. Vet-Toulouse.* 2007; 5: 253-259.

Palzer A, Ritzmann M, Wolf G, Heinritzi K. Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *Vet. Rec.* 2008; 162: 267-271.

Pandya M, Pacheco JM, Bishop E, Kenney M, Milward F, Doel T, Golde WT. An alternate delivery system improves vaccine performance against Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV). *Vaccine* 2012; 30: 3106-3111.

Paquin G, Achacha M, Toburen T. The first effective transdermal, needle-free injections in Canada. Annual meeting AASV, 2005. USA. 75.

Park SJ, Seo HW, Park C, Chae C. Interaction between single-dose *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus vaccines on dually infected pigs. *Res. Vet. Sci.* 2014: 516-522.

Phillips JC, Blackford JT, Lembcke LM, Grosenbaugh DA, Leard T. Evaluation of needle-free injection devices for intramuscular vaccination in horses. *J. Equine Vet. Sci.* 2011; 31: 738-743.

Pieters M, Pijoan C, Fano E, Dee S. An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. *Vet. Microbiol.* 2009; 134: 261-266.

Pieters M, Fano E, Pijoan C, Dee S. An experimental model to evaluate *Mycoplasma hyopneumoniae* transmission from asymptomatic carriers to unvaccinated and vaccinated sentinel pigs. *Can. J. Vet. Res.* 2010; 74: 157-160.

Pommier P, Keïta A, Pagot E, Flochlay A. Field efficacy of a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine in the control of enzootic pneumonia in swine. *Rev. Med. Vet-Toulouse.* 2000; 8-9: 835-840.

Rapp-Gabrielson VJ, Gergen LR, Eddy BA, Junker DE, Weston CQ, Fleck RW, Wasmoen TL. Efficacy of intradermal vaccination against challenge of swine with a heterologous H3N2 Swine Influenza Virus. Allen D. Lemman Swine Conference,

2003. USA. 33.

Redondo E, Masot AJ, Fernández A, Gázquez A. Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Comp. Pathol.* 2009; 140: 260-270.

Reinbold JB, Coetzee JF, Hollis LC, Nickell JS, Riegel CM, Christopher JA, Ganta RR. Comparison of iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in Holstein steers via needle and needle-free injection techniques. *Am. J. Vet. Res.* 2010; 71: 1178-1188.

Rey MR, Undi M, Rodriguez-Lecompte JC, Joseph T, Morrison J, Yitbarek A, Wittenberg K, Tremblay R, Crow GH, Ominski KH. A study of the effectiveness of a needle-free injection device compared with a needle and syringe used to vaccinate calves against Bovine Viral Diarrhea and Infectious Bovine Rhinotracheitis Viruses. *Vet. J.* 2013; 198: 235-238.

Reynolds SC, St Aubin LB, Sabbadini LG, Kula J, Vogelaar J, Runnels P, Peters AR. Reduced lung lesions in pigs challenged 25 weeks after the administration of a single dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine at approximately 1 week of age. *Vet. J.* 2009; 181: 312-320.

Rodríguez F, Quesada O, Poveda JB, Fernández A, Lorenzo H. Immunohistochemical detection of Interleukin-12 and Interferon- γ in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Comp. Pathol.* 2007; 136: 79-82.

Rodríguez F, Ramírez GA, Sarradell J, Andrada M, Lorenzo H. Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Comp. Pathol.* 2004; 130: 306-312.

Rosales E, Mendoza S, Martens M, Quintero V, Ramirez C, Luna E, Vargas A, Reynoso M. Use of novel intradermal needle-free system: a field study comparing it with conventional intramuscular injection for administration of Aujeszky's

disease vaccination (Porcilis[®] Begonia). 19th Congress of the International Pig Veterinary Society, 2006. Copenhagen, Denmark. 157.

Sann H. Sinnesphysiologie. In: Physiologie der Haustiere, 2. edn. 2005. ed: Engelhardt W, Breves G. Enke Verlag, Stuttgart. 68-101.

Sarradell J, Andrada M, Ramírez AS, Fernández A, Gómez-Villamandos JC, Jover A, Lorenzo H, Herráez P, Rodríguez F. A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Pathol. 2003; 40: 395-404.

Schloesser CA, Daniels CS, Cook CJ, Civis C, Loskutov A, Kuhn M, Senn M, Wayne S. Accuracy and precision of Pulse micro-dose injection device using Draxxin[™], Excede[®], Excenel[®] and sterile water. Annual Meeting AASV, 2008. USA. 79-82.

Schramm-Baxter J, Mitragotri S. Needle-free jet injections: dependence of jet penetration and dispersion in the skin on jet power. J. Control. Release 2004; 97: 527-535.

Schramm J, Mitragotri S. Transdermal Drug Delivery by Jet Injectors: Energetics of Jet Formation and Penetration. Pharm. Res. 2002; 19: 1673-1679.

Schreiber A. Untersuchungen zum Einfluss maternaler Antikörper auf die humorale Immunantwort bei Ferkeln, die in der ersten und vierten bzw. vierten und achten Lebenswoche gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* (Hyoresp[®], Firma Merial) geimpft wurden. Diss. med. vet. 2002. Tierärztliche Hochschule. Hannover.

Schreiber R. Cytokines and their receptors. In: Janeway's Immunobiology, 8th edn. 2012. ed: Murphy K. Garland Science, 779-781.

Segalés J, Valero O, Espinal A, López-Soria S, Nofrariás M, Calsamiglia M, Sibila M. Exploratory study on the influence of climatological parameters on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection dynamics. *Int. J. Biometeorol.* 2012; 56: 1167-1171.

Selbitz H-J. Zellwandlose Bakterien der Klasse Mollicutes. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre, 9. Auflage edn. 2011. ed: Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P. Enke Verlag, Stuttgart. 319-329.

Shergold OA, Fleck NA, King TS. The penetration of a soft solid by a liquid jet, with application to the administration of a needle-free injection. *J. Biomech.* 2006; 39: 2593-2602.

Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Rosell C. Association between *Mycoplasma hyopneumoniae* at different respiratory sites and presence of histopathological lung lesions. *Vet. Rec.* 2004a; 155: 57-58.

Sibila M, Calsamiglia M, Vidal D, Badiella L, Aldaz A, Jensen JC. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. *Can. J. Vet. Res.* 2004b; 68: 12-18.

Sibila M, Nofrariás M, López-Soria S, Segalés J, Valero O, Espinal A, Calsamiglia M. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Vet. Microbiol.* 2007; 122: 97-107.

Sibila M, Pieters M, Molitor T, Maes D, Haesebrouck F, Segales J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet. J.* 2009; 181: 221-231.

Siugzdaite J, Garlaite K, Urbsiene D. Evaluation of antibody formation, daily weight gain and meat quality after vaccination of piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Acta Vet. Hung.* 2003; 51: 273-281.

Smith JF, Johnson BJ, Kapil S, Hollis LC, Mosier DA. Serological responses to IBR viral vaccine and Mannheimia haemolytica bacterin/leukotoxoid administered with needle-free injection technology. Cattlemen's Day, 2005. Manhattan. 62-64.

Soonawala D, Verdijk P, Wijmenga-Monsuur AJ, Boog CJ, Koedam P, Visser LG, Rots NY. Intradermal fractional booster dose of inactivated poliomyelitis vaccine with a jet injector in healthy adults. *Vaccine* 2013; 31: 3688-3694.

Sorensen V, Barfod K, Feld NC, Vraa-Andersen L. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the surveillance of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Rev. Sci. Tech.* 1993; 12: 593-604.

Sørensen V, Ahrens P, Barfod K, Feenstra AA, Feld NC, Friis NF, Bille-Hansen V, Jensen NE, Pedersen MW. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Vet. Microbiol.* 1997; 54: 23-34.

Stachowiak JC, Li TH, Arora A, Mitragotri S, Fletcher DA. Dynamic control of needle-free jet injection. *J. Control. Release* 2009; 135: 104-112.

Stakenborg T, Vicca J, Butaye P, Maes D, Peeters J, De Kruif A, Haesebrouck F. The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 2005a; 109: 29-36.

Stakenborg T, Vicca J, Butaye P, Maes D, Minion FC, Peeters J, De Kruif A, Haesebrouck F. Characterization of In Vivo acquired resistance of *Mycoplasma hyopneumoniae* to macrolides and lincosamides. *Microb Drug Resist* 2005b; 11: 290-294.

Stärk KDC, Nicolet J, Frey J. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by Air Sampling with a Nested PCR Assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64: 543-548.

Stipkovits L, Miller D, Glavits R, Fodor L, Burch D. Treatment of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* with various antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 2001; 65: 213-222.

Strait EL, Erickson BZ, Thacker EL. Analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. AASV Annual Meeting, 2004. USA. 95-96.

Strait EL, Madsen ML, Minion FC, Christopher-Hennings J, Dammen M, Jones KR, Thacker EL. Real-Time PCR Assays To Address Genetic Diversity among Strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 2491-2498.

Tajima M, Yagihashi T. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infect. Immun.* 1982; 37: 1162-1169.

Takeuti KL, Watanabe TTN, Castro LA, Driemeier D, Barcellos DESN. Histopathological and immunohistochemical characterization of pneumonia caused by co-infection between *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. *Acta Sci. Vet.* 2013; 41: 1117.

Tassis PD, Papatsiros VG, Nell T, Maes D, Alexopoulos C, Kyriakis SC, Tzika ED. Clinical evaluation of intradermal vaccination against porcine enzootic pneumonia (*Mycoplasma hyopneumoniae*). *Vet. Rec.* 2012; 170: 261.

Thacker EL, Thacker BJ, Boettcher TB. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *J. Swine Health Prod.* 1998; 6: 107-112.

Thacker EL, Halbur PG, Ross RF, Thanawongnuwech R, Thacker BJ. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-induced pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 620-627.

Thacker EL, Thacker BJ, Kuhn M, Hawkins PA, Waters WR. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *Am. J. Vet. Res.* 2000a; 61: 1384-1389.

Thacker EL, Thacker BJ, Young TF, Halbur PG. Effect of vaccination on the potentiation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine* 2000b; 18: 1244-1252.

Thacker EL, Thacker BJ, Janke BH. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and Swine Influenza Virus. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 2525-2530.

Thacker EL. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Anim. Health Res. Rev.* 2004; 5: 317-320.

Thacker EL, Thacker BJ, Wolff T. Efficacy of a chlortetracycline feed additive in reducing pneumonia and clinical signs induced by experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* challenge. *J. Swine Health Prod.* 2006; 14: 140-144.

Thacker EL, Minion FC. Mycoplasmosis. In: *Diseases of Swine*, 10th Edition edn. 2012. ed: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. Wiley-Blackwell, West Sussex. 779-797.

Thanawongnuwech R, Thacker EL. Interleukin-10, interleukin-12, and interferon-gamma levels in the respiratory tract following *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV infection in pigs. *Viral Immunol.* 2003; 16: 357-367.

Thanawongnuwech R, Thacker B, Halbur P, Thacker EL. Increased production of proinflammatory cytokines following infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004; 11: 901-908.

Thongkamkoon P, Narongsak W, Kobayashi H, Pathanasophon P, Kishima M, Yamamoto K. In vitro susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates and occurrence of fluoroquinolone, macrolides and lincomycin resistance. *J. Vet. Med. Sci.* 2013; 75: 1067-1070.

Tzivara A, Kritas SK, Bourriel AR, Alexopoulos C, Kyriakis SC. Efficacy of an inactivated aqueous vaccine for the control of enzootic pneumonia in pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Rec.* 2007; 160: 225-229.

Uhl R. Untersuchung eines nadellosen Injektionsverfahrens für Schweine. *Diss. med. vet.* 2013. Ludwig-Maximilians-Universität. München.

Valentin-Weigand P. Allgemeine Bakteriologie, Grundlagen. In: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 9. Auflage edn. 2011. ed: Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P. Enke, Stuttgart. 84-112.

Van Alstine WG. Respiratory system. In: *Disease of Swine*. 2012. ed: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. Wiley-Blackwell, 348-362.

Van Drunen Littel-Van den Hurk S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet. Microbiol.* 2006; 113: 275-282.

Van Soest EM, Fritschi L. Occupational health risks in veterinary nursing: an exploratory study. *Aust. Vet. J.* 2004; 82: 346-350.

Verdin E, Saillard C, Labbé A, Bové JM, Kobisch M. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. *Vet. Microbiol.* 2000; 76: 31-40.

Vicca J, Maes D, Thermote L, Peeters J, Haesebrouck F, De Kruif A. Patterns of *Mycoplasma hyopneumoniae* Infections in Belgian Farrow-to-Finish Pig Herds with Diverging Disease-Course. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*

2002; 49: 349-353.

Vicca J, Stakenborg T, Maes D, Butaye P, Peeters J, De Kruif A, Haesebrouck F. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet. Microbiol.* 2003; 97: 177-190.

Vicca J, Stakenborg T, Maes D, Butaye P, Peeters J, De Kruif A, Haesebrouck F. In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 4470-4472.

Vicca J, Maes D, Jonker L, De Kruif A, Haesebrouck F. Efficacy of in-feed medication with tylosin for the treatment and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. *Vet. Rec.* 2005; 156: 606-610.

Villarreal I, Meyns T, Dewulf J, Vranckx K, Calus D, Pasmans F, Haesebrouck F, Maes D. The effect of vaccination on the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions. *Vet. J.* 2011a; 188: 48-52.

Villarreal I, Maes D, Vranckx K, Calus D, Pasmans F, Haesebrouck F. Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vaccine* 2011b; 29: 1731-1735.

Villarreal I, Vranckx K, Calus D, Pasmans F, Haesebrouck F, Maes D. Effect of challenge of pigs previously immunised with inactivated vaccines containing homologous and heterologous *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *BMC Vet. Res.* 2012; 8: 2.

Vitoriano-Souza J, Moreira N, Teixeira-Carvalho A, Carneiro CM, Siqueira FA, Vieira PM, Giunchetti RC, Moura SA, Fujiwara RT, Melo MN, Reis AB. Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: saponin, incomplete Freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. *PLoS ONE* 2012; 7: e40745.

Vranckx K, Maes D, Marchioro SB, Villarreal I, Chiers K, Pasmans F, Haesebrouck F. Vaccination reduces macrophage infiltration in bronchus-associated lymphoid tissue in pigs infected with a highly virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain. *BMC Vet. Res.* 2012a; 8: 24.

Vranckx K, Maes D, Del Sacristan R. P, Pasmans F, Haesebrouck F. A longitudinal study of the diversity and dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pig herds. *Vet. Microbiol.* 2012b; 156: 315-321.

Wagner S, Dues G, Sawitzky D, Frey P, Christ B. Assessment of the biological performance of the needle-free injector INJEX using the isolated porcine forelimb. *Br. J. Dermatol.* 2004; 150: 455-461.

Walders B, Raschke A, Neugebauer M, Geuther E, Bertling W, Reiser C, Buck A, Strich S, Hess J. Blending of a conventional *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine with a positive marker: tracking of immunised pigs by peptide-specific antibodies raised to the marker component. *Res. Vet. Sci.* 2005; 78: 135-141.

Wallgren P, Bölske G, Gustafsson S, Mattsson S, Fossum C. Humoral immune responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* in sows and offspring following an outbreak of mycoplasmosis. *Vet. Microbiol.* 1998; 60: 193-205.

Weese JS, Jack DC. Needlestick injuries in veterinary medicine. *Can. Vet. J.* 2008; 49: 780-784.

Wesley RD, Lager KM. Evaluation of a recombinant Human Adenovirus-5 vaccine administered via needle-free device and intramuscular injection for vaccination of pigs against Swine Influenza Virus. *Am. J. Vet. Res.* 2005; 66: 1943-1947.

Wilkins JR, Bowman ME. Needlestick injuries among female veterinarians: frequency, syringe contents and side-effects. *Occup. Med.* 1997; 47: 451-457.

Williams J, Fox-Leyva L, Christensen C, Fisher D, Schlicting E, Snowball M, Negus S, Mayers J, Koller R, Stout R. Hepatitis A vaccine administration: comparison between jet-injector and needle injection. *Vaccine* 2000; 18: 1939-1943.

Willson PJ, Rossi-Campos A, Potter AA. Tissue reaction and immunity in swine immunized with *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines. *Can. J. Vet. Res.* 1995; 59: 299-305.

Wilson S, Van Brussel L, Saunders G, Taylor L, Zimmermann L, Heinritzi K, Ritzmann M, Banholzer E, Eddicks M. Vaccination of piglets at 1 week of age with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine reduces lung lesions and improves average daily gain in body weight. *Vaccine* 2012; 30: 7625-7629.

Wilton J, Jenkins C, Cordwell SJ, Falconer L, Minion FC, Oneal DC, Djordjevic MA, Connolly A, Barchia I, Walker MJ, Djordjevic SP. Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 2009; 71: 566-582.

Woolley LK, Fell SA, Djordjevic SP, Eamens GJ, Jenkins C. Plasmin activity in the porcine airways is enhanced during experimental infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*, is positively correlated with proinflammatory cytokine levels and is ameliorated by vaccination. *Vet. Microbiol.* 2013; 164: 60-66.

Woolums AR, Ensley DT, Tanner PA, Fankhauser R, Shen J, Songer JG, Leard AT, Milward FW, Pence ME, Hurley DJ. Humoral immunity and injection-site reactions in cattle vaccinated with a multivalent clostridial vaccine administered via subcutaneous injection or via transdermal needle-free injection. *Am. J. Vet. Res.* 2011; 72: 1124-1129.

Yazawa S, Okada M, Ono M, Fujii S, Okuda Y, Shibata I, Kida H. Experimental dual infection of pigs with an H1N1 Swine Influenza Virus (A/Sw/Hok/2/81) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 2004; 98: 221-228.

Yeske PE. Mycoplasma eradication strategies. AASV Annual Meeting, 2007. 367.

Yeske PE. Summary of Mycoplasma hyopneumoniae eradication experiences completed in Upper Midwest USA. 21st Congress of the International Pig Veterinary Society, 2010. Vancouver, Canada. 141.

Zhang Q, Young TF, Ross RF. Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for Mycoplasma hyopneumoniae. Infect. Immun. 1994; 62: 1616-1622.

Zhang Q, Young TF, Ross RF. Identification and characterization of a Mycoplasma hyopneumoniae adhesin. Infect. Immun. 1995; 63: 1013-1019.

Zielinski GC, Ross RF. Adherence of Mycoplasma hyopneumoniae to porcine ciliated respiratory-tract cells. Am. J. Vet. Res. 1993; 54: 1262-1269.

Zimmermann L. Evaluation der Wirksamkeit und Sicherheit einer Mycoplasma hyopneumoniae Vakzine bei Ferkeln in der ersten Lebenswoche. Diss. med. vet. 2012. Ludwig-Maximilians-Universität. München.

Zimmermann W, Odermatt W, Tschudi P. Enzootic pneumonia (EP): the partial curing of EP-reinfected swine herds as an alternative to total cure. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 1989; 131: 179-186.

X. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1 - Mittlerer klinischer Gesamtscore der Kontroll- und Vakzinegruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum im Vergleich</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 2 - Vergleich des Verlaufs des mittleren täglichen lokalen Hautreaktionsscores der Kontroll- und Vakzinegruppen</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 3 - Vergleich der durchschnittlichen inneren Körpertemperaturen der Kontroll- und Vakzinegruppen</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 4 - Verlauf der mittleren Antikörpertiter der Placebo- und der Vakzinegruppen im Vergleich, mit signifikanten Unterschieden der mittleren P/PK-Werte zwischen den Studiengruppen</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 5 - Anzahl seropositiver Tiere der Placebo- und der Vakzinegruppen im Vergleich, mit signifikanten Unterschieden zwischen den Studiengruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten.....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 6 - Vergleich der mittleren Gewichte (kg) der Placebo- und der Vakzinegruppen, mit Signifikanzen zwischen den Studiengruppen</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 7 - Vergleich der mittleren täglichen Zunahmen der Placebo- und der Vakzinegruppen mit den signifikanten Gewichtsunterschieden</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 8 - Vergleich der Körpergewichte (kg) der Placebo- und der Vakzinegruppen zum ersten Schlachtermin</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 9 - Vergleich der mittleren Lungenveränderungen der Tiere der Placebo- und der Vakzinegruppen in Prozent</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 10 - Vergleich der Häufigkeitsverteilung der Tiere der Placebo- und Vakzinegruppen innerhalb der unterschiedlichen Kategorien der Lungenläsionen, mit Signifikanzen zwischen den Studiengruppen</i>	<i>64</i>

2. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 - Einteilung der Tiere in die vier Studiengruppen.....</i>	41
<i>Tabelle 2 - Verteilung der Safety-Tiere auf die vier Studiengruppen</i>	41
<i>Tabelle 3 - Score der klinischen Untersuchung</i>	42
<i>Tabelle 4 - Scorepunkte lokale Reaktion, Durchmesser</i>	43
<i>Tabelle 5 - Scorepunkte lokale Reaktion, Konsistenz</i>	43
<i>Tabelle 6 - Scorepunkte lokale Reaktion, Entzündungszeichen</i>	43
<i>Tabelle 7 - Anzahl der Tiere mit klinischen Auffälligkeiten zwischen den Kontroll- und Vakzinegruppen.....</i>	50
<i>Tabelle 8 - Anzahl der Tiere mit einer lokalen Hautreaktion, Verhärtung und Rötung u./ o. Wärme an der Injektionsstelle. Häufigkeitsverteilung der maximal aufgetretenen verschiedenen Grade.....</i>	51
<i>Tabelle 9 - Anzahl der Tiere mit einer lokalen Hautreaktion an der Injektionsstelle länger als einen Tag bzw. Persistenz an Tag 7</i>	52
<i>Tabelle 10 - Mittlerer Score der Lokalreaktionen als Summe der Scores der acht Untersuchungszeitpunkte, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Studiengruppen.....</i>	54
<i>Tabelle 11 - Mittlerer Gesamtscore der Lokalreaktion als Summe der Scores der acht Untersuchungszeitpunkte, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Studiengruppen.....</i>	55
<i>Tabelle 12 - Vergleich der mittleren Mastdauer der Placebo- und der Vakzinegruppen mit Häufigkeitsverteilung der Tiere innerhalb der Schlachtttermine.....</i>	61
<i>Tabelle 13 - Vergleich der mittleren Endmastgewichte (kg) der Placebo- und der Vakzinegruppen zum ersten Schlachtttermin</i>	62
<i>Tabelle 14 - Auftreten von Pleuritiden innerhalb der Studiengruppen.....</i>	65
<i>Tabelle 15 - Vergleichende Anzahl M. hyopneumoniae q-PCR positiver Lungenproben und mittlere Erregerlast der Placebo- und Vakzinegruppen.....</i>	65

XI. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Mathias Ritzmann für die Überlassung dieses aktuellen und spannenden Themas und für die Ermöglichung der Mitarbeit an der Klinik für Schweine, welche mir stets große Freude bereitet hat.

Ebenfalls bedanke ich mich bei meinem Betreuer Dr. Matthias Eddicks für die lehrreichen Ausführungen, die Inspirationen und Korrekturen.

Bei allen Mitarbeitern der Klinik für Schweine, auch den bereits ausgeschiedenen, bedanke ich mich für ihre Mithilfe bei der Studie und ihre stetige Unterstützung. Insbesondere danke ich Christine Weiß und allen anderen Mitdoktoranden für ihre tatkräftige Hilfe bei den Wiege- und Schlachthofterminen und für das wunderbar freundschaftliche Arbeitsklima. Meinen Studienkolleginnen, den Freundinnen in der Heimat sowie meinen Mitbewohnerinnen gilt ein herzliches Dankeschön - sie haben immer ein offenes Ohr für die kleinen Hindernisse des Lebens. Vielen Dank für eure kreativen Lösungsansätze, euren Humor und eure Freundschaft!

Ein ganz besonderer Dank gilt Olaf Skoeries und seinem ganzen Team bei denen meine Mitdoktoranden und ich stets eine sehr herzliche Gastfreundschaft erfahren und immer auf spontane Unterstützung zählen konnten. Danke für die Hilfe bei der Betriebssuche! Sehr dankbar bin ich allen Mitarbeitern des Studienbetriebes, ohne Sie wäre die Durchführung nicht so effektiv abgelaufen.

Bei der Firma MSD Tiergesundheit bedanke ich mich für die Bereitstellung der Impfstoffe und die finanzielle Unterstützung des Projektes. Insbesondere danke ich Dr. Kerstin Fiebig für Ihre hervorragende fachliche und persönliche Betreuung.

Meinen Eltern Roger und Lila, meiner Schwester Sophie und meinem Freund Max gilt das letzte große Dankeschön für ihre unabdingbare Unterstützung während des Studiums und der Dissertation, ihr seid großartig - Villmools Merci!