

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

Zeitgleiche Applikation der Impfstoffe ECOPORC SHIGA<sup>®</sup>  
und Stellamune<sup>®</sup> One bei Ferkeln in der ersten  
Lebenswoche

von Sebastian Alexander Fröhlich  
aus Regensburg

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. S. Zöls, Dr. N. Übel

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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

**Tag der Promotion: 18.07.2015**

Meinen Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

I.	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
II.	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
1.	<b><i>E. coli</i> - Ödemkrankheit .....</b>	<b>2</b>
1.1.	Ätiologie .....	2
1.2.	Epidemiologie .....	6
1.3.	Pathogenese .....	6
1.4.	Klinische Symptomatik .....	8
1.5.	Pathomorphologie und -histologie .....	9
1.5.1.	Makroskopische Veränderungen .....	9
1.5.2.	Mikroskopische Veränderungen .....	10
1.6.	Immunität.....	11
1.7.	Diagnose.....	11
1.8.	Therapie .....	13
1.9.	Prophylaxe .....	13
2.	<b><i>M. hyopneumoniae</i> - Enzootische Pneumonie.....</b>	<b>16</b>
2.1.	Ätiologie .....	16
2.2.	Epidemiologie .....	16
2.3.	Pathogenese .....	19
2.4.	Klinische Symptomatik .....	21
2.5.	Pathomorphologie und -histologie.....	24
2.5.1.	Makroskopische Veränderungen .....	24
2.5.2.	Mikroskopische Veränderungen .....	25
2.6.	Immunität.....	26
2.7.	Diagnose.....	28
2.7.1.	Kultur .....	29
2.7.2.	Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und in-situ Hybridisierung. .....	29
2.7.3.	PCR.....	30
2.8.	Therapie .....	31
2.9.	Bekämpfung.....	32
2.9.1.	Vakzination .....	32
2.9.2.	Elimination und Eradikation .....	33

3.	<b>Kombinationsimpfungen beim Schwein.....</b>	<b>34</b>
III.	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>37</b>
1.	<b>Anzeige des Versuchsvorhabens .....</b>	<b>37</b>
2.	<b>Arbeitshypothese .....</b>	<b>37</b>
3.	<b>Versuchsbetrieb .....</b>	<b>37</b>
4.	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>39</b>
4.1.	Auswahl der Tiere.....	39
4.2.	Versuchsgruppen.....	40
5.	<b>Vakzine .....</b>	<b>41</b>
6.	<b>Datenerhebung .....</b>	<b>42</b>
6.1.	Klinische Untersuchung .....	42
6.1.1.	Allgemeinuntersuchung .....	42
6.1.2.	Lokale Reaktion an der Injektionsstelle .....	42
6.1.3.	Rektale Körpertemperatur.....	42
6.2.	Blutprobenentnahme .....	43
6.3.	Gewichtsentwicklung .....	44
6.4.	Anteil untergewichtiger Tiere.....	45
6.5.	Tierverluste und Behandlungen.....	45
6.6.	Lungenbefunde am Schlachthof .....	45
6.7.	Serologische Untersuchung.....	46
6.7.1.	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> ELISA.....	46
6.7.2.	Serum-Neutralisationstest an Verozellen zum Nachweis neutralisierender Antikörper gegen Stx2e.....	47
6.8.	Molekularbiologische und histologische Untersuchung von .....	48
	Schlachtlungen.....	48
7.	<b>Statistik.....</b>	<b>49</b>
IV.	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>51</b>
1.	<b>Verträglichkeit und Sicherheit der Vakzination .....</b>	<b>51</b>
1.1.	Klinische Untersuchung .....	51
1.2.	Rektale Körpertemperatur.....	52
2.	<b>Wirksamkeit der <i>M. hyopneumoniae</i>-Impfung .....</b>	<b>54</b>

---

2.1.	Serologie .....	54
2.1.1.	Antikörper gegen <i>M. hyopneumoniae</i> .....	54
2.1.2.	Serum-Neutralisationstest an Verozellen zum Nachweis neutralisierender Antikörper gegen das Shigatoxin Stx2e .....	57
2.2.	Gewichtsentwicklung .....	58
2.3.	Anteil untergewichtiger Tiere.....	60
2.4.	Mastdauer .....	61
2.5.	Lungenbefunde am Schlachthof .....	61
<b>3.</b>	<b>Mortalität.....</b>	<b>63</b>
<b>4.</b>	<b>Behandlung respiratorischer Erkrankungen.....</b>	<b>65</b>
<b>5.</b>	<b>Molekularbiologische und histologische Untersuchungen .....</b>	<b>66</b>
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>67</b>
<b>1.</b>	<b>Verträglichkeit und Sicherheit der Vakzination .....</b>	<b>67</b>
1.1.	Klinische Untersuchung .....	67
1.1.1.	Allgemeinuntersuchung .....	67
1.1.2.	Lokale Reaktion an der Injektionsstelle .....	68
1.1.3.	Rektale Körpertemperatur.....	69
<b>2.</b>	<b>Serologie .....</b>	<b>71</b>
2.1.	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> Antikörperverlauf .....	71
2.2.	Neutralisierende Antikörper gegen Stx2e.....	74
<b>3.</b>	<b>Gewichtsentwicklung.....</b>	<b>75</b>
<b>4.</b>	<b>Anteil an untergewichtigen Tieren.....</b>	<b>78</b>
<b>5.</b>	<b>Lungenbefunde am Schlachthof.....</b>	<b>80</b>
<b>6.</b>	<b>Mortalität und Behandlung von respiratorischen .....</b> <b>Erkrankungen.....</b>	<b>82</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>86</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>88</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>90</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>117</b>
<b>1.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>117</b>

<b>2.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>118</b>
<b>3.</b>	<b>Tabellen-Anhang .....</b>	<b>120</b>
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>126</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ADWG	average daily weight gain
AIDA	adhesin involved in diffuse adherence
BALF	bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
BALT	bronchus-associated lymphatic tissue
BDW	bodyweight
CD	cluster of differentiation
CFU	colony forming unit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED	edema disease
EDEC	edema disease <i>Escherichia coli</i>
EDP	edema disease principle
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EP	Enzootische Pneumonie
GB3	Globotriosylceramide
GB4	Globotetraosylceramide
h	Stunde
H1N1	Influenzastamm H1N1
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie

IL	Interleukin
LW	Lebenswoche
<i>M. hyopneumoniae</i>	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
MIRD	mycoplasma induced respiratory disease
ng	nano gramm
n-PCR	nested-polymerase chain reaction assay
PCV2	porzines Circovirus Typ 2
p.i.	post infectionem
p.inj.	post injectionem
PMWS	postweaning multisystemic wasting syndrome
PRDC	porcine respiratory disease complex
PRRSV	porcine reproductive and respiratory syndrome virus
PWD	postweaning diarrhea
rt-PCR	reverse transcriptase PCR
SD	Standardabweichung
SIV	swine influenza virus
SLT	shiga like toxin
Stx2e	Shigatoxin 2e
TLR	toll like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

## I. EINLEITUNG

Da ein Großteil der Impfungen beim Ferkel während der Säugezeit durchgeführt wird, sind viele Ferkelimpfstoffe bereits ab der ersten Lebenswoche zugelassen. Dieser frühe Impfzeitpunkt ist einerseits absinkenden maternalen Antikörpern sowie frühen Infektionszeitpunkten und der Dauer des Aufbaus einer ausreichenden Immunität geschuldet. Aufgrund der betriebsindividuellen Infektionsdynamik kann es in bestimmten Betrieben sinnvoll sein, mehrere Impfstoffe zur gleichen Zeit zu verabreichen. Jedoch gibt es, insbesondere bei neu entwickelten Impfstoffen, wenig Erfahrung bezüglich der Sicherheit und Wirksamkeit einer zeitgleichen Anwendung eines zweiten Impfstoffes. Im Hinblick auf tierschutzrelevante Aspekte ist eine gleichzeitige Applikation mehrerer Impfstoffe anzustreben, da laut MÜHLBAUER (2009) bereits das Handling von Schweinen mit Stress verbunden ist und auf diese Weise handlingsbedingter Stress für Muttersau und Ferkel reduziert werden kann.

Die Ödemkrankheit der Schweine, verursacht durch *Escherichia coli* (*E. coli*) sowie die Enzootische Pneumonie, ausgelöst durch eine Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*), führen weltweit zu wirtschaftlichen Verlusten (MAES et al., 1996; FAIRBROTHER und GYLES, 2012; THACKER und MINION, 2012). Die Vakzination gilt neben der Optimierung des Managements als wirksame Maßnahme die jeweiligen Infektionen zu kontrollieren (MAES et al., 2008; LILLIE-JASCHNISKI et al., 2013).

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Wirksamkeit einer One-Shot Impfung gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* (Stellamune<sup>®</sup> One) bei zeitgleicher Applikation einer Vakzine gegen die Ödemkrankheit (ECOPORC SHIGA<sup>®</sup>) bei Ferkeln in der ersten Lebenswoche in einem *M. hyopneumoniae*-infizierten Betrieb zu überprüfen. Als Kontrollgruppe diente eine *M. hyopneumoniae*-ungeimpfte Gruppe.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. *E. coli* - Ödemkrankheit

#### 1.1. Ätiologie

*Escherichia coli* zählen zu den gramnegativen fakultativ anaeroben Stäbchenbakterien und werden der Familie der *Enterobacteriaceae* und Gattung *Escherichia* zugeordnet (WIELER et al., 2011). *E. coli* sind 1,1 - 1,5 x 2,0 - 6,0 µm große, teils peritrich begeißelte und kapselbildende Stäbchenbakterien (WIELER und EWERS, 2011). Als natürliches Reservoir dient der Darm von Säugetieren (WIELER et al., 2011). Sie gehören auch beim Schwein der natürlichen Darmflora an (WENDT et al., 2013).

Kommensale *E. coli*-Stämme werden von intestinal (InPEC) und extraintestinal (ExPEC) pathogenen *E. coli*-Stämmen unterschieden, wobei ihre Einteilung in Pathovaren anhand ihrer Virulenzfaktoren erfolgt (Tabelle 1) (WIELER und EWERS, 2011). Die Serotypisierung erfolgt anhand des Nachweis bestimmter Oberflächenstrukturen der Bakterien, wie der O-Antigene (Bestandteil des Lipopolysaccharids der Zellhülle), der K-Antigene (Kapselpolysaccharid), der H-Antigene (Flagellen-Antigen) und der F-Antigene (Fimbrien-Antigen) (WENDT et al., 2013).

Die Erreger der Ödemkrankheit (EDEMA DISEASE *E. COLI*/ EDEC) werden vor allem den Serovaren O138, O139, O141 (SMITH et al., 1983; GANNON et al., 1988) sowie vereinzelt O147 und O157 zugeordnet (WIELER et al., 2011). Zu ihren Virulenzfaktoren zählen einerseits Anheftungsfaktoren wie die F18ab- sowie F18ac-Fimbrien und andererseits das Shiga-like Toxin 2e (Stx2e) (NAGY et al., 1997; WIELER et al., 2011). F18ac-Fimbrien werden vorwiegend von *E. coli* der Serogruppen O141 und O157 exprimiert (NAGY et al., 1997). Rezeptoren für F18-Fimbrien sind genetisch determiniert (WENDT et al., 2013). Schweine ohne diesen Rezeptor sind gewissermaßen resistent gegen EDEC (WENDT et al., 2013). Das Maß für die Exprimierung von F18-Rezeptoren ist altersabhängig unterschiedlich, da Schweine diese vorwiegend erst ab einem Alter von 20 Tagen ausbilden (WENDT et al., 2013). Dies erklärt die Tatsache, dass die Ödemkrankheit vorwiegend bei älteren Ferkeln auftritt (WENDT et al.,

2013). Als weiterer Adhäsionsfaktor wird ADHESIN INVOLVED IN DIFFUSE ADHERENCE (AIDA) beschrieben, der häufig in Kombination mit den für ED und POST-WEANING-DIARRHEA (PWD) ursächlichen Virulenzfaktoren F18 und Stx2e auftritt (NIEWERTH et al., 2001). AIDA-I vermittelt die Anheftung der *E. coli* im Mukus oberhalb der Darmepithelzellen und fördert somit deren Kolonisierung (WIELER und EWERS, 2011).

Nach WIELER et al. (2011) bildet eine gewisse Anzahl (16,1 - 57,7 %) der Stämme zusätzlich zu den EDEC-typischen Virulenzfaktoren Enterotoxine aus. Zwei Haupttypen von Shiga-like Toxinen lassen sich anhand ihrer antigenetischen Kreuzreaktivität mit dem Toxin von *Shigella-dysenteriae* I identifizieren, das Shiga-like Toxin 1 (SlT-1) und das Shiga-like Toxin 2 (SlT-2) (STROCKBINE et al., 1986). Die bei der Ödemkrankheit zum Tragen kommende Variante des Shiga-Like Toxins 2, Shiga-like Toxin 2e (SLT-2e) hingegen zeichnet sich dadurch aus, dass es in vitro mehr für Vero- als für HeLa-Zellen toxisch ist (BLANCO et al., 1983; MARQUES et al., 1987). Zudem ist das von EDEC produzierte Stx2e hitzelabiler als SLT-1 und -2 und kann nicht durch Anti-SLT1 neutralisiert werden (GANNON und GYLES, 1990). SLT-2e lässt sich mittels Anti-SLT2 neutralisieren, wonach es als SLT-2-variant (SLT2-v) katalogisiert wurde (MARQUES et al., 1987). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird das SLT-2v als Stx2e-Toxin benannt.

**Tabelle 1: Zusammenfassung der wichtigsten *E. coli*-Pathovaren und Virulenzfaktoren nach WIELER und EWERS (2011)**

	Virulenzfaktoren/ Adhäsine	Toxine	Häufige Serovare	Typische Infektionskrankheit
<b>Intestinal pathogene <i>E. coli</i> (InPEC)</b>				
Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>E. coli</i> secreted Protein A (EspA)</li> <li>- Intimin</li> <li>- Long polar Fimbriae (Lpf)</li> <li>- Adhäsion Fimbriae/rabbit 1 (AF/R1)</li> <li>- Porcine attaching and effacing associated (Paa)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lymphostatin (LifA)</li> <li>- Serinprotease (EspP)</li> <li>- <i>E. coli</i> secreted Proteins (Esp), F, G, H</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O2, O5, O13: H2</li> <li>- O15: NM</li> <li>- O25: H11</li> <li>- O26: NM (non-motile)/ H11</li> <li>- O45, O103: H2</li> <li>- O111: NM/H2, O119, O128, O145</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diarrhö (Kaninchen, Kalb, Schwein, Hund, Katze)</li> </ul>
Enterotoxische <i>E. coli</i> (ETEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fimbrien (F4, F5, F6, F17b, F18ac, F41)</li> <li>- Porcine attaching and effacing associated (Paa)</li> <li>- Adhäsion für diffuse Adhärenz (AIDA-I)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hitze labile Enterotoxine (LT-I; LT-II)</li> <li>- Hitze stabile Enterotoxine (ST-Ia, ST-Ib, ST-II)</li> <li>- Hitze stabiles <i>E. coli</i>-Enterotoxin (EAST1)</li> <li>- <math>\alpha</math>-Hämolyysin (<math>\alpha</math>-Hly)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O8, O9, O45, O64, O20, O101, O108, O138, O139, O141, O147, O149, O157</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sekretorische Diarrhö (Kalb, Saugferkel, Lamm, Ziege, Hund, Katze)</li> </ul>
Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i> (STEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>E. coli</i>-sezerniertes Protein A (EspA)</li> <li>- Intimin</li> <li>- EHEC Factor of Adhesion 1 (Efa-1)</li> <li>- Long polar Fimbriae (Lpf)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Shigatoxin (Stx; Stx1; Stx2)</li> <li>- Enterohämolyysin (EHly)</li> <li>- Serinprotease (EspP)</li> <li>- <i>E. coli</i> secreted Proteins (Esp) F, G, H</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O5: NM</li> <li>- O26: NM/H11</li> <li>- O91: NM</li> <li>- O111: NM/H2/H8</li> <li>- O103: H2</li> <li>- O145: H28</li> <li>- O118: NM/H16</li> <li>- O157: NM/H7</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- (osmotische) Diarrhö (Kalb, Lamm, Ziege, Dammwild; sporadisch Hund, Katze)</li> </ul>
Ödemkrankheits <i>E. coli</i> (EDEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- F18ab</li> <li>- Adhäsion für diffuse Adhärenz (AIDA-I)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Shigatoxin 2e (Stx2e)</li> <li>- <math>\alpha</math>-Hämolyysin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O138, O139, O141, O147, O157</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absetzferkel</li> </ul>

Uropathogene <i>E. coli</i> (UPEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- P-Fimbrien (Pap)</li> <li>- Typ-I-Fimbrien (Fim)</li> <li>- S-Fimbrien (Sfa)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\alpha</math>-Hämolysin (<math>\alpha</math>-Hly)</li> <li>- Zytonekrose-Faktor (CNF-1)</li> <li>- Sezerniertes Autotransporter-Toxin (Sat)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O1, O2, O4, O6, O18, O25, O74</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zystitis, Pyelonephritis</li> <li>- Hund, Katze, Coliforme Mastitis (CM) beim Schwein</li> </ul>
Aviäre pathogene <i>E. coli</i> (APEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Typ-I-Fimbrien (Fim)</li> <li>- Temperatursensitives Hämagglutinin (Tsh)</li> <li>- P-Fimbrien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vakuolisierendes Autotransporter-Toxin (Vat)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O1: H1/H2</li> <li>- O2: H1/H2/H5</li> <li>- O18, O78</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Systemische Infektionen beim Wirtschaftsgefügel</li> </ul>
Septikämische <i>E. coli</i> (SEPEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fimbrien (F17b, F17c,)</li> <li>- CS31A</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- O78: K80</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Septikämie bei Kälbern und Lämmern</li> </ul>

## 1.2. Epidemiologie

*E. coli*-Infektionen sind weit verbreitet und kommen sowohl in Industrie- als auch Entwicklungsländern vor (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Ihr bevorzugter Lebensraum ist beim Schwein der Gastrointestinaltrakt (FAIRBROTHER und GYLES, 2012).

Es wird angenommen, dass die Verbreitung pathogener *E. coli* durch Trinkwasser, Aerosole, Futter, Viehverkehr, Schweine und durch andere Tierarten stattfinden kann (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Die Ansteckung mit pathogenen *E. coli* erfolgt oral (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Jedoch sind nicht alle durch *E. coli* hervorgerufenen Krankheitsbilder ansteckend: So scheinen intestinale Infektionen, bedingt durch ETEC, EDEC und EPEC kontagiös zu sein, hingegen Infektionen verursacht durch ExPEC in der Regel nicht (FAIRBROTHER und GYLES, 2012).

## 1.3. Pathogenese

Die Übertragung pathogener *E. coli* beim Schwein erfolgt vertikal von der Sau auf ihren Nachwuchs und im späteren Verlauf horizontal von Ferkel zu Ferkel (SIDLER et al., 2013). Nach BURGSTALLER (1981) entwickeln sich die EDEC vorwiegend zwei Wochen nach dem Absetzen der Ferkel, was mit einer abrupten Futterumstellung und/oder einer einseitig zusammengesetzten Futterration (zu kohlenhydratreich) zusammenhängen mag. Auch HEINRITZI (2006a) beschreibt, dass ein abrupter Futterwechsel zu einer Dysbiose im Darm von Ferkel führt, was im Folgenden eine massenhafte Vermehrung enteropathogener *E. coli* hervorruft. Des Weiteren spielen eine geringe Trypsin- und Pepsin-Aktivität sowie eine reduzierte Salzsäureproduktion durch die Fundusdrüsen im Magen eines wenige Wochen alten Ferkels bei der Futterumstellung eine bedeutende Rolle (BURGSTALLER, 1981). Werden *E. coli*-Bakterien in ausreichenden Mengen von Schweinen aufgenommen, können die Erreger, nachdem sie sich im Gastrointestinaltrakt angesiedelt und proliferiert haben, laut FAIRBROTHER und GYLES (2012) hohe Bakterienzahlen von  $10^9$  Keime/ g Magen-Darm-Inhalt erreichen, die folglich für Absetz-Diarrhö und/oder Ödemkrankheit ursächlich sein können. Bereits einen Tag nach experimenteller Infektion von drei Wochen alten Ferkeln mit einem pathogenen *E. coli* Stamm (S1191) kann Stx2e im Kot detektiert werden (CORNICKE et al.,

2000). In dieser Studie von CORNICK et al. (2000) treten maximale Konzentrationen an Stx2e-Titern sowie Bakterienkolonisation des verwendeten *E. coli*-Stammes (S1191) im Ileum an Tag vier post inoculationem bei Schweinen ohne klinische Anzeichen und an Tag sechs post inoculationem bei Schweinen mit klinischen Anzeichen auf. Zu Beginn der Krankheit scheint der Gehalt an Stx2e im Ileum verglichen zu dem im Kolon signifikant höher zu sein (CORNICK et al., 2000). Es werden höhere ileale Toxintiter ( $\geq 1:8192$ ) und eine hohe bakterielle Kolonisationsdichte von  $\geq 10^6$  cfu/cm im Ileum vor allem bei klinisch erkrankten Tieren detektiert, wobei keine absolute Korrelation zwischen Stx2e-Titer und bakterieller Besiedlungsdichte gemessen werden kann (CORNICK et al., 2000). Um eine Kolonisation des Darmes zu ermöglichen, benötigen EDEC und ETEC das Vorhandensein von Fimbrienadhäsinen und komplementären Rezeptoren im Dünndarmepithel oder in der Schleimschicht des Jejunums (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Dies geschieht mittels F18-Fimbrien, welche an spezifischen, genetisch determinierten Enterozyten der Dünndarmschleimhaut anhaften (SIDLER et al., 2013). Fimbrien sind Proteinstrukturen, die es dem Erreger ermöglichen, eine spezifische Ligand-Rezeptor-Bindung herzustellen (WIELER und EWERS, 2011). Die Empfänglichkeit mancher Schweine für die Ödemkrankheit ist variabel und kann nach SMITH und HALLS (1968) erblich bedingt sein.

Das von den EDEC produzierte Stx2e-Toxin wird vom Darm in den Blutkreislauf absorbiert und verursacht vaskuläre Schäden in den Zielorganen, indem das Toxin an Globotetraosylceramide (GB<sub>4</sub>-Rezeptor) von roten Blutkörperchen bindet (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Übereinstimmend bindet nach DEGRANDIS et al. (1989) das Stx2e-Toxin präferentiell an GB<sub>4</sub>-Rezeptoren und in reduziertem Maße auch an Globotriosylceramide (GB<sub>3</sub>-Rezeptoren). In Serum und Plasma (MATISE et al., 2003) sowie in Cerebrospinalflüssigkeit (CORNICK et al., 2000) lässt sich Stx2e bei infizierten Tieren nicht detektieren. In einem Infektionsversuch stellen CORNICK et al. (2000) frühestens fünf Tage post inoculationem mit einem pathogenen *E. coli*-Stamm (S1191) eine vaskuläre Nekrose fest. Stx2e bindet an Gefäße in der Submukosa und der *Muscularis Mucosae* und an interstitielle Zellen der Darmzotten von Jejunum, Ileum und unter Umständen von Kolon (WADDELL et al., 1996). Eine minimale Dosis von

0,1 ng Stx2e verhindert nach MACLEOD et al. (1991b) die Proteinsynthese in den porzinen endothelialen Zellen.

Darüber hinaus beobachten WADDELL et al. (1996), dass Stx2e zudem schwach an den Bürstensaum von Enterozyten im unteren Bereich der Zotten von Jejunum und Ileum binden, jedoch nicht im Kolon. Manche EDEC-Stämme gelangen vom Darm zu den mesenterialen Lymphknoten, wo sie Stx2e produzieren und somit einen alternativen Mechanismus zur Absorption von Stx2e ins Blut darstellen (FAIRBROTHER und GYLES, 2012).

Die häufigste durch Stx2e hervorgerufene Veränderung ist eine degenerative Angiopathie kleiner Arterien sowie Arteriolen (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). CLUGSTON et al. (1974a) stellen 40h nach intravenöser Verabreichung von EDEMA DISEASE PRINCIPLE (EDP) bei infizierten Schweinen einen Blutdruckanstieg fest, der zugleich mit den für die Ödemkrankheit typischen neurologischen Veränderungen im Tier einhergeht (CLUGSTON et al., 1974a). Dieser Anstieg des Blutdruckes führt laut CLUGSTON et al. (1974a) dazu, dass die ohnehin bereits lädierten Gefäße noch weiter geschädigt werden.

Neurologische Ausfallerscheinungen sind vermutlich einerseits der Ausbildung eines Ödems (NIELSEN und CLUGSTON, 1971) und andererseits einer Hypoxie durch verminderten Blutfluss im zentralen Nervensystem (ZNS) geschuldet (CLUGSTON et al., 1974a). Dieser verminderte Blutfluss kommt wahrscheinlich durch die sich ausbildenden Ödeme sowie aufgrund der Läsionen in den Gefäßen zustande (CLUGSTON et al., 1974a).

#### **1.4. Klinische Symptomatik**

Die Ödemkrankheit tritt zumeist bei Ferkeln ein bis zwei Wochen nach dem Absetzen auf (WENDT et al., 2013) und kann einzelne Tiere oder aber auch die ganze Gruppe betreffen (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). In vielen Fällen sind die besonders gut entwickelten Ferkel davon betroffen (WENDT et al., 2013). Häufig finden sich als erste Anzeichen der Erkrankung plötzlich verstorbene Tiere, welche augenscheinlich ohne Krankheits symptomatik verendet sind (FAIRBROTHER und GYLES, 2012; WENDT et al., 2013). Nach experimentell ausgelöster ED beschreiben MACLEOD et al. (1991a) Inappetenz und zunehmende Desorientierung sowie Ödeme an den Augenlidern. In einer

weiteren experimentellen Studie von CORNICK et al. (2000), in der Schweine oral mit *E. coli* (Serotyp O139) infiziert werden, vergehen fünf Tage, bis sich klinische Zeichen in Form von neurologischen Ausfallserscheinungen oder Tod äußern. Inkoordination tritt kurz nach dem Auftreten von Ödemen auf und verschlimmert sich soweit, dass die Tiere nicht mehr in der Lage sind aufzustehen (MACLEOD et al., 1991a). Neurologische Ausfallserscheinungen zeigen sich auch in Form von Tremor, Ruderbewegungen der Gliedmaßen, versteiften Gliedmaßen, Krämpfen, veränderte/ -n Stimme/ Tonlauten, Dyspnoe (MACLEOD et al., 1991a; WENDT et al., 2013) sowie Koma (MACLEOD et al., 1991a). In milden Fällen werden die subkutanen Ödeme von Juckreiz begleitet, welcher nach Abheilen wieder abklingt (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Bei einigen Tieren tritt im Endstadium der Erkrankung wässriger Durchfall mit Anhäufung frischer Blutgerinnsel auf (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Dies hängt damit zusammen, dass gewisse Stämme (O141:K85, K88 ab) neben dem Stx2e-Toxin zusätzlich Enterotoxine bilden (LINGGOOD und THOMPSON, 1987). Neben dem akuten Verlauf der Ödemkrankheit wird zudem ein subklinischer Verlauf beschrieben, bei dem Tiere klinisch unauffällig scheinen, allerdings vaskuläre Läsionen entwickeln und eine verminderte Wachstumsrate haben (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Die chronische Ödemkrankheit tritt bei einem kleinen Anteil der Schweine auf, welche die akute Krankheitsphase überleben oder bei denen Absetzdurchfall, verursacht durch Stx2e-produzierende *E. coli*, im Vordergrund steht (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Diese überlebenden Tiere entwickeln sich zu Kümmerern und zeigen teilweise zeitlebens zentralnervöse Störungen wie Blindheit, Kopfschlagen, Kopfschiefhaltung, Manegebewegungen sowie Lähmungen (WENDT et al., 2013).

## **1.5. Pathomorphologie und -histologie**

### **1.5.1. Makroskopische Veränderungen**

Der Ernährungszustand betroffener Tiere ist meist gut (FAIRBROTHER und GYLES, 2012; WENDT et al., 2013) und der Magen häufig gut gefüllt (MACLEOD et al., 1991a; FAIRBROTHER und GYLES, 2012), wohingegen der Dünndarm relativ futterleer ist (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Ödeme

treten an verschiedenen Stellen im Körper auf, können aber nach FAIRBROTHER und GYLES (2012) auch gänzlich fehlen. Subkutane Ödeme treten vor allem im Gesicht, besonders am Augenlid auf, lassen sich aber auch in der Submukosa der Kardia-Region sowie im Fundusbereich des Magens wie auch im Mesokolon, im Dünndarmmesenterium und in der Gallenblasenwand finden (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). MACLEOD et al. (1991a) stellen bei experimentell infizierten Schweinen Ödeme des Mesenteriums des Kolonkegels sowie des terminalen Kolons fest, wohingegen Ödeme im Dünndarm-Mesenterium nur bei Verabreichung höherer Dosen von purifizierten Stx2e-Toxins auftreten. Bei einem gewissen Anteil an Tieren lässt sich ein Lungenödem mit typischer sublobulärer Stauung beobachten (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Des Weiteren können die Lymphknoten des Mesenteriums sowie Kolons vergrößert, ödematös und gestaut sein (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). In perikardialen, pleuralen und peritonealen Hohlräumen findet sich vereinzelt seröse Flüssigkeit (MACLEOD et al., 1991a; FAIRBROTHER und GYLES, 2012), in der Fibrinablagerungen vorhanden sein können (FAIRBROTHER und GYLES, 2012).

Nach FAIRBROTHER und GYLES (2012) zeigen einige Tiere das klinische Bild einer hämorrhagischen Gastroenteritis, mit Ausbildung extensiver Hämorrhagien sowie Ödemen in der Submukosa von Kardia und der Mukosa von Dünndarm und anschließenden Dickdarmanteilen. Auch MACLEOD et al. (1991a) stellen in einem Infektionsversuch Hämorrhagien im terminalen Kolon wie auch im Cerebellum fest.

### **1.5.2. Mikroskopische Veränderungen**

Bei genauer Betrachtung der Veränderungen in der Mikrozirkulation im Darm können METHIYAPUN et al. (1984) eine Vakuolisierung und Schwellung von endothelialeem Gewebe sowie perivaskuläre Ödeme wie auch Ablagerung von elektronendichtem Material (Fibrinablagerung) finden. Darüber hinaus wird eine Proliferation von Endothelzellen sowie eine Nekrose der *Tunica media* beobachtet (METHIYAPUN et al., 1984). CLUGSTON et al. (1974b) stellen bei experimentell ausgelöster *E. coli*-Enterotoxämie vermehrt nicht-entzündliche Ödeme sowie eine Angiopathie in kleinen Arterien und Arteriolen fest. Die

primären arteriellen Veränderungen sind in akuten Fällen ein murales Ödem sowie eine hyaline Degeneration und bei überlebenden Tieren eine mediale Nekrose, welche sich durch Pyknose und Karyorrhexis in den Muskelzellen der Arteriolen manifestiert (CLUGSTON et al., 1974b). Bei Tieren, die in der akuten Phase der Ödemkrankheit getötet werden, kann v.a. in der Submukosa der Kardialregion des Magens, der Submukosa des Zäkums sowie in den Lymphknoten und dem zentralen Nervensystem nicht-entzündliche Flüssigkeit gefunden werden (CLUGSTON et al., 1974b). Auch Gefäße im ZNS weisen hyaline bzw. fibrinoide Gefäßwanddegenerationen und -nekrosen auf (WENDT et al., 2013). Diese sogenannte zerebrospinale Angiopathie zeichnet sich hauptsächlich durch perivaskuläre Plasmarrhagien und Malazieherde aus (WENDT et al., 2013). Es kommt im weiteren Verlauf zu neuronalen Nekrosen, Sphäroidbildung (Aufquellung von Axonen), Myelinolyse sowie zum Auftreten von Gitterzellen (WENDT et al., 2013).

### **1.6. Immunität**

Auf enterische *E. coli*-Infektionen folgt eine antikörpervermittelte Immunität, welche durch eine humorale Immunantwort hervorgerufen wird (MURPHY et al., 2009b; FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Anfänglich werden die Ferkel durch im Kolostrum enthaltene IgG-Antikörper und folgend durch eine lokale intestinale Immunantwort (IgA-Antikörper) vor Infektionen geschützt (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Diese spezifischen Antikörper sind vorwiegend gegen Oberflächenantigene wie Fimbrien oder die Polysaccharid-Kapsel der ETEC gerichtet und verhindern eine Adhäsion des Erregers an Rezeptoren der Epithelzellen im Darm (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). MACLEOD und GYLES (1991) sowie OANH et al. (2012) und FLORIAN et al. (2012) beobachteten nach einer Immunisierung von Schweinen mittels eines inaktivierten oder genetisch modifizierten Stx2e-Toxins die Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen das Stx2e-Toxin.

### **1.7. Diagnose**

Eine Verdachtsdiagnose kann aufgrund der klinischen Symptome, wie plötzlich auftretende Ataxie und schwanker Gang, sowie anhand von Ödemen an prädestinierten Stellen, wie etwa dem Augenlid und der Stirn, gestellt werden

(FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Hilfreich ist der Zeitpunkt des Auftretens der Symptomatik, nämlich ein bis zwei Wochen nach dem Absetzen der Ferkel (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Typische pathologische Befunde, in Form von Ödemen in der Schleimhaut des Magens sowie des Mesenteriums können hinweisend sein (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Aufgrund dessen, dass *E. coli*-Bakterien vorwiegend den Dünndarm besiedeln ist es sinnvoll, diesen bakteriologisch zu untersuchen und nach erfolgreicher Anzucht eine Typisierung vorzunehmen (WENDT et al., 2013). Pathogene *E. coli*-Isolate können anhand dieser Typisierung identifiziert werden, da nur eine geringe Anzahl an O-Serogruppen mit der Ausprägung klinischer Krankheitsbilder in Verbindung steht (FRYDENDAHL, 2002; FAIRBROTHER und GYLES, 2012). In einer Studie von FRYDENDAHL (2002) korrelieren die O-Serogruppen sowie die hämolytische Aktivität der *E. coli* mit deren Pathogenität. Hilfreicher ist es jedoch *E. coli* anhand ihrer Virulenzfaktoren zu typisieren (FRYDENDAHL, 2002; FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Hierzu entwickelten FRYDENDAHL et al. (2001) eine 5' Nuklease PCR, die sich als schnelles und spezifisches Diagnostikum für die Detektion von Virulenzfaktoren von pathogenen *E. coli* herausgestellt hat. Auch der von LEE et al. (2008) entwickelte MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY (Multiplex PCR) ist geeignet, enterotoxische *E. coli* bei Ferkeln nachzuweisen. Es werden 14 Sets von Oligonucleotid-Primern eingesetzt, um 13 für ETEC typische Virulenzfaktoren, wie etwa Fimbrienantigene (F4, F5, F6, F18 und F41) oder Gene für Enterotoxine (STa, STb, LT, Stx2e und EAST1) sowie Gene für alternative Adhäsionsfaktoren (F1, AIDA-1 und pAA) zu detektieren (LEE et al., 2008).

Histopathologisch können *E. coli* Bakterien anhand von in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe sowie mittels Immunhistochemie oder indirekter Immunfluoreszenz mit Hilfe gefrorener Gewebeproben dargestellt werden (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Der Nachweis aus Kot ist ebenfalls möglich, allerdings können in perakuten Fällen entsprechende Erreger in den Fäzes noch nicht detektierbar sein (WENDT et al., 2013). *E. coli*-Stämme, welche ursächlich für die Ödemkrankheit sind, zeigen in der Kultur zumeist Hämolyse, jedoch kann allein aufgrund dieser Tatsache nicht auf EDEC geschlossen werden, da Absetzschweine hämolysierende *E. coli*-Stämme

auch ohne relevante Virulenzfaktoren beherbergen können (WENDT et al., 2013). Daher ist es sinnvoll, auf den molekularbiologischen Nachweis der Gene zurückzugreifen, welche für die typischen Virulenzfaktoren, wie etwa die Fimbrienantigene oder das Stx2e-Toxin, codieren (WENDT et al., 2013).

### **1.8. Therapie**

Bei Auftreten klinischer Symptome der Ödemkrankheit kann eine parenterale antibiotische Therapie mit wirksamen Präparaten eingeleitet werden (WENDT et al., 2013). Hierbei sollte laut FAIRBROTHER und GYLES (2012) auf Antiinfektiva zurückgegriffen werden, welche hohe therapeutische Konzentrationen im Darmlumen erwirken können, wie etwa Amoxicillin/Clavulansäure, Apramycin, Ceftiofur, Neomycin, Trimethoprim, Fluorquinolone oder Cephalosporine. Vor Beginn einer antimikrobiellen Therapie sollte eine *E. coli*-Infektion bestätigt sowie ein Resistenztest durchgeführt werden, da die antimikrobielle Sensitivität unter *E. coli*-Isolaten sehr variieren kann und bei ED oder PWD verursachenden *E. coli*-Isolaten hohe Resistenzraten vorliegen (AMEZCUA et al., 2002; MAYNARD et al., 2003; FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Zudem muss bedacht werden, dass es durch das nachfolgende Absterben der gram-negativen Keime zu einer massenhaften Freisetzung von Lipopolysacchariden kommen kann, welche in der Lage sind, einen lebensbedrohlichen Endotoxinschock herbeizuführen, sodass vorbeugend die Applikation nichtsteroidaler Antiphlogistika angezeigt ist (WENDT et al., 2013). Eine metaphylaktische Gabe von Antibiotika über das Futter oder das Trinkwasser kann im Bestand das weitere Auftreten klinisch erkrankter Tiere reduzieren, da die Vermehrung und die Aktivität pathogener *E. coli* Keime im Darm gehemmt wird (WENDT et al., 2013). Hierfür kommen vor allem Aminoglycoside und Colistin zum Einsatz, wobei letzteres den Vorteil einer guten Stabilität sowie geringen Toxizität hat und sehr langsam Resistenzen entwickelt (FAIRBROTHER und GYLES, 2012).

### **1.9. Prophylaxe**

Um Verdauungsstörungen beim Absetzen der Ferkel vorzubeugen, ist es ratsam die Tiere langsam an das neue Futter zu gewöhnen (BURGSTALLER, 1981; WENDT et al., 2013). Eine restriktive Fütterung mehrerer kleiner Portionen über den Tag verteilt reduziert das Risiko einer durch *E. coli* hervorgerufenen

Erkrankung (FAIRBROTHER und GYLES, 2012; WENDT et al., 2013). Weitere positive Effekte erzielen eine Erhöhung des Rohfaseranteils im Futter, sowie eine Reduzierung des Gehalts an Mengenelementen und des Energie- und Proteingehalts im Futter (WENDT et al., 2013). BERTSCHINGER et al. (1979) finden heraus, dass bei Absetzschweinen, welche mit dem *E. coli*-Isolat O139:K82 infiziert sind und welchen eine extrem nährstoffarme und rohfaserreiche Diät gefüttert wird, die Zahl an pathogenen *E. coli* in den Fäzes deutlich reduziert werden kann. Im Vergleich dazu verenden in der Kontrollgruppe, welche eine normale Ferkel- und Absetzfuttermischung erhalten, 26 % der Versuchstiere (BERTSCHINGER et al., 1979). Nach BERTSCHINGER et al. (1979) führen diese Diäten, die den Krankheitsausbruch verhindern können, dazu, dass bei den Schweinen mit starken Wachstumseinschränkungen zu rechnen ist. Somit kann eine solche Diät nur mit Supplementierung einer aktiven Immunisierung und lediglich über einen limitierten Zeitraum nach dem Absetzen eingesetzt werden (BERTSCHINGER et al., 1979). Des Weiteren können dem Futter organische Säuren, Probiotika, Zink-Oxid sowie getrocknetes Plasma zugesetzt werden (FAIRBROTHER und GYLES, 2012). Nach NOLLET et al. (1999) kann durch eine Futtersupplementation von porzinen Plasma Puder bei gerade abgesetzten Tieren die Ausbildung ED-ähnlicher Symptome verhindert und die fäkale Ausscheidung des Erregers reduziert werden. FAIRBROTHER und GYLES (2012) schlagen zudem vor, das Absetzalter der Ferkel zu erhöhen, für ausreichend Wärme zu sorgen und auf Hygiene zu achten.

Ein weiterer Schritt zur Vorbeugung der Ödemkrankheit stellt die Immunisierung von Schweinen dar. MACLEOD und GYLES (1991) können mittels passiver oder aktiver Immunisierung auf Basis von inaktiviertem Stx2e-Toxin erreichen, dass immunisierte Versuchstiere neutralisierende Antikörper im Serum aufbauen und folglich nach Challenge mit purifizierten Stx2e überleben. BERTSCHINGER et al. (2000) untersuchen die aktive orale Immunisierung von Saugferkeln auf Basis einer F18ac-Fimbrien-Vakzine. Sie kommen zu dem Ergebnis, dass die oral verabreichte Fimbrien-Vakzine nur hinsichtlich der homologen Fimbrienvariante mittels IgA-Antikörper Schutz bietet (BERTSCHINGER et al., 2000). OANH et al. (2012) zeigen in einer Studie,

dass die aktive Immunisierung von Saugferkeln und trächtigen Sauen mittels Stx2e-Toxoid zu einer starken Immunantwort in geimpften Tieren führt, die sich anhand hoher Antikörper-Titer gegen Stx2e widerspiegelt. Zusätzlich werden geimpfte Tiere vor der Ausprägung von klinischen Anzeichen der Ödemkrankheit geschützt und es werden keine negativen Effekte auf die Wachstumsleistung der Tiere festgestellt (OANH et al., 2012). Die Ferkel der gegen Stx2e-geimpften Sauen entwickeln signifikant höhere spezifische Stx2e-Antikörperspiegel, welche bis zu einem Monat nach dem Absetzen anhalten (OANH et al., 2012).

Eine neue Möglichkeit der Vakzination bietet die Toxoidvakzine ECOPORC SHIGA<sup>®</sup> (LILLIE-JASCHNISKI et al., 2013). Es handelt sich um eine Subunitvakzine, bei der durch genetische Modifikation eine Toxinmutante entwickelt wurde (LÜDER et al., 2012), wodurch die Zytotoxizität des modifizierten Stx2e-Antigens um mehr als vier Zehnerpotenzen reduziert werden konnte (FLORIAN et al., 2012). Anhand von Challenge-Studien kann bereits gezeigt werden, dass die durch Vakzination mit diesem Impfstoff entstehenden neutralisierenden Antikörper gegen das Stx2e-Toxin in direktem Zusammenhang mit der Ausbildung eines Schutzes gegen die Ödemkrankheit stehen (LÜDER et al., 2012). Die Wirksamkeit und Verträglichkeit des Impfstoffes konnte in verschiedenen Betrieben, inklusive von Problembetrieben, bestätigt werden (LILLIE-JASCHNISKI et al., 2013). Hierbei werden unter Verwendung der Vakzine Tierverluste, der Anteil an Kümmerern und der Verbrauch an oralen Antibiotika statistisch signifikant reduziert (LILLIE-JASCHNISKI et al., 2013). Die geimpften Studientiere zeigen signifikant höhere Zunahmen und die durchschnittliche Aufzuchtdauer reduziert sich von 53,4 Tagen auf 51,6 Tage (LILLIE-JASCHNISKI et al., 2013). Eine einmalige Applikation des ECOPORC SHIGA<sup>®</sup>-Impfstoffes am 4. Lebenstag erzielt eine Immunität mit Ausbildung neutralisierender Antikörper gegen Stx2e ab dem 21. Lebenstag, die bis zum 105. Lebenstag der Tiere anhält (LÜDER et al., 2012).

## 2. *M. hyopneumoniae* - Enzootische Pneumonie

### 2.1. Ätiologie

*Mycoplasma hyopneumoniae* wird als Primärerreger der Enzootischen Pneumonie beschrieben, tritt weltweit beim Schwein auf (THACKER und MINION, 2012) und zählt laut SELBITZ (2011a) zu den häufigsten und wichtigsten bakteriellen Erregern beim Schwein. Mykoplasmen werden der Klasse der *Mollicutes* zugeordnet, welche sich in vier Ordnungen unterteilen lässt: die *Entomoplasmatales*, die *Acholeplasmatales*, die *Anaeroplasmatales* und die *Mycoplasmatales* (VALENTIN-WEIGAND, 2011). Letztgenannte Ordnung unterteilt sich in die Familie der *Mycoplasmataceae* mit den Genera der *Mycoplasma* und *Ureoplasma* (VALENTIN-WEIGAND, 2011). Als zellwandlose Bakterien (SELBITZ, 2011a) zählen Mykoplasmen mit einer Größe (Durchmesser) von 0,4 - 1,2 Mikrometer (TAJIMA und YAGIHASHI, 1982) zu den kleinsten, sich selbst vermehrenden Bakterien (RAZIN, 1992). Da ihre Zellen nur von einer Zytoplasmamembran umgeben sind und somit keine starre Zellwand aufweisen, bedingt dies ihr pleomorphes Aussehen (SELBITZ, 2011a). Mykoplasmen lassen sich ubiquitär auf den Schleimhäuten von Tieren finden (THACKER und MINION, 2012). Neben *M. hyopneumoniae* sind andere wichtige pathogene Mykoplasmen beim Schwein *Mycoplasma hyorhinis* (*M. hyorhinis*), welche Polyserositis und Arthritis verursachen, *Mycoplasma hyosynoviae* (*M. hyosynoviae*), welche ebenfalls Arthritis auslösen und *Mycoplasma suis* (*M. suis*), welche für die infektiöse Anämie des Schweines verantwortlich sind (THACKER und MINION, 2012). Nicht pathogen, jedoch beim Schwein vorkommend, scheinen *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma suis*, *Mycoplasma hyopharyngeis* und einige *Acheloplasma* zu sein (THACKER und MINION, 2012).

### 2.2. Epidemiologie

Bei der Übertragung von *M. hyopneumoniae* gilt das Schwein als einziger Wirt und alleiniger Überträger (WHITTLESTONE, 1976). In einem infizierten Bestand ergeben sich zwei mögliche Infektionswege, eine indirekte aerogene Tröpfcheninfektion und eine direkte Ansteckungsmöglichkeit über individuellen Tierkontakt (SELBITZ, 2011a). Die direkte Übertragung von Tier zu Tier ist eine

der häufigsten Infektionswege, vor allem unter Feldbedingungen (THACKER und MINION, 2012). Hierbei können sich bereits Saugferkel von Sauen oder Jungsauen während der Säugezeit anstecken (RUIZ et al., 2003). CALSAMIGLIA und PIJOAN (2000) zeigen, dass die nasale Ausscheidungsrate der Sauen mit zunehmender Parität sinkt. In einer Untersuchung scheiden die Jungsauen den Erreger zu 52 % aus, wohingegen die Sauen der zweiten bis vierten Parität diesen nur noch zu 39 % und die Sauen der fünften bis siebten Parität noch zu 35 % ausscheiden (CALSAMIGLIA und PIJOAN, 2000). SIBILA et al. (2007) können bereits in der ersten Lebenswoche *M. hyopneumoniae* bei Ferkeln isolieren. Ist ein Saugferkel erstmals infiziert, kann eine Erregerübertragung auf Wurfgeschwister während der Säugezeit und später zu Buchtengenossen auf dem horizontalen Wege von Tier zu Tier stattfinden (FANO et al., 2005a; THACKER und MINION, 2012). In geschlossenen Betrieben muss neben der Ansteckung durch Buchtengenossen auch mit einer horizontalen Infektion durch ältere Individuen im Aufzuchtbereich gerechnet werden (THACKER und MINION, 2012). Da die Erreger über lange Zeit im Respirationstrakt betroffener Tiere verweilen, können latent infizierte Tiere als asymptomatische Träger neue, bisher nicht infizierte Tiere anstecken (FANO et al., 2005a; PIETERS et al., 2009). Infizierte Schweine können sowohl in der akuten Phase der Erkrankung (MEYNS et al., 2004) als auch in der chronischen Phase der Infektion Erreger auf empfängliche Schweine übertragen (PIETERS et al., 2010). Die Geschwindigkeit, mit der sich *M. hyopneumoniae* im Bestand ausbreitet, wird von MAROIS et al. (2007) unter experimentellen Bedingungen untersucht, und bereits nach sieben Tagen kann der Erreger aus zuvor nicht-infizierten Kontakttieren mittels einer Kultur angezüchtet werden. Auch MEYNS et al. (2004) beobachten in einem experimentellen Versuch, dass ein Absetzferkel während eines sechswöchigen Zeitrahmens im Durchschnitt ein weiteres Tier infiziert. Zeigt ein Bestand in der akuten Phase der Infektion Atemwegssymptomatik, so kann nach STÄRK et al. (1998) ein Anstieg der Erregernachweisrate in Luftproben verzeichnet werden. OTAKE et al. (2010) finden selbst in 9,2 km Umkreis um einen infizierten Betrieb noch infektiöse Erreger. Somit trägt die Übertragung über Aerosole ohne direkten Tierkontakt ebenfalls zur Verbreitung des Erregers bei (LEON et al., 2001; FANO et al., 2005b, 2005a). Nach Untersuchungen, die Aufschluss über die Persistenz von

*M. hyopneumoniae* geben sollen, zeigen FANO et al. (2005a), dass nach experimenteller Infektion mit *M. hyopneumoniae* der Erreger mittels n-PCR sowohl bei infizierten Tieren als auch bei zuvor negativ getesteten Tieren bis 185 Tage post infectionem (p.i.) nachgewiesen werden kann. Eine noch längere Persistenz des Erregers ermitteln PIETERS et al. (2009). Selbst 200 Tage p.i. kommt es zu einer Übertragung des Erregers auf Sentinel-Tiere (PIETERS et al., 2009).

Bezüglich der Verbreitung des Erregers bei drei bis sechs Wochen alten Ferkeln werden bei 500 klinisch auffälligen Tieren aus 50 Herden mit endemischen Atemwegsproblemen bei 11,2 % der Schweine *M. hyopneumoniae* mittels n-PCR aus BAL ermittelt (MOORKAMP et al., 2009). In einer anderen Studie können bei 921 Absetzferkeln aus 9,3 % der untersuchten Lungen *M. hyopneumoniae* nachgewiesen werden, wohingegen der Erreger bei 201 Saugferkeln nur zu 2,0 % aus Lungengewebe mittels PCR detektiert werden kann (NATHUES et al., 2010). Im Jahr 2010 werden 2500 Saugferkel aus 125 Betrieben mittels Nasentupfer und rt-PCR untersucht, wovon in insgesamt 3,9 % der Tiere aus 46 Betrieben der Erreger direkt nachgewiesen wird, so dass auf eine Herdenprävalenz von 36,8 % geschlossen wird (NATHUES et al., 2013a). In Belgien beträgt nach MAES et al. (1999a) die mediane Seroprävalenz von Mastschweinen auf Herdenebene 88 %.

Auch weisen GROSSE BEILAGE et al. (2009) unter Sauen in Nord-Westdeutschland eine Seroprävalenz hinsichtlich *M. hyopneumoniae* von 65 % nach. Hierbei liegt die geringste Seroprävalenz im einzelnen Betrieb bei 14 % (GROSSE BEILAGE et al., 2009). Im Vergleich dazu liegt in Frankreich die Seroprävalenz von Sauen aus fünf geschlossenen Betrieben bei mindestens 55 % (FABLET et al., 2011). Der Erreger selbst kann in dieser Studie bei 2,4 % der Tiere direkt nachgewiesen werden (FABLET et al., 2011).

Nach GROSSE BEILAGE et al. (2009) sind Risikofaktoren, welche in positiver Korrelation zur Seroprävalenz bei Sauen stehen, ein fehlendes Rein-Raus-Verfahren der Abferkelabteile, ein zwei Wochen-Rhythmus oder eine fehlende Quarantäne bei Eingliederung zugekaufter Eber in den Betrieb. Des Weiteren ist der Anteil seropositiver Sauen in Betrieben, in denen die Ferkel gegen

*M. hyopneumoniae* geimpft werden, niedriger (GROSSE BEILAGE et al., 2009). In Mastbetrieben korrelieren ein schlechtes Management und ein Bezug von Ferkeln aus mehreren Herkunftsbetrieben mit einer höheren Inzidenz an klinischen Symptomen und Lungenläsionen (DIFRANCO et al., 1989). Neben diesen Risikofaktoren beeinflussen nach SEGALLES et al. (2012) jedoch auch klimatische Faktoren die Zunahme des Risikos einer *M. hyopneumoniae*-Infektion. Hierzu zählen beispielsweise niedrige Außentemperaturen und hohe durchschnittliche wöchentliche Niederschläge (SEGALLES et al., 2012).

Das Risiko für das Einzeltier zum Absetzzeitpunkt *M. hyopneumoniae*-positiv zu sein kann laut NATHUES et al. (2013b) bereits im Ferkelalter reduziert werden, wenn in den ersten zwei Lebenswochen für hohe Temperaturen im Ferkelnest gesorgt wird, ein Schleifen der Zähne vorgenommen wird und eine zweimalige Eisenapplikation erfolgt. FANO et al. (2007) stellen fest, dass eine Kolonisation mit *M. hyopneumoniae* zur Zeit des Absetzens in direktem Bezug zu Serokonversion, dem direkten Erregernachweis mittels PCR aus Bronchialtupferprobenentnahmen sowie zur Ausdehnung und Häufigkeit von Lungenläsionen am Schlachthof stehen.

### **2.3. Pathogenese**

Die Kolonisation der Atemwege mit *M. hyopneumoniae* erfolgt durch die Anheftung an die Zilien des Respirationstraktes (ZIELINSKI und ROSS, 1993). Zunächst an der Spitze der Zilien lokalisiert, gelangen die Erreger im Laufe der Infektion tiefer in die interziliären Zwischenräume und einige treten in direkten Kontakt mit den Mikrovilli (JACQUES et al., 1992). In erster Linie dienen den *M. hyopneumoniae* Glykokonjugate als Rezeptoren auf den Zilien des Respirationstraktes (ZHANG et al., 1994). Das sogenannte P97 Membranprotein spielt eine primäre Rolle als Adhäsion virulenter *M. hyopneumoniae* Stämme (ZHANG et al., 1995; DEUTSCHER et al., 2012). Die Befunde der Studie von ZHANG et al. (1995) deuten darauf hin, dass das Protein P97 einen wichtigen Virulenzfaktor von *M. hyopneumoniae* darstellt. Nach WILTON et al. (2009) könnten auch die Proteine P85 und P102 eine Rolle bei der ziliären Bindung spielen. Pilusähnliche Fibrillen helfen bei der Verknüpfung von Bakterium und Zilie (BLANCHARD et al., 1992; SARRADELL et al., 2003). YOUNG et al. (2000)

untersuchen in einer Studie die invitro-Anheftung von *M. hyopneumoniae* an Zilien von porzinen Trachealepithelzellen und beobachten, dass es nur bei virulenten *M. hyopneumoniae* Stämmen zu einer Anheftung an die Zilien und zu offensichtlichen Schäden kommt, wohingegen apathogene Stämme sich nicht anheften.

Eine erfolgreiche Kolonisation und Anheftung der Erreger an die Zilien im Respirationstrakt führen anschließend zur Ziliostasis, zu deren Verklumpung und schließlich zum Verlust der Zilien (DEBEY und ROSS, 1994). Nachfolgend kommt es zum Niedergang bronchialer muzinbildender Becherzellen sowie zu einer Veränderung der Zusammensetzung der produzierten Sekrete (DEBEY et al., 1992). Diese Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance führt dazu, dass Zelldebris und invasierende Pathogene, insbesondere Bakterien, nicht mehr ausreichend aus den Atemwegen abtransportiert und abgehalten werden können (THACKER und MINION, 2012). Als Konsequenz daraus und aufgrund weiterer immunsuppressiver Effekte von *M. hyopneumoniae* können Kommensale des oberen Atmungstraktes wie beispielsweise *Pasteurella multocida* (*P. multocida*), *Streptococcus suis* (*S. suis*), *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) und *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) in den Alveolen als sekundäre Pathogene proliferieren (THACKER und MINION, 2012).

Histologisch ist das Frühstadium der Infektion durch eine bronchioläre und lymphoretikuläre Hyperplasie gekennzeichnet (BLANCHARD et al., 1992). Die ansteigende Zahl an mononukleären Zellen sowie die lymphatische Hyperplasie im perivaskulären und peribronchialen Raum führen schlussendlich zu einer Komprimierung der Bronchien (BLANCHARD et al., 1992). Eine Verengung des Lumens der Bronchiolen bewirkt eine Atelektase der umliegenden Alveoli, was laut SARRADELL et al. (2003) anhand verschiedener Mechanismen erklärt werden kann: einerseits aufgrund von sich ansammelndem Schleim sowie entzündlichen Exsudaten, deren Ansammlung durch den Verlust der mukoziliären Clearance begünstigt wird, weiter durch eine gesteigerte Aktivität schleimproduzierender Zellen und einer veränderten Glykoprotein Produktion in den Becherzellen und andererseits durch eine Bronchokonstriktion aufgrund

chemischer Mediatoren sowie durch den Druck, welcher durch eine Zunahme an umgebenden lymphatischem Gewebe verursacht wird.

Immunhistochemisch stellen RODRIGUEZ et al. (2004) fest, dass es nach einer *M. hyopneumoniae*-Infektion zudem zu einer vermehrten Produktion von immunmodulatorischen und proinflammatorischen Zytokinen, wie etwa Interleukin (IL)-2,4 und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) kommt, welche wiederum an der Entstehung von Lungenläsionen sowie der lymphoretikulären Hyperplasie des BRONCHUS ASSOCIATED LYMPHATIC TISSUE (BALT) mitverantwortlich sind.

#### **2.4. Klinische Symptomatik**

Bei einer Monoinfektion mit *M. hyopneumoniae* ist ein Bestand alleinig mit *M. hyopneumoniae* infiziert und man spricht von einer Mykoplasmen-Pneumonie (THACKER und MINION, 2012). Klinisch zeigen betroffene Tiere einen trockenen, unproduktiven Husten, der besonders nach dem Auftreiben der Tiere auftritt (THACKER und MINION, 2012). Eine Ausbreitung im Bestand verläuft in der Regel langsam und zumeist sind Absetz- und Mastschweine oder auch junge Zuchttiere von der Infektion betroffen (GROSSE BEILAGE et al., 2013). In Infektionsversuchen zeigen vereinzelt Tiere sechs bis sieben Tage p.i. erste klinische Anzeichen, wobei die Hustenrate vier Wochen p.i. ihren Höhepunkt erreicht (SØRENSEN et al., 1997; VICCA et al., 2003). Die reduzierte Futteraufnahme während der klinischen Erkrankung wirkt sich nach THACKER und MINION (2012) negativ auf das gleichmäßige Wachstum der Tiere aus, so dass die Gruppen auseinanderwachsen. Kommt es zusätzlich zu einer Koinfektion mit bakteriellen Sekundärerregern wie *P. multocida*, *S. suis*, *H. parasuis* oder *A. pleuropneumoniae*, wird dies als Enzootische Pneumonie bezeichnet (THACKER und MINION, 2012). Vom PORCINEN RESPIRATORY DISEASE COMPLEX (PRDC) wird bei einer Koinfektion mit Viren wie PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV), PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) oder SWINE INFLUENZA VIRUS (SIV) gesprochen (THACKER und MINION, 2012). Die aufgrund von Sekundärinfektionen verkomplizierten Krankheitsverläufe zeichnen sich durch das Auftreten zusätzlicher Symptome wie Fieber, Niedergeschlagenheit und Dyspnoe aus und

können mit einem Anstieg der Mortalitätsrate einhergehen (SELBITZ, 2011a; THACKER und MINION, 2012). Bei klinischer Untersuchung erkrankter Tiere fällt auskultatorisch ein in- und expiratorisch verschärftes bronchiales Atemgeräusch auf, welches oft von Rasseln oder Giemen begleitet wird (HEINRITZI, 2006b).

Werden zudem Umweltfaktoren, welche zum Krankheitsgeschehen beitragen, berücksichtigt, spricht man von einer MYCOPLASMA INDUCED RESPIRATORY DISEASE (MIRD) (SELBITZ, 2011b). Solche negativen Einflussfaktoren können laut HEINRITZI (2006b) eine hohe Besatzdichte, schlechte Ventilation des Stalles, niedrige oder stark schwankende Tag-Nacht-Temperaturen, feuchte oder schlecht isolierte Bodenflächen, Luftzug oder ein hoher Schadgasgehalt der Luft sein. Bei niedrigen Temperaturen steigt die Wahrscheinlichkeit einer *M. hyopneumoniae*-Infektion (SEGALES et al., 2012), da niedrige Temperaturen die Flimmerbewegungen der Zilien im Respirationstrakt hemmen sowie die Lungenclearance herabsetzen (HEINRITZI, 2006b). Um das Zusammenspiel verschiedener Erreger in der Genese von Pneumonien zu ermitteln, wird in einer Studie von PALZER et al. (2008) die BAL-Flüssigkeit von 239 klinisch kranken Schweinen untersucht. Hierbei ist der Nachweis von *M. hyopneumoniae* positiv mit dem Nachweis weiterer bakterieller Erreger wie *P. multocida*, *M. hyorhinis* und *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) sowie dem PRRS-Virus (Genotyp 1) assoziiert (PALZER et al., 2008). In einer Studie von TAKEUTI et al. (2013) kann aus Lungengewebsproben, in denen *P. multocida* isoliert wird, zusätzlich *M. hyopneumoniae* zu 96,7 % pathohistologisch und zu 61 % immunhistochemisch nachgewiesen werden. Dieser Befund untermauert die wichtige Bedeutung des Zusammenspiels beider Erreger bei klinisch erkrankten Tieren (TAKEUTI et al., 2013). Nach experimenteller Infektion mit *M. hyopneumoniae* zeigen mit *P. multocida* und *M. hyopneumoniae*-infizierte Tiere höheres Fieber, vermehrt Husten und Dyspnoe und folglich auch extensivere exsudative Lungenläsionen, als alleinig mit *M. hyopneumoniae*-infizierte Tiere (CIPRIAN et al., 1988). Ebenso zeigen FABLET et al. (2012), dass *M. hyopneumoniae*-Infektionen bei vier bis 16 Wochen alten Schweinen positiv mit einer PCV2-Infektion korrelieren. In Herden, in denen häufiger Schweine mit *M. hyopneumoniae* und PCV2 infiziert

sind, wird charakteristisch eine höhere mittlere PCV2 Viruslast festgestellt, als in anderen Herden (FABLET et al., 2012). Dieses Ergebnis stimmt mit dem von DORR et al. (2007) überein, welche in einer epidemiologischen Erhebung feststellen, dass die Wahrscheinlichkeit, dass PCV2-infizierte Tiere gleichzeitig mit *M. hyopneumoniae* infiziert sind, besonders in der Aufzuchtphase signifikant höher ist. Durch experimentelle Koinfektion mit beiden Erregern werden mikroskopische Läsionen und die PCV2 Viruslast im Lungen- sowie im lymphatischen Gewebe, verglichen zu einer Monoinfektion, gesteigert (OPRIESSNIG et al., 2004). Darüber hinaus erhöht die gleichzeitige Anwesenheit von *M. hyopneumoniae* die Inzidenz von POSTWEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME (PMWS) (OPRIESSNIG et al., 2004). Im Gegensatz dazu stellen SIBILA et al. (2012) bei experimenteller Infektion mit *M. hyopneumoniae* und PCV2 keine Potenzierung klinischer Anzeichen und Läsionen fest. Im Hinblick auf eine Koinfektion mit PRRSV beobachten THACKER et al. (1999), dass *M. hyopneumoniae* die durch PRRSV induzierte Klinik und daraus folgende Lungenläsionen verschärft. Durch das stetige Aufkommen neuer Monozyten und Makrophagen aufgrund der chronisch verlaufenden *M. hyopneumoniae*-Infektion, wird es den PRRS-Viren ermöglicht, in der Lunge in geringen Mengen und über lange Zeit zu persistieren (THACKER et al., 1999). Die durch *M. hyopneumoniae* hervorgerufene Potenzierung der Lungenläsionen sowie die verschärft auftretende Klinik wird ebenfalls von THACKER et al. (2000a) sowie THANAWONGNUWECH und THACKER (2003) bestätigt. Eine retrospektive Analyse der an Atemwegserkrankungen beteiligten Erreger beim Schwein in den USA zeigt, dass in 82,2 % aller untersuchten Fälle zwei oder mehr Pathogene gleichzeitig detektiert werden können, wovon PRRSV oder SIV in Kombination mit anderen bakteriellen Sekundärerregern ein häufiger Grund für Atemwegsproblematiken sind (CHOI et al., 2003). Neben einem positiven SIV-Befund werden zudem häufig Koinfektionen mit *P. multocida*, PRRSV und *M. hyopneumoniae* festgestellt (CHOI et al., 2003). Schweine, die sowohl mit *M. hyopneumoniae* als auch mit SIV infiziert sind, zeigen deutlich vermehrt Husten, wobei sich der Schweregrad der Pneumonie dadurch nicht verschlimmert (THACKER et al., 2001). Nach THACKER et al. (2001) reagieren beide Erreger vielmehr additiv miteinander, als dass *M. hyopneumoniae* einen potenzierenden Einfluss auf den

Verlauf einer SIV-Infektion nehmen würde (THACKER et al., 2001). Jedoch beobachten YAZAWA et al. (2004) bei einer Koinfektion von mit *M. hyopneumoniae*-infizierten Tieren mit einem niedrig pathogenen H1N1-SIV-Stamm, dass sich in kombiniert infizierten Tieren Lungenläsionen schwerwiegender darstellen, als in nur mit SIV-infizierten Tieren. Werden Schweine zuerst mit *M. hyopneumoniae* und anschließend mit einem H1N1-SIV infiziert, so steigert dies das Ausmaß der klinischen Symptomatik, wonach erkrankte Tiere Hyperthermie zeigen, an Appetit verlieren und sich zudem deren Lungenläsionen verschlimmern (DEBLANC et al., 2012).

Auch Endoparasiten wie *Ascaris suum* können einen Einfluss auf den Impferfolg gegen *M. hyopneumoniae* und nachfolgend auf die Ausprägung der Klinik nehmen (STEENHARD et al., 2009). STEENHARD et al. (2009) zeigen, dass Tiere, welche bereits mit *Ascaris suum* infiziert sind und gegen *M. hyopneumoniae* geimpft werden, deutlich stärkere Lungenveränderung aufweisen, als Tiere, welche gegen *M. hyopneumoniae* geimpft sind und anschließend mit *Ascaris suum* infiziert werden.

## **2.5. Pathomorphologie und -histologie**

### **2.5.1. Makroskopische Veränderungen**

In akuten Fällen einer Mykoplasmen-Pneumonie lassen sich makroskopische Läsionen in Form von kranio-ventralen bzw. diffusen Verhärtungen, einer verminderten Retraktionsfähigkeit der Lunge sowie in Form von abgegrenzten Ödemen finden (THACKER und MINION, 2012). Im Anschnitt zeigt sich das Lungenparenchym solch unkomplizierter *M. hyopneumoniae*-Infektionen farblich relativ uniform (THACKER und MINION, 2012). Die höchste Prävalenz an Lungenläsionen lässt sich an den rechts apikalen, sowie rechts kardialen und links kardialen Lungenlappen feststellen (SØRENSEN et al., 1997). Nach SØRENSEN et al. (1997) hängt dies vermutlich damit zusammen, dass in den rechten apikalen Lobus ein direkter Stammbronchus aus der Trachea mündet. Im chronischen Stadium der EP lassen sich vor allem in den kranio-ventralen Anteilen der Lunge lila bis grau verfärbte und karnifizierte Bereiche vorfinden (THACKER und MINION, 2012). Des Weiteren zeigt sich das Bild einer lymphatischen Hyperplasie sowie eine Verdickung der interalveolären Septen in

diesen betroffenen Arealen (MAES et al., 1996). In abheilenden Wundbereichen findet man kollabierte Alveolen, ein alveoläres Emphysem und umfangreich hyperplastische Lymphknoten (MAES et al., 1996).

Nach MAES et al. (1996) sind zwei bis vier Wochen nach erfolgter Infektion die makroskopischen Veränderungen am deutlichsten ausgeprägt. Diese beginnen acht Wochen nach der Infektion abzuheilen, falls Sekundärinfektionen ausbleiben (MAES et al., 1996). In abgeheilten Läsionen lassen sich kollabierte und/ oder emphysematöse Alveolen sowie fibrosiertes Gewebe in den peribronchialen Arealen der Lunge finden (THACKER und MINION, 2012). Die tracheobronchialen Lymphknoten sind in der Regel fest und vergrößert (THACKER und MINION, 2012). Nach zehn Wochen sind nach MAES et al. (1996) nur noch einige makroskopisch sichtbare Veränderungen zu detektieren. Jedoch sind bei einem komplizierten Verlauf mit pyogenen Sekundärerregern größere Teile der Lunge betroffen, die sich bei Palpation fest und verdichtet anfühlen (THACKER und MINION, 2012). Im Anschnitt von verändertem Lungengewebe zeigt sich ein heterogenes Bild von weißlich bis grauer Farbe und aufgeblähten Alveolen (THACKER und MINION, 2012). Auf Druck kann mukopurulenten Exsudat aus den Atemwegen gewonnen werden (THACKER und MINION, 2012). ANDREASEN et al. (2001) untersuchen den Zusammenhang zwischen Serokonversion und der Ausprägung von Lungenveränderungen am Schlachthof und zeigen, dass Tiere, welche kurz vor Schlachtermin serokonvertieren, das größte Ausmaß an Mykoplasmen-ähnlichen katarrhalischen Lungenveränderungen aufweisen. Hingegen zeigen Tiere, welche bereits früh in ihrem Leben serokonvertiert sind, vor allem kranio-ventrale pleuritische Veränderungen (ANDREASEN et al., 2001). Übereinstimmend stellen FRAILE et al. (2010) eine positive Korrelation von kranio-ventralen Lungenkonsolidierungen und einer positiven Seroprävalenz hinsichtlich *M. hyopneumoniae* fest.

### **2.5.2. Mikroskopische Veränderungen**

Eine histopathologische Untersuchung von Lungen zuvor infizierter Schweine (14 Tage p.i.) ergibt nach SØRENSEN et al. (1997) eine subakute lobuläre Pneumonie mit katarrhalischer Bronchitis und Bronchiolitis. Auch SARRADELL

et al. (2003) stellen mikroskopisch eine katarrhalisch-bronchointerstitielle Pneumonie mit Infiltration von Entzündungszellen in der *Lamina propria* von Bronchien und Bronchiolen sowie Alveolarsepten fest. Charakteristisch lassen sich eine Hyperplasie der Epithelzellen und eine gesteigerte perivaskuläre und peribronchiale Akkumulation von mononukleären Zellen beobachten (KOBISCH und FRIIS, 1996). Eine Hyperplasie der mononukleären Zellen im BALT führt zur Obliteration des Lumens der Bronchiolen und ist somit ursächlich für die Atelektase der umliegenden Alveolen (SARRADELL et al., 2003). Vorwiegend lassen sich hierbei Makrophagen sowie dendritische Zellen, B- und T-Lymphozyten, IgA<sup>+</sup>- und IgG<sup>+</sup>-Plasmazellen und häufiger CD4<sup>+</sup>- als CD8<sup>+</sup>-Zellen finden (SARRADELL et al., 2003). Darüber hinaus können Zilienverlust (SARRADELL et al., 2003) und ein Abschilfern der Zilien tragenden Zellen in den luftleitenden Wegen beobachtet werden (MAES et al., 1996). In den Alveoli und den luftleitenden Lumina selbst finden sich seröse Flüssigkeit, Makrophagen ebenso wie neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen (THACKER und MINION, 2012). In chronischen Veränderungen sind rund um die Bronchien und Bronchiolen Lymphozyten und vereinzelt Makrophagen lokalisiert (THACKER und MINION, 2012). In sich bereits regenerierenden Arealen finden sich kollabierte und/oder emphysematöse Alveolen sowie Fibrosen in peribronchialen Regionen (THACKER und MINION, 2012). *M. hyopneumoniae* selbst ist an und zwischen den Zilien der Epithelzellen der Bronchien und Bronchiolen zu finden (SARRADELL et al., 2003).

## 2.6. Immunität

In der Abwehr von viralen Infektionen scheint die zell-medierte Immunantwort von großer Bedeutung zu sein (LOWE et al., 2005; FORT et al., 2009; MARTELLI et al., 2009). Nach THACKER et al. (2000b) spielt diese auch eine Hauptrolle bei der Abwehr einer Infektion mit *M. hyopneumoniae*.

Nach Infektion mit *M. hyopneumoniae* befinden sich im BALT vor allem Makrophagen (SARRADELL et al., 2003). In Fällen der Enzootischen Pneumonie besteht das hyperplastische BALT aus Makrophagen, dendritischen Zellen, T- und B-Lymphozyten, sowie IgG<sup>+</sup>- und IgA<sup>+</sup>-Plasmazellen (SARRADELL et al.,

2003). Ein Anstieg an CD4<sup>+</sup>- und die Abnahme an CD8<sup>+</sup>-Zellen im Laufe der Infektion wird übereinstimmend von REDONDO et al. (2009) sowie SARRADELL et al. (2003) festgestellt. CD4<sup>+</sup>-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Makrophagen und bei der Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten (REDONDO et al., 2009). Mittels TOLL-LIKE RECEPTORS-2 und -6 (TLR2 und TLR6) können antigenpräsentierende Zellen wie etwa Alveolarmakrophagen *M. hyopneumoniae*-Antigen erkennen (MUNETTA et al., 2003). Nach Kontakt von Antigen mit Makrophagen können die Makrophagen neben TNF- $\alpha$  auch andere Zytokine wie IL1 und IL6 produzieren (CHOI et al., 2006). Eine Expression der drei Zytokine geht nach Untersuchungen von CHOI et al. (2006) stets mit Lungenveränderungen einher. Auch RODRIGUEZ et al. (2004) stellen nach natürlicher Infektion mit *M. hyopneumoniae* einen Anstieg an Zytokinen, wie etwa IL2, IL4, TNF- $\alpha$  sowie IL1 und IL6, fest. Diese Zytokine sind in der Lage, sowohl Lungenläsionen als auch eine Hyperplasie des BALTs in infizierten Schweinen zu verursachen (RODRIGUEZ et al., 2004) und spielen eine tragende Rolle bei der Initiierung und Regulierung von Entzündungsreaktionen einer *M. hyopneumoniae*-Infektion (CHOI et al., 2006).

Eine Impfung und Infektion mit *M. hyopneumoniae* induziert eine lokale mukosale Immunantwort im Respirationstrakt von Schweinen (THACKER et al., 2000b). Nach THACKER et al. (2000b) scheint eine Impfung in der Lage zu sein, die Proliferation von B-Lymphozyten zu hemmen und die Produktion von *M. hyopneumoniae* spezifischen IFN- $\gamma$  sezernierenden Lymphozyten im Blut zu stimulieren (THACKER et al., 2000b). Letztgenannte spielen eine bedeutende Rolle bei der Schutzwirkung vor einer *M. hyopneumoniae*-Infektion, aktivieren darüber hinaus Makrophagen und fördern die Zell-vermittelte Immunantwort (THACKER et al., 2000b). Die Vakzination beeinflusst zudem die Bildung von TNF- $\alpha$ , dessen Konzentration nach Challenge mit *M. hyopneumoniae* bei ungeimpften Tieren höher ist, als bei geimpften Tieren (THACKER et al., 2000b). OKADA et al. (2000) zeigen, dass nach Vakzination und folgender Infektion mit *M. hyopneumoniae* die Erregeranzahl sowie die Zahl an Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit (BALF) bei geimpften Tieren im Vergleich zu ungeimpften Tieren abnimmt. Des Weiteren wird das Level an TNF- $\alpha$ , sowie

der mittlere Prozentsatz an Lungenläsionen, an Entzündungszellen in den Atemwegen und an T-Zellakkumulationen rund um die Bronchien reduziert (OKADA et al., 2000). In einem Infektionsversuch von WOOLLEY et al. (2013) weisen ungeimpfte Tiere im Vergleich zu geimpften Tieren 21 Tage nach Challenge mit *M. hyopneumoniae* erhöhte Konzentrationen an TNF- $\alpha$ , IL1 und -6 sowie eine erhöhte Aktivität von Plasmin in der Tracheobronchialflüssigkeit auf. Bezüglich der mukosalen humoralen Immunitätsausbildung führt eine Vakzination bei Schweinen zu einem höheren Anstieg *M. hyopneumoniae* spezifischer IgA- und IgG-Antikörper in der BAL-Flüssigkeit als bei ungeimpften Tieren (OKADA et al., 2000). Ebenso beobachten THACKER et al. (2000b) und VRANCKX et al. (2012a) eine systemische humorale Immunitätsausbildung, da im Serum die Konzentration an *M. hyopneumoniae* spezifischen Antikörpern signifikant höher ist, als bei ungeimpften Tieren. DJORDJEVIC et al. (1997), THACKER et al. (1998) und VRANCKX et al. (2012b) zeigen hingegen, dass keine Korrelation zwischen der Höhe der gemessenen Antikörpertiter im Serum und der Schutzwirkung nach einer Mykoplasmen-Infektion, im besonderen Hinblick auf Lungenläsionen, besteht.

Nach OKADA et al. (2000) und THACKER et al. (2000b) scheinen die durch eine Impfung gegen *M. hyopneumoniae* hervorgerufenen Veränderungen der zellulären Immunität und der mukosalen Antikörperkonzentrationen einen wichtigen Einfluss auf die durch *M. hyopneumoniae* verursachte Entzündungsreaktion zu haben. Somit trägt eine Vakzination bedeutend zur Kontrolle der durch *M. hyopneumoniae* hervorgerufenen Pneumonie bei (OKADA et al., 2000; THACKER et al., 2000b).

## 2.7. Diagnose

Eine Evaluierung von Kultivierung, Immunfluoreszenz, ELISA und PCR zum Nachweis von *M. hyopneumoniae* im Lungengewebe kommt zu dem Ergebnis, dass alle vier Methoden eine hohe Sensitivität in akuten Stadien der Infektion aufweisen (SØRENSEN et al., 1997). In dieser experimentellen Studie erweist sich die Kultivierung in späteren Stadien der Infektion als überlegen (SØRENSEN et al., 1997). Bezüglich der Spezifität der einzelnen Tests untereinander werden keine Unterschiede ermittelt (SØRENSEN et al., 1997).

### 2.7.1. Kultur

Die Anzucht gilt als der Goldstandard unter den diagnostischen Mitteln *M. hyopneumoniae* nachzuweisen, auch wenn diese sich als sehr schwierig erweist, da die Wachstumsdauer des Erregers sehr lange ist, dieser hohe Ansprüche an Nährmedien stellt und es die Gefahr von Verunreinigungen birgt (THACKER, 2004). In einer Studie von HILTERMANN-LINDEN (2004) erweist sich die Kultur als impraktikabel, da von 51 Kulturen 27 (53 %) durch Verunreinigungen nicht auswertbar sind. Geeignetes Probenmaterial für eine Anzucht liefern nach MAROIS et al. (2007) beispielsweise Trachealtupfer und tracheobronchiale Spülungen, wohingegen Nasentupfer oder Tonsillentupfer weniger geeignet scheinen. Um Verunreinigungen zu vermeiden, bietet sich im Vergleich zu einer intratrachealen Beprobung eine transtracheale Probengewinnung an (HENNIG-PAUKA et al., 2007). Lungengewebsproben, welche unter Ultraschallkontrolle dem Schwein entnommen werden, können weitere Verunreinigungen verhindern (HEINRITZI et al., 2003).

### 2.7.2. Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und in-situ Hybridisierung

Mit Hilfe spezifischer anti-*M. hyopneumoniae*-Antikörper lassen sich via Immunfluoreszenz (IF) und Immunhistochemie (IHC) Mykoplasmen im Lungengewebe darstellen, wohingegen sich die in-situ-Hybridisierung spezifischer Nukleinsäuren bedient (THACKER und MINION, 2012). Gewebeproben für die Immunhistochemie und die in-situ-Hybridisierung sollten zeitnah post mortem entnommen werden und in 10 %ig neutral gepuffertem Formalin fixiert werden (THACKER und MINION, 2012). Nach MOORKAMP et al. (2010) erweist sich eine Immunhistochemie mittels monoklonalen Antikörpern als geeignet, um *M. hyopneumoniae* nachzuweisen; jedoch ist eine n-PCR für eine frühe Detektion einer Infektion, ohne Ausbildung makroskopischer Befunde, unersetzlich. Eine Korrelation zwischen Erregernachweis durch eine IHC oder IF und dem Vorhandensein von Lungenläsionen wird von MOORKAMP et al. (2010) und MAROIS et al. (2007) beschrieben. Auch gelingt mittels einer in-situ Hybridisierung der Nachweis von typischen Nukleinsäuresequenzen (KWON und CHAE, 1999). Ein Hybridisierungssignal kann auf der luminalen Seite von bronchialen und

bronchiolären Epithelzellen festgestellt werden, jedoch nicht in deren Zytoplasma (KWON und CHAE, 1999).

### 2.7.3. PCR

Eine Möglichkeit *M. hyopneumoniae* im Gewebe nachzuweisen, stellt die PCR dar; der Nachweis mit dieser Methode erweist sich sowohl in Feldversuchen als auch in Infektionsversuchen als sehr sensitiv und spezifisch (BLANCHARD et al., 1996; SØRENSEN et al., 1997; BAUMEISTER et al., 1998). Nach Aussage von BLANCHARD et al. (1996) ist die PCR bei experimentell infizierten Tieren im Anfangsstadium der Infektion gegenüber einer IF sensitiver. Als Probenmaterial eignet sich nach BAUMEISTER et al. (1998) BALF sowie tracheobronchiale Spülungen von Schweinen (BLANCHARD et al., 1996). Auch in einer Studie von KURTH et al. (2002) eignet sich die BALF als Medium für eine PCR mit hoher Sensitivität (95-100 %), wohingegen Nasentupfer und Lungengewebe als Ausgangsmaterial weniger aussagekräftig sind. Mit diesen Ergebnissen stimmen auch MAROIS et al. (2007) überein, welche Trachealtupfer und tracheobronchiale Spülungen im Vergleich zu Nasen- und Tonsillentupfer als optimales Probenmaterial bezeichnen. FABLET et al. (2010) vergleichen in einer Studie vier verschiedene Methoden, um Proben für einen *M. hyopneumoniae*-Nachweis zu gewinnen. Eine Evaluation von Nasentupfer, oropharyngealen Tupfer, tracheobronchialen Tupfer und tracheobronchialer Spülung als Probenausgangsmaterial ergibt, dass der Tracheobronchialtupfer und die tracheobronchiale Spülung die sensitivsten Probenentnahmemethoden sind, um *M. hyopneumoniae* in natürlich-infizierten Tieren zu detektieren (FABLET et al., 2010). Bei experimentell infizierten Schweinen können BLANCHARD et al. (1996) aus tracheobronchialen Spülungen zudem eine gute Korrelation zwischen PCR und IF-Test feststellen. Ein höchstes Maß an Sensitivität einer PCR erzielen HENNIG-PAUKA et al. (2007) in Kombination mit einer bronchoskopischen Lavage.

Besonders sensitiv unter den PCR-Methoden scheint die nested-PCR (n-PCR) zu sein, die statt nur einem Primer-Set zwei Primer-Sets verwendet und somit weniger als 80 Mikroorganismen detektieren kann und zudem nicht mit anderen Mykoplasmen-Spezies oder Atemwegskommensalen kreuzreagiert

(CALSAMIGLIA et al., 1999). Unter Verwendung von Nasentupfern als Probenmaterial ist die n-PCR der herkömmlichen PCR überlegen (CALSAMIGLIA et al., 1999). Sind histopathologische Veränderungen in den Lungen vorhanden, welche charakteristisch für eine *M. hyopneumoniae*-Infektion sind, gibt es eine gute Korrelation zwischen n-PCR und dem Vorhandensein solcher Läsionen (CALSAMIGLIA et al., 2000).

## 2.8. Therapie

Der Einsatz von antibiotischen Mitteln gegen eine *M. hyopneumoniae*-Infektion reduziert die klinische Symptomatik einer EP, führt jedoch weder zu einer Erregerelimination noch zur Heilung bereits bestehender Läsionen (THACKER und MINION, 2012). Um den Erreger effektiv bekämpfen zu können, sollte das Antibiotikum hohe Wirkstoffkonzentrationen in den Sekreten des Atemtrakts von Schweinen erreichen können (THACKER und MINION, 2012). Die Wirksamkeit einer antimikrobiellen Therapie zur Kontrolle einer Enzootischen Pneumonie wird anhand mehrerer Studien belegt. So werden positive Effekte bezüglich klinischer Symptome, der Inzidenz von Lungenläsionen und eine Verbesserung der Mastleistungsdaten von behandelten Tieren mittels einer Medikation mit Tiamulin, Tylosin, Tulathromycin, Tilmicosin oder Doxycyclin erzielt (HSU et al., 1983; LE GRAND und KOBISCH, 1996; BOUSQUET et al., 1998; MATEUSEN et al., 2001; NUTSCH et al., 2005; VICCA et al., 2005).

STIPKOVITS et al. (2001) vergleichen in einer experimentellen Studie verschiedene Fütterungsantibiotika hinsichtlich ihrer Wirksamkeit. Unter Berücksichtigung klinischer Parameter sowie anhand histologischer und pathologischer Ergebnisse kommen sie zu dem Schluss, dass neben einer Behandlung mittels Tetramulin, Tilmicosin sowie einer Kombination aus Lincomycin und Chlortetracyclin, eine Medikation mit Valnemulin in Kombination mit Chlortetracyclin die beste Wirkung gegen verschiedene atemwegspathogene Erreger wie *M. hyopneumoniae*, *P. multocida* und *A. pleuropneumoniae* erzielen (STIPKOVITS et al., 2001).

Neben der oralen Medikation über das Futter erweisen sich auch Injektionspräparate, wie etwa Florfenicol, Tulathromycin und Enrofloxacin in der Behandlung einer *M. hyopneumoniae*-Infektion als wirksam (MCKELVIE et al., 2005; DEL POZO SACRISTAN et al., 2012).

Aufgrund der fehlenden Zellwand von Mykoplasmen sind Antibiotika, welche mit der Zellwand der Bakterien interagieren, wie etwa Penicilline, Ampicilline, Amoxicilline oder Cephalosporine wirkungslos (THACKER und MINION, 2012). Als ebenso schwach wirksam erweisen sich Polymyxin, Erythromycin, Streptomycin, Trimethoprim und Sulfonamide (THACKER und MINION, 2012).

## 2.9. Bekämpfung

### 2.9.1. Vakzination

Aufgrund der hohen Inzidenz von *M. hyopneumoniae* werden in Deutschland circa 80 % aller Ferkel gegen *M. hyopneumoniae* geimpft. Der Anteil infizierter Herden in Deutschland beträgt nach GROSSE BEILAGE et al. (2013) mehr als 90 %. Um *M. hyopneumoniae* in einem Bestand zu bekämpfen und vorzubeugen, haben sich auf Basis mehrerer Infektions- wie auch Feldversuche Impfungen gegen *M. hyopneumoniae* bei Saugferkeln in der ersten bis zur dritten Lebenswoche als wirksam erwiesen (THACKER et al., 1998; DAWSON et al., 2002; REYNOLDS et al., 2009; WILSON et al., 2012). Weltweit sind verschiedene Impfstoffe gegen *M. hyopneumoniae* kommerziell erhältlich, die neben Adjuvantien teils inaktivierte ganzzellige Bakterien enthalten, sog. Ganzzellvakzinen, oder die auf Membranproteinen basieren (THACKER und MINION, 2012). Durch die Vakzination wird jedoch keine Erregerelimination im Respirationstrakt von Schweinen bewirkt (LE GRAND und KOBISCH, 1996; MAES et al., 1999b; PIETERS et al., 2010; VILLARREAL et al., 2011a), auch wenn die Prävalenz von *M. hyopneumoniae* im oberen Respirationstrakt von geimpften Schweinen niedriger ist als bei ungeimpften Tieren (SIBILA et al., 2007). Ausgehend von dieser Erregerreduktion kann von einer reduzierten Ausscheidung von *M. hyopneumoniae* bei vakzinierten Tieren ausgegangen werden (BACCARO et al., 2006). Der eigentliche Vorteil einer Impfung gegen *M. hyopneumoniae* besteht laut MAES et al. (1999b), KYRIAKIS et al. (2001), SIUGZDAITE et al. (2003) sowie WILSON et al. (2012) in der Verbesserung der durchschnittlichen täglichen Zunahmen sowie in der Reduzierung EP-ähnlicher Lungenläsionen im Vergleich zu ungeimpften Tieren. Hinsichtlich der Lungenveränderungen stellen FRAILE et al. (2010) fest, dass das Lungengewebe von geimpften Tieren eine signifikant geringere kranio-ventrale Konsolidierung

aufweist, als das ungeimpfter Schweine. Darüber hinaus erzielen vakzinierter Tiere im Vergleich zu ungeimpften Schweinen ein höheres Endmastgewicht (SIUGZDAITE et al., 2003; WILSON et al., 2012), eine bessere Fleischqualität (SIUGZDAITE et al., 2003) und größere Einsparungen hinsichtlich der Medikationen von Schweinen (MAES et al., 1999b; MAES et al., 2003). Ebenso spielt eine signifikant bessere Futterwertung bei geimpften Tieren eine wichtige Rolle für eine bessere Mastleistung (MAES et al., 1999b). Zu einem gleichem Ergebnis kommen KYRIAKIS et al. (2001), die zeigen, dass bei zweifach gegen *M. hyopneumoniae* geimpften Schweinen die Futterverwertung um 13 % im Vergleich zur nicht-geimpften Kontrollgruppe ansteigt.

In Deutschland stehen zurzeit elf Präparate auf dem Markt zur Verfügung, welche sowohl als One-Shot- als auch als Two-Shot-Präparate zu verabreichen sind (VETIDATA, 2015).

### **2.9.2. Elimination und Eradikation**

Ein erster Schritt zur Elimination von *M. hyopneumoniae* in einem Betrieb ist die Optimierung von Management und Haltungsbedingungen (HEINRITZI, 2006b). Hierzu zählen in erster Linie die Verbesserung des Stallklimas, eine Optimierung der Belegdichte, eine Gliederung des Stalles in Alters- und Produktionsgruppen, eine Reduktion der Herkunftsbetriebe, ein striktes Rein-Raus-Verfahren sowie eine zielführende Medikation und Impfmaßnahmen (MAES et al., 2008; THACKER und MINION, 2012).

Als weitere übliche Maßnahme kann die DEPOPULATION AND REPOPULATION durchgeführt werden, bei der eine Herde zuerst komplett depopuliert wird und anschließend mit *M. hyopneumoniae*-negativen Tieren neu aufgebaut wird (YESKE, 2007). Der Vorteil besteht vor allem darin, dass in einem Aufwand mehrere Krankheitserreger eliminiert werden können (YESKE, 2007).

Alternativ kann auch ein in der Schweiz angewendetes Teilsanierungsprogramm durchgeführt werden, welches allgemein unter dem Namen THE SWISS SYSTEM bekannt ist, und sich vor allem für kleinere Betriebe gut eignet (ZIMMERMANN et al., 1989). Während eines jungtierfreien Intervalls von 14

Tagen werden keine Zukäufe jüngerer Tiere als zehn Monate getätigt und die Sauenherde wird über diesen Zeitraum antibiotisch behandelt (ZIMMERMANN et al., 1989).

Beim MEDICATED EARLY WEANING werden Ferkel ab ihrer Geburt bis zum 10. Lebenstag und die Sauen ab Verbringung in die Abferkelboxen und während ihrer gesamten Säugezeit medikamentös behandelt (ALEXANDER et al., 1980). Als weitere besondere Strategie werden die Ferkel bereits mit fünf Tagen abgesetzt und in isolierte Aufzuchtboxen eingestallt, von wo sie nach circa fünfwöchigem Aufenthalt in isolierte Mastboxen umgestallt werden (ALEXANDER et al., 1980). Auch ohne Depopulation erfolgreich ist ein Konzept in einem Mastbetrieb, bei dem *M. hyopneumoniae*-positive Tiere antibiotisch behandelt werden und ausschließlich negative und geimpfte Tiere neu hinzugestallt werden, während beide Gruppen räumlich getrennt voneinander aufgestallt und entlüftet werden sowie über eine eigene Gülleabführung verfügen (HEINONEN et al., 2011). In einer Studie von GEIGER und GROTH (2010) führt in einem geschlossenen Betrieb mit 3800 Sauen ein Programm zur Erregereradikation, wonach zufolge die gesamte Sauenherde geimpft, alle Sauen und Neugeborenen antibiotisch behandelt werden und eine Depopulation von Aufzucht und Mast stattfindet, bevor *M. hyopneumoniae*-negative Tiere eingestallt werden.

Trotz erfolgreichen Erregereliminierungen aus Schweineherden kommt es jedoch häufig zur Wiedereinschleppung von *M. hyopneumoniae*, sei es über den Luftweg oder den Erwerb und die Neueinstellung infizierter, jedoch serologisch negativer Tiere (MAES et al., 2008).

### **3. Kombinationsimpfungen beim Schwein**

Anhand einer Challenge-Studie zeigen THACKER et al. (2000a), dass eine alleinige Impfung mit einer Two-Shot *M. hyopneumoniae*-Vakzine (Impfung zur 3. und 5. Lebenswoche) eine PRRSV-induzierte Pneumonie in mit *M. hyopneumoniae*- und PRRSV-infizierten Tieren lindern, jedoch nicht eliminieren kann. Eine zusätzlich zur *M. hyopneumoniae*-Impfung vorgenommene Vakzination gegen PRRS (Genotyp-2) in der 4. Lebenswoche

scheint hingegen diesen positiven Effekt auf die Lungengesundheit aufgrund der *M. hyopneumoniae*-Vakzine wettzumachen (THACKER et al., 2000a). Jedoch nimmt nach THACKER et al. (2000a) eine PRRSV-Infektion oder Vakzination keinen Einfluss auf die spezifische Antikörperbildung, gemessen in der BAL von Schweinen.

Im Gegensatz dazu zeigen DREXLER et al. (2010), dass eine kombinierte intramuskuläre Impfung mit einer Two-Shot *M. hyopneumoniae*-Vakzine und einer attenuierten PRRSV lebend-Vakzine (Genotyp 1) im Vergleich zur einzelnen Verwendung der Vakzinen ohne signifikante Unterschiede bezüglich einer PRRSV-Virämie oder *M. hyopneumoniae*-induzierten Lungenveränderungen einhergeht. In diesem Experiment wird die PRRSV-Vakzine gleichzeitig mit der Boostervakzination gegen *M. hyopneumoniae* verabreicht (DREXLER et al., 2010). STRICKER et al. (2013) untersuchen ebenfalls in einer Feldstudie die Applikation einer PRRSV (Genotyp 1)-Vakzine (3. Lebenswoche) sowie einer *M. hyopneumoniae*-Vakzine (1. und 3. Lebenswoche) als Mischspritze und als gleichzeitige Verabreichung an unterschiedlichen Injektionsstellen und kommen zu dem Ergebnis, dass in Bezug auf die Entwicklung von spezifischen Antikörpern gegen *M. hyopneumoniae* in den *M. hyopneumoniae*-geimpften Gruppen die Anzahl serologisch positiver Schweine signifikant höher ist, als in den ungeimpften Gruppen. Auch bezüglich der Lungenscores weisen simultan und gleichzeitig geimpfte Gruppen signifikant niedrigere Lungenscores auf, verglichen mit der alleinig gegen PRRSV-geimpften Gruppe (STRICKER et al., 2013). Darüber hinaus erzielen simultan geimpfte Schweine signifikant niedrigere Lungenscores als die Placebogruppe (STRICKER et al., 2013). Hinsichtlich der Parameter der Effektivität (tägliche Zunahmen, Mortalität, klinische Parameter) sowie der Safety (lokale und systemische Reaktionen nach der Impfung) ergeben sich zwischen den fünf Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede (STRICKER et al., 2013). Lokale Reaktionen treten direkt im Anschluss an die Vakzination auf und betreffen 5 % der simultan geimpften Tiere, jedoch sind am darauf folgenden Tag nur noch 1 % der Tiere betroffen und eine Woche post vaccinationem können keine lokalen Veränderungen an den Injektionsstellen verzeichnet werden (STRICKER et al., 2013). Ebenso

wirksam erweist sich die gleichzeitige Impfung gegen *M. hyopneumoniae* und PCV2 hinsichtlich der Tiergesundheit bei Herden mit suboptimalem Gesundheitsstatus (HERBICH et al., 2013). Eine gleichzeitige Impfung, sei es kombiniert/ gemischt oder gleichzeitig nimmt keinen negativen Einfluss auf den Gesundheitsstatus. Die simultane Impfung führt zum gleichen positiven Effekt bezüglich AVERAGE DAILY WEIGHT GAIN (ADWG), wie die Einzelverabreichung des Impfstoffes (HERBICH et al., 2013). Verglichen mit der alleinigen Gabe eines der Impfstoffe ergeben sich für die gleichzeitige Verabreichung beider Impfstoffe (simultan oder parallel) keine Anhaltspunkte, dass der PCV2- oder *M. hyopneumoniae*-Impfstoff einen negativen Einfluss auf die Ausbildung einer impfstoffinduzierten humoralen Immunantwort hat (HERBICH et al., 2013).

MEISTERMANN (2006) untersucht die Wirksamkeit eines Kombinationsimpfstoffes gegen *Haemophilus parasuis* und *M. hyopneumoniae* und die eines monovalenten Impfstoffes gegen *M. hyopneumoniae* bei Schweinen und kommt zu dem Ergebnis, dass die Mykoplasmen-Komponente im Kombinationsimpfstoff bezüglich des serologischen Verlaufes der Antikörperbildung und der Immunitätsausbildung vergleichbar mit der des Monoimpfstoffes gegen *M. hyopneumoniae* ist. Zudem werden keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Tageszunahmen sowie Futtermittelverwertung der Versuchstiere ermittelt (MEISTERMANN, 2006). Ein grenzwertig nicht signifikanter Unterschied ( $p > 0,051$ ) wird bezüglich der Pneumonien festgestellt (MEISTERMANN, 2006). Nach MEISTERMANN (2006) ist die Kombinationsimpfung tendenziell der Monovakzination überlegen.

In Bezug auf eine gleichzeitige Impfung gegen PRRSV und PCV2 kommen MARTELLI et al. (2013) zu dem Schluss, dass die gleichzeitige Verabreichung der Impfstoffe (sowohl simultan als auch parallel) mit einem klinischen Schutz nach natürlicher Infektion assoziiert ist und nicht zu Interferenzen mit der Entwicklung von spezifischer und zell-medierter Immunität führt.

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Anzeige des Versuchsvorhabens

Am 27.09.2013 wurde das Versuchsvorhaben "Zeitgleiche Applikation der Impfstoffe ECOPORC SHIGA<sup>®</sup> und Stellamune<sup>®</sup> One im Feldversuch" mit dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532.2-17-13 bei der Regierung von Oberbayern angezeigt.

#### 2. Arbeitshypothese

Ziel der Untersuchung war es, die Wirksamkeit einer *M. hyopneumoniae*-Impfung bei Ferkeln in der ersten Lebenswoche in einem *M. hyopneumoniae*-belasteten Betrieb zu evaluieren. Hierzu wurde die zeitgleiche Verabreichung eines Impfstoffes gegen *M. hyopneumoniae* und eines Impfstoffes gegen das Stx2e-Toxin mit der alleinigen Impfung gegen *M. hyopneumoniae* verglichen. Von der *M. hyopneumoniae*-ungeimpften Gruppe Eco werden im Vergleich zu den *M. hyopneumoniae*-geimpften Gruppen Mhyo und Eco/Mhyo niedrigere Leistungsparameter und ein negativer Einfluss auf die Lungengesundheit erwartet. Mit vergleichbaren Ergebnissen bezüglich der Leistungsparameter und der Lungenscores ist in der kombiniert geimpften Gruppe verglichen mit der alleinig *M. hyopneumoniae*-geimpften Gruppe zu rechnen. Der Antikörperverlauf der kombiniert geimpften Gruppe ist mit jeweils dem der alleinig vakzinierten Gruppe vergleichbar.

#### 3. Versuchsbetrieb

Die Versuchsdurchführung erfolgte im Zeitraum von Dezember 2013 bis August 2014 in einem geschlossenen Betrieb in Niederbayern, mit 180 Sauenplätzen und 1600 Mastplätzen. Neben Sauen dänischer Genetik wurden Sauen der Rasse Deutsches-Edelschwein x Deutsche Landrasse mit Piétraîneber-Samen belegt.

Der Betrieb galt aufgrund klinischer Befunde und trotz bestehender *M. hyopneumoniae*-Impfung (Suvaxyn<sup>®</sup>MH-One, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland) als Mykoplasmen-verdächtig. Dies wurde anhand

makroskopischer Befunde am Schlachthof (Spitzenlappenpneumonien) und dem immunhistochemischen Nachweis von *M. hyopneumoniae* aus verändertem Lungengewebe vor Versuchsbeginn bestätigt.

Hinsichtlich klinischer Anzeichen für Ödemkrankheit, verursacht durch *E. coli*, galt dieser Betrieb als unverdächtig. Vor Studienbeginn wurde dies zusätzlich anhand eines SNT-Tests zum Nachweis neutralisierender Antikörper gegen Stx2e sowohl bei Sauen als auch bei Ferkeln des Betriebes festgestellt. Alle beprobten Tiere waren negativ. Zudem wurden aus Sammelkotproben von Absetzferkeln mittels PCR keine Shigatoxinbildenden *E. coli* nachgewiesen.

Sechs Wochen vor Versuchsbeginn wurden alle Sauen des Betriebes sowie die Tiere im Flatdeck mit einem FluPan Impfstoff (RESPIPORC FLU PAN, IDT Biologika GmbH, Dessau-Rosslau, Deutschland) geimpft. In vorausgehenden Blutproben wurden von 16 beprobten Sauen nach Bestimmung der Titer haemagglutinierender Antikörper pandemische H1N1-Inflenzaviren nachgewiesen. Hierbei konnten Titer zwischen 1:40 und 1:1280 ermittelt werden. Ziel der vorausgehenden Impfung war es den Infektionsdruck von pandemischen Inflenzaviren im Bestand zu reduzieren und eine Beeinflussung der Ergebnisse im Verlauf des Versuchs zu vermeiden.

Terminorientiert wurden die Sauen 14 Tage nach Abferkelung gegen das porcine Parvovirus und Rotlauf (Parvoruvac<sup>®</sup>, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) geimpft. Gegen PRRSV (Ingelvac<sup>®</sup> PRRS MLV, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) und SIV (RESPIPORC FLU3, IDT Biologika GmbH Dessau-Rosslau, Deutschland) erfolgte eine Vakzination alle vier Monate; eine bestandspezifische Muttertiervakzination gegen *E. coli* fand vier Wochen sowie acht Tage vor Abferkelung statt.

Eine orale antiparasitäre Prophylaxe mit Alfamectin (Alfamectin 6mg/g, alfavet Tierarzneimittel GmbH, Neumünster, Deutschland) wurde alle vier Monate über das Futter bei den Sauen sowie einmalig bei den Mastschweinen des Bestandes durchgeführt. Zusätzlich wurden die Ferkel zum Absetzen über das Futter mit Frommex (Frommex 50mg/g, medistar<sup>®</sup> Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg, Deutschland) anthelminthisch behandelt.

Der Abferkelbereich bestand aus fünf Abteilen, welche sich in zwei Abteile à zwölf Buchten, eines à 16 Buchten, eines à zehn Buchten und eines à fünf Buchten gliederte. Jede der 55 Buchten maß 1,8 x 2,2 m und verfügte über einen MIK-Kunststoffspaltenboden, einen Kastenstand sowie über eine Rotlichtlampe und Fußbodenheizung (40 °C) im Ferkelnest. Die Belüftung der einzelnen Abteile erfolgte über einen Zuluftkanal, welcher über Lochplatten in der Decke den Stall belüftete. Eine Entlüftung der Stallabteile erfolgte über eine Absaugung in Kombination mit Ventilatoren.

Die Sauen erhielten ihre Futterrationen aus hofeigener Herstellung mit Zukauf von Sojaschalen sowie Sojaschrot, Rapsschrot, Mineralfutter, Bierhefe und Molke, über eine Flüssigfütterung mit automatisiertem Tränkeprogramm. Den Saugferkeln stand handelsüblicher Prestarter ab dem 10. Lebenstag ad libitum zur Verfügung.

Mit 3,5 Wochen wurden die Ferkel abgesetzt und in 2,5 x 3,5 m große Buchten ins Flatdeck mit MIK-Kunststoffspaltenboden verbracht. Als Einstallungsmetaphylaxe gegen *E. coli* bedingten Durchfall erhielten sie über das Futter zehn Tage lang Enteroxid (aniMedica Enteroxid N, 25 g/kg, aniMedica GmbH, Senden-Bösesell, Deutschland).

Nach acht Wochen im Flatdeck wurden die Ferkel in die 5,25 x 5 m große Mastbuchten umgestallt. Diese verfügten über einen Betonvollspaltenboden und die Belüftung erfolgte ebenso wie im Flatdeck über eine Türganglüftung.

Eine Futtermittellversorgung der Tiere erfolgte sowohl im Flatdeck als auch in der Mast über eine Multiphasen-Flüssigfütterung mittels hofeigenen Futters und Nippeltränken lieferten Wasser ad libitum.

## **4. Versuchstiere**

### **4.1. Auswahl der Tiere**

Auf Grundlage der Tierzahlberechnung des statistischen Gutachtens wurden 405 Ferkel von 55 Sauen aus drei Abferkelungen mit einem Gewicht  $\geq 1,5$  kg in die Studie aufgenommen. Es wurden ausschließlich normal-anatomische Ferkel von klinisch gesunden Sauen randomisiert nach Geschlecht und Gewicht in den

Versuch eingeschlossen. Hierbei wurden nur Ferkel berücksichtigt, welche zwischen vier und sieben Lebenstagen alt waren.

Am ersten beziehungsweise zweiten Lebenstag wurden den Versuchstieren die Zähne geschliffen. Die Eisengabe mit Ursoferran<sup>®</sup> (Ursoferran<sup>®</sup> 100 mg/ml pro inj., Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) erfolgte zusammen mit der Kastration sowie dem Kupieren des Schwanzes unter Verwendung von Metacam<sup>®</sup> (Metacam<sup>®</sup> 5 mg/ml, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland ) am 3. bis 5. Lebenstag. Alle zootecnischen Maßnahmen wurden vom Landwirt selbst durchgeführt.

Des Weiteren erfolgte unabhängig vom Versuchsablauf eine Impfung der Ferkel gegen PRRSV (Ingelvac<sup>®</sup> PRRS MLV, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) sowie gegen das porcine Circovirus Typ 2 (Ingelvac<sup>®</sup> CircoFLEX, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) am 18.-21. Lebenstag der Tiere.

#### **4.2. Versuchsgruppen**

Am Studientag 0 wurden alle für die Studie ausgewählten Ferkel einer Allgemeinuntersuchung unterzogen, anschließend gewogen und mit gelben, nummerierten Ohrmarken (MS<sup>®</sup> Tag, Schippers GmbH, Kerken, Deutschland) versehen. Danach wurden die Tiere nach Geschlecht und Gewicht randomisiert, den entsprechenden Impfgruppen zugeteilt (Tabelle 2) und gemischt aufgestellt. Zusätzlich wurden in jeder Impfgruppe 25 % der Tiere für die Safety-Group ausgewählt.

Die Tiere der Safety-Group wurden in regelmäßigen Abständen serologisch untersucht und gewogen, sowie an Studientag 1, 2, 3, 7 und 14 einer Allgemeinuntersuchung unterzogen. Eine Blutprobenentnahme erfolgte vierwöchentlich. Die Tiere der Safety-Group werden im Folgenden als Sampletiere bezeichnet. Eine Übersicht des Versuchsablaufes liefert der Tabellen-Anhang (Tabelle 10).

In einem weiteren Schritt wurde den Sampletieren (25 %) die gelbe Ohrmarke durch eine rosa-farbene und identisch nummerierte Ohrmarke (MS<sup>®</sup> Tag, Schippers GmbH, Kerken, Deutschland) ersetzt. Mit Erreichen der 24.

Lebenswoche wurden die Endmasttiere mit nummerierten Sauenohrmarken (MS<sup>®</sup> Tag Standard, Schippers GmbH, Kerken, Deutschland) versehen, um am Schlachthof eine reibungslose Zuordnung von Schlachtkörper und Geschlinge zu gewährleisten.

**Tabelle 2: Versuchsgruppen**

Gruppe	n		Impfstoff/e	Applikationsort und Menge
	alle Tiere	Safety-Group		
Eco	135	34	ECOPORC SHIGA <sup>®</sup>	Rechte Halsseite 1ml
Eco/Mhyo	135	34	ECOPORC SHIGA <sup>®</sup> + Stellamune <sup>®</sup> One	Beidseits 1ml/ 2ml
Mhyo	135	34	Stellamune <sup>®</sup> One	Linke Halsseite 2ml

## 5. Vakzine

Für die Studie wurde der ab dem dritten Lebenstag zugelassene Inaktivatimpfstoff Stellamune<sup>®</sup> One (Elanco Animal Health, Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) verwendet. Dieser enthält als wirksamen Bestandteil den inaktivierten *Mycoplasma hyopneumoniae* Stamm NL 1042, sowie als Adjuvantien Amphigenbase und Drakeol 5 (Mineralöl) (VETIDATA, 2011).

Des Weiteren kam die rekombinante Vakzine (Adsorbat-Vakzine) ECOPORC SHIGA<sup>®</sup> (IDT Biologika, Dessau-Rosslau, Deutschland) zum Einsatz, welche als wirksamen Bestandteil ein genetisch modifiziertes rekombinantes Stx2e-Antigen enthält. Als Adjuvans ist dem Impfstoff Aluminiumhydroxid beigefügt (VETIDATA, 2014). Diese Impfung ist ab dem vierten Lebenstag zugelassen.

Alle Studientiere wurden gemäß der Einteilung nach Tabelle 2 in der ersten Lebenswoche an Studientag 0 nach Zulassungsvorschriften der Hersteller geimpft. Hierzu wurde den Tieren der entsprechende Impfstoff kaudal des Ohrgrundes am Übergang von unbehaarter zu behaarter Haut in die Halsmuskulatur injiziert. Es wurden 0,80 x 40 mm große Einmalkanülen

(Sterican<sup>®</sup>, Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz) sowie mengenverstellbare Impfpistolen „2 ml Premium“ der Firma Simcro (Hamilton, Neuseeland) verwendet. Nach jedem Ferkel wurde die Kanüle gewechselt.

## **6. Datenerhebung**

### **6.1. Klinische Untersuchung**

#### **6.1.1. Allgemeinuntersuchung**

Die am Tag 0 der Studie ausgewählten Sampletiere (4.-7. Lebenstag) wurden vor Applikation der Impfstoffe einer Allgemeinuntersuchung unterzogen. Weitere vier bis sechs Stunden nach Vakzination erfolgte eine Allgemeinuntersuchung ebenso wie an Studientag 1, 2, 3, 7 und 14. Als Parameter wurden Ernährungszustand, Verhalten, Husten, Niesen und Dyspnoe erhoben.

#### **6.1.2. Lokale Reaktion an der Injektionsstelle**

Bei den Sampletieren wurden vor Applikation der/ des Impfstoffe/s sowie vier bis sechs Stunden danach, als auch an Studientag 1, 2, 3, 7 und 14 die Injektionsstelle/-n einmal täglich adspektorisch sowie palpatorisch beurteilt (Tabelle 3).

#### **6.1.3. Rektale Körpertemperatur**

Mittels eines elektronischen Thermometers (Microlife<sup>®</sup> Vet-Temp, Microlife AG, Widnau, Schweiz) wurde bei den Sampletieren vor Applikation der/ des Impfstoffe/s, ebenso wie vier bis sechs Stunden danach, sowie an Studientag 1, 2, 3 und 4 jeweils einmal täglich die Rektaltemperatur gemessen. Traten Abweichungen von der physiologischen Körpertemperatur an Studientag 4 auf, wurde weiterhin täglich die Rektaltemperatur erfasst, bis sich die Werte in einem physiologischen Bereich befanden.

**Tabelle 3: Lokale Hautreaktion an der Injektionsstelle**

Score	Beschreibung
0	Nicht mehr als eine sichtbare Injektionsstelle mit Erythem. Durchmesser $\leq 0,5$ cm, Schwellung der Haut nur in Verbindung mit der Injektionsstelle. Keine Anzeichen von Reizung.
1	Erythem, Durchmesser $> 0,5 - 1$ cm ohne deutlich zu palpierende subkutane oder intramuskuläre Schwellung, evtl. Anzeichen von Reizung, wie gelegentliches Scheuern der Injektionsstelle.
2	Abmessungen Durchmesser $\geq 1 - 2$ cm. Erythem der Haut oder palpierbare subkutane oder intramuskuläre Schwellung mit Anzeichen von Reizung, wie anhaltendes Scheuern der Injektionsstelle, kein Exsudat.
3	Abmessungen Durchmesser $\geq 2$ cm, Erythem der Haut, sichtbare und palpierbare subkutane oder intramuskuläre Schwellung mit Anzeichen von Reizung und Schmerzen, wie anhaltendes Scheuern der Injektionsstelle, evtl. Exsudat oder palpierbare flüssigkeitsgefüllte Schwellung.

## 6.2. Blutprobenentnahme

Die erste Blutprobenentnahme erfolgte bei allen Sampletieren an Studientag 0 (4.-7. Lebenstag), vor der Vakzination. Weitere Blutprobenentnahmen erfolgten bei diesen Tieren im vierwöchigen Abstand: in den Lebenswochen vier, acht, zwölf, 16, 20 und vor der Schlachtung in der 24. Lebenswoche.

Bei den übrigen Tieren der Studie erfolgte zum Absetzen mit circa vier Wochen sowie in der 8. Lebenswoche eine Blutprobenentnahme.

Bis zum 28. Lebenstag wurden die Ferkel aus der Bucht gefangen und von einer Hilfsperson auf dem Schoß fixiert. Anschließend wurde aus der rechten *Vena cava cranialis* Blut entnommen. Tiere im Flatdeck mit bis zu 15 - 20 kg wurden wie oben beschrieben fixiert, die Blutprobenentnahme erfolgte aus der rechten *Vena jugularis externa*. Schwerere Schweine wurden mit Hilfe einer Oberkieferschlinge von einer Hilfsperson fixiert. Hierbei wurde das Blut ebenfalls aus der rechten *Vena jugularis externa* gewonnen. Zur Blutprobenentnahme wurden Serummonovetten (Primavette® V Serum 10ml,

Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) mit Cryolabels (Cryo-BABIES<sup>®</sup> and CRYOTAGS<sup>®</sup>, DIVERSIFIED BIOTEC, Dedham, Massachusetts, USA) versehen und mit der Nummer des jeweiligen Tieres sowie der Vakzinationsgruppe und dem Blutprobenentnahmetag beschriftet. Bis zum 28. Lebenstag wurden 0,80 x 40 mm große sterile Einmalkanülen (Sterican<sup>®</sup>, Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz) verwendet. Im Anschluss, bis zur 20. Lebenswoche wurden sterile Einmalkanülen der Größe 1,10 x 50 mm (Sterican<sup>®</sup>, Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz) benutzt. Zum Mastende erfolgte die Verwendung von Kanülen der Marke SUPRA in einer Größe von 1,20 x 75 mm (Erhardt-Söhne GmbH, Geislingen, Deutschland). Bei allen Blutprobenentnahmen wurden circa zehn ml Blut pro Tier gewonnen.

Anschließend wurden die Proben im Labor (Hämatologisches Labor der Klinik für Schweine, LMU München, Oberschleißheim, Deutschland) mittels einer Zentrifuge (Hettich Rotanta 460 R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) bei 3000 Umdrehungen / min und 20 °C über zehn Minuten zentrifugiert und anschließend das Serum in je drei Eppendorf<sup>®</sup> Safe-Lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert. Die Beschriftungen erfolgten entsprechend der Serummonovetten. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Eppendorf-Tubes bei -20 °C tiefgefroren.

### **6.3. Gewichtsentwicklung**

Die erste Wiegung erfolgte bei allen Tieren der Studie an Studientag 0 (4.-7. Lebenstag) vor Applikation der Impfstoffe. Weitere Wiegunen erfolgten zum Absetzen mit circa vier Lebenswochen (Studientag 24), sowie vor der Einstallung in die Mast mit zwölf Lebenswochen (Studientag 80) und vor der Schlachtung mit circa 24 Lebenswochen (Studientag 164). An Studientag 0 und zum 28. Lebenstag wurden die Tiere mittels einer elektronischen Plateauwaage (MS<sup>®</sup> Wiegeplateau, Schippers GmbH, Kerken, Deutschland) und ab dem 84. Lebenstag mittels einer mobilen digitalen Selektionswaage (RHEWA 82 Comfort, RHEWA Waagenfabrik, August Freudwald GmbH & Co. KG, Mettmann, Deutschland) gewogen.

#### **6.4. Anteil untergewichtiger Tiere**

Untergewichtige Tiere wurden nach KIXMÖLLER et al. (2008) definiert. Hierzu zählten Tiere, die eine um 25 % geringere Tageszunahme hatten als der Durchschnitt aller Studientiere.

#### **6.5. Tierverluste und Behandlungen**

Verendete oder aus Tierschutzgründen euthanasierte Tiere wurden vermerkt und anschließend, je nach Verwesungsgrad des Tierkörpers, einer pathomorphologischen sowie histopathologischen Untersuchung unterzogen. Die Sektionen erfolgten im Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim oder im Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Behandelte Tiere wurden in einer Liste mit Ohrmarkennummer, Datum der Behandlung, Name des Arzneimittels, Dosierung sowie Indikation vermerkt. Nur Behandlungen von respiratorischen Erkrankungen wurden ausgewertet.

#### **6.6. Lungenbefunde am Schlachthof**

Alle Studientiere wurden innerhalb von neun Schlachterminen der Schlachtung zugeführt. Die kürzeste Mastdauer betrug dabei 98 Tage und die längste 154 Tage. Die Schlachtungen fanden entweder im Schlachthof Landshut (VION Landshut, Am Banngaben 24, Landshut, Deutschland) oder im Schlachthof München (Münchner Schlachthof Betriebs GmbH, Zenettistrasse 10, München, Deutschland) statt. Die Studientiere wurden anhand der individuellen Ohrmarken am Schlachtband identifiziert. Um eine Einzeltierzuweisung von Schlachtkörper und dazugehörigem Geschlinge zu gewährleisten, wurden die Ohrmarken der Studientiere am Schlachtband entfernt und in einer Plastiktüte an das zugehörige Geschlinge geheftet. Daraufhin wurde diese Ziptüte zusammen mit dem Geschlinge in eine weitere Plastiktüte gegeben und kurzzeitig bis zur Beurteilung in Lebensmittelkisten aufbewahrt. Der palpatorische sowie adspektorische Lungenscore nach CHRISTENSEN et al. (1999) erfolgte, nachdem alle Studientiere des jeweiligen Schlachttages geschlachtet waren.

Die Bewertung der einzelnen Lungenlappen erfolgte nach CHRISTENSEN et al. (1999). Die einzelnen Lobi erhielten entsprechend ihrer dreidimensionalen mykoplasmen-ähnlichen Veränderungen Prozentangaben von 0 bis 100 %. Die ermittelten Werte wurden in die folgende Gleichung eingesetzt, um den Gesamt-Lungenscore zu ermitteln:

$$(0,05 \times \text{Lobus (L.) cranialis sinister}) + (0,05 \times \text{L. medialis sinister}) + (0,30 \times \text{L. caudalis sinister}) + (0,10 \times \text{L. cranialis dexter}) + (0,10 \times \text{L. medialis dexter}) + (0,35 \times \text{L. caudalis dexter}) + (0,05 \times \text{L. accessorius})$$

## 6.7. Serologische Untersuchung

### 6.7.1. *Mycoplasma hyopneumoniae* ELISA

Um den *M. hyopneumoniae*-Antikörperverlauf der Sampletiere quantitativ im Serum zu bestimmen, wurde ein standardmäßiges Testkit „*Mycoplasma Hyopneumoniae* Antibody Test Kit“ der Firma IDEXX Laboratories (Westbrook, Maine, USA) zusammen mit dem Gerät „Thunderbolt®“ der Firma Gold Standard Diagnostics (Davis, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen indirekten ELISA zur quantitativen Erfassung von *M. hyopneumoniae* Antikörpern. Die genommenen Proben inkubieren in Vertiefungen einer mit Antigen beschichteten Mikrotiterplatte, wonach spezifische Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* einen Komplex mit dem vorhandenen Antigen bilden. In einem nächsten Schritt wird ungebundenes Material herausgewaschen und ein Enzymsubstrat wird in die vorhandenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben, dessen Farbumschlag in direkter Korrelation zur Menge an *M. hyopneumoniae*-Antikörpern steht. Bei der Auswertung der Proben sind Ergebnisse mittels eines errechneten P/PK-Verhältnisses zu interpretieren (Tabelle 4). Die Durchführung des *M. hyopneumoniae*-ELISA erfolgte im Labor der Klinik für Schweine, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

**Tabelle 4: Interpretation des *M. hyopneumoniae*-ELISA**

P/PK-Verhältnis	Interpretation
< 0,30	Negativ für <i>M. hyopneumoniae</i> -Antikörper
0,30 - 0,40	Fraglich für <i>M. hyopneumoniae</i> -Antikörper
> 0,40	Positiv für <i>M. hyopneumoniae</i> -Antikörper

### 6.7.2. Serum-Neutralisationstest an Verozellen zum Nachweis neutralisierender Antikörper gegen Stx2e

Das Vorhandensein neutralisierender Antikörper gegen das Shigatoxin 2e im Blut von Testtieren kann in Zellkultur von Verozellen, die sensitiv für das Toxin sind, im Serumneutralisationstest (SNT) ermittelt werden und korreliert mit der Schutzwirkung, die der Impfstoff im Zieltier hervorruft. Hierzu wurden Proben an die Firma IDT Biologika GmbH in Dessau-Rosslau versandt, welche mittels eines hauseigenen SNT-Tests ausgewertet wurden. Es wurden Serumproben der Safety-Group der 0., 4. und 8. Lebenswoche untersucht.

Folgende Beschreibung des Testverfahrens stammt von IDT Biologika GmbH, Dessau-Rosslau.

Die Prüfung erfolgt in Vero-Zellkulturen mittels Verdünnungsreihen. Im Serum vorhandene Antikörper neutralisieren das Toxin. Anschließend werden Verozellen, die sensitiv für das Toxin sind, suspendiert und den Neutralisationsansätzen zugegeben. Nach Inkubation werden die Zellen mit einem Lebendfarbstoff gefärbt und photometrisch gemessen. Mittels Kontrollansätzen kann die relative Vitalität bezogen auf die unbehandelten Zellen errechnet werden.

Die Bestimmung erfolgt mit zwei Replikaten pro Probe. Pro Testansatz wird eine Kontrollplatte mitgeführt.

### Auswertung:

Zunächst werden die Zellen hinsichtlich Veränderungen der Färbung des Mediums optisch bewertet und bei Auftreten von Abweichungen und Auffälligkeiten werden die Zellen mikroskopisch untersucht. Anschließend erfolgt die Färbung und Messung im Mikrotiterplattenreader (450/620 nm). Gewonnene Messwerte werden anhand der Negativkontrolle und Positivkontrolle standardisiert.

### Auswertung der Ergebnisse:

#### Bestimmung des Stx2e-Neutralisations-Titers:

Die Werte für die relative Vitalität werden gegen die Serumverdünnung aufgetragen (Reihe A (acht Titrationsstufen) bzw. Reihen A, C, E, G entsprechend einer Serumverdünnung von 1:15)

Als Neutralisationstiter wird der reziproke Wert der höchsten Verdünnungsstufe angegeben, bei der die relative Vitalität > 50 % beträgt. Die Grenze für die quantitative Bestimmung des Titers liegt in diesem Test bei einem Titer von 15.

#### Nachweis neutralisierender Antikörper:

Titerstufen unter 1:15 sind nicht mehr quantitativ, sondern ausschließlich qualitativ zu ermitteln. Titer unter 1:15 werden als positiv bewertet (neutralisierende Antikörper nachgewiesen), wenn die relative Vitalität der betreffenden Probe in der 1:15 Verdünnung eine relative Vitalität von > 2 x der relativen Vitalität der Toxinkontrolle mit Feldtoxin besitzt.

## **6.8. Molekularbiologische und histologische Untersuchung von Schlachtlungen**

Am Schlachthof wurden Lungengewebeproben, welche EP-ähnliche Lungenläsionen aufwiesen, von jeweils fünf Tieren pro Versuchsgruppe zur weiteren Diagnostik entnommen. Diese wurden zur molekularbiologischen Untersuchung auf Genomfragmente von PRRSV, PCV2 und SIV an das Institut für Virologie der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie an die IDT Biologika GmbH (Dessau-Rosslau, Deutschland) versandt. Eine

immunhistochemische Untersuchung nach MEENS et al. (2010) bezüglich *M. hyopneumoniae* wurde von einem Fremdlabor übernommen.

Zum Nachweis von PRRSV wurde eine TaqMan real-time RT-PCR nach KLEIBOEKER et al. (2005), modifiziert nach WERNIKE verwendet.

Um PCV2 im Lungengewebe nachzuweisen wurde eine TaqMan real-time PCR zur Detektierung des ORF2 des Porzinen Circovirus Typ 2 nach ZHAO et al. (2010), modifiziert nach FUX durchgeführt.

SIV wurde mittels einer Real-Time PCR mit vorgeschalteter Reverser Transkription nach IDT SOP VFN-PM-027 detektiert.

## 7. Statistik

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden alle Daten mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft<sup>®</sup> Excel 2010 Version 14 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) erfasst und zur statistischen Auswertung in SPSS<sup>®</sup> Statistics 21 (IBM SPSS, Chicago, USA) übertragen. Für die Parameter wurde das arithmetische Mittel, der Median, die Standardabweichung, die Varianz sowie Maximum und Minimum berechnet. Zur Auswahl des geeigneten statistischen Testverfahrens wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt, um auf Normalverteilung der Daten zu testen. Wenn nicht anders beschrieben galten p-Werte von  $\leq 0,05$  als signifikant. Bei Mehrfachvergleichen zwischen den Gruppen wurde das Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm korrigiert (HOLM, 1979). Die Beurteilung der Parameter bezüglich der Sicherheit der Vakzination basierte auf der Analyse der Allgemeinuntersuchung, der lokalen Hautreaktion an der/ den Injektionsstelle/-n sowie der Ergebnisse der rektalen Körperinnentemperatur. Da die Daten der ermittelten durchschnittlichen Körperinnentemperaturen nicht normalverteilt waren, wurden diese mittels eines nicht-parametrischen Testes, in Form des Mann-Whitney U-Tests ausgewertet. Als Kriterien zur Beurteilung der Effektivität der angewandten Impfschemata wurden Gewichtsentwicklung, Lungenbefunde am Schlachthof sowie Mortalität und Anteil an untergewichtigen Tieren herangezogen. Der Parameter molekularbiologische/ histologische Untersuchung wurde deskriptiv

dargestellt. Normalverteilte Daten wie Körpergewicht und tägliche Zunahmen wurden mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA und einem T-Test ausgewertet. Nicht-normalverteilte Parameter wie Mastdauer, sowie die durchschnittlichen Werte des serologischen *M. hyopneumoniae*-Antikörperverschleiss und der mittlere Lungenscore wurden mit Hilfe eines Kruskal-Wallis-Tests und nachfolgend eines Mann-Whitney U-Tests ausgewertet. Die Unterteilung der Lungenscores in die Kategorien 0 (0), 1 ( $> 0 \leq 5$ ), 2 ( $> 5 < 10$ ), 3 ( $10 \leq 20$ ), 4 ( $> 20 < 30$ ), 5 ( $> 30 - 100$ ) wurde deskriptiv dargestellt. Um die Häufigkeitsverteilung von *M. hyopneumoniae*-positiven Tieren, Ergebnissen der klinischen sowie lokalen Untersuchung der Injektionsstellen, Mortalität und Anteil an untergewichtigen Tieren in den Versuchsgruppen, Behandlung respiratorischer Erkrankungen, Häufigkeit von Pleuritiden als auch die Ergebnisse des Serum-Neutralisationstest an Verozellen zum Nachweis neutralisierender Antikörper gegen Stx2e aufzuzeigen, wurde zur Berechnung dieser ein Chi-Quadrat-Test verwendet. Zwei-Gruppen-Vergleiche (Gruppe Eco-Mhyo; Gruppe Eco/Mhyo-Mhyo) erfolgten für die Parameter Körpergewicht, Tageszunahmen, Mastdauer, Lungenscore, Anteil an untergewichtigen Schweinen sowie Behandlung respiratorischer Erkrankungen und verendete Tiere. Drei-Gruppen-Vergleiche (Gruppe Eco-Mhyo; Gruppe Eco-Eco/Mhyo; Gruppe Eco/Mhyo-Mhyo) wurden für die Auswertung der Parameter der serologischen Untersuchungen sowie der Körperinnentemperatur herangezogen.

## **IV. ERGEBNISSE**

Insgesamt wurden 405 Tiere in die Studie eingeschlossen, wovon 377 Tiere die 24. Lebenswoche erreichten. Die übrigen 28 Schweine wurden vorzeitig entweder aus dem Versuch ausgeschlossen ( $n = 7$ ), aus Tierschutzgründen euthanasiert ( $n = 4$ ) oder verendeten ( $n = 17$ ).

Im Schlachthof konnte bei 364 Tieren ein Lungenscore durchgeführt werden. Neun Tiere hatten während des Schlachtvorgangs ihre Ohrmarke verloren und vier Tiere verstarben im Zeitraum nach der 24. Lebenswoche.

### **1. Verträglichkeit und Sicherheit der Vakzination**

#### **1.1. Klinische Untersuchung**

Insgesamt 101 Sampletiere wurden vor Versuchsbeginn sowie vier bis sechs Stunden nach Vakzination und an den Studientagen 1, 2, 3, 7 und 14 einmal täglich klinisch und lokal untersucht und die Injektionsstellen wurden beurteilt. Bis Studientag 4 erfolgte täglich eine einmalige rektale Temperaturmessung.

Weder Tiere der Gruppe Eco und der Gruppe Eco/Mhyo, noch Tiere der Gruppe Mhyo zeigten vier bis sechs Stunden nach Vakzination lokale Veränderungen an den Injektionsstellen. Ein Tier aus Gruppe Eco/Mhyo hatte an Studientag 1 an der linken Injektionsstelle (Stellamune<sup>®</sup> One) ein Erythem von 0,5 - 1 cm Durchmesser (Score 1). Bei den folgenden Untersuchungen der Injektionsstellen an Studientag 2, 3, 7 und 14 wurde bei allen Tieren die Injektionsstelle mit dem Score 0 beurteilt.

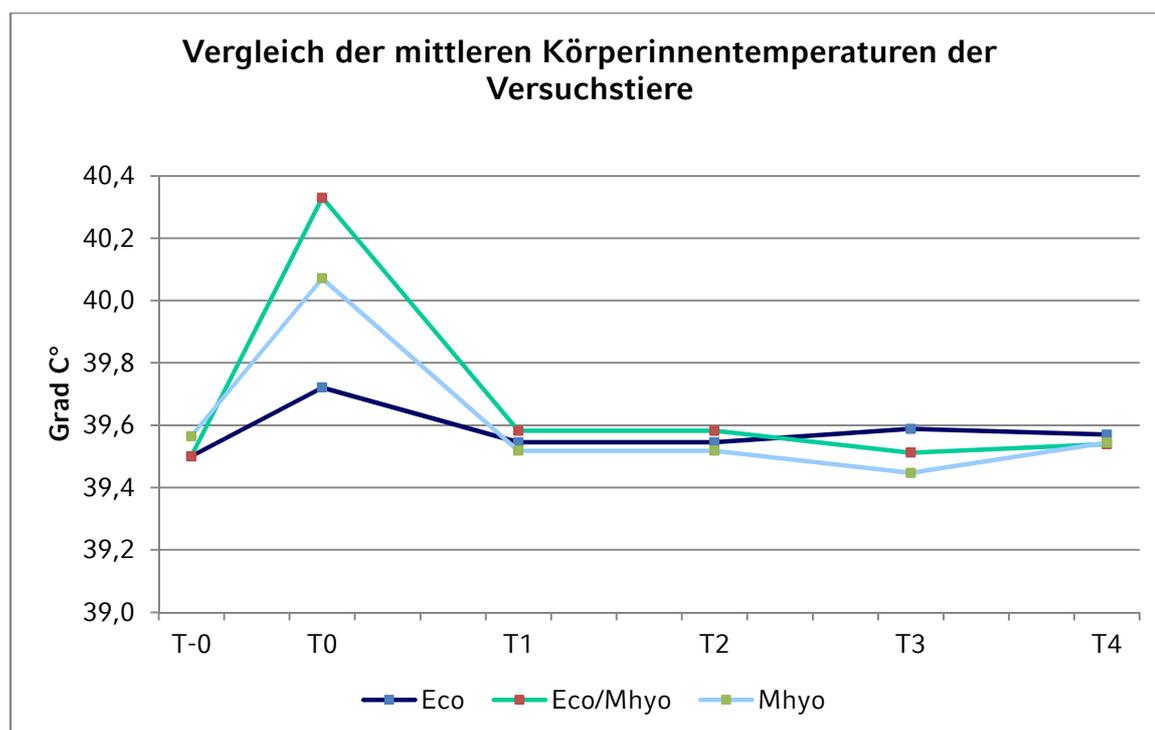
Während der zwei-wöchigen Überwachung der Tiere der Safety-Gruppe hustete keines der Tiere oder zeigte Niesen oder Dyspnoe. Ein Tier aus der Versuchsgruppe Eco/Mhyo zeigte an Studientag 14 ein reduziertes Verhalten (Score 1). Drei Tiere aus der Gruppe Eco, zwei Tiere aus der Gruppe Eco/Mhyo und ein Tier aus der Gruppe Mhyo entwickelten während der zweiwöchigen Überwachungsphase einen reduzierten Ernährungszustand (Score 1-2) (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Anzahl (%) der Tiere mit klinischen Veränderungen bis 14 Tage post vaccinationem**

Gruppe	Eco (n = 34)		Eco/Mhyo (n = 33)		Mhyo (n = 34)	
	n	%	n	%	n	%
Husten	0	0%	0	0%	0	0%
Niesen	0	0%	0	0%	0	0%
Dyspnoe	0	0%	0	0%	0	0%
Reduziertes Verhalten	0	0%	1	3%	0	0%
Reduzierter Ernährungszustand	3	9%	2	6%	1	3%

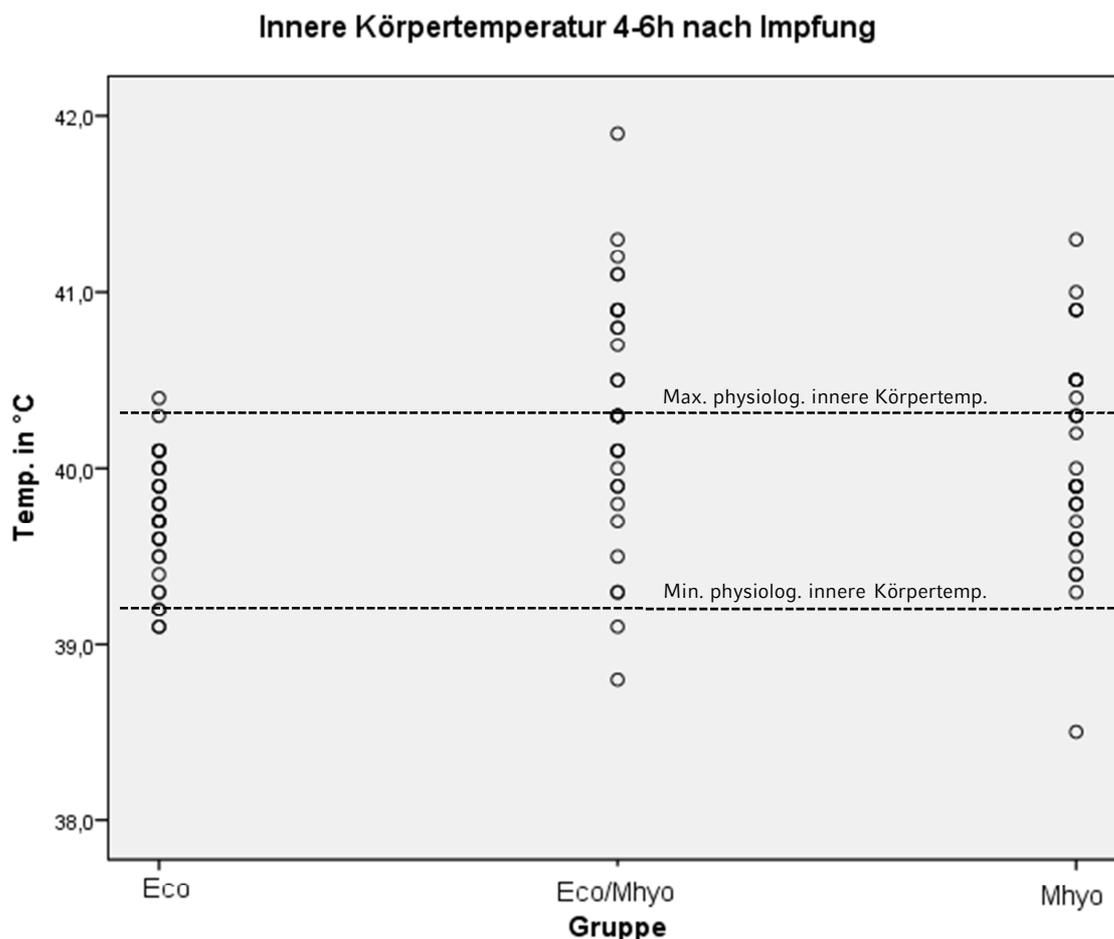
## 1.2. Rektale Körpertemperatur

An den beschriebenen Studientagen wurde die durchschnittliche rektale Körpertemperatur der Samplertiere der verschiedenen Versuchsgruppen ermittelt. Hierbei galt als physiologischer Bereich das von HEINRITZI et al. (2006) für Saugferkel beschriebene Temperaturintervall von 38,9 °- 40,1 °C. Vor Applikation des Impfstoffes bzw. der Impfstoffe (T-0) wick keine der Versuchsgruppen bezüglich der mittleren rektalen Körpertemperatur vom physiologischen Bereich ab (durchschnittliche Körpertemperatur der Gruppen zwischen 39,5 °C und 39,6 °C (SD ± 0,3)). Vier bis sechs Stunden nach Verabreichung der Vakzinen (T0) konnte in Gruppe Eco/Mhyo eine erhöhte mittlere Körpertemperatur von 40,3 °C (SD ± 0,7) beobachtet werden (Abbildung 1, Abbildung 2). Die Werte der Gruppen Eco und Mhyo waren 39,7 °C (SD ± 0,3) bzw. 40,1 °C (SD ± 0,6) (Abbildung 1, Abbildung 2).



**Abbildung 1: Durchschnittliche Körperinnentemperatur der Versuchsgruppen im Vergleich**

Die mittlere innere Körpertemperatur der Gruppe Eco/Mhyo sowie die der Gruppe Mhyo war signifikant höher ( $p_{\text{Eco/Mhyo}} < 0,001$  bzw.  $p_{\text{Mhyo}} = 0,006$ ) als die der Gruppe Eco. Zwischen der Gruppe Eco/Mhyo und der Gruppe Mhyo konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Vier bis sechs Stunden nach der Impfung hatten zwei Tiere aus der Gruppe Eco, 20 Tiere aus der Gruppe Eco/Mhyo und 15 Tiere aus der Gruppe Mhyo eine erhöhte innere Körpertemperatur ( $> 40,1$  °C). An Studientag 1 wurde in allen Gruppen eine durchschnittliche Körperinnentemperatur von  $39,5$  °C ( $SD \pm 0,3$ ) gemessen. Ein Tier aus Gruppe Eco/Mhyo wies an ST1 mit  $40,6$  °C eine erhöhte Körperinnentemperatur auf. Die in den folgenden Tagen (Studientag 2 bis 4) ermittelten Körperinnentemperaturen lagen in allen Gruppen zwischen  $39,4$  °C und  $39,6$  °C, ohne sich signifikant zu unterscheiden.



**Abbildung 2: Innere Körpertemperatur der einzelnen Tiere der drei Versuchsgruppen 4-6 h post vaccinationem**

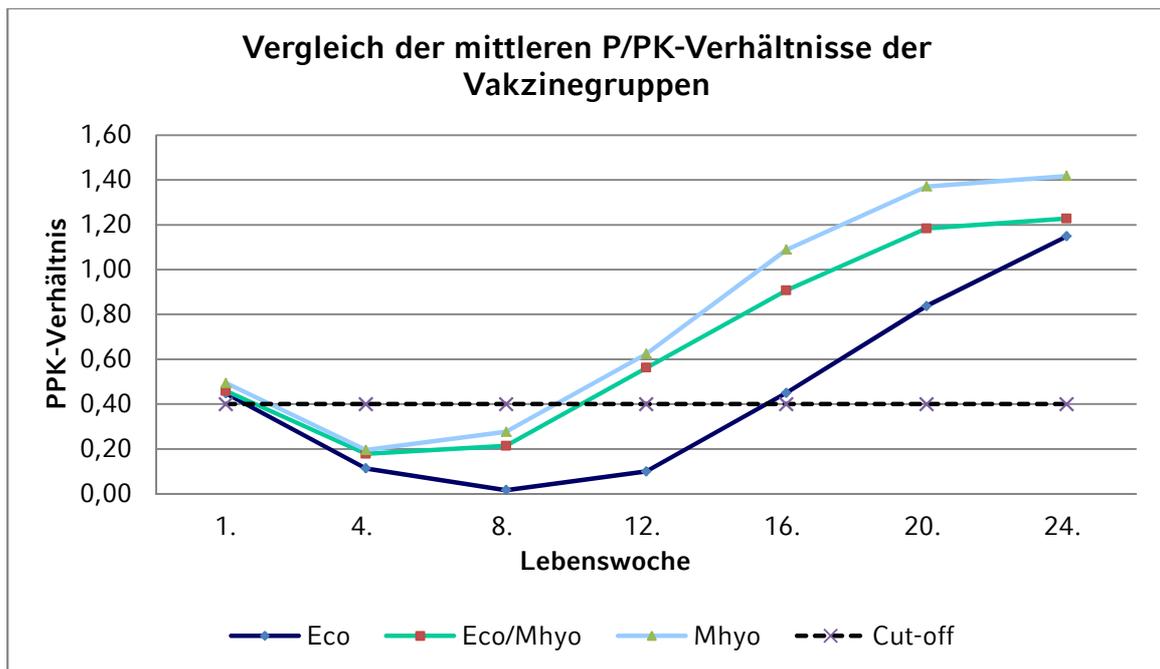
## 2. Wirksamkeit der *M. hyopneumoniae*-Impfung

### 2.1. Serologie

#### 2.1.1. Antikörper gegen *M. hyopneumoniae*

Von den Sampletieren der Studie wurde vor Applikation der Impfstoffe sowie in der 4., 8., 12., 16., 20., und 24. Lebenswoche Blut gewonnen. Zum Zeitpunkt ST0 waren in der Gruppe Eco 46,7 %, in der Gruppe Eco/Mhyo 50,0 % und in der Gruppe Mhyo 54,5 % der Tiere seropositiv ( $p > 0,05$ ) (Abbildung 4). Die mittleren P/PK-Werte lagen zwischen 0,45 und 0,49 (Abbildung 3) ohne sich signifikant zu unterscheiden. Im weiteren Verlauf sanken bis zur 4. Lebenswoche die Antikörperspiegel in allen drei Gruppen, so dass die P/PK-Werte der Gruppen im Mittel zwischen 0,11 und 0,20 lagen. Die

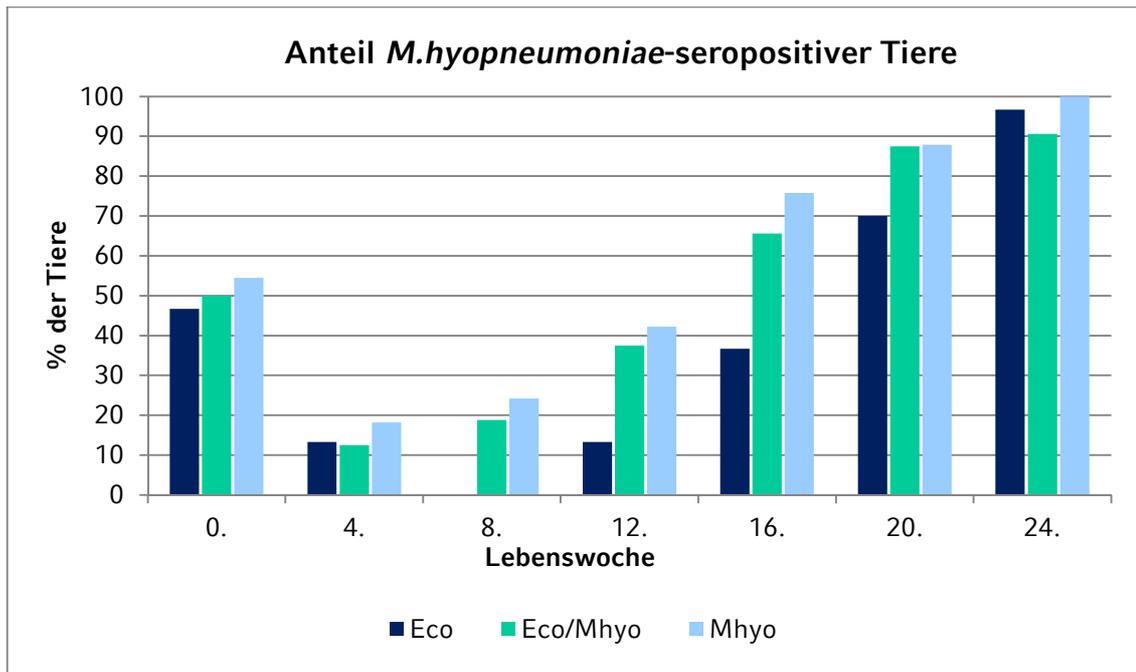
Versuchsgruppen unterschieden sich numerisch voneinander. Zu diesem Zeitpunkt waren in Gruppe Eco 13,3 % der Tiere, in Gruppe Eco/Mhyo 12,5 % sowie 18,2 % in Gruppe Mhyo seropositiv. Bis zur 8. Lebenswoche stiegen die mittleren P/PK-Werte der Schweine der Gruppen Eco/Mhyo und Mhyo im Mittel auf Werte zwischen 0,21 und 0,28 an, wohingegen die mittleren P/PK-Werte der Tiere aus Gruppe Eco auf 0,02 abfielen. Im Vergleich zu Gruppe Eco hatten zu diesem Zeitpunkt Tiere aus den Gruppen Mhyo sowie Eco/Mhyo signifikant höhere mittlere P/PK-Werte ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 3: Verlauf der mittleren Antikörpertiter der Impfgruppen im Vergleich**

In der 8. Lebenswoche war in der Gruppe Eco kein Tier seropositiv, im Gegensatz zu der Gruppe Eco/Mhyo und der Gruppe Mhyo mit 18,8 % bzw. 24,2 % seropositiver Tiere ( $p_{\text{Mhyo}} = 0,005$ ;  $p_{\text{Eco/Mhyo}} = 0,024$ ). In der 12. Lebenswoche überschritten die Gruppen Eco/Mhyo und Mhyo mit einem mittleren P/PK-Wert von 0,56 bzw. 0,62 den Cut-off von 0,4. Der P/PK-Wert von Gruppe Eco lag bei 0,1. Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen der Gruppe Mhyo und der Gruppe Eco ( $p < 0,001$ ) sowie zwischen der Gruppe Eco/Mhyo und der Gruppe Eco ( $p = 0,001$ ), wobei die Gruppen Eco/Mhyo und Mhyo sich nicht signifikant unterschieden. 13,3 % der Tiere waren zu diesem

Zeitpunkt in der Gruppe Eco seropositiv, in der Gruppe Eco/Mhyo und der Gruppe Mhyo waren es 37,5 % bzw. 42,4 % der Tiere. Die Gruppe Mhyo hatte zu diesem Zeitpunkt einen signifikant höheren Anteil an seropositiven Tieren als die Gruppe Eco ( $p = 0,013$ ). Die Gruppe Eco/Mhyo unterschied sich numerisch von Gruppe Eco ( $p = 0,042$ ). Zur 16. Lebenswoche überschritten auch die Tiere der Gruppe Eco im Mittel den Cut-off mit einem P/PK-Verhältnis von 0,45, während mittlere P/PK-Werte der Tiere aus den Gruppen Eco/Mhyo und Mhyo zwischen 0,91 und 1,09 lagen. Der Anteil an serokonvertierten Tieren war in der Gruppe Eco 36,7 % und in den Gruppen Eco/Mhyo und Mhyo 65,6 % bzw. 75,8 %. Signifikante Unterschiede bezüglich der durchschnittlichen Antikörperhöhe konnten zwischen der Gruppe Eco und der Gruppe Mhyo sowie zwischen der Gruppe Eco und der Gruppe Eco/Mhyo ( $p_{\text{Mhyo}} < 0,001$ ;  $p_{\text{Eco/Mhyo}} = 0,005$ ) ermittelt werden. In der Gruppe Mhyo serokonvertierte zu diesem Zeitpunkt ein signifikant höherer Anteil an Tieren als in der Gruppe Eco ( $p = 0,002$ ). In der 20. Lebenswoche lagen die mittleren P/PK-Werte der Gruppen zwischen 0,84 und 1,37. Signifikant höhere Werte im Vergleich zur Gruppe Eco erzielten hierbei die Gruppe Mhyo ( $p = 0,001$ ) und die Gruppe Eco/Mhyo ( $p = 0,024$ ). Prozentual waren in der 20. Lebenswoche 70 % bis 87,9 % der Versuchstiere in den Gruppen seropositiv (Abbildung 4), ohne sich signifikant zu unterscheiden. Am Ende der Mast in der 24. Lebenswoche wiesen die Versuchstiere mittlere P/PK-Werte von 1,15 für die Gruppe Eco sowie von 1,23 bzw. 1,42 für die Gruppen Eco/Mhyo und Mhyo auf, ohne sich signifikant zu unterscheiden. Zu diesem Zeitpunkt waren 90,6 % bis 100 % der Tiere in den Versuchsgruppen seropositiv (Abbildung 4). Während der gesamten Mastperiode serokonvertierten in der Gruppe Mhyo alle Sampletiere (33 / 33 Tieren), in der Gruppe Eco/Mhyo 31 / 32 Tieren und aus der Gruppe Eco 29 / 30 Tieren. Zu keinem der Zeitpunkte ergaben sich signifikante Unterschiede bezüglich der P/PK-Werte zwischen der Gruppe Eco/Mhyo und der Gruppe Mhyo.



**Abbildung 4: Anteil seropositiver Tiere der Vakzinierungsgruppen im Vergleich**

### 2.1.2. Serum-Neutralisationstest an Verzellen zum Nachweis neutralisierender Antikörper gegen das Shigatoxin Stx2e

Für die Auswertung des Serum-Neutralisationstestes wurden Blutproben der Sampletiere zu Studientag 0 (vor Impfung) sowie zur 4. und 8. Lebenswoche verwendet. Die Ergebnisse wurden hinsichtlich positiv ja/nein ausgewertet.

Vor Applikation der Impfstoffe wies keine der drei Versuchsgruppen neutralisierende Antikörper gegen das Stx2e-Toxin auf. Zum Absetzen in der 4. Lebenswoche waren in Gruppe Eco 85,7 % der Tiere, in Gruppe Eco/Mhyo 100,0 % der Tiere und in Gruppe Mhyo 0,0 % der Tiere seropositiv (Tabelle 6). Sowohl Gruppe Eco als auch Gruppe Eco/Mhyo unterschieden sich signifikant in Höhe des Anteils an seropositiven Tieren von Gruppe Mhyo ( $p_{\text{Eco/Mhyo}} < 0,001$ ;  $p_{\text{Eco}} < 0,001$ ).

Mit acht Wochen waren in Gruppe Eco 96,4 % der Tiere und in Gruppe Eco/Mhyo 96,9 % der Tiere seropositiv, wohingegen in Gruppe Mhyo keines der Tiere neutralisierende Antikörper gegen Stx2e entwickelte (Tabelle 6). Der Anteil seropositiver Tiere war sowohl in Gruppe Eco als auch in Gruppe

Eco/Mhyo verglichen zu Gruppe Mhyo signifikant größer ( $p_{\text{Eco}} < 0,001$ ;  $p_{\text{Eco/Mhyo}} < 0,001$ ).

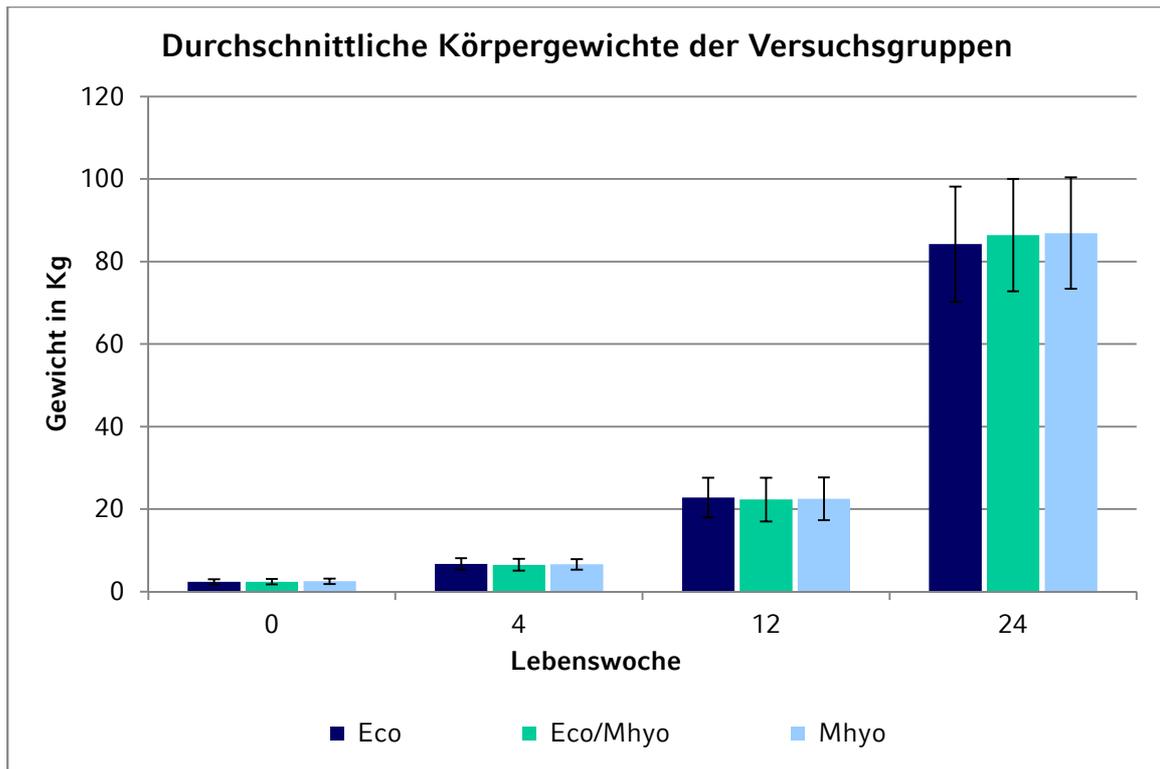
**Tabelle 6: Anteil seropositiver Tiere im Serum-Neutralisationstest**

Gruppe	vor Impfung	4. LW	8.LW
Eco	0%	85,7%	96,4%
Eco/Mhyo	0%	100%	96,9%
Mhyo	0%	0%	0%

## 2.2. Gewichtsentwicklung

Alle Studientiere wurden am Tag des Einschusses (St0), zum Absetzen in der 4. Lebenswoche sowie zur Umstallung in die Mast (12. Lebenswoche) und am Ende der Mast in der 24. Lebenswoche gewogen. Es wurden jeweils die durchschnittlichen Körpergewichte der Studientiere zu den einzelnen Wiegeterminen berechnet (Abbildung 5). Des Weiteren wurden die mittleren täglichen Zunahmen zwischen Tag 1 und 28, Tag 28 - 84, in der Mast zwischen Tag 84 - 168 sowie über den gesamten Zeitraum von Tag 0 - 168 ermittelt (Abbildung 6). Bis zum Ende der Mast konnten die Gewichte von 377 von insgesamt 405 Schweinen verfolgt werden.

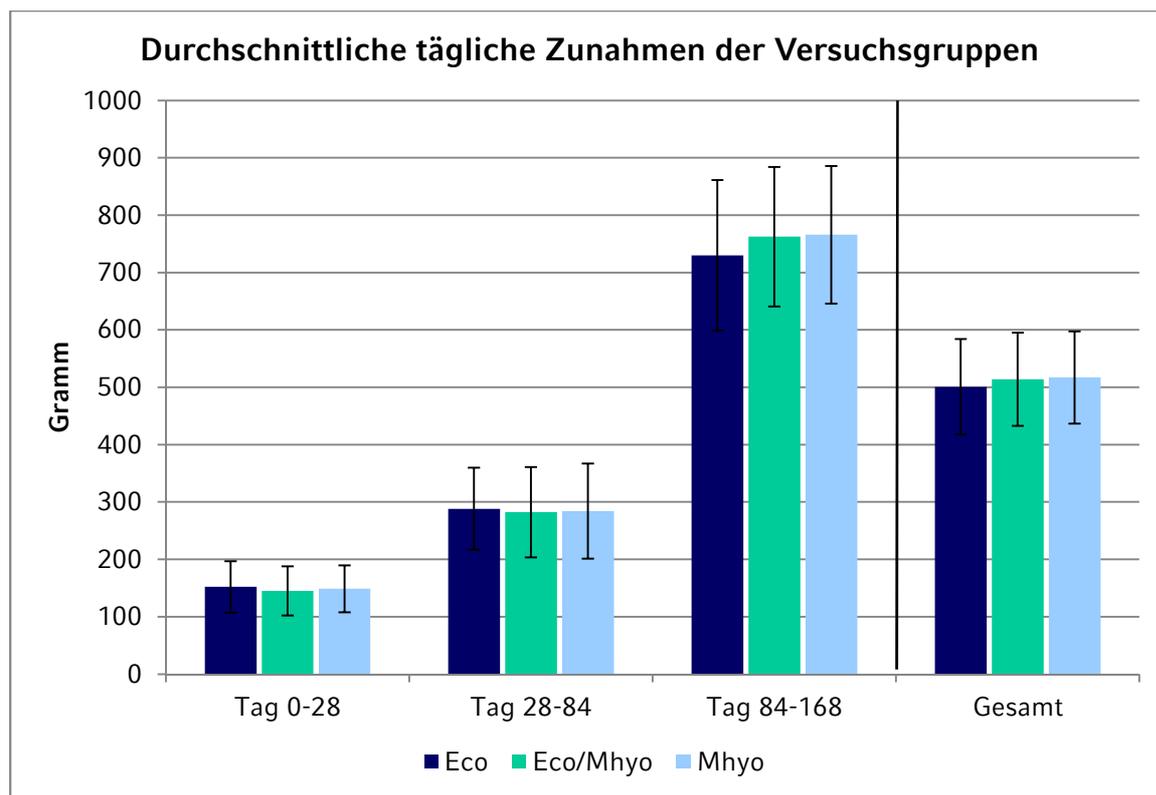
Zum Einschluss wogen die Studientiere der Gruppe Eco und der Gruppe Eco/Mhyo im Durchschnitt 2,4 kg. Tiere aus der Gruppe Mhyo wogen zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich 2,5 kg. Die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Auch zum Absetzen mit vier Lebenswochen (T4) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden. Zu diesem Zeitpunkt wogen die Tiere im Mittel zwischen 6,5 kg und 6,7 kg. Bei Einstellung in die Mast (T12) erzielten die Studientiere durchschnittliche Körpergewichte zwischen 22,3 kg und 22,8 kg (Abbildung 5), ohne sich signifikant voneinander zu unterscheiden.



**Abbildung 5: Vergleich der durchschnittlichen Körpergewichte der Studientiere**

Am Ende der Mast wogen die Tiere der Gruppe Eco durchschnittlich 84,2 kg, der Gruppe Eco/Mhyo 86,4 kg und Schweine der Gruppe Mhyo 86,9 kg ( $p > 0,05$ ).

Die Tageszunahmen der Gruppe Eco lagen im Mittel von Studientag 0 bis zur 4. Lebenswoche bei 152,0 g (Abbildung 6). Die Schweine aus der Gruppe Eco/Mhyo nahmen täglich im Mittel 144,9 g und Tiere aus der Gruppe Mhyo durchschnittlich 148,7 g pro Tag zu ( $p > 0,05$ ). Während der Aufzucht von Tag 28 bis Tag 84 nahmen die Schweine aus der Gruppe Eco 288,3 g, Tiere aus der Gruppe Eco/Mhyo 282,4 g und Tiere aus der Gruppe Mhyo 284,3 g täglich zu ( $p > 0,05$ ). Während der Mast (Tag 84-168) wurden in der Gruppe Eco durchschnittliche Tageszunahmen von 730,0 g erzielt, in der Gruppe Eco/Mhyo von 762,7 g und in der Gruppe Mhyo von 766,0 g. Hierbei unterschied sich Gruppe Mhyo mit durchschnittlich 36,0 g täglicher Mehrzunahmen signifikant von Gruppe Eco ( $p = 0,024$ ). Keine signifikanten Unterschiede konnten zwischen Gruppe Mhyo und Eco/Mhyo ermittelt werden ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 6: Vergleich der durchschnittlichen Tageszunahmen der Versuchsgruppen**

Über die gesamte Versuchsdauer von 168 Tagen nahmen die Tiere aus der Gruppe Eco täglich durchschnittlich 500,9 g zu, die Tiere aus Gruppe Eco/Mhyo 514,0 g und die Tiere aus Gruppe Mhyo 517,1 g, ohne sich jedoch signifikant zu unterscheiden ( $p > 0,05$ ) (Abbildung 6).

### 2.3. Anteil untergewichtiger Tiere

Um den Anteil an untergewichtigen Tieren während der Mastperiode darzustellen, wurde dieser bezüglich der täglichen Zunahme zwischen der 12. und 24. Lebenswoche ermittelt. Alle Studientiere nahmen in diesem Zeitraum im Mittel 693,2 g pro Tag zu. So galten Tiere mit weniger als 519,9 g täglichen Zunahmen als untergewichtige Tiere.

In der Gruppe Eco wurden 8,5 %, in der Gruppe Eco/Mhyo 3,1 % und in der Gruppe Mhyo 1,6 % der Tiere als untergewichtig eingestuft. Diese Verteilung der Häufigkeiten war signifikant ( $p = 0,017$ ). In Gruppe Eco waren verglichen zur Gruppe Mhyo signifikant mehr Tiere untergewichtig ( $p = 0,016$ ). Zwischen

der Gruppe Eco/Mhyo und der Gruppe Mhyo konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

#### 2.4. Mastdauer

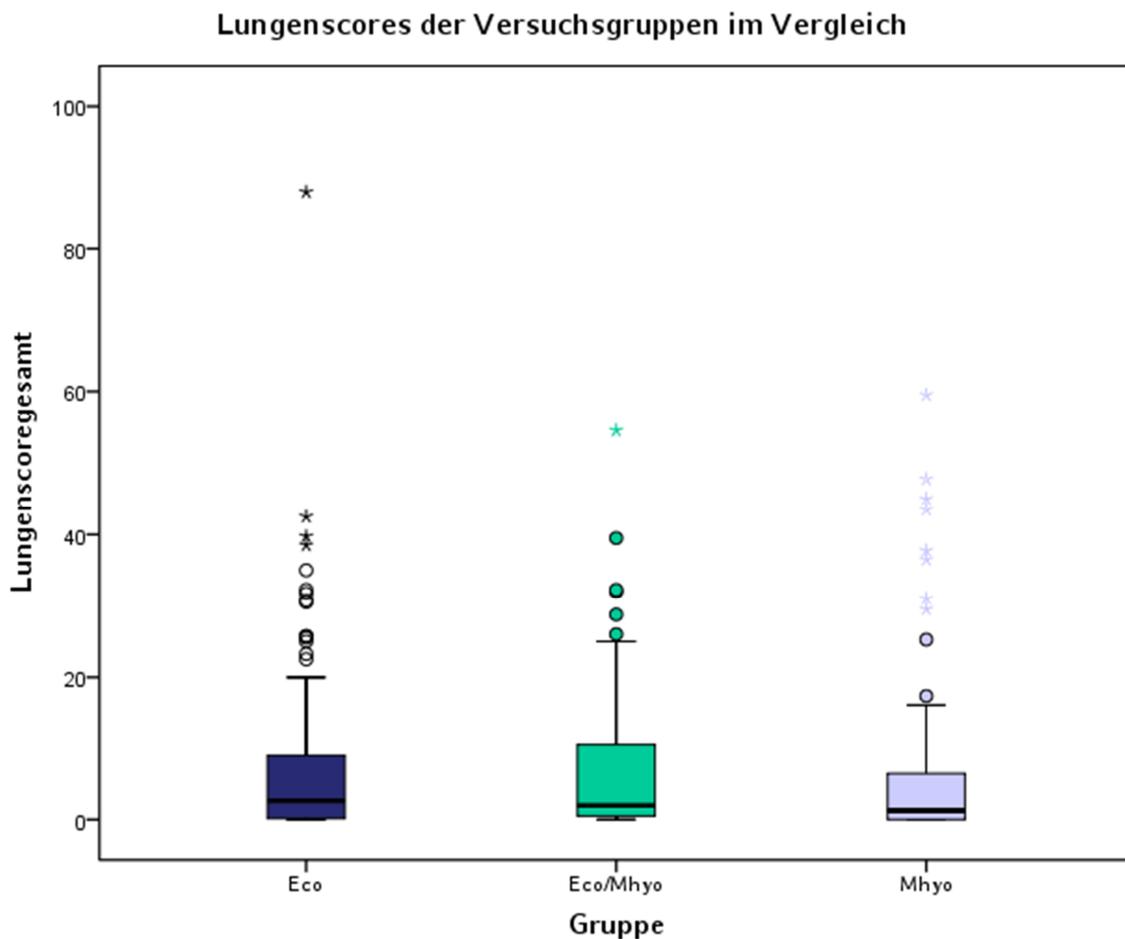
Vergleicht man die Versuchsgruppen bezüglich ihrer durchschnittlichen Mastdauer in Tagen, so lassen sich numerische Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ermitteln ( $p > 0,05$ ). Schweine aus der Gruppe Mhyo benötigten durchschnittlich 126,3 Tage, aus der Gruppe Eco/Mhyo durchschnittlich 126,6 Tage und aus der Gruppe Eco durchschnittlich 128,0 Tage bis zur Schlachtreife (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Vergleich der Mastdauer**

Gruppe	Mittlere Mastdauer in Tagen	Min (Anzahl Tage)	Max (Anzahl Tage)	SD
Eco	128,0	98	154	12,3
Eco/Mhyo	126,6	98	154	12,2
Mhyo	126,3	98	154	12,4

#### 2.5. Lungenbefunde am Schlachthof

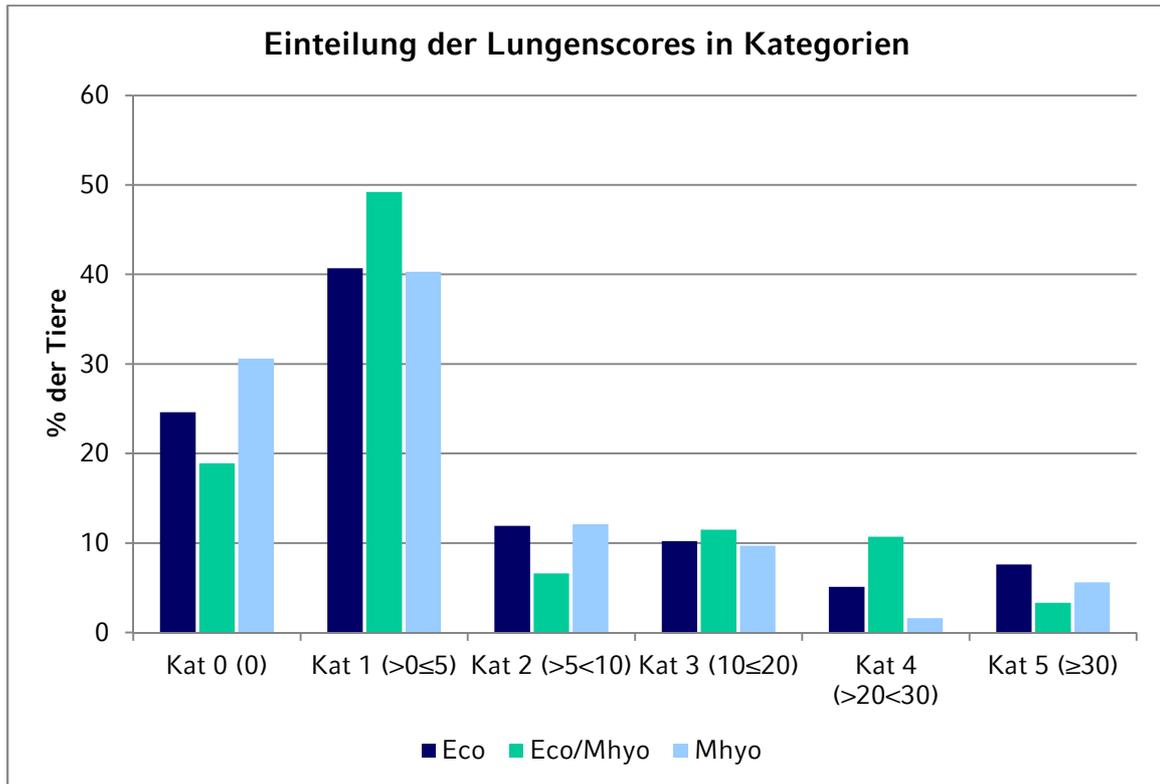
Am Schlachthof wurden 364 Lungen (Gruppe Eco:  $n = 118$ , Gruppe Eco/Mhyo:  $n = 122$ , Gruppe Mhyo:  $n = 124$ ) nach einem Score von CHRISTENSEN et al. (1999) beurteilt. Zudem fand eine Kategorisierung anhand der prozentualen Lungenveränderungen statt. Betrachtete man die Ergebnisse der mittleren Lungenscores aller Versuchstiere (Abbildung 7), so erzielten die Tiere der Gruppe Eco einen mittleren Lungenscore von 7,7 ( $SD \pm 12,6$ ), im Vergleich zu Gruppe Eco/Mhyo mit 6,8 ( $SD \pm 10,0$ ) und Gruppe Mhyo mit 5,7 ( $SD \pm 10,7$ ). Die Versuchsgruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 7: Gesamtlungenscore der Tiere der Versuchsgruppen im Vergleich**

Die mittleren Lungenscore-Werte der nur an Pneumonie erkrankten Tiere (Lungenscore > 0) waren in der Gruppe Eco 10,2 (SD ± 13,6) und in den Gruppen Eco/Mhyo sowie Mhyo 8,4 (SD ± 10,5) bzw. 8,2 (SD ± 12,1) ( $p > 0,05$ ). Nach Kategorisierung der Lungenscores (Abbildung 8) fanden sich in Kategorie 0 (Lungenscore 0) 24,6 % der Tiere aus Gruppe Eco, 18,9 % aus Gruppe Eco/Mhyo sowie 30,6 % aus Gruppe Mhyo. Zu Kategorie 1 (Lungenscore  $0 < \leq 5$ ) zählten in Gruppe Eco 40,7 %, in Gruppe Eco/Mhyo 49,2 % und in Gruppe Mhyo 40,3 % der Tiere. In Kategorie 5 (mittlere Lungenscores  $\geq 30$ ) waren 7,6 % der Tiere aus Gruppe Eco, 3,3 % aus Gruppe Eco/Mhyo und 5,6 % aus Gruppe Mhyo.

Zusätzlich zur Erhebung des Lungenscores wurde das Aufkommen von Pleuritiden beurteilt. Hierbei hatten 19,5 % der Schweine aus Gruppe Eco, 18,9 % aus Gruppe Eco/Mhyo und 26,6 % der Tiere aus Gruppe Mhyo Pleuritis. Diese Häufigkeiten unterschieden sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 8: Kategorisierung der Lungenscores im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen**

### 3. Mortalität

Insgesamt wurden 405 Tiere in die Studie eingeschlossen, von denen 32 Tiere während der Studienzeit verendeten oder aus tierschutzrechtlichen Gründen euthanasiert werden mussten. Es ergab sich eine errechnete Mortalität von 7,7 %. Aus der Gruppe Eco verendeten 17 Tiere (12,6 %), aus der Gruppe Eco/Mhyo sieben Tiere (5,2 %) und aus der Gruppe Mhyo acht Tiere (5,9 %). Diese Verteilung war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

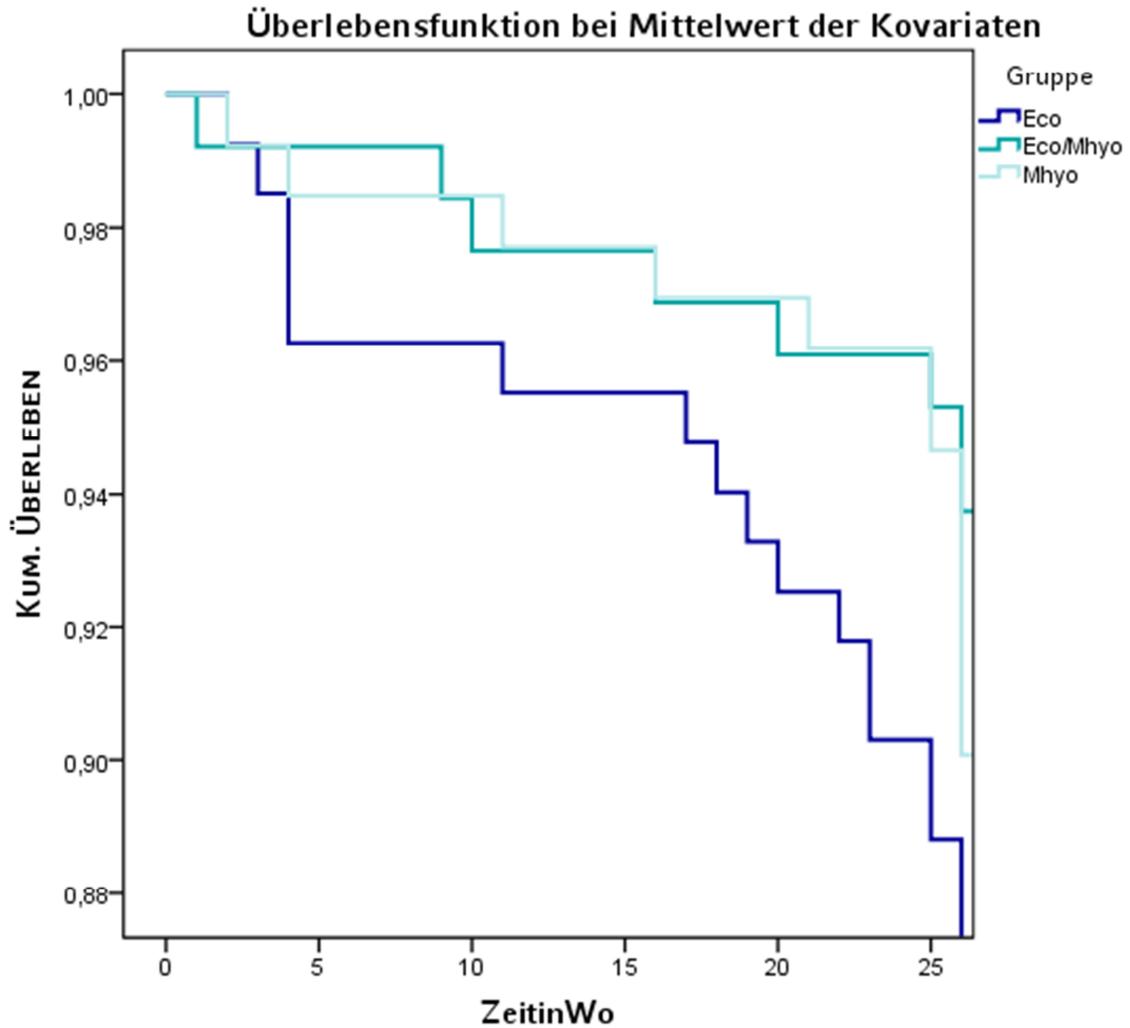
Bezogen auf die einzelnen Produktionsstufen verstarben bis zum Absetzen mit vier Lebenswochen acht Ferkel, wovon fünf Tiere (3,7 %) der Gruppe Eco

angehörten, ein Tier (0,7 %) Gruppe Eco/Mhyo und zwei Tiere (1,5 %) Gruppe Mhyo. Bis zum Umstallen in die Mast (12. Woche) verstarben weitere vier Tiere (1 %). Ein Tier aus Gruppe Eco, zwei Tiere aus Gruppe Eco/Mhyo und ein Tier aus Gruppe Mhyo. Während der Mast sind 20 (4,9 %) Tiere verendet, wovon elf Tiere der Gruppe Eco, vier Tiere der Gruppe Eco/Mhyo und fünf Tiere der Gruppe Mhyo angehörten.

Von den 32 verendeten Tieren wurden 26 Schweine pathomorphologisch und histopathologisch untersucht. Von diesen Tieren wurde bei 17 Schweinen ein pathologischer Lungenbefund erhoben. Neun dieser pathologischen Lungenbefunde konnten Tieren der Gruppe Eco zugeordnet werden. Häufige Erregerisolate aus den Lungen waren PRRSV (Genotyp 1 und 2), SIV, *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) und *Pasteurella multocida* (*P. multocida*). An den verendeten Tieren konnten zugleich mehrere pathomorphologische Befunde erhoben werden (Tabelle 8). Eine Übersicht aller verstorbenen Tiere bietet die Cox-Regression, wie in Abbildung 9 dargestellt.

**Tabelle 8: Pathomorphologische Befunde während der Studie verendeter Tiere**

Organsystem	Befund	Anzahl n
Herz-Kreislauf	Endocarditis valvularis thromboticans	4
	Herzmissbildung	2
	Perikarditis	2
Gastrointestinaltrakt	Enteritis	3
	ulzerierende Gastritis	1
	Kolonruptur	1
	Peritonitis	2
Bewegungsapparat	Arthritis	2
ZNS	Meningoenzephalitis	2
	Enzephalitis	1
Sonstiges	Nephritis	1



**Abbildung 9: Cox-Regression zum Vergleich der Mortalität unter den Versuchsgruppen**

#### **4. Behandlung respiratorischer Erkrankungen**

Insgesamt wurden während der Studie in allen drei Versuchsgruppen 27 Einzeltiere aufgrund von Atemwegserkrankungen behandelt. Im Detail betrachtet wurden in Gruppe Eco 9,6 % der Tiere ( $n = 13$ ), in Gruppe Eco/Mhyo 5,9 % ( $n = 8$ ) und in Gruppe Mhyo 4,4 % der Tiere ( $n = 6$ ) therapiert. Im Vergleich der Versuchsgruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

## 5. Molekularbiologische und histologische Untersuchungen

Von jeweils fünf Tieren pro Versuchsgruppe wurden molekularbiologische und histologische Untersuchungen anhand von Lungenproben vom Schlachthof durchgeführt. Kriterium für die Auswahl der Tiere waren deutlich sichtbare EP-ähnliche Läsionen an den Lungen. Eine Übersicht bietet Tabelle 9.

Alle untersuchten Lungenproben waren in der immunhistochemischen Untersuchung bezüglich *M. hyopneumoniae* positiv. In keiner der Lungenproben konnten mittels PCR PRRSV-, Influenza- oder PCV2-DNA/RNA detektiert werden.

**Tabelle 9: Molekularbiologische und histologische Untersuchung von Lungenproben**

	Anzahl Proben	positiv	negativ
<i>M. hyopneumoniae</i>	15	15	0
SIV	15	0	15
PRRSV	15	0	15
PCV2	15	0	15

## V. DISKUSSION

### 1. Verträglichkeit und Sicherheit der Vakzination

#### 1.1. Klinische Untersuchung

In den ersten zwei Wochen nach Applikation der/ des Impfstoffe/-s erfolgte an Studientag 0, 1, 2, 3, 7 und 14 einmal täglich eine klinische Untersuchung sowie die Begutachtung der Injektionsstelle/-n der Sampletiere. Zusätzlich wurde vor Applikation der/ des Impfstoffe/-s sowie vier bis sechs Stunden danach und an den folgenden vier Studientagen die rektale Körpertemperatur gemessen.

##### 1.1.1. Allgemeinuntersuchung

Ein Tier aus der Versuchsgruppe Eco/Mhyo zeigte an Studientag 14 ein reduziertes Verhalten. Im Laufe der 14-tägigen Überwachungsphase wiesen drei Tiere aus der Gruppe Eco, zwei Tiere aus der Gruppe Eco/Mhyo und ein Tier aus der Gruppe Mhyo einen reduzierten Ernährungszustand auf. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt zeigten die Sampletiere Husten, Niesen oder Anzeichen für Dyspnoe. Auch DAWSON et al. (2002) konnten nach Applikation eines One-Shot-*M. hyopneumoniae*-Impfstoffes keinerlei relevante klinische Nebenwirkungen beobachten. Die in den Packungsbeilagen von Stellamune<sup>®</sup> One und ECOPORC SHIGA<sup>®</sup> beschriebenen Nebenwirkungen, wie etwa zeitweises Auftreten klinischer Verhaltensauffälligkeiten der Tiere nach Applikation des Impfstoffes (ECOPORC SHIGA<sup>®</sup>) oder in sehr seltenen Fällen Überempfindlichkeitsreaktionen, einschließlich Schock oder Todesfälle (Stellamune<sup>®</sup> One) (VETIDATA, 2011, 2014), konnten in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden. WILSON et al. (2012) zeigten, dass in einer in der ersten Lebenswoche gegen *M. hyopneumoniae*-geimpften Gruppe während des 14-tägigen Untersuchungszeitraumes nach der Verabreichung der Vakzine 26,3 % der Tiere in ihrem Verhalten reduziert waren, wohingegen es in der nicht geimpften Kontrollgruppe nur 14,7 % waren. In einer Studie von DREXLER et al. (2010) wiesen nur wenige Tiere (2 / 12 Tieren) nach Applikation einer Kombinationsimpfung gegen *M. hyopneumoniae* und PRRSV in der 4. Lebenswoche vorübergehende systemische Reaktionen auf. Nebenwirkungen in

Form von Erbrechen, angestrenzter Atmung, Ataxie sowie Seitenlage von Tieren wurden von MAES et al. (1999b) kurz nach Applikation einer *M. hyopneumoniae*-Vakzine bei einigen Tieren beobachtet. KRISTENSEN et al. (2014) und KYRIAKIS et al. (2001) stellten hingegen keine klinischen Auffälligkeiten nach Applikation von *M. hyopneumoniae*-Vakzinen fest. Nach einer Impfung gegen das Stx2e-Toxin mittels ECOPORC SHIGA<sup>®</sup> wurden laut LÜDER et al. (2012) keine nennenswerten Unterschiede bezüglich des Gesundheitsstatus, der lokalen Reaktionen nach der Vakzination, der histopathologischen Besonderheiten oder der Körperinnentemperatur zwischen geimpften Tieren und nicht geimpften Kontrolltieren beobachtet. Anhand von Ergebnissen aus Feldstudien und experimentellen Laborstudien wurden kalkulatorisch bei einmalig an Lebenstag vier geimpften Tieren bis zu 1 % Abweichungen von der Norm festgestellt (LÜDER et al., 2012). STRICKER et al. (2013) untersuchten die Verträglichkeit einer zeitgleich applizierten PRRSV- (Genotyp 1)-Vakzine und einer *M. hyopneumoniae*-Vakzine an 1000 Studientieren und stellten keine klinisch relevanten lokalen oder systemischen Reaktionen aufgrund der Vakzination fest. Übereinstimmend wurden in der vorliegenden Studie weder bei Tieren aus den alleinig geimpften Gruppen noch der kombiniert geimpften Gruppe systemische Nebenwirkungen beobachtet.

### 1.1.2. Lokale Reaktion an der Injektionsstelle

Laut Packungsbeilage der beiden Impfstoffe können post injectionem vorübergehend Gewebereaktionen in Form von Schwellungen mit einem Durchmesser bis 2,5 cm (Stellamune<sup>®</sup> One) bzw. in Form von kleinen lokalen Reaktionen bis maximal 0,5 cm (ECOPORC SHIGA<sup>®</sup>) auftreten, welche jedoch nach wenigen Tagen abgeklungen sein sollen (VETIDATA, 2011, 2014). Während des 14-tägigen Untersuchungszeitraumes wurde bei einem Studientier aus der Gruppe Eco/Mhyo an der linken Injektionsstelle (Stellamune<sup>®</sup> One) ein Erythem von 0,5 - 1 cm Durchmesser festgestellt. Dieses trat an Studientag 1, ein Tag nach der Vakzinierung auf und war am darauffolgenden Tag bereits nicht mehr sichtbar. Bei allen weiteren untersuchten Sampletieren konnten keine unphysiologischen Veränderungen an den Injektionsstellen festgestellt werden. Auch STRICKER et al. (2013) stellten nach gleichzeitiger Impfung von Schweinen mittels einer *M. hyopneumoniae*-Vakzine und einer PRRSV (Genotyp

1)-Vakzine keine relevanten Auffälligkeiten hinsichtlich lokaler Reaktionen fest. ELICKER (2006) untersuchte die Gewebeerträglichkeit mehrerer *M. hyopneumoniae*-Vakzinen und beobachtete, dass vier Stunden post vaccinationem an der Injektionsstelle eine geringgradig bis mittelgradig derbe Konsistenz und erhöhte Hauttemperatur sowie eine teils geringgradige Hautrötung auftreten konnte. Die Vakzinen induzierten meist geringgradige Veränderungen an den Injektionsstellen und neben der jeweiligen Impfstoffzusammensetzung war ebenfalls das verabreichte Injektionsvolumen für die pathomorphologischen Unterschiede verantwortlich (ELICKER und SIPOS, 2009). In der vorliegenden Studie schien das verabreichte Volumen und die Zusammensetzung der Impfstoffe sowie die gleichzeitige Applikation beider Vakzinen zu keinen klinischen Auffälligkeiten geführt zu haben, so dass bis auf ein Tier aus der Gruppe Eco/Mhyo alle Sampletiere nach Untersuchung der Injektionsstellen einen Score von Null erhielten.

### 1.1.3. Rektale Körperinnentemperatur

Die Packungsbeilage des *M. hyopneumoniae*-Impfstoffes (Stellamune<sup>®</sup> One) beschreibt mögliche Temperaturerhöhungen von bis zu 1,9 °C bis vier Tage nach der Impfung (VETIDATA, 2011). Ebenso wird in der Packungsbeilage des ECOPORC SHIGA<sup>®</sup>-Impfstoffes auf eine mögliche Temperaturerhöhung um bis zu 1,7 °C über maximal zwei Tage hingewiesen (VETIDATA, 2014). Der Vergleich der mittleren rektalen Körperinnentemperaturen ergab an Studientag 0 prae vaccinationem keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Vier bis sechs Stunden post vaccinationem wurde bei den Sampletieren der Gruppe Eco/Mhyo eine durchschnittliche Körperinnentemperatur von 40,3 °C, in Gruppe Mhyo von 40,1 °C und in Gruppe Eco von 39,7 °C gemessen. Die mittlere innere Körpertemperatur der Gruppe Eco/Mhyo sowie die der Gruppe Mhyo war signifikant höher als die der Gruppe Eco ( $p_{\text{Eco/Mhyo}} < 0,001$ ,  $p_{\text{Mhyo}} = 0,006$ ). Hierbei hatten 20 Tiere aus der Gruppe Eco/Mhyo und 15 Tiere aus der Gruppe Mhyo eine erhöhte Körperinnentemperatur ( $> 40,1$  °C). Im Vergleich wurde bei nur zwei Tieren aus Gruppe Eco eine erhöhte innere Körpertemperatur gemessen. Vergleicht man die am Studientag 0, vier bis sechs Stunden nach Vakzination ermittelten mittleren Körperinnentemperaturen der Versuchsgruppen mit dem

physiologischen Bereich eines Saugferkels, der nach HEINRITZI et al. (2006) bei 38,9 °- 40,1 °C liegt, so wich nur Gruppe Eco/Mhyo im Mittel um 0,2 °C von der Norm ab, wohingegen die anderen beiden Versuchsgruppen im physiologischen Bereich lagen. Die maximal von Ferkeln erzielten Körperinnentemperaturen waren zu diesem Zeitpunkt in Gruppe Eco/Mhyo 41,9 °C, in Gruppe Mhyo 41,3 °C und in Gruppe Eco 40,4 °C. Somit lagen die maximal erreichten Körperinnentemperaturen der Tiere in dem von der Packungsbeilage beschriebenen möglichen Bereich. Einen Tag nach der Impfung konnte in allen Versuchsgruppen im Mittel eine physiologische Körperinnentemperatur von 39,5 °C gemessen werden. Nur bei einem Tier aus der Gruppe Mhyo wurde zu diesem Zeitpunkt noch Fieber (40,6 °C) festgestellt. Auch im weiteren Verlauf bis Studientag 4 wichen die gemessenen durchschnittlichen rektalen Körperinnentemperaturen nicht mehr vom physiologischen Bereich eines Saugferkels (38,9°- 40,1 °C) (HEINRITZI et al., 2006) ab.

Bezüglich der *M. hyopneumoniae*-Vakzine konnten in Studien von DAWSON et al. (2002) und WILSON et al. (2012) keine Unterschiede zwischen *M. hyopneumoniae*-geimpften Tieren und Tieren aus der ungeimpften Kontrollgruppe ermittelt werden. Ebenso wurden bei Saugferkeln nach einer doppelt dosierten Gabe von ECOPORC SHIGA<sup>®</sup>-Impfstoff am 4. Lebenstag keine nennenswerten Auffälligkeiten und Unterschiede bezüglich der rektalen Körperinnentemperatur verglichen mit der ungeimpften Kontrollgruppe beobachtet (LÜDER et al., 2012).

Übereinstimmend wurden in den vier auf die Impfung folgenden Tagen keine Abweichungen der physiologischen Körperinnentemperaturen der Tiere gemessen. Lediglich vier bis sechs Stunden nach Vakzination stiegen im Mittel die Körperinnentemperaturen der gegen *M. hyopneumoniae*-geimpften Versuchstiere an. Diese Temperaturerhöhung entspricht jedoch den Abweichungen, die in der Packungsbeilage als mögliche Begleiterscheinung der Impfung aufgeführt werden.

Somit kann anhand dieser Ergebnisse (IV.1) davon ausgegangen werden, dass die zeitgleiche Verabreichung der Impfstoffe, verglichen mit der einzeln

applizierten *M. hyopneumoniae*-Vakzine, als verträglich und sicher zu bewerten ist.

## 2. Serologie

### 2.1. *Mycoplasma hyopneumoniae* Antikörperverlauf

BANDRICK et al. (2008) zeigten, dass neugeborene Ferkel vor Kolostrumaufnahme naiv bezüglich *M. hyopneumoniae* sind. Nach der Aufnahme von Kolostrum von Sauen, die Kontakt mit *M. hyopneumoniae*-Antigen hatten, können spezifische Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* von den Ferkeln binnen 6 h via Kolostrum aufgenommen werden (BANDRICK et al., 2011). Vor Studienbeginn wurde im Versuchsbetrieb *M. hyopneumoniae* nachgewiesen, so dass bei den ermittelten hohen mittleren Antikörpertitern an Studientag 0 (4. - 7. Lebenstag) von maternalen Antikörpern auszugehen ist. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits in der Gruppe Eco 46,7 %, in der Gruppe Eco/Mhyo 50,0 % und in der Gruppe Mhyo 54,5 % der Tiere seropositiv. In einer Untersuchung von MORRIS et al. (1994) wurde eine mittlere Halbwertszeit der Antikörper von 15,8 Tagen festgestellt, wobei deren Persistenz von der anfänglich erreichten Antikörperkonzentration im Ferkel bzw. im Serum der Muttertiere (WALLGREN et al., 1998) abhing. WALLGREN et al. (1998) wiesen noch nach 6,5 Wochen maternale Antikörper in Ferkeln nach. Eine weitere Erklärung für den hohen Anteil an seropositiven Tieren in den ersten Lebenswochen wäre, dass sich Ferkel bereits sehr früh während der Säugeperiode von der Muttersau über direkten Kontakt infiziert haben, da der Erreger nasal von der Sau auf ihren Nachwuchs übertragen werden kann (CALSAMIGLIA und PIJOAN, 2000). Jedoch benötigen Tiere nach natürlicher Infektion drei bis fünf Wochen, um spezifische Antikörper aufzubauen (SØRENSEN et al., 1993). Zudem konnten NATHUES et al. (2010) nur eine geringe Prävalenz von 2,0 % an Saugferkelinfektionen in Deutschland feststellen. Im Verlauf der ersten vier Lebenswochen nahmen die mittleren Antikörpertiter der Studientiere ab. Dieses Absinken der Antikörpertiter wurde ebenfalls von LILLIE (2004), STRAUSS (2007), WILSON et al. (2012) und HERBICH et al. (2013) im Blut von Ferkeln von seropositiven Sauen beobachtet. In der vorliegenden Studie ließen sich bis zur 4. Lebenswoche keine

signifikanten Unterschiede der mittleren Antikörperhöhe zwischen den Versuchsgruppen erkennen. Prozentual waren zu diesem Zeitpunkt in Gruppe Eco 13,3 % der Tiere, in Gruppe Eco/Mhyo 12,5 % sowie 18,2 % in Gruppe Mhyo seropositiv. In der 8. Lebenswoche hatten in der Gruppe Mhyo bereits 24,2 % der Tiere und in der Gruppe Eco/Mhyo bereits 18,8 % der Tiere serokonvertiert. Indessen wies aus der Gruppe Eco keines der Tiere Titer über dem Cut-off von 0,4 auf. Aufgrund der ab der 4. Lebenswoche stetig ansteigenden mittleren Antikörpertiter sowie der Zunahme des Anteils seropositiver Tiere der *M. hyopneumoniae*-geimpften Gruppen kann von einer Infektion ab der 4. Lebenswoche ausgegangen werden. Im Gegensatz zu den sinkenden Antikörpertitern der Gruppe Eco zwischen der 4. und 8. Lebenswoche, stiegen die Antikörpertiter der gegen *M. hyopneumoniae*-geimpften Gruppen an, was durch die vorausgegangene Impfung und einen erneuten Antigenkontakt bei Feldinfektion zu erklären ist. Aufgrund der Feldinfektion wurden die durch die Vakzination gebildeten T- und B-Gedächtniszellen erneut stimuliert (AHMED und GRAY, 1996). In der 8. Lebenswoche hatten im Vergleich zur Gruppe Eco (n = 0) signifikant mehr Sampletiere in den Gruppen Mhyo (n = 8) und Eco/Mhyo (n = 6) serokonvertiert. Zudem war im Mittel die Antikörperhöhe der gegen *M. hyopneumoniae*-geimpften Gruppen ( $P/PK_{Mhyo} = 0,28 \pm 0,32$ ;  $P/PK_{Eco/Mhyo} = 0,21 \pm 0,34$ ) signifikant höher als die der Gruppe Eco ( $P/PK = 0,02 \pm 0,07$ ). Somit zeigten die gegen *M. hyopneumoniae*-geimpften Gruppen einen Boostereffekt (MURPHY et al., 2009a). Dieser Anstieg der Serumantikörper aufgrund einer *M. hyopneumoniae*-Impfung und *M. hyopneumoniae*-Infektion konnte auch in anderen Studien beobachtet werden (THACKER et al., 2000b; SIUGZDAITE et al., 2003; METTLER, 2009). Nach natürlich stattgefundenener *M. hyopneumoniae*-Infektion findet eine Serokonversion drei bis fünf Wochen später statt (SØRENSEN et al., 1993). Auch OKADA et al. (2005) detektierten bei ungeimpften Tieren spezifische Antikörper drei bis vier Wochen nach experimenteller Infektion über einen Zeitraum von 15 Wochen. Zwischen der 8. und 12. Lebenswoche stiegen übereinstimmend auch die mittleren Antikörpertiter der Gruppe Eco an, was zeigt, dass auch die nicht gegen *M. hyopneumoniae*-geimpften Tiere nach erfolgter Feldinfektion mit dem Antigen spezifische Antikörper gebildet hatten. Allerdings erfolgte dieser Anstieg der mittleren Antikörpertiter im Vergleich zu

den geimpften Gruppen Mhyo und Eco/Mhyo, vergleichbar mit den Untersuchungen von WILSON et al. (2012) und SIBILA et al. (2007), um circa drei Wochen später. Aufgrund dessen, dass alle Versuchstiere gemischt aufgestellt waren, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Infektion unter allen Versuchsgruppen zum gleichen Zeitpunkt stattfand.

Gegen *M. hyopneumoniae*-geimpfte Tiere hatten im Mittel in der 12. Lebenswoche Antikörpertiter von 0,56 - 0,62, sodass sie im Gegensatz zu der *M. hyopneumoniae*-ungeimpften Gruppe Eco den Cut-off-Wert von 0,4 bereits überschritten. Zu diesem Zeitpunkt hatten in der Gruppe Eco lediglich 13,3 % der Tiere serokonvertiert, wohingegen in der Gruppe Mhyo und der Gruppe Eco/Mhyo bereits 42,4 % bzw. 37,5 % der Tiere im ELISA als seropositiv galten. Der Unterschied bezüglich des prozentualen Anteils seropositiver Tiere war zwischen der alleinig geimpften Gruppe Mhyo und der Gruppe Eco signifikant höher. Die Höhe der Antikörperspiegel hingegen war in beiden Versuchsgruppen mit *M. hyopneumoniae*-Impfung signifikant höher als in der ungeimpften Gruppe Eco. Durch eine um circa drei Wochen früher einsetzende Serokonversion in den Gruppen Mhyo und Eco/Mhyo im Gegensatz zu der Gruppe Eco waren die gegen *M. hyopneumoniae*-geimpften Tiere im Flatdeck und während der Mastphase besser gegen die Auswirkungen der *M. hyopneumoniae*-Infektion geschützt. Dies könnte die höheren Tageszunahmen und Körpergewichte der geimpften Schweine erklären. Die *M. hyopneumoniae*-ungeimpften Tiere aus Gruppe Eco konnten nicht früh genug einen ausreichenden Schutz aufbauen und waren somit den anderen Versuchsgruppen unterlegen. Dieser zeitliche Vorsprung der gegen *M. hyopneumoniae*-geimpften Versuchsgruppen verschaffte dem Immunsystem der Tiere den Vorteil, sich rechtzeitig mit der Mykoplasmen-Infektion auseinanderzusetzen, so dass geimpfte Tiere folglich in der sensiblen Phase der Infektion, ab Beginn der Mast (LEON et al., 2001), besser geschützt waren.

Wird zeitgleich zur *M. hyopneumoniae*-Vakzine ein weiterer Impfstoff eingesetzt, so zeigten THACKER et al. (2000a), dass eine PRRSV-Vakzination keinen Einfluss auf die *M. hyopneumoniae*-spezifische Antikörperbildung, gemessen in der BAL von Schweinen, nimmt. STRICKER et al. (2013) untersuchten ebenfalls die Applikation einer PRRSV-(Genotyp 1)-Vakzine (3.

Lebenswoche) sowie einer *M. hyopneumoniae*-Vakzine (1. und 3. Lebenswoche) als Mischspritze oder nach zeitgleicher Verabreichung an unterschiedlichen Injektionsstellen. In Bezug auf die Entwicklung spezifischer Antikörper gegen *M. hyopneumoniae* war in den *M. hyopneumoniae*-geimpften Gruppen die Anzahl serologisch positiver Schweine signifikant höher als in den ungeimpften Gruppen (STRICKER et al., 2013). Ebenso wirksam erwies sich die gleichzeitige Impfung gegen *M. hyopneumoniae* und PCV2 (HERBICH et al., 2013). Verglichen mit der alleinigen Gabe eines der Impfstoffe wurde nach zeitgleicher Administration beider Impfstoffe (simultan oder parallel) die Ausbildung einer impfstoffinduzierten humoralen Immunantwort nicht negativ beeinflusst (HERBICH et al., 2013). Übereinstimmend stellte MEISTERMANN (2006) beim Vergleich eines Kombinationsimpfstoffes gegen *H. parasuis* und *M. hyopneumoniae* mit einem monovalenten Impfstoffes gegen *M. hyopneumoniae* bei Schweinen fest, dass die *M. hyopneumoniae*-Komponente im Kombinationsimpfstoff bezüglich des serologischen Verlaufes der Antikörperbildung und der Immunitätsausbildung vergleichbar mit der des Monoimpfstoffes gegen *M. hyopneumoniae* war.

Somit kann abschließend festgehalten werden, dass die zeitgleiche Verabreichung einer *M. hyopneumoniae*-Vakzine in Kombination mit einer Vakzine gegen das Stx2e-Toxin von *E. coli* die Bildung *M. hyopneumoniae*-spezifischer Antikörper nicht negativ beeinflusst.

## 2.2. Neutralisierende Antikörper gegen Stx2e

Die an Studientag 0, prae vaccinationem, bei den Sampletieren ermittelte Abwesenheit neutralisierender Antikörper gegen das Stx2e-Toxin von EDEC bestätigte, dass bis zu diesem Zeitpunkt kein Versuchstier Kontakt mit dem Erreger hatte. Bereits in einem Präscreening im Betrieb wurden weder Stx2e-Toxin noch EDEC spezifische Virulenzfaktoren nachgewiesen. Um einen möglichen Einfluss der ECOPORC SHIGA<sup>®</sup>-Impfung auf die Leistungsdaten der Schweine auszuschließen, wurde gezielt ein Betrieb ohne Hinweise auf Ödemkrankheit ausgewählt. Vier Wochen nach Vakzination zeigte sich eine Zunahme seropositiver Tiere in den mit ECOPORC SHIGA<sup>®</sup> geimpften Gruppen (Gruppe Eco und Gruppe Eco/Mhyo), wohingegen in der gegen Stx2e-

ungeimpften Gruppe Mhyo keines der Tiere serokonvertierte. So hatten zum Absetzzeitpunkt, der kritischen Phase der Ödemkrankheit (WENDT et al., 2013), 85,7 % der Tiere aus der Gruppe Eco und 100 % der Tiere aus der Gruppe Eco/Mhyo neutralisierende Antikörper gegen das Stx2e-Toxin gebildet. Das Vorhandensein dieser spezifischen Antikörper kann auf die Impfung mit dem ECOPORC SHIGA<sup>®</sup>-Impfstoff zurückgeführt werden (LÜDER et al., 2012). In vorausgegangenen Untersuchungen von LÜDER et al. (2012) wurde bereits ein direkter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein neutralisierender Antikörper gegen Stx2e nach Impfung mit ECOPORC SHIGA<sup>®</sup> und dem Schutz gegen die Ödemkrankheit nachgewiesen. In der 8. Lebenswoche wiesen in der Gruppe Eco 96,4 % und in der Gruppe Eco/Mhyo 96,9 % der Tiere neutralisierende Antikörper auf, so dass nahezu alle Sampletiere bis auf jeweils ein Tier aus den gegen Stx2e geimpften Versuchsgruppen (Gruppe Eco und Gruppe Eco/Mhyo) einen wirksamen Schutz gegen die Ödemkrankheit aufwiesen. Anhand dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, dass die *M. hyopneumoniae*-Impfkomponente keinerlei negative Auswirkungen auf die Ausbildung neutralisierender Antikörper unter den Versuchstieren hatte. Zudem wurden zwischen der Gruppe Eco und der Gruppe Eco/Mhyo keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

### 3. Gewichtsentwicklung

Die Gewichte von 377 von insgesamt 405 eingestellten Schweinen konnten bis zum Ende der Mast verfolgt werden. Die Wiegetermine wurden entsprechend ihrer Lebensphasen Säugeperiode, Aufzuchtphase sowie Mast eingeteilt. Die Gewichtsdaten aller Tiere wurden zum Studieneinschluss (4. bis 7. Lebenstag), sowie zum Absetzen in der 4. Lebenswoche, zur Einstellung in die Mast mit zwölf Lebenswochen und am Ende der Mast mit 24 Lebenswochen erhoben. Damit das Geschlecht der Tiere und deren Fütterung bei der Beurteilung der Gewichtsparameter keinen Einfluss auf das durchschnittliche Gruppengewicht nahmen, wurden alle Tiere zu Beginn der Studie nach Geschlecht und Gewicht randomisiert und alle Schweine erhielten in ihrer Aufzucht bis zum Mastende jeweils das gleiche Futter und wurden in Gruppen gemischt aufgestellt.

Die Gewichtsentwicklung der Schweine aller Versuchsgruppen war bis zum Beginn der Mastphase mit zwölf Wochen ähnlich und unterschied sich sowohl bezüglich der ermittelten Körpergewichte als auch der täglichen Zunahmen nicht signifikant. Auch METTLER (2009), DEL POZO SACRISTAN et al. (2014) und KRISTENSEN et al. (2014) stellten während der Aufzucht keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Gewichtszunahme von geimpften Ferkeln verglichen zu ungeimpften Ferkeln fest. Jedoch zeigten RAUTIAINEN et al. (2000), dass Infektionen mit *M. hyopneumoniae* früh in der Aufzucht, maßgeblich verschärft durch Sekundärinfektionen und schlechte Umweltbedingungen, aber auch unkomplizierte Infektionen mit *M. hyopneumoniae* die täglichen Zunahmen der Schweine reduzieren können. Anhand des *M. hyopneumoniae*-spezifischen Antikörperverlaufs kann bei den Studientieren von einer früh in der Aufzucht stattgefundenen Infektion ausgegangen werden. Die Schweine aus der Gruppe Mhyo nahmen während der Mastperiode mit 766 g / Tag im Mittel 36 g signifikant mehr zu, als die Tiere aus der Kontrollgruppe (Gruppe Eco). Die Gruppe Eco/Mhyo konnte um 32,7 g höhere mittlere Tageszunahmen im Vergleich zur Gruppe Eco erzielen. Anhand einer Metaanalyse über Impfstoffstudien in den 1990er Jahren zeigten JENSEN et al. (2002), dass geimpfte Schweine um 21 g höhere Tageszunahmen hatten als ungeimpfte Schweine. Ähnliche Ergebnisse konnten DAWSON et al. (2002) in deutschen Betrieben erzielen, wonach vakzinierte Tiere im Mittel 23 g mehr pro Tag an Gewicht zunahmen als die ungeimpfte Kontrollgruppe. In einer Studie von MAES et al. (2003) wurde in 14 Schweineherden in Belgien bei gegen *M. hyopneumoniae*-geimpften Schweinen eine durchschnittliche tägliche Mehrzunahme von 22 g/ Tag erzielt. CHARLIER et al. (1993), LE GRAND und KOBISCH (1996) sowie MAES et al. (1999b) beobachteten, dass gegen *M. hyopneumoniae*-geimpfte Schweine bis zu fünf Tage früher als ungeimpfte Tiere ein Gewicht von 100 kg erreichten. Übereinstimmend führte die Mehrzunahme der *M. hyopneumoniae*-geimpften Studientiere zu einer verkürzten Mastdauer. Die Gruppen Mhyo und Eco/Mhyo wurden im Durchschnitt 126,3 bzw. 126,6 Tage, hingegen Tiere aus der Gruppe Eco im Mittel 128,0 Tage gemästet.

Beim letzten Wiegetermin in der 24. Lebenswoche konnten Tiere aus den Versuchsgruppen mit *M. hyopneumoniae*-Impfung (Gruppe Eco/Mhyo und Gruppe Mhyo) um 2,2 kg bzw. 2,7 kg höhere mittlere Körpergewichte erzielen als Tiere ohne *M. hyopneumoniae*-Impfung. In Studien von SIUGZDAITE et al. (2003) und TZIVARA et al. (2007) erreichten vakzinierte Tiere im Vergleich zu ungeimpften Tieren ein um 4 kg bis 6 kg höheres Endmastgewicht. SARRADELL et al. (2003) erklären dies einerseits durch die Ansammlung von Schleim und entzündlichen Exsudaten in den Atemwegen und andererseits durch eine Zunahme von lymphatischem Gewebe und durch Bronchokonstriktion, welche zu einer Verengung des Lumens der Bronchiolen führt. Hieraus resultiert eine Atelektase der Alveoli (SARRADELL et al., 2003). Eine womöglich entstehende Hypoxie aufgrund des reduzierten Sauerstoffaustausches in der Lunge würde im Folgenden zu einem verminderten Stoffwechsel im Tier führen, wovon auch der Muskelaufbau betroffen sein könnte. Laut HOPPELER und DESPLANCHES (1992) sowie HOPPELER et al. (1990) führt eine länger andauernde Hypoxie beim Menschen zu einer Abnahme von Körper- sowie Muskelmasse.

Anhand mehrerer Feldstudien, in denen die Wirksamkeit von *M. hyopneumoniae*-Vakzinen untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass eine Vakzination gegen *M. hyopneumoniae* einen positiven Effekt auf die Mastleistung geimpfter Schweine im Vergleich zu ungeimpften Kontrolltieren hatte (SIUGZDAITE et al., 2003; LILLIE, 2004; TZIVARA et al., 2007; METTLER, 2009; WILSON et al., 2012). Im Gegensatz dazu belegten andere Studien, dass durch eine alleinige Vakzination keine signifikante Verbesserung der Mastleistung erzielt werden konnte (POMMIER et al., 2000; BACCARO et al., 2006; KRISTENSEN et al., 2014). Aus diesen widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der Mastleistungssteigerung lässt sich schließen, dass neben einer Vakzination gegen *M. hyopneumoniae* auch andere Faktoren wie Management, Stallklima, Impf- und Infektionszeitpunkt, Infektionsdruck oder das Vorhandensein anderer pathogener Erreger im Bestand eine tragende Rolle spielen.

In der vorliegenden Studie wurde zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe Mhyo und der Gruppe Eco/Mhyo festgestellt. Sowohl hinsichtlich der durchschnittlichen täglichen Zunahmen als auch

bezüglich ihrer ermittelten mittleren Körpergewichte waren die Werte beider Gruppen stets vergleichbar, so dass nur geringe numerische Differenzen ermittelt werden konnten. Eine noch zu geringe Versuchstieranzahl und eine hohe Standardabweichung kann dazu geführt haben, dass bezüglich des durchschnittlichen Körpergewichts zum Mastende kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe Mhyo und Eco festgestellt werden konnten. Zudem kann ein Grund hierfür sein, dass im Stall geimpfte und ungeimpfte Tiere zusammengestellt waren, so dass im Vergleich zu üblichen Produktionsmethoden, bei denen alle Tiere des Bestandes geimpft werden, von einem erhöhten Infektionsdruck ausgegangen werden kann (DAWSON et al., 2002). Bei Schließung der Impfdecke sollte mit besseren Erfolgen bezüglich der Mastleistung gerechnet werden können.

#### 4. Anteil an untergewichtigen Tieren

Als untergewichtig wurden Tiere definiert, die eine um 25 % geringere Tageszunahme hatten als der Durchschnitt aller Studientiere (KIXMÖLLER et al., 2008). Vergleicht man den Anteil untergewichtiger Tiere in den Versuchsgruppen zwischen der 12. und der 24. Lebenswoche, so lag in der Gruppe Eco der Anteil untergewichtiger Tiere bei 8,5 % im Gegensatz zu 3,1 % in der Gruppe Eco/Mhyo und 1,6 % in der Gruppe Mhyo. In diesem für Ödemkrankheit-unverdächtigen Betrieb könnte hierfür die fehlende *M. hyopneumoniae*-Impfung in der Gruppe Eco ein Grund sein. In mehreren Studien wurde bereits der positive Einfluss der *M. hyopneumoniae*-Vakzination auf die täglichen Zunahmen von Schweinen belegt (DAWSON et al., 2002; JENSEN et al., 2002; MAES et al., 2003). RAUTIAINEN et al. (2000) zeigten, dass durch Sekundärinfektionen und schlechte Umweltbedingungen verkomplizierte *M. hyopneumoniae*-Infektionen zu reduzierten Futteraufnahmen betroffener Tiere führen. Anhand des Verlaufes der *M. hyopneumoniae*-spezifischen Antikörper kann in der vorliegenden Studie von einer um die 4. Lebenswoche stattgefundenen Infektion ausgegangen werden. Gegen *M. hyopneumoniae*-geimpfte Tiere hatten im Zeitraum von der 12. bis 24. Lebenswoche höhere Tageszunahmen ( $ADWG_{Mhyo} = 766 \text{ g}$ ;

ADWG<sub>Eco/Mhyo</sub> = 762,7 g) als *M. hyopneumoniae*-ungeimpfte Tiere (ADWG<sub>Eco</sub> = 730 g). Nach THACKER und MINION (2012) wirkt sich die reduzierte Futterraufnahme negativ auf das gleichmäßige Wachstum der Tiere aus. MAES et al. (1999b) zeigten, dass die Futtermittelverwertung bei ungeimpften Tieren sinkt. Um 1 kg Körpergewicht zuzunehmen benötigten ungeimpfte Schweine 2,90 kg Futter im Gegensatz zu geimpften Schweinen, die für die gleiche Gewichtszunahme 2,83 kg Futter verbrauchten (MAES et al., 1999b). Eine zusätzliche Mehrbelastung, verursacht durch eine verschärfte *M. hyopneumoniae*-Infektion, mag dazu geführt haben, dass die Studientiere aufgrund dessen weniger Futter zu sich nahmen und folglich an Gewicht verloren. Anhand eines Tiermodells mit Ratten konnten MCCARTHY et al. (1985) zeigen, dass nach Injektion von IL1 die Futterraufnahme von Tieren reduziert war und schlossen somit daraus, dass diese verminderte Futterraufnahme während einer Infektion auf die Freisetzung von IL1 im Körper zurückzuführen ist. In einem weiteren Versuchsmodell an Ratten konnten BREUILLE et al. (1999) nach intravenöser Verabreichung von *E. coli*-Erregern zudem eine signifikante Korrelation zwischen der TNF- $\alpha$  Konzentration im Blutplasma und Körpergewichtsverlust feststellen. Diese proinflammatorischen Zytokine sind zudem an der Entstehung von Lungenläsionen und der BAL-Hyperplasie in den Atemwegen von Schweinen mitverantwortlich (RODRIGUEZ et al., 2004) und spielen eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Regulierung von Entzündungsreaktionen der *M. hyopneumoniae*-Infektion (CHOI et al., 2006).

In der vorliegenden Studie war der Anteil untergewichtiger Tiere zum Ende der Mastperiode in der alleinig geimpften Gruppe Mhyo signifikant niedriger, als in der ungeimpften Gruppe Eco. Hingegen wurden keine signifikanten Unterschiede unter den *M. hyopneumoniae*-geimpften Gruppen ermittelt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die fehlende *M. hyopneumoniae*-Impfung einen negativen Einfluss auf das gleichmäßige Wachstum der Tiere nimmt.

## 5. Lungenbefunde am Schlachthof

Um EP-ähnliche Lungenläsionen am Schlachthof zu erfassen und zu bewerten, wurde ein Lungenscore nach CHRISTENSEN et al. (1999) durchgeführt, welcher den prozentualen Anteil des veränderten Lungengewebes gemessen an der Gesamtlungenoberfläche wiedergibt.

In der vorliegenden Studie zeigten einmalig in der ersten Lebenswoche gegen *M. hyopneumoniae*-geimpfte Versuchsgruppen (Gruppe Mhyo und Gruppe Eco/Mhyo) tendenziell bessere Ergebnisse bezüglich ihres mittleren Lungenscores als die *M. hyopneumoniae*-ungeimpfte Gruppe Eco, wenngleich keine signifikanten Unterschiede unter den Gruppen ermittelt werden konnten. Die niedrigsten Lungenscorewerte nach CHRISTENSEN et al. (1999) erzielte hierbei die Gruppe Mhyo mit einem Wert von 5,7, verglichen mit der Gruppe Eco/Mhyo mit einem Wert von 6,8 und der Gruppe Eco mit einem Wert von 7,7. Betrachtet man nur den Anteil an Tieren mit veränderten Lungen (Lungenscore > 0), so ergibt sich für die Gruppe Mhyo ein durchschnittlicher Lungenscore von 8,2, für die Gruppe Eco/Mhyo von 8,4 und für die Gruppe Eco von 10,2. Nach Kategorisierung der Lungenbefunde hatten prozentual mehr Tiere aus den *M. hyopneumoniae*-geimpften Gruppen niedrige Lungenscores (Lungenscore  $0 \leq 5$ ) als die Kontrollgruppe Eco. Hingegen hatten mehr Tiere aus der Kontrollgruppe Eco schwerwiegende Lungenveränderungen und wurden der Kategorie 5 (Lungenscore > 30) zugeordnet. In zahlreichen experimentellen sowie Feldstudien wurde die Wirksamkeit von *M. hyopneumoniae*-Vakzinen hinsichtlich ihrer positiven Auswirkung auf die Lungengesundheit von Schweinen getestet, wobei mittels Vakzination sowohl der mittlere Prozentsatz an Lungenläsionen als auch der Prozentsatz an Tieren mit Lungenveränderungen reduziert wurde (MAES et al., 1998; OKADA et al., 2000; REYNOLDS et al., 2009; WILSON et al., 2012). Ähnliche Ergebnisse erzielten WILSON et al. (2012) in einer Feldstudie, wonach hinsichtlich der Lungengesundheit geimpfte Tiere durchschnittlich 5 % und ungeimpfte Tiere im Mittel 9 % Veränderungen aufwiesen. Nach Kategorisierung der Lungenbefunde befanden sich im Bereich von 0 - 5 % Lungenveränderungen 52,3 % der Tiere aus der Vakzinegruppe und lediglich 36,5 % der Tiere aus der Placebogruppe, wohingegen sich in der Kategorie von > 30 %

Lungenveränderungen 3,6 % der Tiere aus der Vakzine- und 8,7 % aus der Placebogruppe befanden (WILSON et al., 2012). SIUGZDAITE et al. (2003) verglichen in einer Studie die Lungenläsionen *M. hyopneumoniae*-vakzinierter Tiere mit ungeimpften Kontrolltieren und kamen zu dem Ergebnis, dass bei geimpften Tieren durchschnittlich 3,27 % der Lungenoberfläche verändert waren, hingegen bei ungeimpften Tieren 9,04 % der Lungenoberfläche betroffen waren. PIETERS et al. (2010) mutmaßten darüber hinaus, dass aufgrund einer *M. hyopneumoniae*-Impfung entzündliche Prozesse in der Lunge nach kürzlich erfolgter Infektion zwar verschärft werden, jedoch schneller ausheilen, als bei ungeimpften Tieren. So könnten am Schlachthof niedrigere Lungenscores bei geimpften Tieren erwartet werden, wenn davon ausgegangen wird, dass die *M. hyopneumoniae*-Infektion bereits früh in der Aufzucht stattgefunden hat.

Allerdings verringert sich durch eine Impfung gegen *M. hyopneumoniae* die Übertragung des Erregers nicht signifikant (MEYNS et al., 2006; VILLARREAL et al., 2012), so dass FABLET et al. (2012) keinen positiven Effekt der Vakzination auf die Lungengesundheit von Schweinen am Schlachthof beobachten konnten. In der vorliegenden Studie war es möglich die Erreger sowohl bei *M. hyopneumoniae*-ungeimpften Tieren (n=5) als auch bei *M. hyopneumoniae*-geimpften Tieren (n=10) mittels Immunhistochemie darzustellen. CHARLEBOIS et al. (2014) beobachteten zudem, dass die Homologie zwischen Feld- und Impfstämmen oft weniger als 55 % betrug. Eine Vakzination kann, abhängig von der Virulenz des zirkulierenden *M. hyopneumoniae*-Stammes, unterschiedlich protektiv wirken, was sich auf die Klinik und die induzierten Lungenveränderungen im Schwein auswirkt (VILLARREAL et al., 2011b).

Unter Verwendung eines kombinierten Impfschemas konnten THACKER et al. (2000a) zeigen, dass eine zusätzlich zur *M. hyopneumoniae*-Vakzination (1. und 5. Lebenswoche) durchgeführte Impfung gegen PRRSV (4. Lebenswoche) zu einer Reduktion der Effektivität der *M. hyopneumoniae*-Vakzine führen kann. Jedoch wurde dieser negative Effekt in einer Studie von STRICKER et al. (2013), in der die Applikation einer PRRSV-(Genotyp 1)-Vakzine (3. Lebenswoche) und einer *M. hyopneumoniae*-Vakzine (1. und 3. Lebenswoche) als Mischspritze

sowie als gleichzeitige Verabreichung an unterschiedlichen Injektionsstellen verglichen wurde, nicht beobachtet. Sowohl simultan als auch gleichzeitig geimpfte Gruppen wiesen im Vergleich zur alleinig PRRSV-geimpften Gruppe signifikant niedrigere Lungenscores auf (STRICKER et al., 2013). Darüber hinaus konnten simultan geimpfte Schweine zudem signifikant niedrigere Lungenscores als die Placebogruppe erzielen (STRICKER et al., 2013). Bei gleichzeitiger Verabreichung einer *M. hyopneumoniae*-Vakzine in Kombination mit einer PCV2-Vakzine wurde in einer Erhebung von KIM et al. (2011) eine signifikante Reduzierung makroskopischer Lungenveränderungen im Vergleich zu ungeimpften Tieren beobachtet.

Das Ausmaß der Lungenveränderungen ähnelte sich in der vorliegenden Studie bei gegen *M. hyopneumoniae*-geimpften Tieren. *M. hyopneumoniae* geimpfte Tiere erzielten numerisch niedrigere Lungenscore-Werte, als *M. hyopneumoniae*-ungeimpfte Schweine. Jedoch traten hohe Standardabweichungen von 10,5 - 13,5 auf, was ein Grund dafür sein kann, dass keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe erzielt werden konnten.

## **6. Mortalität und Behandlung von respiratorischen Erkrankungen**

Im Verlauf der Studie verstarben insgesamt 32 Tiere. Diese verendeten oder wurden aus tierschutzrechtlichen Gründen euthanasiert. Daraus ergab sich eine Mortalität von 7,7 %. An den verendeten Tieren wurde eine pathomorphologische sowie histopathologische Untersuchung vorgenommen. Im Detail verstarben in der *M. hyopneumoniae*-ungeimpften Gruppe Eco 17 Tiere, wohingegen in Gruppe Eco/Mhyo sieben und in Gruppe Mhyo acht Tierverluste auftraten. Ein Großteil der in die Pathologie eingesandten Tiere hatte pathologische Lungenveränderungen (n = 17).

Während der Studie wurden 27 Tiere aufgrund respiratorischer Probleme medikamentös behandelt. Unter den Versuchstieren ergaben sich keine signifikanten Unterschiede: 13 Tiere (9,6 %) aus der Gruppe Eco, acht Tiere (5,9 %) aus der Gruppe Eco/Mhyo und sechs Tiere (4,4 %) aus der Gruppe

Mhyo wurden therapiert. Die Behandlungen wurden größtenteils vom Landwirt durchgeführt. Dieser war für eine korrekte Aufzeichnung der Behandlungen verantwortlich.

Der numerische Unterschied zwischen den Versuchsgruppen kann auf einen fehlenden Impfschutz der Gruppe Eco gegenüber *M. hyopneumoniae* zurückgeführt werden. Somit waren Schweine der Gruppe Eco eher der Gefahr von Sekundärinfektionen ausgesetzt als geimpfte Tiere. Nach erfolgreicher Ansiedlung von *M. hyopneumoniae* im Atemtrakt betroffener Schweine kommt es zu einer Beeinträchtigung der Mukoziliären Clearance, welche dazu führt, dass Zelldebris und eindringende Pathogene, insbesondere Bakterien, nicht mehr ausreichend aus den Atemwegen abtransportiert und abgehalten werden können (THACKER und MINION, 2012). Solche Erreger können zum Beispiel *P. multocida*, *S. suis*, *H. parasuis* oder *A. pleuropneumoniae* sein, welche in der Lage sind den Krankheitsverlauf erheblich zu verschlimmern, so dass die Mortalitätsrate ansteigt (SELBITZ, 2011a; THACKER und MINION, 2012). Übereinstimmend wurde in neun von 15 Sektionen aus der Gruppe Eco ein pathologischer Lungenbefund erhoben. Betroffene Tiere litten teils an katarrhalisch-eitriger Bronchopneumonie mit Beteiligung bakterieller Sekundärerreger wie *P. multocida*, *S. suis* und *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*) oder an virusinduzierten interstitiellen Pneumonien mit Nachweis von Virusgenom, wie etwa von PRRS-Viren, sowohl von Genotyp 1 als auch Genotyp 2, oder Influenzaviren. THACKER et al. (1999) zeigten zudem, dass eine *M. hyopneumoniae*-Infektion den klinischen Verlauf einer durch PRRSV-induzierten Virus Pneumonie verschärft, sowie ausgeprägtere makroskopische und mikroskopische Lungenläsionen verursacht. Im vorliegenden Studienbetrieb waren zwar alle Schweine gegen PRRSV (Genotyp 2) geimpft, jedoch konnte aus verendeten Tieren Virusgenom von PRRS-Viren, sowohl vom Genotyp 1 als auch vom Genotyp 2 isoliert werden.

Auch in den gegen *M. hyopneumoniae*-geimpften Versuchsgruppen wurden bei verendeten Tieren Bronchopneumonien mit Beteiligung von bakteriellen Sekundärerregern sowie PRRSV und Influenza nachgewiesen. Diese traten jedoch in geringerem Maße auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die *M. hyopneumoniae*-Impfung vermehrt dazu geführt hat, bei einem Großteil

der Tiere das Ausmaß und das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung zu reduzieren. Auch bewirkten FABLET et al. (2012) mittels einer Vakzination gegen *M. hyopneumoniae* keine positiven Effekte auf die Lungengesundheit. Dies beruht auf der Tatsache, dass durch eine Vakzination keine Erregerelimination im Respirationstrakt von Schweinen erzielt wird (LE GRAND und KOBISCH, 1996; MAES et al., 1999b; PIETERS et al., 2010; VILLARREAL et al., 2011a) und die Übertragung von *M. hyopneumoniae* mittels Impfung nicht signifikant reduziert werden kann (MEYNS et al., 2006; VILLARREAL et al., 2011a).

Unter experimentellen Bedingungen konnten PARK et al. (2014) zeigen, dass die Verabreichung einer One-Shot *M. hyopneumoniae*-Vakzine in der Lage ist, bei mit *M. hyopneumoniae* und PRRSV infizierten Tieren eine Reduktion der PRRSV-Virämie herbeizuführen und den Grad an durch PRRSV induzierten Lungenveränderungen zu reduzieren. Auch in einer Studie von THACKER et al. (2000a) wurde beobachtet, dass eine *M. hyopneumoniae*-Vakzination zu einer Reduktion, jedoch nicht Eliminierung der Potenzierung der durch eine PRRSV induzierten Pneumonie führt. Es wird zudem beschrieben, dass eine zusätzlich zur *M. hyopneumoniae*-Impfung durchgeführte Vakzinierung gegen PRRSV dazu führen kann, die Effektivität der *M. hyopneumoniae*-Impfung herabzusetzen (THACKER et al., 2000a), was im Folgenden erklären könnte, dass auch bei geimpften Tieren gravierendere Lungenveränderungen zu verzeichnen waren, welche schlussendlich zum Tod der Tiere geführt haben könnten.

Unter Berücksichtigung aller untersuchter Parameter wurde schlussendlich in dieser Studie gezeigt, dass die kombinierte Verabreichung eines Impfstoffes gegen das Stx2e-Toxin und *M. hyopneumoniae* verglichen mit der einzelnen Applikation des *M. hyopneumoniae*-Impfstoffes als sicher und verträglich zu bewerten ist. Durch die zeitgleiche Verabreichung von Stellamune<sup>®</sup> One und ECOPORC SHIGA<sup>®</sup> konnten im Vergleich zur monovalenten *M. hyopneumoniae*-Vakzine keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Effektivität der Vakzinen sowie der Ausbildung einer humoralen Immunantwort gesehen werden.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Überprüfung der Wirksamkeit einer One-Shot Impfung gegen *M. hyopneumoniae* (Stellamune® One, Elanco Animal Health, Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) bei zeitgleicher Applikation einer Vakzine gegen die Ödemkrankheit (ECOPORC SHIGA®, IDT Biologika, Dessau-Rosslau, Deutschland) bei Ferkeln in der ersten Lebenswoche im Rahmen einer Feldstudie. Hierfür wurde ein geschlossener, EDEC-negativer Betrieb in Süddeutschland gewählt, dem nach einem Präscreening ein Infektionsstatus mit *M. hyopneumoniae* anhand IHC und EP-ähnlichen Lungenveränderungen am Schlachthof nachgewiesen werden konnte. Innerhalb von drei Studieneinschlüssen wurden 405 Ferkel abhängig von Geschlecht und Gewicht randomisiert in zwei *M. hyopneumoniae*-Vakzinationsgruppen (Gruppe Mhyo und Eco/Mhyo) und eine Kontrollgruppe (Gruppe Eco) eingeteilt. Anschließend wurden die Versuchsgruppen gemischt aufgestellt. 25 % der Versuchstiere wurden gemäß Randomisierungsplan einer Safety-Group zugeteilt. Diese Tiere wurden vor und nach Applikation der Impfstoffe sowie in den folgenden 14 Tagen klinisch untersucht und die Injektionsstelle wurde beurteilt. Zur Überprüfung der Wirksamkeit der Vakzination wurden die Studientiere an Studientag 0, 24, 80, 136 und 164 gewogen und die durchschnittlichen Tageszunahmen sowie die Lungenscores am Schlachthof wurden erhoben. Bei den Sampletieren wurde vier-wöchentlich der Verlauf der *M. hyopneumoniae*-Antikörper im Serum mittels ELISA untersucht und in der 0., 4., und 8. Lebenswoche wurde ein SNT-Tests zum Nachweis neutralisierender Antikörper gegen Stx2e durchgeführt. Bezüglich der Sicherheit der Verabreichung der/ des Impfstoffe/-s konnten während eines 14-tägigen Überwachungszeitraumes keine Anzeichen für lokale oder systemische Unverträglichkeiten beobachtet werden. Hinsichtlich der Leistungsparameter erzielte die alleinig gegen *M. hyopneumoniae*-geimpfte Gruppe Mhyo in der Mast zwischen Tag 84 und 168 signifikant höhere Tageszunahmen als die *M. hyopneumoniae*-ungeimpfte Gruppe Eco. Die Gruppe Eco/Mhyo unterschied sich nicht signifikant von der Gruppe Mhyo. In der nicht *M. hyopneumoniae*-geimpften Gruppe Eco waren signifikant mehr Tiere

untergewichtig als in der alleinig *M. hyopneumoniae*-geimpften Gruppe. Die Endgewichte der Versuchsgruppen zur 24. Lebenswoche unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Unterschiede bezüglich der Parameter der Gewichtsentwicklung wären damit zu erklären, dass es sich um einen *M. hyopneumoniae* Problembetrieb handelte und nicht um einen Betrieb mit einer Ödemkrankheits Historie. Der am Schlachthof erhobene Lungenscore unterschied sich ebenfalls nicht statistisch signifikant, jedoch hatten *M. hyopneumoniae*-geimpfte Gruppen bessere Lungenscore-Ergebnisse, als die Gruppe Eco. Die Tiere aus der Gruppe Eco wurden numerisch häufiger gegen respiratorische Erkrankungen therapiert. Sowohl die kombiniert als auch alleinig gegen *M. hyopneumoniae*-geimpften Tiere erzielten zu den Blutprobenentnahmetermen in der 8., 12., 16. und 20. Lebenswoche signifikant höhere P/PK-Werte im *M. hyopneumoniae*-ELISA als die *M. hyopneumoniae*-ungeimpften Schweine der Gruppe Eco. Zu keinem Zeitpunkt ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den mit *M. hyopneumoniae*-geimpften Gruppen. Der prozentuale Anteil an seropositiven Tieren in der Gruppe Mhyo war zur 8., 12. und 16. Lebenswoche und in der Gruppe Eco/Mhyo zur 8. Lebenswoche signifikant höher als in der Gruppe Eco. Neutralisierende Antikörper gegen das Stx2e-Toxin von *E. coli* waren vor der Vakzination der Versuchsgruppen bei keinem der Tiere zu detektieren. Nach erfolgter Impfung entwickelten bis zur 4. Lebenswoche aus der Gruppe Eco 85,7 % der Tiere und aus der Gruppe Eco/Mhyo 100 % der Tiere neutralisierende Antikörper gegen das Stx2e-Toxin. Zur 8. Lebenswoche waren in der Gruppe Eco und Eco/Mhyo 96,4 % bzw. 96,9 % der Tiere seropositiv. Zu beiden Terminen war der Anteil an seropositiven Tieren in den mit ECOPORC SHIGA<sup>®</sup>-geimpften Gruppen signifikant höher als in der Gruppe Mhyo. Die Tiere aus der ECOPORC SHIGA<sup>®</sup>-ungeimpften Gruppe Mhyo entwickelten zu keinem Blutprobenentnahmetermin spezifische neutralisierende Antikörper.

Zusammenfassend konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Effektivität zwischen der One-Shot Impfung gegen *M. hyopneumoniae* bei zeitgleicher Applikation einer Vakzine gegen die Ödemkrankheit und der monovalenten *M. hyopneumoniae*-Vakzine bei Ferkeln in der ersten Lebenswoche festgestellt werden.

## VII. SUMMARY

The aim of this study was to examine the efficacy of a one-shot *M. hyopneumoniae* vaccine (Stellamune<sup>®</sup> One, Elanco Animal Health, Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg, Germany) compared to the effect of simultaneous administration of a vaccine against edema disease (ECOPORC SHIGA<sup>®</sup>, IDT Biologika GmbH, Dessau-Rosslau, Germany) in the first week of life under field conditions. A farrow-to-finish farm in southern Germany, negative for EDEC but with a known history of EP, which was confirmed prior to the study by detection of *M. hyopneumoniae* typical gross lesions at the slaughterhouse and by immunohistochemistry of affected lung tissue, was chosen. The study was performed in three consecutive batches. Altogether, 405 suckling-piglets were randomly assigned to one control group (CG, designated as group Eco) and two *M. hyopneumoniae* vaccination groups (group Mhyo and group Eco/Mhyo) according to their bodyweight and gender. All groups were housed in mixed barns. 25 % of the study animals were randomly assigned as sample animals (safety group). Clinical observations and an injection site reaction score were daily recorded from sample animals prior to and for 14 days after vaccination. To evaluate vaccine efficacy each pig was weighed on study day ST0, ST24, ST80 and ST164 and the average daily weight gain (ADWG) was calculated. Furthermore, the percentage of pneumonic lung lesions observed in each lobe was recorded at the slaughterhouse. Blood samples for serology (*M. hyopneumoniae*-ELISA) were collected from the sample animals prior to vaccination and every four weeks subsequently. A SNT-test against Stx2e-neutralizing antibodies was performed in week 0, four, and eight. Within the 14 days following vaccination, no local or systemic incompatibilities could be observed in sample pigs. Concerning the efficacy parameters, group Mhyo achieved significantly higher ADWG between day 84 and 168 compared to the *M. hyopneumoniae*-unvaccinated group. No significant differences were seen between group Eco/Mhyo and group Mhyo. Significantly more underweighting pigs were seen in the *M. hyopneumoniae*-unvaccinated group Eco compared to the single *M. hyopneumoniae*-vaccinated group. At the end of finishing period there was no significant difference concerning the mean body weight (BDW).

The differences in the analysis of the weight parameters could be explained by the fact that the respective farm had cases of *M. hyopneumoniae* but not of edema disease. Furthermore, no significant differences in lung scoring at slaughterhouse were seen between the groups, even though *M. hyopneumoniae*-vaccinated pigs tended to have a better lung health than unvaccinated pigs. Animals of group Eco were treated more often against respiratory diseases ( $p < 0.05$ ). In week four, eight, twelve, 16 and 20 the pigs vaccinated against *M. hyopneumoniae* achieved significant higher mean sample-to-positive (S/P) ratio in *M. hyopneumoniae* ELISA than the unvaccinated group Eco. There were no significant differences between group Mhyo and group Eco/Mhyo at any time point. The percentage of seropositive pigs in group Mhyo was significantly higher in the 8<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> week of life and in group Eco/Mhyo at 8<sup>th</sup> week of life compared to group Eco. Neutralizing antibodies against Stx2e-toxin of *E. coli* were not detectable in any animal before vaccination. Until the 4<sup>th</sup> week of life 85.7 % of group Eco and 100 % of group Eco/Mhyo developed neutralizing antibodies against Stx2e based on vaccination. In 8<sup>th</sup> week of life 96.4 % and 96.9 % of pigs in group Mhyo and Eco/Mhyo, respectively, were seropositive. On both dates the proportion of seropositive pigs in the ECOPORC SHIGA<sup>®</sup> vaccinated groups was significantly higher than in group Mhyo. Pigs of ECOPORC SHIGA<sup>®</sup> unvaccinated group Mhyo did not develop neutralizing antibodies at any time.

In conclusion, no significant differences regarding the efficacy of a simultaneous administration of a *M. hyopneumoniae* vaccine and a vaccine against edema disease compared to a single administration of *M. hyopneumoniae* vaccine could be observed in pigs in the first week of life in the present study.

## VIII. 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.

Amezcuca R, Friendship RM, Dewey CE, Gyles C, Fairbrother JM. Presentation of postweaning *Escherichia coli* diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. *Can J Vet Res* 2002; 66: 73-78.

Andreasen M, Mousing J, Krogsgaard Thomsen L. 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.

Baccaro MR, Hirose F, Umehara O, Goncalves LC, Doto DS, Paixao 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.

Bandrick M, Pieters M, Pijoan C, Molitor TW. Passive transfer of maternal *Mycoplasma hyopneumoniae*-specific cellular immunity to piglets. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 540-543.

Bandrick M, Pieters M, Pijoan C, Baidoo SK, Molitor TW. Effect of cross-fostering on transfer of maternal immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* to piglets. *Vet Rec* 2011; 168: 100.

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.

Bertschinger HU, Eggenberger E, Jucker H, Pfirter HP. Evaluation of low nutrient, high fibre diets for the prevention of porcine *Escherichia coli* enterotoxaemia. *Vet Microbiol* 1979; 3: 281-290.

Bertschinger HU, Nief V, Tschäpe H. Active oral immunization of suckling piglets to prevent colonization after weaning by enterotoxigenic *Escherichia coli* with fimbriae F18. *Vet Microbiol* 2000; 71: 255-267.

Blanchard B, Vena MM, Cavalier A, Lelannic J, 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.

Blanco J, Gonzalez EA, Bernardez I, Regueiro B. Differentiated Biological-Activity of Vero Cytotoxins (Vt) Released by Human and Porcine *Escherichia-Coli* Strains. *FEMS Microbiol Lett* 1983; 20: 167-170.

Bousquet E, Pommier P, Wessel-Robert S, Morvan H, Benoit-Valièrgue 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.

Breuille D, Voisin L, Contrepois M, Arnal M, Rose F, Obled C. A Sustained Rat Model for Studying the Long-Lasting Catabolic State of Sepsis. *Infect Immun* 1999; 67: 1079-1085.

Burgstaller G. Fütterung der Ferkel. In: Praktische Schweinefütterung, 1 edn. Comberg G, ed. Stuttgart: Eugen Ulmer 1981: 161-181.

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.

Charlebois A, Marois-Crehan C, Helie 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. Efficacite d'un vaccin contre *Mycoplasma Hyopneumoniae* utilise dans des elevages infectes en France. *Proceedings of the 25th Journees de la recherche porcine en France*. Paris 1993: 345.

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.

Christensen G, Sørensen V, Mousing J. Diseases of the Respiratory System. In: *Diseases of Swine*, 8 edn. Straw BE, D'Allaire S, Mengelin WL, Taylor DJ, ed.:

Wiley 1999: 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.

Clugston RE, Nielsen NO, Roe WE. Experimental Edema Disease of Swine (*E-Coli* Enterotoxemia). 2. Development of Hypertension after Intravenous Administration of Edema Disease Principle. *Can J Comp Med Vet* 1974a; 38: 29-33.

Clugston RE, Nielsen NO, Smith DLT. Experimental Edema Disease of Swine (*E-Coli* Enterotoxemia). 3. Pathology and Pathogenesis. *Can J Comp Med Vet* 1974b; 38: 34-43.

Cornick NA, Matise I, Samuel JE, Bosworth BT, Moon HW. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: temporal and quantitative relationships among colonization, toxin production, and systemic disease. *J Infect Dis* 2000; 181: 242-251.

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 A, 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.

DeGrandis S, Law H, Brunton J, Gyles C, Lingwood CA. Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *J Biol Chem* 1989; 264: 12520-12525.

Del Pozo Sacristan R, Thiry J, Vranckx K, Lopez Rodriguez 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 Sacristan 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.

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 AA, Thacker EL. Efficacy of combined porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in piglets. Vet Rec 2010; 166: 70-74.

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.

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.

Fablet C, Marois-Crehan C, Simon G, Grasland B, Jestin A, Kobisch M, Madec F, Rose N. Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: A cross-sectional study. Vet Microbiol 2012; 157: 152-163.

Fairbrother JM, Gyles CL. Colibacillosis. In: Diseases of swine, 10 edn. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, ed. West Sussex: John Wiley & Sons 2012: 723-749.

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.

Florian V, Günther D, Lüken C, Langer O, Lüder O, Selbitz H. Construction of recombinant *Escherichia coli* strain for development of a Stx2e subunit vaccine against edema disease. Proceedings of the 22nd International Pig Veterinary Society Congress. Jeju, Korea 2012: 77.

Fort M, Fernandes LT, Nofrarias M, Diaz I, Sibila M, Pujols J, Mateu E, Segales 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, López-Jiménez R, Nofrarias M, Segalés J. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Vet J* 2010; 184: 326-333.

Frydendahl K, Imberechts H, Lehmann S. Automated 5' nuclease assay for

detection of virulence factors in porcine *Escherichia coli*. *Mol Cell Probes* 2001; 15: 151-160.

Frydendahl K. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol* 2002; 85: 169-182.

Gannon VP, Gyles CL, Friendship RW. Characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* from pigs. *Can J Vet Res* 1988; 52: 331-337.

Gannon VPJ, Gyles CL. Characteristics of the Shiga-like toxin produced by *Escherichia coli* associated with porcine edema disease. *Vet Microbiol* 1990; 24: 89-100.

Geiger J, Groth D. *Mycoplasma hyopneumoniae* elimination in a 3800 sow, multi-site system. Proceedings of the 21nd International Pig Veterinary Society Congress. Vancouver, Kanada 2010: 640.

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, 1 edn. Grosse Beilage E, Wendt M, ed. Stuttgart: Eugen Ulmer 2013: 200-270.

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 Ausg G Grosstiere Nutztiere 2003; 30: 264-272.

Heinritzi K. Krankheiten des Verdauungstraktes. In: Schweinekrankheiten, 1 edn. Heinritzi K, Gindele HR, Reiner G, Schnurrbusch U, ed. Stuttgart: Eugen Ulmer 2006a: 147-162.

Heinritzi K, Gindele HR, Reiner G, Schnurrbusch U. Besonderheiten bei der speziellen Untersuchung des Schweines. In: Schweinekrankheiten, 1 edn. Heinritzi K, Gindele HR, Reiner G, Schnurrbusch U, ed. Stuttgart: Eugen Ulmer 2006: 23-27.

Heinritzi K. Pneumonie. In: Schweinekrankheiten, 1 edn. Heinritzi K, Gindele HR, Reiner G, Schnurrbusch U, ed. Stuttgart: Eugen Ulmer 2006b: 137-146.

Hennig-Pauka I, Bremerich S, Nienhoff H, Schroder 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. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 2013; 41: 279-288.

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.

Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand Stat

Theory Appl 1979: 65-70.

Hoppeler H, Kleinert E, Schlegel C, Claassen H, Howald H, Kayar SR, Cerretelli P. Morphological adaptations of human skeletal muscle to chronic hypoxia. *Int J Sports Med* 1990; 11 Suppl 1: 3-9.

Hoppeler H, Desplanches D. Muscle structural modifications in hypoxia. *Int J Sports Med* 1992; 13 Suppl 1: 166-168.

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.

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, Ersboll 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.

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.

Kixmüller M, Ritzmann M, Eddicks M, Saalmüller A, Elbers K, Fachinger V. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 2008; 26: 3443-3451.

Kleiboeker SB, Schommer SK, Lee S-M, Watkins S, Chittick W, Polson D. Simultaneous Detection of North American and European Porcine Reproductive

and Respiratory Syndrome Virus Using Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-PCR. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17: 165-170.

Kobisch M, Friis NF. Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech Oie* 1996; 15: 1569-1605.

Kristensen CS, 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 EC. 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.

Kyriakis SC, Alexopoulos C, Vlemmas J, Sarris K, Lekkas S, Koutsoviti-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. Comparaison de l'utilisation d'un vaccin et d'un traitement antibiotique séquentiel dans un élevage infecté par *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res* 1996; 27: 241-253.

Lee SI, Kang SG, Kang ML, Yoo HS. Development of Multiplex Polymerase Chain Reaction Assays for Detecting Enterotoxigenic *Escherichia Coli* and their Application to Field Isolates from Piglets with Diarrhea. *J Vet Diagn Invest* 2008;

20: 492-496.

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.

Lillie-Jaschniski K, Köchling M, Linder T. Erste Erfahrungen mit dem Einsatz von ECOPORC SHIGA, der neuen Vakzine gegen die Ödemkrankheit – Auswertungen aus Feldversuchen in Deutschland. *Tierarztl Umsch* 2013; 68: 377-382.

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.

Linggood MA, Thompson JM. Verotoxin production among porcine strains of *Escherichia coli* and its association with oedema disease. *J Med Microbiol* 1987; 24: 359-362.

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.

Lüder O, Selbitz H, Florian V, Fricke R, Bastert O, Langer O, Siebenhaar S. Testing of the safety and efficacy of a vaccine containing a genetically modified Stx2e-antigen in laboratory and field studies. *Proceedings of the 22nd International Pig Veterinary Society Congress*. Jeju, Korea 2012: 77.

MacLeod DL, Gyles CL, Wilcock BP. Reproduction of Edema Disease of Swine

with Purified Shiga-like Toxin-II Variant. *Vet Pathol* 1991a; 28: 66-73.

MacLeod DL, Gyles CL, Valdivieso-Garcia A, Clarke RC. Physicochemical and biological properties of purified *Escherichia coli* Shiga-like toxin II variant. *Infect Immun* 1991b; 59: 1300-1306.

MacLeod DL, Gyles CL. Immunization of pigs with a purified Shiga-like toxin II variant toxoid. *Vet Microbiol* 1991; 29: 309-318.

Maes D, Verdonck M, Deluyker H, de Kruif A. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet Q* 1996; 18.

Maes D, Deluyker H, Verdonck M, Castryck F, Miry C, Lein A, Vrijens B, de Kruif A. The effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with a continuous production system. *Zentralbl Veterinarmed B* 1998; 45: 495-505.

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. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 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, Verbeke W, Vicca J, Verdonck M, de Kruif A. Benefit to cost of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds under Belgian market conditions from 1996 to 2000. *Livest Prod Sci* 2003; 83: 85-93.

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.

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.

Marques LRM, Peiris JSM, Cryz SJ, O'Brien AD. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol Immunol* 1987; 44: 33-38.

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, Ardigo P, Ferrari L, Morganti M, De Angelis E, Bonilauri P, Luppi A, Guazzetti S, Caleffi A, Borghetti P. Concurrent vaccinations against PCV2 and PRRSV: study on the specific immunity and clinical protection in naturally infected pigs. *Vet Microbiol* 2013; 162: 558-571.

Mateusen B, Maes D, Hoflack G, Verdonck M, De Kruif A. A Comparative Study of the Preventive Use of Tilmicosin 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.

Matise I, Cornick NA, Samuel JE, Moon HW. Binding of shiga toxin 2e to porcine erythrocytes in vivo and in vitro. *Infect Immun* 2003; 71: 5194-5201.

Maynard C, Fairbrother JM, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC, Brousseau R,

Masson L, Larivière S, Harel J. Antimicrobial Resistance Genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 Isolates Obtained over a 23-Year Period from Pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3214-3221.

McCarthy DO, Kluger MJ, Vander AJ. Suppression of food intake during infection: is interleukin-1 involved? *Am J Clin Nutr* 1985; 42: 1179-1182.

McKelvie J, Morgan JH, Nanjiani IA, Sherington J, Rowan TG, Sunderland SJ. Evaluation of tulathromycin for the treatment of pneumonia following experimental infection of swine with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Ther* 2005; 6: 197-202.

Meens J, Bolotin V, Frank R, Bohmer J, Gerlach GF. Characterization of a highly immunogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoprotein Mhp366 identified by peptide-spot array. *Vet Microbiol* 2010; 142: 293-302.

Meistermann C. Vergleichende Untersuchung zur Effektivität eines Kombinationsimpfstoffes gegen *Haemophilus parasuis* und *Mycoplasma hyopneumoniae* und eines monovalenten Impfstoffes gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* bei Schweinen. Diss. med. vet. 2006. Tierärztliche Hochschule Hannover.

Methiyapun S, Pohlenz JFL, Bertschinger HU. Ultrastructure of the Intestinal Mucosa in Pigs Experimentally Inoculated with an Edema Disease-Producing Strain of *Escherichia coli* (0139:K12:H1). *Vet Pathol* 1984; 21: 516-520.

Mettler S. Untersuchungen zur Wirksamkeit zweier *Mycoplasma hyopneumoniae* Impfstoffe bei verschiedenen Haltungssystemen innerhalb eines Betriebs. 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.

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, Beilage EG, Hewicker-Trautwein M. Immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in piglets. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 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.

Mühlbauer I. Untersuchungen zur Belastung bei der Kastration von Saugferkeln unter CO<sub>2</sub>-Narkose. Diss. med. vet. 2009. Ludwig-Maximilians-Universität. München.

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, Travers P, Walport M. Immunisierung. In: Janeway Immunologie, 7 edn. ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2009a: 922-981.

Murphy K, Travers P, Walport M. Glossar. In: Janeway Immunologie, 7 edn. ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2009b: 1021-1063.

Nagy B, Whipp SC, Imberechts H, Bertschinger HU, DeanNystrom EA, Casey TA, Salajka E. Biological relationship between F18ab and F18ac fimbriae of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs with oedema disease or diarrhoea. *Microb Pathog* 1997; 22: 1-11.

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

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

Nielsen NO, Clugston RE. Comparison of E-Coli Endotoxin Shock and Acute Experimental Edema Disease in Young Pigs. *Ann N Y Acad Sci* 1971; 176: 176-189.

Niewerth U, Frey A, Voss T, Le Bouguenec C, Baljer G, Franke S, Schmidt MA. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 143-149.

Nollet H, Deprez P, Van Driessche E, Muylle E. Protection of just weaned pigs against infection with F18+ *Escherichia coli* by non-immune plasma powder. *Vet Microbiol* 1999; 65: 37-45.

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.

Oanh TKN, Nguyen VK, De Greve H, Goddeeris BM. Protection of Piglets against Edema Disease by Maternal Immunization with Stx2e Toxoid. *Infect Immun* 2012; 80: 469-473.

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.

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.

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

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; 96: 516-522.

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.

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* 2000; 151: 835-840.

Rautiainen E, Virtala AM, Wallgren P, Saloniemi H. Varying effects of infections with *Mycoplasma hyopneumoniae* on the weight gain recorded in three different multisource fattening pig herds. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000; 47: 461-469.

Razin S. Peculiar Properties of Mycoplasmas - the Smallest Self-Replicating Prokaryotes. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 100: 423-431.

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

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.

Rodriguez F, Ramirez 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.

Ruiz AR, Utrera V, Pijoan C. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* sow vaccination on piglet colonization at weaning. *J Swine Health Prod* 2003; 11: 131-135.

Sarradell J, Andrada M, Ramirez AS, Fernandez A, Gomez-Villamandos JC, Jover A, Lorenzo H, Herraiz P, Rodriguez 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.

Segales J, Valero O, Espinal A, Lopez-Soria S, Nofrarias 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. Gattung *Mycoplasma*. In: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 9 edn. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, ed. Stuttgart: Enke 2011a: 319-329.

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

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

Sibila M, Fort M, Nofrarias M, Perez de Rozas A, Galindo-Cardiel I, Mateu E, Segales J. Simultaneous porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-inoculation does not potentiate disease in conventional pigs. *J Comp Pathol* 2012; 147: 285-295.

Sidler X, Grummer B, Kamphues J, Kietzmann M, Rohde J, Weissenböck H, Wendt M, grosse Beilage E. Diagnostik, Prophylaxe, Therapie von Erkrankungen des zentralen und peripheren Nervensystems in Schweinebeständen. In: Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand, 1 edn. grosse Beilage E, Wendt M, ed.: Eugen Ulmer 2013: 397-427.

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 HW, Halls S. The production of oedema disease and diarrhoea in weaned pigs by the oral administration of *Escherichia coli*: factors that influence the course of the experimental disease (Plate III). *J Med Microbiol* 1968; 1: 45-59.

Smith HW, Green P, Parsell Z. Vero Cell Toxins in *Escherichia coli* and Related Bacteria: Transfer by Phage and Conjugation and Toxic Action in Laboratory Animals, Chickens and Pigs. *J Gen Microbiol* 1983; 129: 3121-3137.

Sørensen 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.

Stärk KD, Nicolet J, Frey J. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 543-548.

Steenhard NR, Jungersen G, Kokotovic B, Beshah E, Dawson HD, Urban JF, Jr., Roepstorff A, Thamsborg SM. *Ascaris suum* infection negatively affects the response to a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination and subsequent challenge infection in pigs. *Vaccine* 2009; 27: 5161-5169.

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.

Strauss C. Einfluss der Mutterschutzimpfung gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* auf den Impfschutz der Ferkel. Diss. med. vet. 2007. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Stricker TM, Weissenbacher-Lang C, Ritzmann M, Ladinig A. A study to assess the compatibility of simultaneous use of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (EU-type) vaccine and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine under field conditions. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2013; 126: 189-196.

Strockbine NA, Marques LR, Newland JW, Smith HW, Holmes RK, O'Brien AD. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun* 1986; 53: 135-140.

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, de Castro LA, Driemeier D, de Barcellos DESN.

Caracterização histopatológica e imuno-histoquímica da pneumonia causada pela co-infecção por *Pasteurella multocida* e *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos. *Acta Sci Vet* 2013; 41: 1117.

Thacker EL, Thacker BJ, Boettcher TB, Jayappa H. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *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, Young TF, Halbur PG. Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine* 2000a; 18: 1244-1252.

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* 2000b; 61: 1384-1389.

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, Minion FC. Mycoplasmosis. In: *Diseases of Swine*, 10 edn. Zimmerman J.J. KLA, Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W., ed. West

Sussex: John Wiley & Sons 2012: 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.

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.

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

Vetidata 2011. Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittel Anwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht. Stellamune® One. [www.vetidata.de](http://www.vetidata.de). Accessed 25.2.2015.

Vetidata 2014. Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittel Anwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht. ECOPORC SHIGA®. [www.vetidata.de](http://www.vetidata.de). Accessed 25.02.2015.

Vetidata 2015. Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittel Anwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht. [www.vetidata.de](http://www.vetidata.de). Accessed 16.02.2015.

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, 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.

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, Sacristan Rdel 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.

Waddell TE, Lingwood CA, Gyles CL. Interaction of verotoxin 2e with pig intestine. *Infect Immun* 1996; 64: 1714-1719.

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.

Wendt M, Epe C, Grummer B, Kamphues J, Kietzmann M, Rohde J,

Weissenböck H. Diagnostik, Prophylaxe und Therapie von Erkrankungen des Verdauungstraktes in Schweinebetrieben. In: Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand, 1 edn. Grosse Beilage E, Wendt M, ed. Stuttgart: Eugen Ulmer 2013: 271-349.

Whittlestone P. Immunity to mycoplasmas causing respiratory diseases in man and animals. *Adv Vet Sci Comp Med* 1976; 20: 277-307.

Wieler LH, Ewers C. Gattung Escherichia. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 9 edn. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, ed. Stuttgart: Enke 2011: 187-197.

Wieler LH, Ewers C, Selbitz H-J. Gramnegative fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 9 edn. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, ed. Stuttgart: Enke 2011: 185-246.

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. 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.

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 P. *Mycoplasma* eradication strategies. Proceedings of American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting. Orlando, USA 2007: 367.

Young TF, Thacker EL, Erickson BZ, Ross RF. A tissue culture system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. *Vet Microbiol* 2000; 71: 269-279.

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

Zhang QJ, Young TF, Ross RF. Microtiter Plate Adherence Assay and Receptor Analogs for *Mycoplasma-Hyopneumoniae*. *Infect Immun* 1994; 62: 1616-1622.

Zhao K, Han F, Zou Y, Zhu L, Li C, Xu Y, Zhang C, Tan F, Wang J, Tao S. Rapid detection of porcine circovirus type 2 using a TaqMan-based real-time PCR. *Virology* 2010; 7: 374.

Zielinski GC, Ross RF. Adherence of *Mycoplasma-Hyopneumoniae* to Porcine Ciliated Respiratory-Tract Cells. *Am J Vet Res* 1993; 54: 1262-1269.

Zimmermann W, Odermatt W, Tschudi P. Enzootische Pneumonie (EP): die Teilsanierung EP - reinfizierter Schweinezuchtbetriebe als Alternative zur Totalsanierung. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1989: 179-191.

## IX. ANHANG

### 1. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Durchschnittliche Körperinnentemperatur der Versuchsgruppen im Vergleich</i> .....	53
<i>Abbildung 2: Innere Körpertemperatur der einzelnen Tiere der drei Versuchsgruppen ..... 4-6 h post vaccinationem</i> .....	54
<i>Abbildung 3: Verlauf der mittleren Antikörpertiter der Impfgruppen im Vergleich</i> .....	55
<i>Abbildung 4: Anteil seropositiver Tiere der Vakzinationsgruppen im Vergleich</i> .....	57
<i>Abbildung 5: Vergleich der durchschnittlichen Körpergewichte der Studientiere</i> .....	59
<i>Abbildung 6: Vergleich der durchschnittlichen Tageszunahmen der Versuchsgruppen</i> ...	60
<i>Abbildung 7: Gesamlungenscore der Tiere der Versuchsgruppen im Vergleich</i> .....	62
<i>Abbildung 8: Kategorisierung der Lungenscores im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen</i> .....	63
<i>Abbildung 9: Cox-Regression zum Vergleich der Mortalität unter den Versuchsgruppen</i> .....	65

## 2. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Zusammenfassung der wichtigsten E. coli-Pathovaren und Virulenzfaktoren nach WIELER und EWERS (2011) .....</i>	<i>4</i>
<i>Tabelle 2: Versuchsgruppen .....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 3: Lokale Hautreaktion an der Injektionsstelle .....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 4: Interpretation des M. hyopneumoniae-ELISA .....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 5: Anzahl (%) der Tiere mit klinischen Veränderungen bis 14 Tage post vaccinationem .....</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 6: Anteil seropositiver Tiere im Serum-Neutralisationstest.....</i>	<i>58</i>
<i>Tabelle 7: Vergleich der Mastdauer .....</i>	<i>61</i>
<i>Tabelle 8: Pathomorphologische Befunde während der Studie verendeter Tiere.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabelle 9: Molekularbiologische und histologische Untersuchung von Lungenproben ...</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 10: Versuchsaufbau .....</i>	<i>120</i>
<i>Tabelle 11: p-Werte des Vergleichs der mittleren rektalen Körperinnentemperaturen zwischen den Versuchsgruppen zu verschiedenen Zeitpunkten.....</i>	<i>121</i>
<i>Tabelle 12: p-Werte des Vergleichs des Anteils an M. hyopneumoniae-seropositiven Tieren zwischen den Versuchsgruppen.....</i>	<i>122</i>
<i>Tabelle 13: p-Werte des Vergleichs der mittleren P/PK-Verhältnisse nach Auswertung des M. hyopneumoniae-ELISA zwischen den Versuchsgruppen.....</i>	<i>122</i>
<i>Tabelle 14: p-Werte des Vergleichs der prozentualen Anteile an Stx2e-seropositiven Tieren nach der Auswertung des SNT-Tests zwischen den Versuchsgruppen.....</i>	<i>123</i>
<i>Tabelle 15: p-Werte des Vergleichs der mittleren Körpergewichte zu unterschiedlichen Wiegeterminen zwischen den Versuchsgruppen .....</i>	<i>123</i>
<i>Tabelle 16: p-Werte des Vergleichs der mittleren täglichen Zunahmen der Studientiere zu den unterschiedlichen Zeiträumen zwischen den Versuchsgruppen.....</i>	<i>123</i>
<i>Tabelle 17: p-Werte des Vergleichs der mittleren Mastdauer zwischen den Versuchsgruppen.....</i>	<i>124</i>
<i>Tabelle 18: p-Werte des Vergleichs des Anteils an untergewichtigen Tieren zwischen den Versuchsgruppen.....</i>	<i>124</i>
<i>Tabelle 19: p-Werte des Vergleichs der mittleren gesamt-Lungenscore-Ergebnisse zwischen den Versuchsgruppen .....</i>	<i>124</i>
<i>Tabelle 20: p-Werte des Vergleichs der mittleren Lungenscore-Ergebnisse nur an Pneumonie erkrankter Tiere zwischen den Versuchsgruppen.....</i>	<i>124</i>

---

*Tabelle 21: p-Werte des Vergleichs des Anteils an verendeten Tieren der  
Versuchsgruppen..... 125*

### 3. Tabellen-Anhang

Tabelle 10: Versuchsaufbau

Studientag (ST)	Lebentag (d) Lebenswoche (LW)	Sicherheit (25% der Tiere)		Wirksamkeit (n=405 Tiere)		
		klin. US lokale US	Temp.	Blutproben (25% der Tiere)	Wiegen	Lungen- check
Geburt	d1					
ST0	d4-7	x (vor und 4- 6h p. vac)	x (vor und 4-6h p. vac)	x	x	
ST1	d5	x	x			
ST2	d6	x	x			
ST3	d7	x	x			
ST4	d8		x			
ST5	d9		(x)			
ST6	d10		(x)			
ST7	d11	x	(x)			
ST8	d12		(x)			
ST9	d13		(x)			
ST10	d14		(x)			
ST11	d15		(x)			

ST12	d16		(x)			
ST13	d17		(x)			
ST14	d18	x	(x)			
ST24	4. LW (Absetzen)			x (alle Tiere)	x	
ST52	8. LW			x (alle Tiere)		
ST80	12. LW			x	x	
ST108	16. LW			x		
ST136	20. LW			x		
ST164	24. LW Beginn Schlachtung			x	x	

**Tabelle 11: p-Werte des Vergleichs der mittleren rektalen Körpertemperaturen zwischen den Versuchsgruppen zu verschiedenen Zeitpunkten**

Gruppenvergleich	Studientag					
	-0	0	1	2	3	4
Eco - Mhyo	0,244	<b>0,006</b>	0,785	0,771	0,059	0,630
Eco - Eco/Mhyo	0,943	<b>&lt; 0,001</b>	0,613	0,717	0,362	0,7360
Eco/Mhyo - Mhyo	0,237	0,101	0,809	0,467	0,360	0,967

Nach Bonferroni-Holm Adjustierung signifikante Werte sind fett markiert.

**Tabelle 12: p-Werte des Vergleichs des Anteils an *M. hyopneumoniae*-seropositiven Tieren zwischen den Versuchsgruppen**

Gruppenvergleich	Lebenswoche						
	0	4	8	12	16	20	24
Eco - Mhyo	0,617	0,735	<b>0,005</b>	<b>0,013</b>	<b>0,002</b>	0,120	0,476
Eco - Eco/Mhyo	0,805	1,000	<b>0,024</b>	0,042	0,041	0,123	0,613
Eco/Mhyo - Mhyo	0,806	0,733	0,764	0,801	0,422	1,000	0,114

Nach Bonferroni-Holm Adjustierung signifikante Werte sind fett markiert.

**Tabelle 13: p-Werte des Vergleichs der mittleren P/PK-Verhältnisse nach Auswertung des *M. hyopneumoniae*-ELISA zwischen den Versuchsgruppen**

Gruppenvergleich	Lebenswoche						
	0	4	8	12	16	20	24
Eco - Mhyo	0,545	0,019	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,001</b>	0,044
Eco - Eco/Mhyo	0,850	0,074	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,005</b>	<b>0,024</b>	0,531
Eco/Mhyo - Mhyo	0,609	0,573	0,108	0,504	0,393	0,217	0,196

Nach Bonferroni-Holm Adjustierung signifikante Werte sind fett markiert.

**Tabelle 14: p-Werte des Vergleichs der prozentualen Anteile an Stx2e-seropositiven Tieren nach der Auswertung des SNT-Tests zwischen den Versuchsgruppen**

Gruppenvergleich	Lebenswoche		
	0	4	8
Eco - Mhyo	k.A.	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>
Eco - Eco/Mhyo	k.A.	0,042	1,000
Eco/Mhyo - Mhyo	k.A.	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>

Nach Bonferroni-Holm Adjustierung signifikante Werte sind fett markiert.

**Tabelle 15: p-Werte des Vergleichs der mittleren Körpergewichte zu unterschiedlichen Wiegeterminen zwischen den Versuchsgruppen**

Gruppenvergleich	Lebenswoche			
	0	4	12	24
Eco - Mhyo	0,845	0,658	0,633	0,118
Eco/Mhyo - Mhyo	0,706	0,419	0,707	0,757

**Tabelle 16: p-Werte des Vergleichs der mittleren täglichen Zunahmen der Studientiere zu den unterschiedlichen Zeiträumen zwischen den Versuchsgruppen**

Gruppenvergleich	Zeitraum			
	T0-4	T4-12	T12-24	T0-24
Eco - Mhyo	0,549	0,682	<b>0,024</b>	0,118
Eco/Mhyo - Mhyo	0,467	0,849	0,826	0,757

Nach Bonferroni-Holm Adjustierung signifikante Werte sind fett markiert.

**Tabelle 17: p-Werte des Vergleichs der mittleren Mastdauer zwischen den Versuchsgruppen**

Gruppenvergleich	Mastdauer
Eco - Mhyo	0,438
Eco/Mhyo - Mhyo	0,762

**Tabelle 18: p-Werte des Vergleichs des Anteils an untergewichtigen Tieren zwischen den Versuchsgruppen**

Gruppenvergleich	Zeitraum T12-24
Eco - Mhyo	<b>0,016</b>
Eco/Mhyo - Mhyo	0,447

Nach Bonferroni-Holm Adjustierung signifikante Werte sind fett markiert.

**Tabelle 19: p-Werte des Vergleichs der mittleren gesamt-Lungenscore-Ergebnisse zwischen den Versuchsgruppen**

Gruppenvergleich	Lungenscore
Eco - Mhyo	0,069
Eco/Mhyo - Mhyo	0,082

**Tabelle 20: p-Werte des Vergleichs der mittleren Lungenscore-Ergebnisse nur an Pneumonie erkrankter Tiere zwischen den Versuchsgruppen**

Gruppenvergleich	Lungenscore
Eco - Mhyo	0,110
Eco/Mhyo - Mhyo	0,843

**Tabelle 21: p-Werte des Vergleichs des Anteils an verendeten Tieren der Versuchsgruppen**

Gruppenvergleich	Während der Studie verendet
Eco - Mhyo	0,026
Eco/Mhyo - Mhyo	0,500

## X. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle 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. Sie waren mir jederzeit ein ausgezeichneter Doktorvater.

Ebenfalls bedanke ich mich herzlich bei meinen Betreuerinnen Dr. Susanne Zöls und Dr. Nicole Übel für die stetige Unterstützung, die Inspirationen und Korrekturen. Zudem gilt ein großes Dankeschön Dr. Julia Stadler und Dr. Matthias Eddicks für die Beantwortung aller fachlichen Fragen und euren umfassenden Rat sowie Herrn Dr. Reese für die wertvolle statistische Beratung.

Bei allen Mitarbeitern der Klinik für Schweine, auch den bereits ausgeschiedenen, bedanke ich mich für die Mithilfe bei der Studie und die stetige Unterstützung bei jeglichen Belangen. Mein besonderer Dank gilt hierbei Marie Isernhagen für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Wiege- und Schlachthofterminen sowie den besten Mitdoktoranden für das wunderbar freundschaftliche und familiäre Arbeitsklima. Wir hatten zusammen jede Menge Spaß und ich hoffe stets, dass wir immer eine so tolle Gemeinschaft bleiben werden.

Sehr dankbar bin ich der Familie Keil und deren Mitarbeitern am Hof des Studienbetriebes, ohne Sie wäre die Durchführung meiner Studie nicht möglich gewesen.

Ebenfalls möchte ich mich namentlich bei Dr. Kathrin Lillie-Jaschniski und der IDT Biologika GmbH für die Unterstützung bei der Studie, die wertvollen Diskussionsbeiträge sowie die Auswertung des SNT-Tests bedanken.

Herzlichen Dank auch an meine Freundin Johanna Dietsche für die Unterstützung in stressigen Zeiten sowie ihre Geduld und Rücksichtnahme!

Und nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mich stets in Schul-, Studiums- und Promotionszeiten uneingeschränkt unterstützten sowie meiner Schwester Alisa und meinen Bruder Dominik. Danke für eure bedingungslose Unterstützung und dafür, dass ihr mir immer die Sicherheit vermittelt, dass ich mich auf euch verlassen kann!